



**CECÍLIA ALEIXO SERPA**

**METABOLISMO DE LIPÍDEOS, SACAROSE E  
ANTIOXIDANTE DURANTE A GERMINAÇÃO E  
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE  
SERINGUEIRA (*Hevea spp*)**

**LAVRAS - MG  
2025**

**CECÍLIA ALEIXO SERPA**

**METABOLISMO DE LIPÍDEOS, SACAROSE E ANTIOXIDANTE DURANTE A  
GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE  
SERINGUEIRA (*Hevea spp*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

**Orientador**

**LAVRAS – MG**

**2025**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Serpa, Cecilia Aleixo.

Metabolismo de Lipídeos, Sacarose e Antioxidantes durante a  
germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de Seringueira  
(*Hevea spp*) / Cecilia Aleixo Serpa. - 2018.

64 p. : il.

Orientador(a): Luiz Edson Mota de Oliveira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. *Hevea spp*. 2. invertases. 3. sistema antioxidante. I. Oliveira,  
Luiz Edson Mota de. II. Título.

**CECÍLIA ALEIXO SERPA**

**METABOLISMO DE LIPÍDEOS, SACAROSE E ANTIOXIDANTE DURANTE A  
GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE  
SERINGUEIRA (*Hevea spp*)**

**METABOLISM OF LIPID, SUCROSE AND ANTIOXIDANT DURING THE  
GERMINATION AND INITIAL DEVELOPMENT OF MANY SEEDLINGS  
(*Hevea spp*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre

Aprovada em 20 de março de 2018.

Prof. Dr. Nelson Delú Filho – UNIS

Dra. Débora de Oliveira Prudente - UFLA

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

**Orientador**

**LAVRAS – MG**

**2025**

Aos meus pais:

Margarete Aparecida Aleixo Serpa e Olavo Luís Aguilar Serpa, pelo esforço para propiciar-me o melhor conforto possível, pelo exemplo de vida, de amor, responsabilidade, e por indiscriminadamente sempre estarem ao meu lado.

Aos meus irmãos Mariana Aleixo Serpa e Murilo Aleixo Serpa, por sempre serem apoio, incentivo e acolhida.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por manter forte a minha fé e perseverança.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), e em especial ao Departamento de Biologia (DBI), Setor de Fisiologia Vegetal pela oportunidade concedida.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira, por confiar em mim, por todo carinho, dedicação, paciência, companheirismo e amizade durante todos esses anos, com o qual eu aprendi um mundo sobre bioquímica e fisiologia de plantas.

Ao Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães por todo apoio e prontidão em me auxiliar nas análises realizadas e pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Nelson Delú Filho, por ter aceito o convite para participar da banca examinadora.

À pesquisadora Dra. Débora Prudente, pela amizade, ajuda, e por ter aceito o convite para participar da banca examinadora.

À pesquisadora Heloísa Oliveira, pela ajuda nas análises, por ser exemplo de dedicação e amor no que faz.

A todos os meus colegas de Pós-graduação, e em especial, Bárbara Amâncio, Jacqueline Oliveira, Joyce, Farley, Manoel, Mário e Cássio, pelo apoio e palavras amigas.

Aos alunos de iniciação científica Thaiara, Victor, Guilherme e em especial ao Caique pela imensa ajuda.

À amiga Nathália Mattos pela troca de ideias, amizade e companheirismo durante o trabalho.

À minha querida Avó Anna, minhas madrinhas Nélvia e Sílvia, e a tia Valderis, por me apoiarem e me ajudarem nos momentos em que mais precisei.

A todos da minha família que sempre me incentivaram nessa caminhada e que estiveram ao meu lado.

A todos que de alguma forma se fizeram presentes.

Muito obrigada!

*“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”. (George B. Shaw)*

## RESUMO

A seringueira (*Hevea spp*) é conhecida como uma espécie potencial produtora de látex. Pouca atenção é voltada para suas sementes, já que podem ser utilizadas na produção de porta-enxertos para implementação de novos seringueis e biocombustível, e apreciada para consumo humano em formas de farinhas, suplementos, cosméticos. Objetivou-se avaliar o comportamento de algumas enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos, sacarose e antioxidantes com o intuito de ampliar o conhecimento sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de seringueira. As sementes utilizadas foram coletadas de árvores de pé-franco. Foram avaliados os seguintes estádios de desenvolvimento: semente quiescente (SQ) – logo após a deiscência; —ponto branco (PB) – 9 dias após a semeadura (DAS); —pata de aranha (PA) – 13 DAS; —palitot (PAL) – 18 DAS e iniciação foliar (IF) – 25 DAS. Foram coletadas 100 sementes e/ou plântulas em cada estágio e realizadas as seguintes avaliações: teor de água, matéria seca, teor de lipídeos e análise histológica dos corpos lipídicos presentes no endosperma. As enzimas analisadas foram: invertase ácida do vacúolo (IAV), invertase ácida da parede (IAP), invertase neutra do citosol (INC), nos tecidos de eixo embrionário, cotilédone, endosperma, amêndoa, raiz e parte aérea. Também foram analisadas as enzimas: isocitrato liase (ICL), lipoxigenase (LOX), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) e superóxido dismutase (SOD), por eletroforese em cotilédone, endosperma, amêndoa, raiz e parte aérea. A análise de expressão foi realizada através do software ImageJ<sup>®</sup>. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se o software SISVAR com a análise de variância feita com base na comparação de médias, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. O teor mais elevado de lipídeos e matéria seca foi evidenciado em SQ, esse comportamento justifica-se, pois esse é quantitativamente o principal composto de reserva da semente. A matéria seca do endosperma foi expressivamente consumida durante a germinação enquanto o eixo embrionário e cotilédones cresciam. A máxima degradação de lipídeos e da síntese de sacarose ocorre no endosperma em PB. A atividade de IAV foi mais acentuada em tecidos maduros. Já a atividade de IAP foi mais alta em tecidos em desenvolvimento pois essa enzima é característica de zonas de crescimento ativo. A atividade de INC é relativamente inferior as invertases ácidas, pois é uma enzima expressa em tecidos visando a manutenção dos carboidratos. Outra constatação importante está na presença das invertases em SQ, sugerindo que essas enzimas sejam pré-existentes, pois são importantes durante o desenvolvimento das sementes. A expressão da ICL em SQ pode ser proveniente do processo de formação das sementes. Por outro lado, a presença de LOX salienta as condições de estresse que os tecidos podem ter passado durante a germinação. A elevada atividade da CAT e GPX em SQ sugerem que essas enzimas são oriundas do processo de formação da semente e a atividade da SOD foi superior as da CAT e GPX pois ela é a primeira barreira de desintoxicação celular. O aumento da atividade de SOD no decorrer do processo germinativo denota a boa hidratação desses tecidos, reduzindo a formação de espécies reativas de oxigênio.

**Palavras-chave:** *Hevea spp*. Invertases. Sistema Antioxidante. Triacilgliceróis.

## ABSTRACT

The rubber tree (*Hevea spp*) is known as a potential species of latex. Little attention is focused on their seeds, since they can be used in the production of rootstocks for the implementation of new seringals and biofuel, in addition to being appreciated for human consumption in flours, supplements, cosmetics. The objective of this study was to evaluate the behavior of some enzymes involved in the metabolism of lipids, sucrose and antioxidants in order to increase knowledge about germinative aspects and initial development of rubber tree seedlings. The seeds used were collected from standing trees. The following stages of development were evaluated: quiescent seed (SQ) - shortly after dehiscence; "White point" (PB) - 9 days after sowing (DAS); "Spider's paw" (PA) - 13 DAS; "Palito" (PAL) - 18 DAS and leaf initiation (IF) - 25 DAS. 100 seeds and / or seedlings were collected at each stage and the following evaluations were performed: water content, dry matter, lipid content and histological analysis of the lipid bodies present in the endosperm. The enzymes analyzed were: acid invertase of the vacuole (IAV), acid wall invertase (IAP), cytosol neutral invertase (INC), embryonic axis, cotyledon, endosperm, almond, root and shoot. The enzymes: isocitrate lyase (ICL), lipoxygenase (LOX), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD) were also analyzed by electrophoresis technique in cotyledon, endosperm, almond, root and shoot. Expression analysis was performed using ImageJ® software. The experimental design was completely randomized using the SISVAR software with analysis of variance based on the comparison of means by the Scott-Knott test, with a 5% probability. The highest content of lipids and dry matter was evidenced in SQ, this behavior is justified, since this is quantitatively the main reserve compound of the seed. Dry matter of the endosperm was significantly consumed during germination while the embryonic axis and cotyledons grew. The maximum degradation of lipids and sucrose synthesis occurs in the endosperm in PB. IAV activity was more pronounced in mature tissues. The activity of IPA was higher in developing tissues because this enzyme is characteristic of active growth zones. The activity of INC is relatively lower than acidic invertases, since it is an enzyme expressed in tissues aiming at the maintenance of carbohydrates. Another important finding is the presence of invertases in SQ, suggesting that these enzymes are pre-existing, since they are important during seed development. The expression of ICL in SQ can be derived from the seed formation process. On the other hand, the presence of LOX stresses the stress conditions that the tissues may have passed during germination. The high activity of CAT and GPX in SQ suggest that these enzymes come from the seed formation process and the SOD activity was superior to those of CAT and GPX as it is the first cell detoxification barrier. The increase in SOD activity during the germination process indicates the good hydration of these tissues, reducing the formation of reactive oxygen species.

**Keywords:** *Hevea spp*. Invertases. Antioxidant System. Triacylglycerols.



## INDICADORES DE IMPACTOS

A pesquisa analisou o metabolismo de lipídeos, sacarose e antioxidantes durante a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de seringueira (*Hevea spp.*), trazendo avanços significativos para a compreensão do aproveitamento de reservas energéticas e do sistema antioxidante em sementes recalcitrantes. Os resultados indicaram que a mobilização de lipídeos e matéria seca ocorre de forma progressiva, garantindo substratos energéticos essenciais para o desenvolvimento embrionário, sendo que a máxima degradação dessas reservas foi observada na raiz aos 13 dias após a semeadura. As invertases desempenharam papel fundamental na disponibilização de carboidratos, destacando a importância da invertase ácida da parede celular em tecidos em crescimento e da invertase neutra na manutenção metabólica. A atuação da isocitrato liase no ciclo do glioxilato foi decisiva para a conversão de lipídeos em carboidratos, um fator crucial para a viabilidade das plântulas. A presença da lipoxigenase indicou estresse oxidativo durante a germinação, sendo que as enzimas antioxidantes catalase e glutatona peroxidase já estavam ativas na semente antes da germinação, protegendo a estrutura celular contra danos oxidativos. A pesquisa apresenta impacto acadêmico ao contribuir para o aprofundamento do conhecimento sobre o metabolismo de sementes recalcitrantes, sendo relevante para estudantes, pesquisadores e instituições que atuam na área de fisiologia vegetal e biotecnologia. Além disso, ao fornecer subsídios para a conservação e o armazenamento dessas sementes, auxilia bancos de germoplasma e instituições voltadas à preservação da biodiversidade, com reflexos diretos na educação científica e na formação de profissionais qualificados para atuar na área ambiental. A seringueira, sendo uma cultura estratégica para o setor agrícola e industrial, tem potencial para beneficiar viveiristas e produtores rurais, além de contribuir para a produção sustentável de borracha natural, biocombustíveis e produtos agroindustriais. O estudo, ao abordar aspectos essenciais do metabolismo vegetal e sua aplicação na sustentabilidade da produção agrícola, alinha-se a iniciativas voltadas ao aprimoramento da capacitação técnica e científica, promovendo impactos na educação e na difusão do conhecimento dentro e fora do meio acadêmico. Dessa forma, a pesquisa representa uma contribuição relevante para a ciência, a sustentabilidade e o desenvolvimento de estratégias de manejo mais eficientes e ambientalmente responsáveis.

## IMPACT INDICATORS

The research analyzed the metabolism of lipids, sucrose, and antioxidants during the germination and early development of rubber tree (*Hevea spp.*) seedlings, making significant advancements in understanding the utilization of energy reserves and the antioxidant system in recalcitrant seeds. The results indicated that the mobilization of lipids and dry matter occurs progressively, providing essential energy substrates for embryonic development, with maximum degradation of these reserves observed in the root at 13 days after sowing. Invertases played a key role in the availability of carbohydrates, highlighting the importance of the cell wall acid invertase in growing tissues and the neutral invertase in metabolic maintenance. The involvement of isocitrate lyase in the glyoxylate cycle was crucial for the conversion of lipids into carbohydrates, an essential factor for seedling viability. The presence of lipoxygenase indicated oxidative stress during germination, with antioxidant enzymes catalase and glutathione peroxidase already active in the seed before germination, protecting the cellular structure from oxidative damage. The research has academic impact by contributing to a deeper understanding of the metabolism of recalcitrant seeds, being relevant for students, researchers, and institutions involved in plant physiology and biotechnology. Additionally, by providing insights into the conservation and storage of these seeds, it supports germplasm banks and institutions focused on biodiversity preservation, with direct effects on scientific education and the training of professionals in the environmental field. As a strategic crop for the agricultural and industrial sectors, the rubber tree has the potential to benefit nurserymen and farmers, in addition to contributing to the sustainable production of natural rubber, biofuels, and agro-industrial products. The study, by addressing essential aspects of plant metabolism and its application to the sustainability of agricultural production, aligns with initiatives aimed at improving technical and scientific training, promoting impacts on education and knowledge dissemination both within and outside the academic community. Therefore, the research represents a significant contribution to science, sustainability, and the development of more efficient and environmentally responsible management strategies.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fotografia da semente de seringueira após a deiscência (SERPA, 2018) 20
- Figura 2** - Fotografias de sementes de seringueira. Amêndoas da semente de seringueira (A); Amêndoa da semente de seringueira cortada longitudinalmente, discriminando o cotilédone e o eixo embrionário (B) (SERPA, 2018).....20
- Figura 3** - Fotografias de sementes de seringueira durante os estádios de desenvolvimento germinativo (SERPA, 2018)..... 21
- Figura 4** - Esquema demonstrativo da fase inicial do processo de peroxidação lipídica (REPETTO, 2012).....26
- Figura 5** - Fase inicial do passo de propagação do processo de peroxidação lipídica indicando o consumo de oxigênio (REPETTO, 2012).....26
- Figura 6** - Esquema ilustrativo dos estádios do desenvolvimento durante a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de seringueira. Semente quiescente; —Ponto Branco;—Pata de Aranhã;—Palito; Iniciação foliar. Ufla, Lavras, MG, 2018 (SERPA, 2018) .....32
- Figura 7** - Matéria seca das diferentes partes da semente de seringueira para os estádios de desenvolvimento semente quiescente (SQ); ponto branco (PB);—pata de aranhã (PA); —palito (PAL); iniciação foliar (IF).As barras exibem o erro padrão da média(SERPA, 2018)..... 38
- Figura 8** - Médias dos comprimentos de raiz e parte aérea em diferentes estádios de desenvolvimento: —pata de aranhã (PA); —palito (PAL); iniciação foliar (IF). As barras exibem o erro padrão da média (SERPA, 2018).....39
- Figura 9 - A, B e C** Documentação microscópica de endosperma de sementes de seringueira, corado com Sudan IV para identificação de corpos lipídicos. As estruturas representadas com coloração alaranjada representam os lipídeos no endosperma de sementes de seringueira. Ufla, Lavras, MG, 2018. (SERPA, 2018)..... 41
- Figura 10 - A, B e C** Atividade das invertases ácida do vacúolo (IAV) – A; invertase ácida da parede (IAP) – B; e invertase neutra do citosol (INC) – C; nos estádios de desenvolvimento de sementes de seringueira. As médias de cinco repetições foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ) (SERPA, 2018)..... 43 e 44
- Figura 11** - Expressão enzimática da isocitrato liase (ICL) nas colunas: 1- semente quiescente; 2 – cotilédone em SQ; 3 – endosperma em SQ; 4 – cotilédone em PB; 5 - endosperma em PB; 6 – amêndoa em PA; 7 – raiz em PA; 8 – amêndoa em PA; 9 – raiz em PAL; 10 – parte aérea em PAL; 11 – raiz em IF; 12 – parte aérea em IF, de sementes de seringueira (SERPA, 2018) .....45

- Figura 12** - Quantificação em Pixel<sup>2</sup> por mg de matéria seca da expressão enzimática da isocitrato liase (ICL) nos estádios de desenvolvimento: semente quiescente (SQ) para cotilédone, endosperma e semente inteira; —ponto branco (PB) para cotilédone e endosperma; —pata de aranha (PA) para amêndoa e raiz; —palitol (PAL) para amêndoa raiz e parte aérea; iniciação foliar (IF) para raiz e parte aérea, de sementes de seringueira (SERPA, 2018)..... 46
- Figura 13** - Expressão enzimática da lipoxigenase (LOX) nas colunas: 1- semente quiescente; 2 – cotilédone em SQ; 3 – endosperma em SQ; 4 – cotilédone em PB; 5 - endosperma em PB; 6 – amêndoa em PA; 7 – raiz em PA; 8 – amêndoa em PA; 9 – raiz em PAL; 10 – parte aérea em PAL; 11 – raiz em IF; 12 – parte aérea em IF, de sementes de seringueira (SERPA, 2018) .....47
- Figura 14** - Quantificação em Pixel<sup>2</sup> por mg de matéria seca da expressão enzimática da lipoxigenase (LOX) nos estádios de desenvolvimento: semente quiescente (SQ) para cotilédone, endosperma e semente inteira; —ponto branco (PB) para cotilédone e endosperma; —pata de aranha (PA) para amêndoa e raiz; —palitol (PAL) para amêndoa raiz e parte aérea; iniciação foliar (IF) para raiz e parte aérea, de sementes de seringueira (SERPA, 2018)..... 48
- Figura 15** - Expressão enzimática da catalase (CAT) nas colunas: 1- semente quiescente; 2 – cotilédone em SQ; 3 – endosperma em SQ; 4 – cotilédone em PB; 5 - endosperma em PB; 6 – amêndoa em PA; 7 – raiz em PA; 8 – amêndoa em PA; 9 – raiz em PAL; 10 – parte aérea em PAL; 11 – raiz em IF; 12 – parte aérea em IF, de sementes de seringueira (SERPA, 2018)..... 49
- Figura 16** - Quantificação em Pixel<sup>2</sup> por mg de matéria seca da expressão enzimática da catalase (CAT) nos estádios de desenvolvimento: semente quiescente (SQ) para cotilédone, endosperma e semente inteira; —ponto branco (PB) para cotilédone e endosperma; —pata de aranha (PA) para amêndoa e raiz; —palitol (PAL) para amêndoa raiz e parte aérea; iniciação foliar (IF) para raiz e parte aérea, de sementes de seringueira (SERPA, 2018) ..... 50
- Figura 17** - Expressão enzimática da glutatona peroxidase (GPX) nas colunas: 1- semente quiescente; 2 – cotilédone em SQ; 3 – endosperma em SQ; 4 – cotilédone em PB; 5 - endosperma em PB; 6 – amêndoa em PA; 7 – raiz em PA; 8 – amêndoa em PA; 9 – raiz em PAL; 10 – parte aérea em PAL; 11 – raiz em IF; 12 – parte aérea em IF, de sementes de seringueira (SERPA, 2018) .....51
- Figura 18** - Quantificação em Pixel<sup>2</sup> por mg de matéria seca da expressão enzimática da glutatona peroxidase (GPX) nos estádios de desenvolvimento: semente quiescente (SQ) para cotilédone, endosperma e semente inteira; —ponto branco (PB) para cotilédone e endosperma; —pata de aranha (PA) para amêndoa e raiz; —palitol (PAL) para amêndoa raiz e parte aérea; iniciação foliar (IF) para raiz e parte aérea, de sementes de seringueira (SERPA, 2018)..... 51
- Figura 19** - Expressão enzimática da superóxido dismutase (SOD) nas colunas: 1- semente

quiescente; 2 – cotilédone em SQ; 3 – endosperma em SQ; 4 – cotilédone em PB; 5 - endosperma em PB; 6 – amêndoa em PA; 7 – raiz em PA; 8 – amêndoa em PA; 9 – raiz em PAL; 10 – parte aérea em PAL; 11 – raiz em IF; 12 – parte aérea em IF, de sementes de seringueira (SERPA, 2018).....53

**Figura 20** - Quantificação em Pixel<sup>2</sup> por mg de matéria seca da expressão enzimática da superóxido dismutase (SOD) nos estádios de desenvolvimento: semente quiescente (SQ) para cotilédone, endosperma e semente inteira; —ponto branco (PB) para cotilédone e endosperma; —pata de aranha (PA) para amêndoa e raiz; —palitol (PAL) para amêndoa raiz e parte aérea; iniciação foliar (IF) para raiz e parte aérea, de sementes de seringueira (SERPA, 2018) ..... 54

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Composição de sementes de seringueira expressas por mg de matéria seca de endosperma. Onde SQ: sementes quiescentes; PB: —ponto branco; PA: —pata de aranha; PAL: —palito; IF: iniciação foliar. Dados adaptados de Alencar (2003) ..... 23
- Tabela 2** - Teor de água nas diferentes partes da semente de seringueira de acordo com os estádios de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de seringueira. SQ: semente quiescente; PB: —ponto branco; PA: —pata de aranha; PAL: —palito; IF: iniciação foliar. Os valores entre parênteses representam o percentual de erro padrão em relação aos médias apresentadas. Ufla, Lavras, MG, 2018. (SERPA, 2018) ..... 37
- Tabela 3** - Teor de lipídeos expressos em matéria seca, presente nas diferentes partes da semente de seringueira de acordo com os estádios de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de seringueira. SQ: semente quiescente; PB: —ponto branco; PA: —pata de aranha; PAL: —palito; IF: iniciação foliar. Os valores em parênteses representam o percentual de erro padrão das médias apresentadas. Ufla, Lavras, MG, 2018. (SERPA, 2018).....40

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>18</b>
2.1 Aspectos Gerais.....	18
2.2 Características Botânicas.....	18
2.3 Semente de Seringueira.....	19
2.4 Processo Germinativo.....	24
2.4.1 Metabolismo de Lipídeos.....	24
2.4.2 Metabolismo de Carboidratos.....	26
2.4.3 Enzima Lipoxigenase.....	28
2.4.4 Sistema Antioxidante.....	29
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 Estádios Analisados.....	32
3.2 Características avaliadas.....	33
3.2.1 Determinação teor de água das sementes.....	33
3.2.2 Comprimento de raiz e altura de parte aérea.....	33
3.3 Avaliações lipídicas.....	33
3.4 Avaliações enzimáticas.....	34
3.4.1 Invertase ácida do vacúolo.....	34
3.4.2 Invertase neutra do citosol.....	34
3.4.3 Invertase ácida da parede.....	35
3.5 Análise eletroforética.....	35
3.6 Delineamento Experimental.....	35
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
4.1 Avaliações Fisiológicas.....	36
4.1.1 Determinação do grau de umidade das sementes.....	36
4.1.2 Comprimento de raiz e altura de parte aérea.....	38
4.1.3 Lipídeos.....	39
4.2 Atividade enzimática.....	42
4.2.1 Invertases.....	42
4.3 Análise eletroforética.....	44
4.3.1 Isocitrato Liase.....	44
4.3.2 Lipoxigenase.....	46
4.3.3 Antioxidantes.....	48

4.3.3.1	Catalase.....	48
4.3.3.2	Glutationa Peroxidase.....	50
4.3.3.3	Superóxido Dismutase.....	52
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>

## INTRODUÇÃO

A seringueira é uma espécie de elevado potencial econômico pois é por meio dela que se extrai o látex, matéria prima utilizada na indústria para a fabricação de produtos como preservativos, luvas cirúrgicas e pneumáticos. Quando a extração do látex não é mais rentável, procede-se a derrubada das árvores, matéria prima muito explorada por países asiáticos como a Malásia, onde 70% da madeira utilizada é proveniente desta espécie (SHIGEMATSU, 2011).

Além do látex e da madeira, as sementes de seringueira constituem foco de novas pesquisas vinculadas ao seu aproveitamento em diversas áreas econômicas. Dentre elas, a sua aplicação na produção de biodiesel, devido ao alto teor de óleo da semente (35-60%) (ONOJI, 2016; RESHAD, 2015). E o seu expressivo valor nutricional, que é aproveitado na produção de farinha de peixe, adubo, suplemento alimentar, barra de cereal, entre outros.

As sementes de seringueira são grandes e classificam-se no grupo de sementes recalcitrantes, ou seja, incapazes de sobreviver e manter-se viáveis durante a dessecação (WALTERS et al., 2013). Essa característica limita o processo de produção de mudas de forma intermitente, pois os porta-enxertos são obtidos por meio da germinação de sementes coletadas das plantações (PRABPREE, 2018), sendo este um entrave em sua utilização. Outra característica das sementes dessa espécie, é que sua deiscência ocorre quando a maturação máxima é atingida e por se tratar de um processo irreversível, pesquisas acerca do conhecimento da atividade das enzimas envolvidas no processo germinativo podem auxiliar na manutenção da viabilidade da semente usada na produção de porta enxertos.

Os primeiros estudos com sementes de seringueira iniciaram-se entre os anos de 1873 - 1875 e não foram bem-sucedidos (DE SOUZA GONÇALVES, 1990). O principal fator ligado as tentativas falhas de maximização da germinação de sementes de seringueira podem estar atreladas a elevada variação no peso de sementes individuais, onde encontram-se valores de 3,5 a 6,0 g/semente (IAC, 2017). Essa discrepância morfológica pode ser atribuída a elevada variabilidade genética desses materiais, que em sua maioria, possuem o endosperma representando cerca de 90% da composição da amêndoa fresca sem tegumento, e o restante encontra-se no eixo embrionário e cotilédone.

Com relação as principais reservas das sementes de seringueira, os lipídeos representam a maior constituição destas, seguido pelo amido, açúcares, proteínas e os aminoácidos (ALENCAR, 2003). Os lipídeos são armazenados nas sementes em oleossomos na forma de triacilgliceróis (TAGs). Os TAGs são a principal reserva de carbono e energia de

espécies oleaginosas, essencial até o momento em que a plântula não dependa mais das reservas da semente. A formação dos corpos lipídicos ocorre a partir do retículo endoplasmático em células embrionárias durante a maturação da semente, sendo degradados na germinação e no subsequente desenvolvimento das plântulas (SHIMADA, 2018).

Os TAGs presentes nos oleossomos iniciam a clivagem por meio das lipases, liberando ácidos graxos nos glioxissomos, onde são degradados pela  $\beta$ -oxidação, produzindo Acetil-CoA (DIETZ et al., 2016). O Acetil-CoA é incorporado no ciclo do glioxilato onde atua a enzima exclusiva do ciclo isocitrato liase (ICL), que participa da conversão de isocitrato a succinato e glioxilato. Essa enzima apresenta sua atividade máxima quando ocorre a mobilização de reservas, maximizando a conversão de lipídeos de reserva a hexoses e posteriormente a sacarose, através dos passos sequenciais da gliconeogênese, mobilizando esses açúcares para locais onde há demanda, especialmente o eixo embrionário.

A sacarose oriunda da hidrólise de lipídeos é quebrada em glicose e frutose por meio da ação das invertases, que estão presentes em diversos compartimentos celulares e fornecem substrato para o crescimento do eixo embrionário e posterior desenvolvimento das plântulas (MOREIRA, 2009).

Além da germinação, vários processos de desenvolvimento durante o ciclo de vida de uma planta são caracterizados por mudanças na composição e renovação de lipídeos celulares. Os corpos lipídicos possuem uma membrana com uma monocamada fosfolipídica que é degradada no início da germinação, tornando detectável uma importante enzima envolvida no processo de estresse oxidativo, a lipoxigenase (LOX) (FEUSSNER, 2001). Ela possui como principal função a oxidação dos ácidos graxos esterificados antes da ação das lipases, podendo ocorrer nesse processo oxidativo a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), que promovem a catálise da peroxidação lipídica, utilizando como substrato os triacilgliceróis e os fosfolipídeos de membranas (DE OLIVEIRA, et al., 2006).

Com a produção das EROS pode ocorrer o aumento da atividade das enzimas envolvidas no sistema antioxidante, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX), que atuam protegendo a integridade do sistema de membranas, da peroxidação lipídica (ROACH et al., 2008). Essa peroxidação, especialmente no eixo embrionário, pode causar um distúrbio metabólico diminuindo a eficiência das enzimas do sistema antioxidante, prejudicando o desenvolvimento germinativo e podendo levar a morte celular e inviabilidade dessas sementes após a deiscência, inviabilizando o armazenamento.

Diante do exposto, objetiva-se avaliar o comportamento de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos, sacarose e antioxidantes no eixo embrionário, cotilédones, endosperma, raiz e parte aérea de sementes de seringueira durante a germinação, visando ampliar o conhecimento sobre aspectos germinativos e do crescimento inicial de *Hevea spp.*

## REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 Aspectos Gerais

O auge da exploração de látex teve início na década de 20, na região Amazônica, onde os barões do café migrando para a região, construíram prédios suntuosos como teatros, praças, que permanecem até hoje como monumentos históricos. Nesse período, a exploração de látex que ainda não era muito conhecida na região gerou grandes riquezas, atraindo povos de diversas regiões em busca de novas oportunidades de trabalho nos seringais. Atualmente, a produção na região ainda permanece de forma extrativa em áreas nativas (TAKEUCHI, 2012). O Brasil, que no início do século 20 era o maior produtor mundial, hoje contribui com somente 1% dos números, sendo incapaz de atender até mesmo a demanda interna de consumo (IRSG, 2009).

Os países asiáticos concentram o maior contingente de produção de borracha no mundo, representando cerca de 60% da produção total. Na década de 80, as áreas que apresentaram elevada expansão das áreas de cultivo de seringueira foram a Malásia e a Tailândia, mas mais recentemente as regiões montanhosas da China, Laos, Tailândia, Vietnã, Camboja e Mianmar apresentaram um crescimento de cerca de 1 milhão de hectares onde as árvores não eram habitualmente cultivadas (MANIVONG; CRAMB, 2008, ZIEGLER et al., 2009, LI; FOX, 2011). Grande parte desse aumento pode ser atribuído ao incentivo governamental tailandês, que atua frente aos agricultores, encorajando-os a explorar novas áreas do país (LI; FOX, 2011).

A região de origem da seringueira, localiza-se Amazônia Tropical Úmida, Mato Grosso e Bahia. Áreas como Goiás, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Maranhão, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, São Paulo e Minas Gerais são consideradas áreas de produção não tradicionais de cultivo comercial no Brasil.

### 1.2 Características Botânicas

A seringueira pertence ao gênero *Hevea* e à família Euphorbiaceae, que também engloba importantes culturas tropicais como a mamona, a mandioca, e o pinhão manso

(GONÇALVES; FONTES, 2009). Essa família, representa 290 gêneros, com cerca de 7500 espécies, que se encontram distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, com enfoque na América e na África.

Segundo Gonçalves et al. (2001), foram relatadas as seguintes espécies de *Hevea* no Brasil: *Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell.-Arg.; *Hevea guianensis* Aublet, *Hevea benthamiana* Muell.-Arg.; *Hevea pauciflora* (Spruce ex Benth.); *Hevea nitida* Mart. ex Muell.-Arg.; *Hevea spruceana* (Benth.); *Hevea paludosa* Ule Jarb.; *Hevea rigidifolia* (Spruce ex Benth.) Muell.-Arg.; *Hevea camporum* Ducke, *Hevea microphylla* Ule e *Hevea camargoana* Pires.

No estudo desse gênero, pode-se observar que apenas as espécies de *Hevea brasiliensis*, *Hevea guianensis* e *Hevea benthamiana* são potenciais produtoras de látex para a extração comercial, dando ênfase a *Hevea brasiliensis*, por ser esta a que possui melhor desempenho produtivo (GONÇALVES et al., 1997).

As plantas de seringueira provenientes de sementes apresentam grande desuniformidade em seu desenvolvimento, mesmo que sejam de um mesmo lote e estejam em condições controladas, sendo aplicadas somente na formação de porta-enxertos em viveiros (MOREIRA, 2009). Isso ocorre por se tratar de uma espécie monóica, alógama, com flores unissexuadas, e caracterizar-se por sua polinização preferencialmente cruzada.

### **1.3 Semente de Seringueira**

As sementes de seringueira possuem tamanho grande, formato ovalado, ligeiramente compridas, com coloração acinzentada ou marrom pálido e com numerosas matizes sobre a superfície dorsal. Aquelas oriundas de clones, como pode-se observar na Figura 1, podem ser identificadas pela coloração do tegumento característica, que é derivado do progenitor do sexo feminino e pelas marcas e formas determinadas pelas pressões externas da cápsula durante o seu desenvolvimento (WORLD AGROFORESTRY DATABASE, 2012).

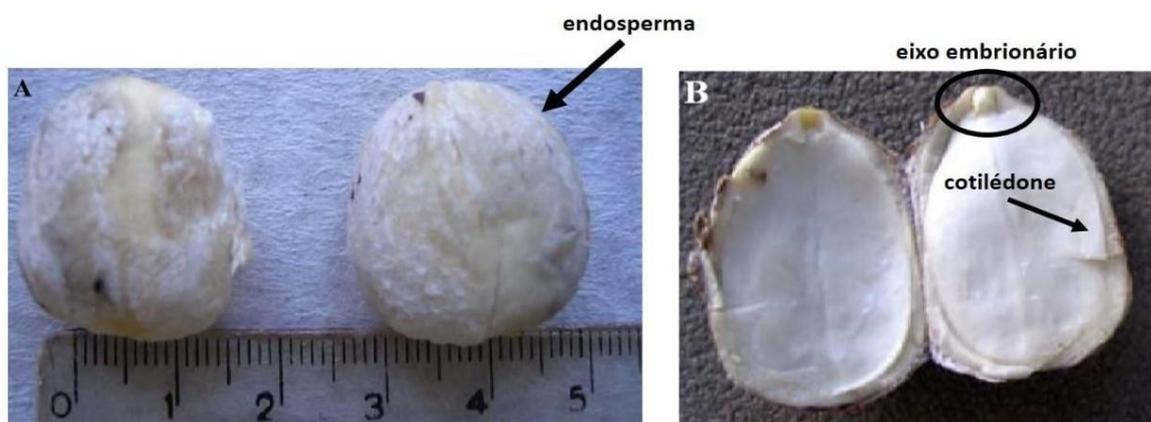
**Figura 1** - Fotografia da semente de seringueira após a deiscência.



Fonte: SERPA, 2018.

O progenitor do sexo masculino, origina o endosperma e o embrião das sementes, por meio de uma fusão tripla feita por um dos gametas masculinos do grão de pólen a dois núcleos polares do saco embrionário, e pela fusão de um outro núcleo reprodutivo do grão de pólen à oosfera, originando os tecidos filiais (embrião e endosperma) (MOREIRA, 2009). Essas estruturas podem ser observadas discriminadamente na Figura 2.

**Figura 2** - Fotografias de sementes de seringueira. Amêndoas da semente de seringueira (A); Amêndoa da semente de seringueira cortada longitudinalmente, discriminando o cotilédone e o eixo embrionário (B).



(Adaptado de Moreira, 2009).

As sementes de seringueira são classificadas como recalcitrantes, ou seja, possuem alta sensibilidade a dessecação e não conseguem preservar o seu sistema de estruturação de membranas quando o conteúdo de água interno atinge valores muito baixos, perdendo sua viabilidade (GARCIA; VIEIRA, 1994). Entre os sintomas evidenciados nas sementes que podem denotar seu envelhecimento, pode-se citar: atraso na germinação, diminuição na taxa de germinação, incapacidade de germinar nos extremos de seu limite ambiental, maior susceptibilidade ao ataque por microrganismos nesses extremos, crescimento diminuído, mudança na cor, aumento no número de plântulas anormais e baixa sobrevivência no campo,

determinando baixa produtividade (CHING; SCHOOLCRAFT, 1968; DELOUCHE, 1968; HARRINGTON, 1972).

No decorrer do processo germinativo, pode-se dividir os estádios de desenvolvimento das sementes de seringueira da seguinte maneira: Semente quiescente (SQ): logo após a dispersão da planta-mãe; ponto branco (PB): inicia-se a protusão radicular por meio do eixo embrionário; pata de aranha (PA): estruturas radiculares mais desenvolvidas; palito (PAL): aumento do comprimento da raiz e desenvolvimento de parte aérea; iniciação foliar (IF): plântula emitindo o primeiro par de folhas, conforme descrito na Figura 3.

**Figura 3** - Fotografias de sementes de seringueira durante os estádios de desenvolvimento germinativo.



Fonte: SERPA, 2018.

De acordo com o experimento conduzido por Alencar (2003), avaliando a mobilização de reservas de sementes de seringueira, obteve-se a constituição representada na Tabela 1 com os estádios acima descritos discriminados no eixo horizontal.

Em sementes quiescentes, pode-se observar que do seu conteúdo total, cerca de 37,5 % eram representados por lipídeos, enquanto que as proteínas representavam 20,1%, seguidos por amido, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e aminoácidos.

A fração proteica pode ser dividida entre as proteínas solúveis e insolúveis. As proteínas insolúveis representam cerca de 11%, e subdividem-se entre prolaminas e glutelinas, enquanto que as insolúveis constituem cerca de 9% e englobam as albuminas e globulinas.

O óleo proveniente das sementes de seringueira possui propriedades similares a aquelas encontradas no óleo de linhaça e soja, e se torna uma alternativa a indústria manufatureira, atuando na complementação de diversas matérias primas que utilizam esse subproduto, tais como biodiesel (SHARON, 2012; FAZAL 2010).

Durante o processo germinativo e desenvolvimento inicial de plântulas o conteúdo de lipídeos, proteínas e carboidratos, foi progressivamente consumido, isso se deve a hidrólise e

mobilização que ocorre por meio da ação de enzimas específicas que atuam durante esses eventos (ALENCAR, 2003).

**Tabela 1** - Composição de sementes de seringueira expressas por mg de matéria seca de endosperma. Onde SQ: sementes quiescentes; PB: —ponto branco; PA: —pata de aranha; PAL: —palito; IF: iniciação foliar. Dados adaptados de Alencar (2003).

	Estádios de Desenvolvimento				
	SQ	PB	PA	PAL	IF
Aminoácidos	0,2 ± 0	14 ± 1,1	20 ± 0,03	18 ± 0,01	11 ± 0,04
Proteínas Totais	225 ± 2,1	208 ± 4,3	180 ± 5,7	142 ± 6,2	125 ± 3,4
Proteínas Solúveis	100 ± 1,8	118 ± 2,1	123 ± 2,0	75 ± 2,4	53 ± 1,2
Proteínas Insolúveis	125 ± 0,8	100 ± 4,3	75 ± 9,8	67 ± 7,2	62 ± 4,6
Lipídeos	410 ± 50	384 ± 26	375 ± 15	298 ± 12	221 ± 16
AR	23,4 ± 6	4 ± 0	37 ± 0,1	21 ± 0,1	25 ± 0,3
AST	34,8 ± 3,1	41 ± 7,9	48 ± 3,1	29 ± 0,2	30 ± 2,8
Sacarose	11,4 ± 3	37 ± 3,9	11 ± 1,5	8 ± 0,1	5 ± 1,5
Amido	48 ± 0,5	20 ± 0,1	41 ± 0,1	8 ± 0,2	27 ± 0,1
Média ± erro padrão da média					

Fonte: SERPA, 2018.

## 1.4 Processo Germinativo

### 1.4.1 Metabolismo de Lipídeos

A germinação e desenvolvimento inicial das plantas de espécies oleaginosas é caracterizado e dependente de uma mobilização dos lipídeos, que consistem como reservas de carbono e energia química para a plântula. As concentrações das substâncias presentes no interior das sementes sofrem variações no decorrer do processo germinativo. Estudos anteriores sugerem que ocorre uma elevação no número de ácidos graxos, fosfatos ácidos e de aminoácidos, e essa produção ocasiona uma acidificação do vacúolo, favorecendo a produção de radicais livres que aceleram a oxidação (ABDUL-BAKI; ANDERSON, 1972).

A composição lipídica dessas sementes pode ser descrita segundo Liu (2018) da seguinte forma: 12,3% ácido palmítico, 2,9% ácido esteárico 29,6%, ácido oleico 37,5%, ácido linoleico e 17,1% ácido linolênico. No entanto, tanto a composição lipídica como sua constituição química são bastante variáveis nos valores encontrados na literatura, pois dependem tanto dos fatores genéticos quanto ambientais.

No interior dos corpos lipídicos, estão localizados os triacilgliceróis, ésteres de glicerol formados por cadeias longas, geralmente de 12 a 24 átomos de carbono, e possuem diferentes graus de insaturação, são unidos às hidroxilas do glicerol formando uma molécula triesterificada de alto peso molecular (600 a 900 g. mol<sup>-1</sup>).

Nas sementes, os locais de armazenamento desses triacilgliceróis são os cotilédones ou o endosperma. De forma geral, estão presentes em aproximadamente 95% do óleo, enquanto o restante é constituído de ácidos graxos livres, fosfolipídeos, carotenos, tocoferóis e traços de água (TAIZ et al., 2017).

Sementes que possuem uma quantidade muito elevada de lipídeos em seu endosperma, possuem enzimas exclusivas que são responsáveis pela quebra desses compostos e posterior fornecimento de substratos para ativação de diversos processos metabólicos, tais como  $\beta$ -oxidação, ciclo do glioxilato e gliconeogênese. Entre essas enzimas pode-se citar a isocitrato liase (ICL) e a malato sintase (MS), responsáveis por catalisar a clivagem de oxiácidos no ciclo do glioxilato, necessários para o desenvolvimento de novas estruturas durante o processo germinativo.

O ciclo do glioxilato foi descoberto por Kornberg e Krebs (1957) a partir de estudos feitos com bactérias cultivadas em acetato. A ICL é uma enzima chave por ser capaz de converter duas moléculas de Acetil-CoA a uma molécula de succinato. Essa via alternativa ao Ciclo de Krebs, confere a essa rota a vantagem de não passar pela etapa descarboxilativa

permitindo maior aproveitamento dos carbonos assimilados para serem utilizados na síntese de carboidratos fornecendo substrato para as reações subsequentes.

Os primeiros estudos onde fez-se a descrição metabólica do ciclo do glioxilato, foram durante trabalhos feitos com bactérias, leveduras e fungos, organismos capazes de sobreviver em ambientes onde a fonte de carbono é proveniente do acetato ou etanol (KORNBERG, 1958). Em sementes oleaginosas, durante o processo germinativo, ocorre a lise dos corpos lipídicos, liberando ácidos graxos, que serão degradados por meio da  $\beta$ -oxidação, fornecendo os substratos para início do ciclo do glioxilato (DIETZ et al., 2016). Em plantas superiores, como *Hevea spp*, esse ciclo é o responsável, durante a germinação, pela conversão de lipídeos em carboidratos. A relação entre as atividades enzimáticas do ciclo e o uso de lipídeos de reserva, em cotilédones, existe em várias espécies, mas com diferenças nas quantidades determinadas e no tempo de germinação (KAGAWA et al., 1973).

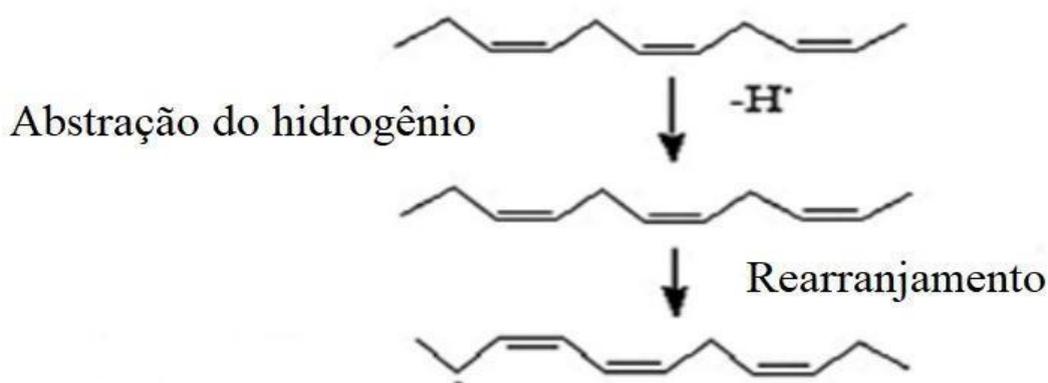
A atividade dessa enzima aumenta durante a germinação das sementes e obtêm valores máximos quando ocorre a máximo da proporção de lipídeos degradados e da síntese de sacarose (BEWLEY & BLACK, 1994). Neste ciclo, os lipídeos insolúveis das sementes se transformam em açúcares solúveis (sacarose), os quais são facilmente deslocados para os meristemas radiculares e apicais (CIONI et al., 1981). Embora o ciclo do glioxilato tenha sido estudado em várias espécies, a relação entre o teor de lipídeos e a atividade dessa enzima em *Hevea spp* ainda não é conhecida.

Por outro lado, a presença de determinadas enzimas pode acusar falhas nas rotas metabólicas atuantes no processo de germinação. A enzima lipoxigenase por exemplo, capaz de produzir oxigênio reativo, pode atuar como catalizador da reação de peroxidação lipídica, acentuando a formação de EROS. Essas peroxidações lipídicas estão entre as principais consequências da deterioração das sementes no processo de envelhecimento. Seu início se dá pela formação espontânea de EROs por meio do processo oxidativo ou por catálises enzimáticas (FERGUSON et al., 1990). Esses radicais livres podem produzir danos nas membranas, continuando a propagação a outros radicais livres, o que geraria uma reação em cadeia, causando um dano degenerativo irreversível, e uma consequente perda da viabilidade de germinação dessas sementes (MCDONALD, 1999).

Nas figuras 4 e 5, pode-se observar um esquema resumido do processo de peroxidação lipídica, onde ocorre a abstração de um hidrogênio do grupamento metil, gerando um radical livre e um ácido. Posteriormente ocorre a reação desse radical livre com o oxigênio molecular fazendo com que ocorra a formação de um radical peróxido que reage com outro ácido graxo

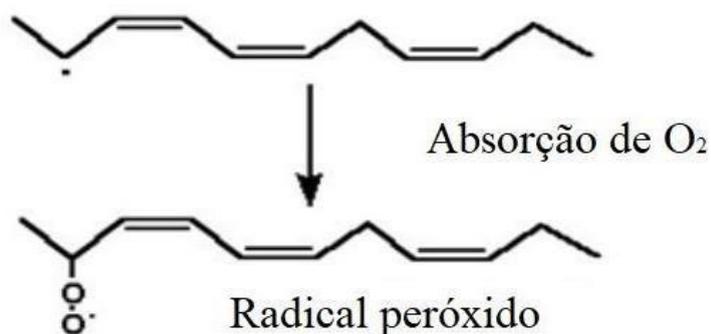
insaturado, formando um hidroperóxido, que é instável e se degrada favorecendo a formação de novos radicais livres (REPETTO, 2012).

**Figura 4** - Esquema demonstrativo da fase inicial do processo de peroxidação lipídica.



Fonte: REPETTO, 2012.

**Figura 5** - Fase inicial do passo de propagação do processo de peroxidação lipídica indicando o consumo de oxigênio.



Fonte: REPETTO, 2012.

#### 1.4.2 Metabolismo de Carboidratos

Os açúcares possuem um papel fundamental no metabolismo celular, sendo responsáveis pelo fornecimento de carbono e energia para os organismos vivos. Geralmente esses carboidratos são armazenados como polissacarídeos em diferentes órgãos da planta (WANG et al., 2018). As rotas enzimáticas responsáveis pela quebra de sacarose no metabolismo celular ocorrem por meio da atividade das invertases e da sacarose sintase (SuSy) (KOCH, 2004).

Os produtos das reações dessas enzimas diferem, as invertases quebram a sacarose em glicose e frutose, (TAIZ; ZEIGER, 2017) enquanto que SuSy forma UDP-Glicose e frutose (SCHMOLZER, 2016). Em geral, as hexoses auxiliam no processo de divisão e a expansão

celular devido ao aumento no fornecimento de esqueleto de carbono, enquanto que a sacarose favorece a diferenciação e a maturação de sementes (BAUD et al., 2002; BORISJUK et al., 2002).

As invertases são responsáveis pela alta acumulação de lipídeos, sugerindo que a sacarose utilizada na síntese de amido ocorre via SuSy, enquanto que a sacarose que é hidrolisada pelas invertases é utilizada para a síntese de lipídeos (TOMLINSON et al., 2004). Órgãos que não fazem fotossíntese e que atuam somente no consumo desses açúcares, são altamente dependentes da ação dessas invertases. Em sementes, os açúcares se encontram em grande parte presentes no endosperma, e dentre suas funções, atuam no suprimento de carbono ao eixo embrionário em desenvolvimento, possibilitando assim a germinação (ZUMA, 2018).

As enzimas SuSy e invertases, responsáveis pela hidrólise de sacarose no embrião e endosperma possuem uma função fundamental na germinação e desenvolvimento inicial das plântulas. A sacarose atua no fornecimento de carbono e energia para órgãos que não realizam fotossíntese (MOREIRA, 2009), importando esses açúcares para suprir suas demandas metabólicas. A presença dessas enzimas no endosperma e embrião, é decorrente da remanescência dessas proteínas no processo de formação desses órgãos durante o desenvolvimento da semente.

Durante a germinação, as sementes passam por estádios de desenvolvimento de diferentes durações, envolvendo mudanças estruturais e fisiológicas nas quais a participação de enzimas no metabolismo de carboidratos é trivial. Existem diferentes isoformas dessas invertases, sendo classificadas de acordo com sua solubilidade e o seu pH ótimo. As invertases solúveis são a invertase ácida do vacúolo e a invertase neutra do citosol, enquanto que a invertase ácida da parede é caracterizada como insolúvel. Além de fornecer hexoses, essas enzimas também participam da regulação da razão sacarose/hexose auxiliando no desenvolvimento e no crescimento de novas estruturas (KOCH, 2004; MOREIRA, 2009). A alta atividade dessas invertases e alta razão de hexose/sacarose no metabolismo celular, também pode ser observada em culturas como o milho e diversos cereais (CHENG; CHOUREY, 1999; WINTER; HUBER, 2000; HIROSE, 2002).

A sacarose e as hexoses estão diretamente ligadas ao suprimento de carbono para o processo respiratório, e atuam como fonte de energia, aminoácidos, lipídeos, proteínas, celulose, amido, clorofilas, carotenoides e fito hormônio (BONOME et al., 2011). A seringueira usa a sacarose como molécula precursora para a biossíntese de látex e na

regeneração da casca (CAIRO, 2009). O metabolismo da sacarose nessa espécie vem sendo amplamente estudando visando a produção de látex (LIU et al., 2015, 2016) porém existem poucos estudos sobre o metabolismo da sacarose em sementes de *Hevea spp.*

### 1.4.3 Enzima Lipoxigenase

As lipoxigenases (LOXs) são enzimas que estão amplamente distribuídas em plantas e animais superiores. Elas podem ser detectadas quando ocorre a degradação dos corpos lipídicos durante os primeiros estádios da germinação, e caracterizam-se por catalisar a adição do oxigênio molecular ao sistema pentadieno dos ácidos graxos polinsaturados, formando hidroperóxidos dos ácidos graxos correspondentes e contêm ferro não-heme, que é necessário para sua atividade catalítica (SHABAN et al., 2013).

Além das EROs, os lipídeos também são catabolizados pelas LOXs, que podem reduzir a viabilidade das sementes, pois quando as sementes são expostas a condições de estresse ocorrem danos físicos em suas células, em decorrência da degradação sequencial de lipídeos (ANJUM et al., 2015). Essas enzimas formam hidroperóxidos de ácidos graxos, que são rapidamente metabolizados para formar vários produtos, dentre esses, cita-se a traumatina envolvida na resposta a ferimentos e na indução da divisão celular e formação de calos (SIEDOW, 1991), o ácido jasmônico, associado à ativação de genes que codificam para a síntese de proteínas de reserva e inibidores de proteases (MELAN et al., 1993).

Em plantas superiores, as LOXs são codificadas por uma família multigênica e o número varia em diferentes espécies, de três para soja e seis para *Arabidopsis*, e para mais de vinte na família *Rosaceae* (LI et al., 2014). As proteínas ou mRNAs das lipoxigenases foram encontradas em todos os órgãos das plantas e sua atividade pode ser detectada em compartimentos como as membranas, vacúolos, corpos lipídicos e cloroplastos (LIAVONCHANKA; FEUSSNER, 2006).

Elas possuem diferentes papéis de atuação na catálise enzimática do sistema vegetal, porém possuem em sua estrutura uma conformação semelhante podendo ser caracterizadas pela presença de um único polipeptídeo, composto por dois grupamentos distintos ligados, sendo eles o N-terminal e o ferro-não heme (MAZUR et al., 2018). O papel do N-terminal em sua composição ainda não é claro, mas sugere-se na literatura que ele seja responsável pela ligação na membrana para aquisição do substrato podendo ter funções reguladoras (EEK et al., 2012)

Possuem a capacidade de catalisar e incorporar moléculas de oxigênio em ácidos graxos poliinsaturados, e diferem em vários aspectos da ação catalítica, tais como pH ótimo

de ação, especificidade para substrato e produtos primários e secundários formados (EVANGELISTA; REGITANO-D'ARCE, 1997; AXELROD et al., 1981).

A localização intercelular de isoformas específicas de LOX fornece informações sobre seu papel fisiológico. A temperatura ideal para sua atividade está em torno de 30°C, temperaturas acima causam uma diminuição acentuada da sua atividade, o que não significa sua inativação (HOLMAN, 1947).

Os hidroperóxidos formados pela ação das lipoxigenases levam ao aparecimento de compostos que têm sido relacionados com a impalatabilidade de grãos de soja (BARROS, 2008; HILDEBRAND et al., 1989), essa característica se torna relevante para sementes de *Hevea spp*, pois novas pesquisas vêm sendo feitas para produção de suplementos alimentares com essas sementes.

#### **1.4.4 Sistema Antioxidante**

A deterioração que as sementes sofrem após a dispersão da planta-mãe está intimamente ligada com a superprodução de espécies reativas de oxigênio, devido ao funcionamento ineficiente ou falha no sistema antioxidante (ANJUM, et al., 2015). A elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) provoca a oxidação de lipídeos de membrana, proteínas e ácidos nucleicos (BERJAK; PAMMENTER, 2007).

A produção de enzimas antioxidantes no sistema celular se dá na maioria das vezes pelo aumento de EROS. O oxigênio (O<sub>2</sub>) é um dos principais compostos responsáveis pelos danos celulares que podem vir a ocorrer por meio da sua oxidação, e embora seja necessário para o desempenho de diversas funções dentro do metabolismo vegetal, ele também leva a produção dessas EROS em eventos metabólicos que ocorrem principalmente na mitocôndria, nos cloroplastos e nos peroxissomos (BHATTACHARJEE, 2010; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011).

As enzimas antioxidantes atuam na desintoxicação enzimática, criando barreiras que impedem a destruição do sistema de membranas causadas pelos elevados níveis de biomoléculas como o oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radical hidroxila (OH) e ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (MITTLER, 2002). As plantas que possuem elevado nível de antioxidantes, possuem melhor tolerância e resistência ao dano oxidativo causado pelas EROS.

No caso de espécies recalcitrantes como *Hevea spp*, as enzimas antioxidantes atuam como sinalizadores de estresses ambientais e salientam a inaptidão dessa espécie a condições

de baixa disponibilidade hídrica, pois nessas condições ocorre um desbalanço a favor dos compostos oxidantes ocasionando danos oxidativos nas estruturas celulares. Quando se desligam da planta-mãe e atingem a maturidade fisiológica, apresentam alto teor de água, e perdem a viabilidade rapidamente quando dessecadas, por isso devem ser armazenadas com alto grau de umidade (BONOME, 2011). Essa condição favorece uma elevada atividade metabólica das sementes e, conseqüentemente aumento de estresse oxidativo. Segundo Bailly (2004), o estresse oxidativo é um dos principais fatores que conduzem à baixa viabilidade de sementes recalcitrantes durante o armazenamento.

A capacidade que as sementes têm de acionar o mecanismo antioxidante quando necessário, pode prevenir o acúmulo de EROS e o estresse oxidativo que poderia causar a lise dessas moléculas. Essas EROS alteram as relações da composição de água dentro da planta, atacando o sistema biológico e causando danos nas estruturas de membranas, oxidando aminoácidos e proteínas e levando a peroxidação lipídica (ASADA 1999; RICHARDSON, 2003). Existe uma variedade de enzimas que atuam no sistema antioxidante como por exemplo a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e glutathione peroxidase (GPX, EC 1.11.1.7). Essas enzimas podem ser encontradas em diferentes compartimentos celulares e contribuem para o controle das EROS nas plantas, que é responsável pelo estágio homeostático redox no sistema (BARBOSA, 2014).

O controle das EROS pode ser enzimático ou não-enzimático (KIM; KWAK, 2010). Nas primeiras linhas de defesa do sistema antioxidante enzimático encontra-se a (SOD), presente em todos os organismos celulares e compartimentos passíveis ao estresse oxidativo, neutralizando o ânion superóxido formando peróxido de hidrogênio, esse ânion superóxido pode doar elétrons reduzindo o peróxido de hidrogênio e formando um OH, esse processo é conhecido como —reação de Haber-Weiss (GIL; TUTEJA, 2010).

A GPX e a CAT possuem diferentes afinidades no processo de eliminação do peróxido de hidrogênio. As catalases estão envolvidas na remoção do excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerados na β-oxidação dos ácidos graxos atuando nos peroxissomos e glioxissomos, enquanto que as peroxidases utilizam o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidantes e estão localizadas no vacúolo e na parede celular (DE GARA et al., 2010). Ambas enzimas participam da eliminação do excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado pela SOD.

A GPX encontra-se em tecidos de animais, plantas e microorganismos e é responsável pela catálise de peróxido de hidrogênio em água (GIL; TUTEJA, 2010). É estável em temperaturas elevadas, sendo utilizada em estudos de síntese proteica, reações e funções

enzimáticas e sua atividade está relacionada ao sistema de defesa da planta a agentes externos (HIRAGA et al., 2001; ALMAGRO et al., 2008; GULSEN et al., 2010; WAR et al., 2012).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação no Departamento de Biologia (DBI), Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA) no município de Lavras - MG. As análises foram conduzidas no Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas e de Anatomia Vegetal no Departamento de Biologia (DBI), Laboratório de Sementes e de Técnicas Moleculares do Departamento de Agricultura (DAG) e Laboratório de Produtos Vegetais do Departamento de Ciências dos Alimentos (DCA), situados na UFLA.

As sementes utilizadas no experimento foram provenientes de árvores de pé franco, com cerca de 15 anos de idade cultivadas na UFLA. As sementes foram coletadas no solo imediatamente após a deiscência dos frutos. O tempo máximo decorrido entre a coleta das sementes e o início dos trabalhos foi de dois dias.

Antes da sementeira, as sementes foram selecionadas visualmente de acordo com o tamanho, densidade, brilho, integridade física e ausência de patógenos. As sementes quiescentes apresentavam massa fresca média de três gramas, sem tegumento, e teor de água de aproximadamente 30%.

A areia utilizada como substrato, foi lavada com água até completa retirada do material orgânico. Foi feita a retirada do tegumento das sementes, antes da sementeira, para auxiliar na observação do crescimento do caule e da raiz. Posteriormente, as sementes foram dispostas em bandejas de plástico de modo a permitir sua germinação.

Foram utilizadas 150 sementes quiescentes para análise do primeiro estágio de desenvolvimento e 600 sementes separadas em quatro lotes de igual quantidade para avaliação dos demais estágios germinativos e de desenvolvimento. A irrigação foi feita com água potável buscando-se sempre manter a umidade do substrato próximo a capacidade de campo.

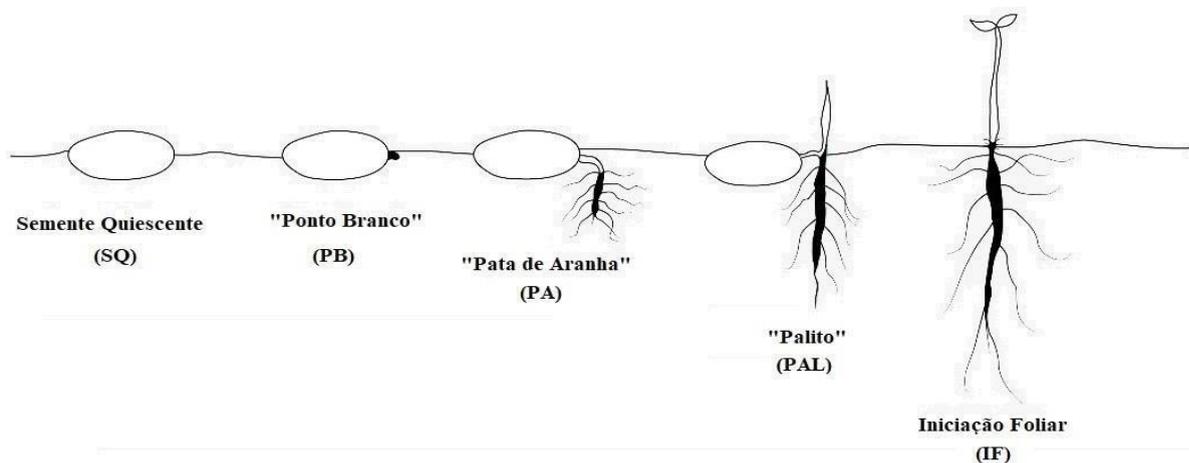
No estudo do processo germinativo de sementes de seringueira, o tempo entre a deiscência dos frutos e o início dos trabalhos, deve ser o mínimo possível, por se tratar de uma semente intolerante a dessecação. Isso se faz necessário para que a perda da sua viabilidade seja a mínima possível.

A germinação dessa espécie é caracterizada por apresentar uma alta variação no desenvolvimento de suas estruturas, desde a semente até a plântula, portanto, em dias alternados, após a semeadura, foi feita a retirada das sementes do germinador para verificar o estágio de desenvolvimento em que se encontravam. As sementes que haviam atingido o estágio de desenvolvimento de interesse foram coletadas e as demais permaneceram nos germinadores. Sendo assim, aos nove dias, foram coletadas as que estavam em —ponto branco; aos 13 dias, as que estavam em —pata de aranha; aos 18 dias, as que estavam em —palito; aos 25, as que estavam no estágio de iniciação foliar.

### 1.5 Estádios Analisados

Os materiais para análises das enzimas foram coletados nos seguintes estádios: semente quiescente (SQ), —ponto branco (PB), —pata de aranha (PA), —palito (PAL) e iniciação foliar (IF), conforme evidenciado na Figura 6. Separados em eixo embrionário, cotilédone e endosperma para SQ e PB, amêndoa e raiz para PA, amêndoa, raiz e parte aérea para PAL e raiz e parte aérea para IF.

**Figura 6 -** Esquema ilustrativo dos estádios do desenvolvimento durante a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de seringueira. Semente quiescente; —Ponto Branco; —Pata de Aranha; —Palito; Iniciação foliar. Ufla, Lavras, MG, 2018.



Fonte: SERPA, 2018.

Para análise eletroforética das enzimas, os materiais foram separados em cotilédone e endosperma para SQ e PB, amêndoa e raiz para PA, amêndoa, raiz e parte aérea para PAL, raiz e parte aérea para IF.

Vale ressaltar que devido à grande desuniformidade no desenvolvimento inicial durante a germinação, o momento de soltura da semente da plântula também foi variável entre os estádios de desenvolvimento, onde pode-se observar algumas sementes ainda ligadas a plântula em IF. Adotou-se o critério de análise sem a amêndoa observando-se o maior número de plantas, a fim de uniformizar ao máximo os dados experimentais.

## **1.6 Características avaliadas**

### **1.6.1 Determinação teor de água das sementes**

O cálculo do teor de água foi feito pela diferença de peso entre o material fresco e o material seco em estufa, com circulação forçada de ar, a 65 °C por cinco dias (VIEIRA, et al., 1995). As sementes foram separadas em embrião, cotilédone, endosperma, amêndoa, raiz e parte aérea. Os valores foram expressos em relação a massa seca.

### **1.6.2 Comprimento de raiz e altura de parte aérea**

Durante as coletas dos materiais, mediu-se o comprimento da raiz, do ponto de inserção dos pecíolos cotiledonares até a extremidade final, para os estádios de —pata de aranha, —palito e emissão foliar, determinando-se o comprimento médio por plântula. Mediu-se a altura da parte aérea, a partir do ponto de conexão dos pecíolos cotiledonares até a extremidade superior, no estádio —palito e iniciação foliar, determinando-se a altura média por planta. Após essas medições as amostras foram secas em estufa, a 65 °C para determinação de matéria seca.

## **1.7 Avaliações lipídicas**

O teor de lipídeos foi feito pelo método gravimétrico seguindo-se o procedimento padrão do Laboratório de Produtos Vegetais da Universidade Federal de Lavras, em uma grama de material seco e moído. Foram colocados em papel filtro e transferidos para conjunto Soxhlet, por um período de quatro horas onde foi feita a extração contínua por refluxo, em presença de éter etílico. Após a completa evaporação do solvente, as amostras foram pesadas e o teor de lipídeos determinado com base na matéria seca. Foram utilizadas três repetições para cada material que constavam de um homogeneizado de dez sementes para cada repetição.

Para análises anatômicas qualitativas realizadas no laboratório de Anatomia Vegetal, as sementes sem tegumento foram submetidas a secções transversais manuais utilizando o

corante Sudan IV para a identificação de corpos lipídicos, de acordo com os métodos de Kraus e Arduin (1997). A preparação de lâminas semipermanentes foi realizada de acordo com as técnicas descritas por Johansen (1940). As observações foram feitas usando um microscópio Axiophot equipado com óptica DIC (Zeiss®, Oberkochen, Alemanha), e a documentação fotográfica foi realizada usando uma câmera digital Powershot A640 (Canon®, Tóquio, Japão).

## **1.8 Avaliações enzimáticas**

Em cada estágio de desenvolvimento as sementes foram coletadas e com o auxílio de um bisturi, foram submetidas a separação do eixo embrionário, cotilédone e endosperma, para SQ e PB; em amêndoa e raiz, para PA; em amêndoa, raiz e parte aérea, para PAL; em raiz e parte aérea, para IF. Após esse procedimento, o material foi congelado a  $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O material congelado foi posteriormente macerado em graal e almofariz com polivinilpirrolidona e nitrogênio líquido e utilizado para as análises das isoformas das invertases.

Para análise das enzimas, ICL, LOX, SOD, CAT e GPX, feitas por eletroforese, utilizou-se o mesmo procedimento acima descrito, porém foram considerados os materiais de endosperma e cotilédones para SQ e PB. Foi feita a lavagem do material com éter etílico e água destilada a fim de extrair o óleo presente nas amostras

### **1.8.1 Invertase ácida do vacúolo**

Para quantificação da invertase ácida do vacúolo (IAV), 0,4 g das amostras foram acondicionadas em eppendorf de 2,0mL com 1,5mL de meio extrator constituído de tampão HEPES (400 mM pH 7,5), PMSF (100 mM),  $\text{MgCl}_2$  (500 mM), DTT (200 mM), ácido ascórbico (50 mM) e  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Posteriormente, o conjunto foi centrifugado a 13.000 rpm a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 20 minutos. O sobrenadante foi coletado, e utilizado como fonte bruta para avaliação da IAV, onde fez-se a incubação do material a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  com o tampão citrato de sódio (400 mM pH 4,5),  $\text{MgCl}_2$  e sacarose aos 10 e 40 minutos. Sucessivamente, a reação foi paralisada e quantificada pelo método dinitrossalicílico (DNS) descrito por Miller (1959).

### **1.8.2 Invertase neutra do citosol**

Para quantificação da invertase neutra do citosol (INC), 0,4 g das amostras foram acondicionadas em eppendorf de 2,0mL com 1,5mL de meio extrator constituído de tampão HEPES (400 mM pH 7,5), PMSF (100 mM),  $\text{MgCl}_2$  (500 mM), DTT (200 mM), ácido

ascórbico (50 mM) e H<sub>2</sub>O destilada. Posteriormente, o conjunto foi centrifugado a 13.000 rpm a 4 °C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi coletado, e utilizado como fonte bruta para avaliação da INC, onde fez-se a incubação do material a 37°C com o tampão fosfato de potássio (200 mM pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> (5 mM) e sacarose (200 mM) aos 10 e 40 minutos. Sucessivamente, a reação foi paralisada e quantificada pelo método dinitrossalicílico (DNS) descrito por Miller (1959).

### **1.8.3 Invertase ácida da parede**

Para extração da invertase ácida da parede celular foi utilizado o mesmo tampão de extração das invertases ácida do vacúolo e neutra do citosol, no entanto, foi adicionado NaCl 1M. Posteriormente, foram centrifugados a 13.000 rpm a 4 °C, durante 20 minutos. A incubação do material foi feita a 37 °C com tampão citrato de sódio (400 mM pH 4,5), MgCl<sub>2</sub> (5 mM) e sacarose (200 mM) aos 10 e 40 minutos. Sucessivamente, a reação foi paralisada e quantificada pelo método dinitrossalicílico (DNS) descrito por Miller (1959).

## **1.9 Análise eletroforética**

O material congelado foi macerado em graal e almofariz com polivinilpirrolidona e nitrogênio líquido e utilizado para as análises. Desse material, foram separadas as amostras e colocadas em eppendorf onde foram adicionados 250 µL de tampão de extração (Tris-HCl 0,2 M, pH:8,0) e 0,1% de β-mercaptoetanol. Estes permaneceram durante a noite toda e no dia seguinte foram centrifugados a 14000 rpm por 30 minutos, a 4 °C. Do sobrenadante, foram retirados 50 µL com posterior aplicação em gel poliacrilamida 7,5% - gel separador e 4,5% - gel concentrador. A corrida eletroforética foi submetida a voltagem constante de 150 V por aproximadamente seis horas. Logo após, foi feita a revelação para cada enzima utilizando a metodologia descrita por Alfenas (2006).

## **1.10 Delineamento Experimental**

O delineamento experimental utilizado para as análises das invertases foi o DBC (Delineamento em Blocos Casualizados), com análises de cinco estádios de desenvolvimento que constaram de cinco repetições cada, contendo dez sementes cada em cada repetição.

As análises estatísticas foram feitas utilizando o pacote computacional Sistema de Análise de Variância – SISVAR (FERREIRA, 2014). A análise de variância foi feita com base na comparação de médias, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Para análise das enzimas por eletroforese, os dados foram avaliados utilizando-se o software ImageJ®, onde é feita a análise das imagens e o seu cálculo é dado com base no número de Pixels<sup>2</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1.11 Avaliações Fisiológicas

#### 1.11.1 Determinação do grau de umidade das sementes

O lote de 750 sementes analisado no experimento apresentou teor de água variável nos diferentes materiais, discriminados conforme os estádios de desenvolvimento. As sementes quiescentes inteiras coletadas logo após a dispersão, apresentaram teor médio de água de 32%, inferiores aos resultados observados por Moreira (2009) que observou valores de aproximadamente 45% e superiores aos observados por Alencar (2003) que observou valores de aproximadamente 27%. Isso se dá pela alta variabilidade genética presente nessas sementes.

Observa-se na Tabela 2, que as sementes inteiras (endosperma, cotilédone e eixo embrionário) em SQ apresentaram valores inferiores para teor de água, em comparação com as sementes PB, pois no início da germinação ocorre uma reidratação dos tecidos, dando início ao processo germinativo.

Quando os tecidos dessas sementes recalcitrantes passam a absorver água, intensifica-se a atividade respiratória e metabólica, fornecendo energia para o desenvolvimento do eixo embrionário, sendo assim, os cotilédones aumentam de volume, provocando uma fissura na amêndoa, facilitando a emergência da radícula e das demais estruturas internas que serão protruídas no processo germinativo (BORGES et al., 2009).

Em PA os materiais já apresentavam raiz, justificando a elevação no teor de água no peso total da amostra, pois as raízes são compostas por aproximadamente 75% de água. Em PAL e IF essa elevação se mantém em decorrência do aumento no desenvolvimento de raiz e parte aérea, que são compostos por cerca de 80% de água para ambos os tecidos.

**Tabela 2** - Teor de água nas diferentes partes da semente de seringueira de acordo com os estádios de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de seringueira. SQ: semente quiescente; PB: —ponto branco; PA: —pata de aranha; PAL: —palitolo; IF: iniciação foliar. Os valores entre parênteses representam o percentual de erro padrão em relação aos médias apresentadas. Ufla, Lavras, MG, 2018.

Componente	Estádios de Desenvolvimento				
	SQ	PB	PA	PAL	IF
	<b>Teor de Água (%)</b>				
Eixo embrionário	50 ( $\pm$ 8)	59 ( $\pm$ 8)			
Cotilédones	41 ( $\pm$ 2)	60 ( $\pm$ 8)			
Endosperma	35 ( $\pm$ 4)	46 ( $\pm$ 3)			
Semente Inteira	32 ( $\pm$ 5)	47 ( $\pm$ 5)			
Amêndoa			46 ( $\pm$ 1)	69 ( $\pm$ 1)	
Raiz			79 ( $\pm$ 4)	80 ( $\pm$ 0,1)	78 ( $\pm$ 1)
Parte Aérea				77 ( $\pm$ 2)	82 ( $\pm$ 2)
Média $\pm$ erro padrão da média					

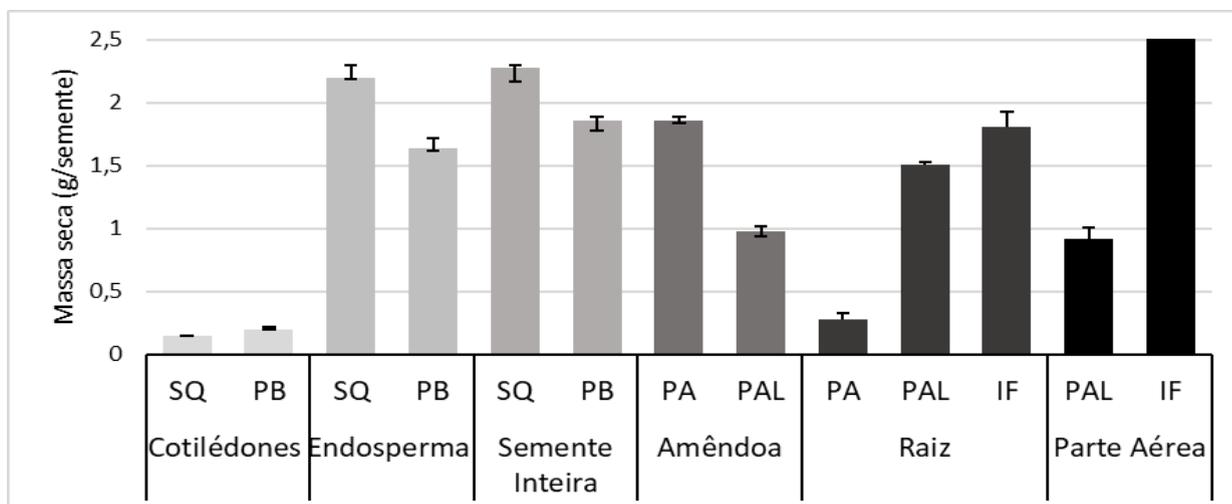
Fonte: SERPA, 2018.

Observa-se na figura 7 que a matéria seca de sementes quiescentes sem tegumento, utilizadas nesse experimento, foi cerca de 2,26 gramas/sememente, e que aproximadamente 93% dessa massa estava acumulada no endosperma (cerca de 2,0 gramas), os outros 7% estavam nos cotilédones e eixo embrionário.

A maior parte das sementes germinadas encontrava-se em —ponto branco aos nove dias após a semeadura (DAS), coincidindo com o tempo observado por Alencar (2003) e Carmo & Gomes (1985), diferindo do tempo observado por Alves et al, (1995).

As sementes em ponto branco (PB) apresentaram um decréscimo de matéria seca de endosperma, pois nesse estágio iniciava-se o processo de embebição, ocorrendo a remobilização de reservas para suprir a demanda dos cotilédones e do eixo embrionário para auxiliar no desenvolvimento da radícula, justificando assim a elevação de matéria seca dos cotilédones.

**Figura 7** - Matéria seca das diferentes partes da semente de seringueira para os estádios de Desenvolvimento: semente quiescente (SQ); ponto branco (PB); —pata de aranha (PA); —palitol (PAL); iniciação foliar (IF). As barras exibem o erro padrão da média.



Fonte: SERPA, 2018.

Para os estádios de desenvolvimento de —pata de aranha (PA), —palitol (PAL) e iniciação foliar (IF), foi feita a separação de amêndoa (endosperma e cotilédone), raiz e parte aérea, onde não era possível fazer a separação das partes de endosperma e cotilédone como em SQ e PB, pois parte desse material já havia sido consumido para suprimento das reservas requeridas no desenvolvimento da raiz.

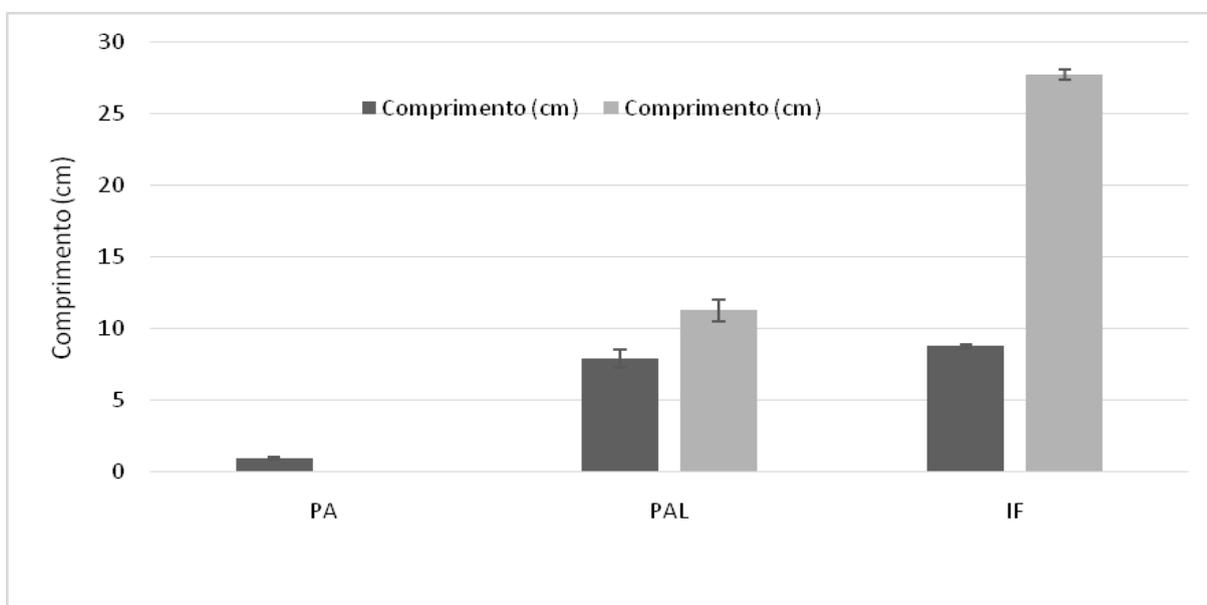
Observou-se decréscimo de matéria seca presente na amêndoa em PA e PAL (Figura 7), bem como ocorreu de SQ para PB, onde as reservas presentes na amêndoa continuavam sendo utilizadas no suprimento dos tecidos dreno. Houve um decréscimo de matéria seca da amêndoa mais acentuado a partir de PAL para o fornecimento de reservas que foram utilizadas no desenvolvimento da raiz e parte aérea. Sabe-se que as plântulas em seus estádios iniciais de desenvolvimento obtêm os nutrientes para o crescimento diretamente das reservas da semente, e que no caso da seringueira, o endosperma representa a quase totalidade da matéria seca da semente, seguido pelos cotilédones e pelo eixo embrionário.

### 1.11.2 Comprimento de raiz e altura de parte aérea

Observa-se na Figura 8 que o comprimento radicular apresenta um aumento de oito vezes de PA (0,9 cm) para PAL (7,9 cm), e mantém-se de maneira uniforme de PAL para IF (8,75 cm), enquanto que o desenvolvimento da parte aérea apresenta um crescimento de cerca de 40% de PAL para IF (27,7 cm).

Somente em PAL a parte aérea cresce em ritmo superior ao da raiz. O baixo aumento no comprimento da raiz de PAL para IF correlacionado com os valores de matéria seca observados na Figura 7, nos permitem afirmar que as raízes laterais se desenvolveram em IF, bem como ocorreu um engrossamento da raiz pivotante, justificando o aumento de matéria seca. Isso se deve provavelmente a hidrólise de lipídeos presentes na amêndoa, atuando como fonte de energia e carbono para o desenvolvimento de novas estruturas.

**Figura 8** - Médias dos comprimentos de raiz e parte aérea em diferentes estádios de desenvolvimento: —pata de aranha (PA); —palito (PAL); iniciação foliar (IF). As barras exibem o erro padrão da média.



Fonte: SERPA, 2018.

### 1.11.3 Lipídeos

Na tabela 3, observa-se que os tecidos que apresentaram o teor mais elevado foram endosperma e cotilédone de semente quiescente (SQ), em razão do início da  $\beta$ -oxidação que estaria ocorrendo, fornecendo precursores biossintéticos para a germinação.

Durante o desenvolvimento germinativo dessas sementes essas reservas foram sendo consumidas gradativamente. Observa-se na Tabela 3, que de SQ para PB houve um decréscimo de 60% e 12% para cotilédone e endosperma, respectivamente. No estágio de PAL o consumo passa a ser mais elevado, havendo um decréscimo de aproximadamente 53% em massa de endosperma/amêndoa quando comparado a SQ. Esses valores (Tabela 3) permitem inferir que apesar de ocorrer um decréscimo de lipídeos durante o processo germinativo, esse consumo é mais acentuado a partir de PAL, pois as demandas de

crescimento em PA aumentaram significativamente. Esse comportamento, assemelha-se ao observado por Graham (2008) que postulou que essas reservas são utilizadas no crescimento e desenvolvimento de plântulas.

**Tabela 3** - Teor de lipídeos expressos em matéria seca, presente nas diferentes partes da semente de seringueira de acordo com os estádios de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de seringueira. SQ: semente quiescente; PB: —ponto branco; PA: —pata de aranha; PAL: —palito; IF: iniciação foliar. Os valores em parênteses representam o percentual de erro padrão das médias apresentadas. Ufla, Lavras, MG, 2018.

Componente	Estádios de Desenvolvimento				
	SQ	PB	PA	PAL	IF
	<b>Teor de Lipídeos (%)</b>				
Cotilédones	66(± 6,2)	27(± 1,1)			
Endosperma	51(± 7,5)	45(± 4,8)			
Semente Inteira	47(± 5,3)				
Amêndoa			32(± 5,3)	24(± 4,1)	
Raiz			14(± 0,2)	16(± 0,1)	17(± 0,7)
Parte Aérea				15(± 2,1)	19(± 0,3)

Média ± erro padrão da média

Fonte: SERPA, 2018.

Observa-se na Tabela 3, que os valores de teor de lipídeos expressos em SQ para as diferentes partes da semente, são mais elevados em SQ. O decréscimo desse composto no decorrer das fases de desenvolvimento, salientam o fato de que a semente já é dispersa da planta-mãe madura, onde não ocorre mais a síntese, e sim a hidrólise de lipídeos.

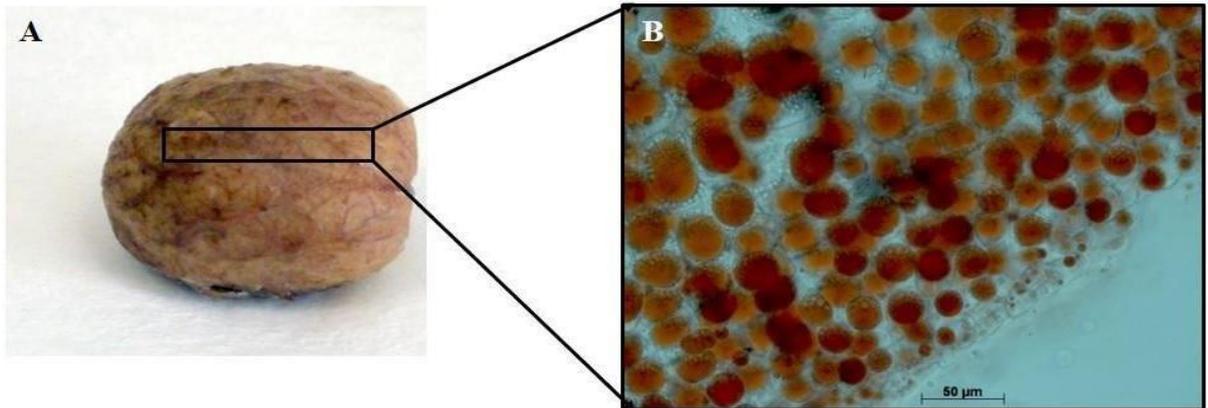
A variação no conteúdo de lipídeos das sementes, deve-se a elevada variabilidade genética das progênies, devido sua polinização cruzada.

Os lipídeos presentes na semente também podem ser observados por meio da identificação dos corpos lipídicos. As sementes apresentaram em seu endosperma em média 50% de lipídeos, corroborando com os valores obtidos por Ren (2012). Eles são importantes fonte de armazenamento de carbono reduzido em diversas espécies como soja, amendoim e algodão (TAIZ et al., 2017).

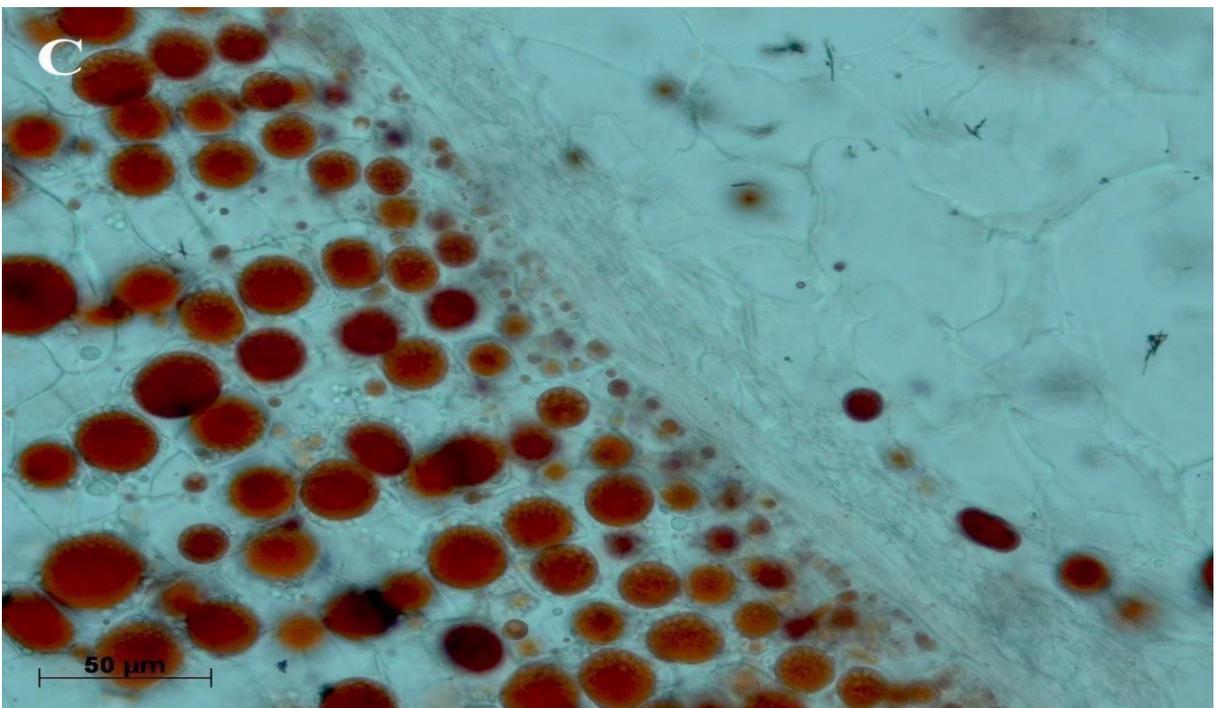
Na Figura 9-B/C, pode-se observar os corpos lipídicos presentes no endosperma de sementes de seringueira. Na maioria das sementes com elevado teor de lipídeos, essas estruturas apresentam-se circundadas por uma monocamada fosfolipídica que é originada do retículo endoplasmático (HUANG et al., 1993; MURPHY; VANCE, 1999). Durante o processo de formação, ocorrem sucessivas fusões até que eles atinjam um diâmetro que

podem variar de 5 a 30  $\mu\text{M}$  (HUANG et al., 1993; LEEGOOD; LEA, 1999; MURPHY; VANCE, 1999).

**Figura 9 - A, B e C** Documentação microscópica de endosperma de sementes de seringueira, corado com Sudan IV para identificação de corpos lipídicos. As estruturas representadas com coloração alaranjada representam os lipídeos no endosperma de sementes de seringueira. Ufla, Lavras, MG, 2018.



Fonte: SERPA, 2018.



Fonte: SERPA, 2018.

## 1.12 Atividade enzimática

### 1.12.1 Invertases

A atividade das invertases ácida do vacúolo (IAV), ácida da parede (IAP), e neutra do citosol (INC), em eixo embrionário, cotilédone, endosperma, amêndoa, raiz e parte aérea durante a germinação e desenvolvimento inicial são observadas na Figura 10 - A, B e C.

No eixo embrionário, a atividade enzimática das invertases foi avaliada nos estádios de SQ – 0 DAS e PB – 9 DAS, onde pode-se observar que em IAV (Figura 10 – A) ocorreu uma queda significativa de sua atividade em comparação ao endosperma e ao cotilédone em SQ, contrário ao que foi observado no comportamento em PB. Os materiais de raiz foram avaliados em PA – 13 DAS, PAL – 19 DAS e IF – 25 DAS onde apresentaram desempenho significativamente mais elevado em relação aos demais materiais em IAV.

A alta atividade das invertases ácidas pode sugerir que elas possuem a função de alongamento e crescimento de tecidos jovens, visto que são responsáveis pela clivagem de sacarose em glicose e frutose elevando a pressão osmótica (STURM; TANG, 1999). Essa afirmação corrobora com os valores mais elevados obtidos em IAP (Figura 10 – B) para todos os materiais avaliados, onde sua atividade se apresentou consideravelmente mais elevada que IAV e INC (Figura 10 – C).

A atividade de IAV (Figura 10 – A) encontra-se na maioria das vezes quando tecido já está maduro (COPELAND, 1990) justificando sua alta atividade em semente quiescente e em raiz de plântulas. Ela também pode atuar no acúmulo de hexoses nos órgãos das plantas em condições de estresse, protegendo o sistema de membranas. Os resultados obtidos neste experimento são contrários aos observados por Tomlinson et al. (2004), que no estudo de sementes de fumo inteiras, observou uma queda na atividade da invertase ácida da parede nos estádios iniciais de desenvolvimento dessas sementes.

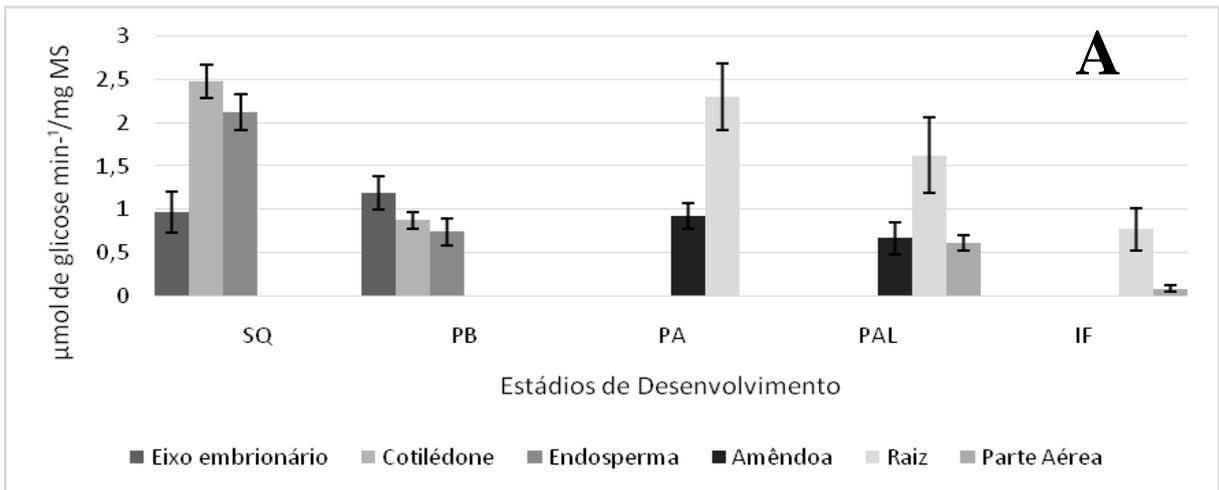
Por outro lado, a atividade de INC é relativamente inferior as invertases ácidas, não possuindo significativa elevação no decorrer do processo germinativo. Esta enzima atua como uma enzima de manutenção, envolvida na degradação de sacarose, sendo observada em taxas mais elevadas em tecidos com menor atividade das invertases ácidas. Devido essa característica, os valores mais elevados de INC quando comparados aos demais estádios podem ser observados em eixo embrionário de PB, sendo um tecido encarregado do suprimento e manutenção do desenvolvimento de novas estruturas.

Os valores de açúcares redutores durante a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas (Tabela 1) nos permite observar que ocorre um decréscimo no seu conteúdo de PA

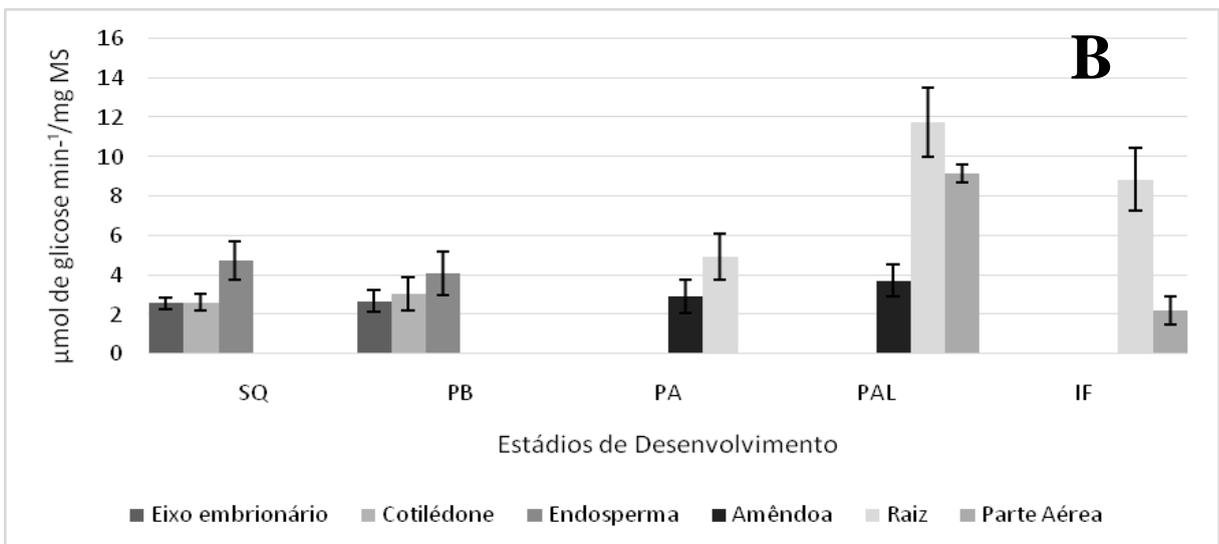
para PAL, sugerindo que neste momento estaria ocorrendo a translocação desses açúcares para a parte aérea e a raiz, valores que trabalham em consonância com a atividade de INC.

Os açúcares utilizados no metabolismo das sementes, são de grande importância, tendo como exemplo a regulação fonte-dreno. Durante o desenvolvimento germinativo, o metabolismo de sacarose, atua no desenvolvimento de diferentes tecidos dreno, favorecendo a germinação.

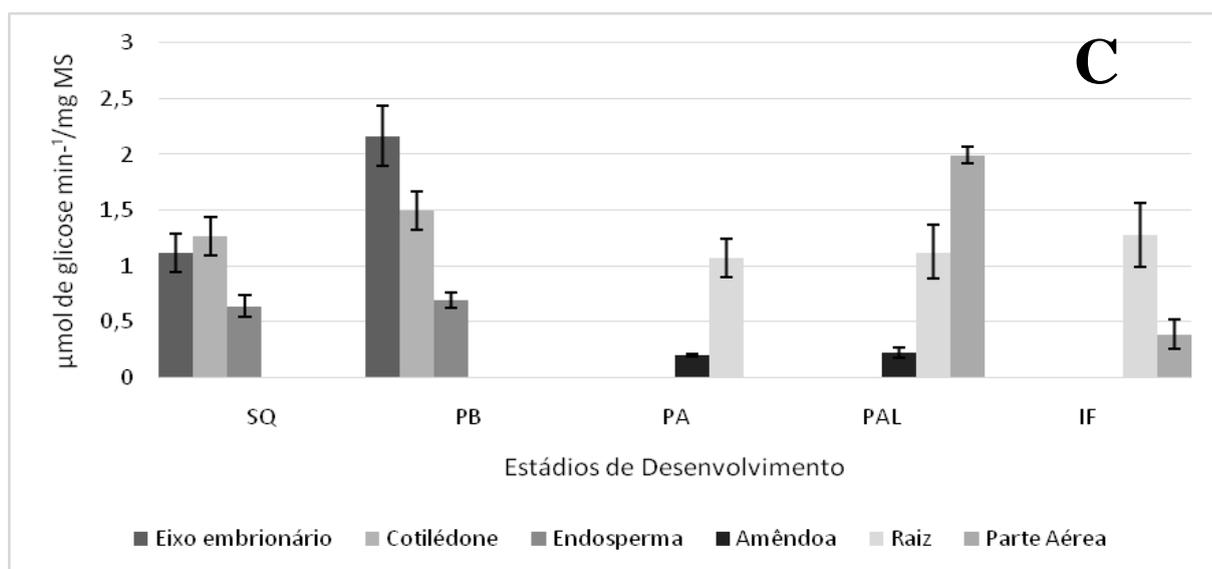
**Figura 10 - A, B C** Atividade das invertases ácida do vacúolo (IAV) – A; invertase ácida da parede (IAP) – B; e invertase neutra do citosol (INC) – C; nos estádios de desenvolvimento de sementes de seringueira. As médias de cinco repetições foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ).



Fonte: SERPA, 2018.



Fonte: SERPA, 2018.



Fonte: SERPA, 2018.

## 1.13 Análise eletroforética

### 1.13.1 Isocitrato Liase

A isocitrato liase participa do ciclo do glioxilato nos glioxissomos, que está envolvido no metabolismo de lipídeos de armazenamento em sementes oleaginosas (CARVALHO, 2014). Com a redução na atividade dessa enzima, a conversão de lipídeos em açúcares é reduzida, denotando que a hidrólise desses lipídeos e consequentemente a qualidade fisiológica dessas sementes é afetada.

Para a enzima isocitrato liase foi constatada uma diminuição em sua expressão do endosperma de PB (5) para amêndoa de PA (6) (Figura 11) (considera-se amêndoa os materiais de endosperma e resquícios do cotilédone que ainda não haviam sido consumidos no processo germinativo).

Observa-se a expressão dessa enzima logo após a dispersão da planta-mãe nos cotilédones da semente SQ (Figura 12) e um posterior decréscimo de 31% observado em PB e essa atividade está diretamente ligada a quebra de lipídeos presente nessas estruturas. A presença dessa enzima nos materiais de SQ pode ser proveniente da síntese —de novo, oriunda do processo de formação das sementes. Esses resultados contradizem os observados por Lado (1968) que fez o estudo com sementes de mamona onde a atividade era crescente nos cotilédones após a embebição.

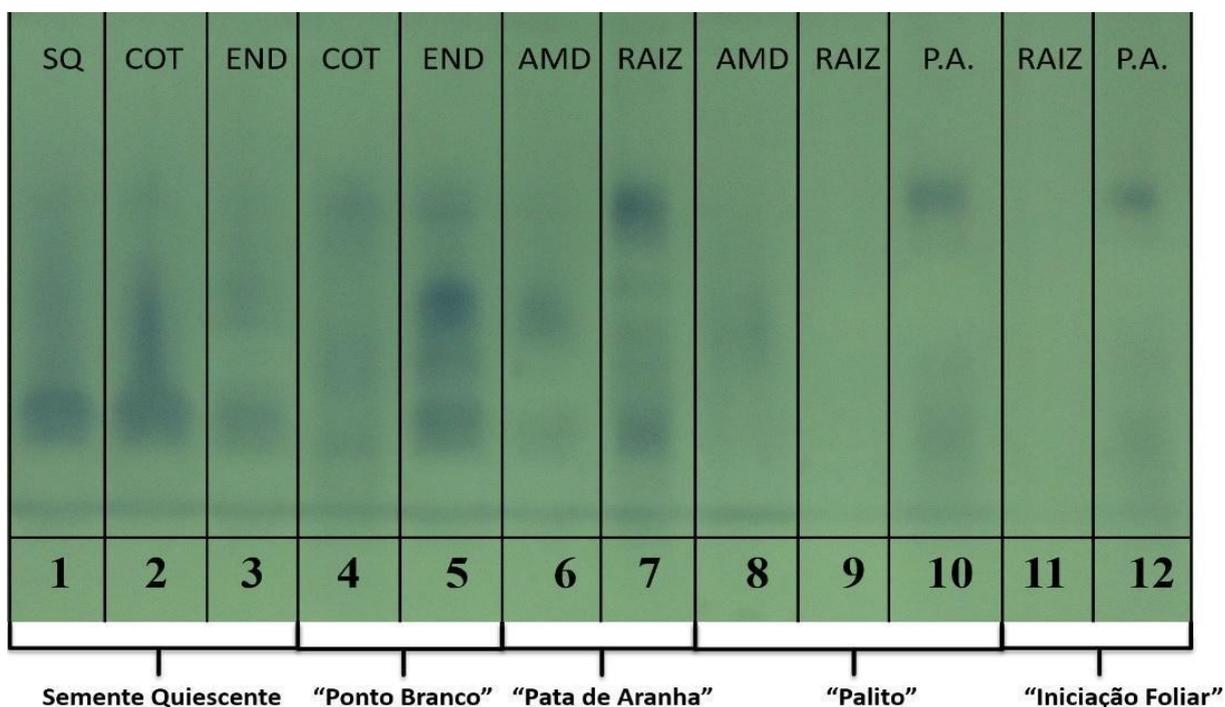
Ocorreu um aumento na atividade de ICL em endosperma de SQ para PB de 68%, onde estava ocorrendo o ciclo do glioxilato para exportação de açúcares que serão utilizados no desenvolvimento de raiz e parte aérea.

Em PA (Figura 12), as plântulas não dependem mais exclusivamente das reservas da semente para seu desenvolvimento, podendo assimilar nutrientes presentes no substrato de cultivo, não sendo tão danosa queda de ICL em amêndoa, para o processo germinativo.

A atividade dessa enzima nos diferentes materiais confirma que as sementes de seringueira possuem o ciclo do glioxilato ativo.

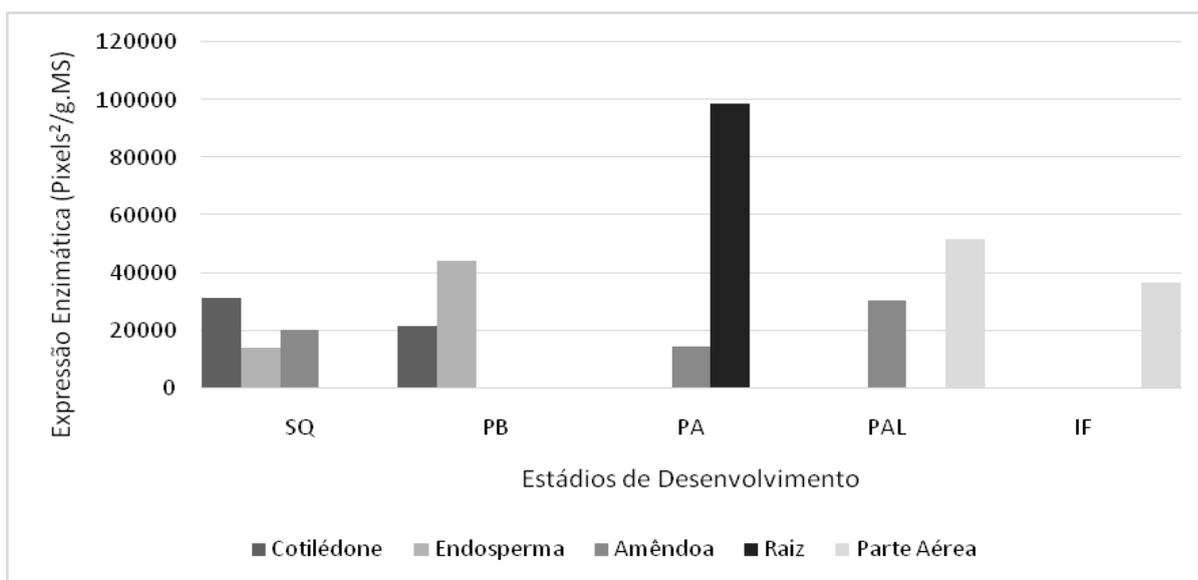
É possível que nos tecidos de raiz (9) (Figura 11) a quebra dos TAGs ocorra por meio da  $\beta$ -oxidação, liberando energia e metabólitos através do Ciclo de Krebs. Esta hipótese é levantada somente para tecidos que não possuem os lipídeos como o principal composto de reserva como por exemplo as raízes, que segundo Alencar (2003) possuem como principal conteúdo de reserva as proteínas e os açúcares.

**Figura 11** - Expressão enzimática da isocitrato liase (ICL) nas colunas: 1- semente quiescente; 2 – cotilédone em SQ; 3 – endosperma em SQ; 4 – cotilédone em PB; 5 - endosperma em PB; 6 – amêndoa em PA; 7 – raiz em PA; 8 – amêndoa em PA; 9 – raiz em PAL; 10 – parte aérea em PAL; 11 – raiz em IF; 12 – parte aérea em IF, de sementes de seringueira.



Fonte: SERPA, 2018.

**Figura 12** - Quantificação em Pixel<sup>2</sup> por mg de matéria seca da expressão enzimática da isocitrato liase (ICL) nos estádios de desenvolvimento: semente quiescente (SQ) para cotilédone, endosperma e semente inteira; —ponto branco (PB) para cotilédone e endosperma; —pata de aranha (PA) para amêndoa e raiz; —palíto (PAL) para amêndoa raiz e parte aérea; iniciação foliar (IF) para raiz e parte aérea, de sementes de seringueira.



Fonte: SERPA, 2018.

### 1.13.2 Lipoxigenase

O metabolismo dos lipídeos das plantas envolve atividades de muitos tipos de lipases, esterases, lipoxigenases e quinases com diferentes preferências de substrato e condições de estresse. Dois processos sobrepostos podem ser distinguidos: primeiro, relacionado à manutenção da estrutura da membrana e o segundo, associado ao sistema de sinalização mediada por lipídeos que permite a adaptação ao ambiente em mudança (MATOS; PHAM-THI, 2009, OKAZAKI; SAITO, 2014). As lipoxigenases induzem a atividade de enzimas antioxidantes no intuito de amenizar os danos causados por esses hidroperóxidos no metabolismo celular.

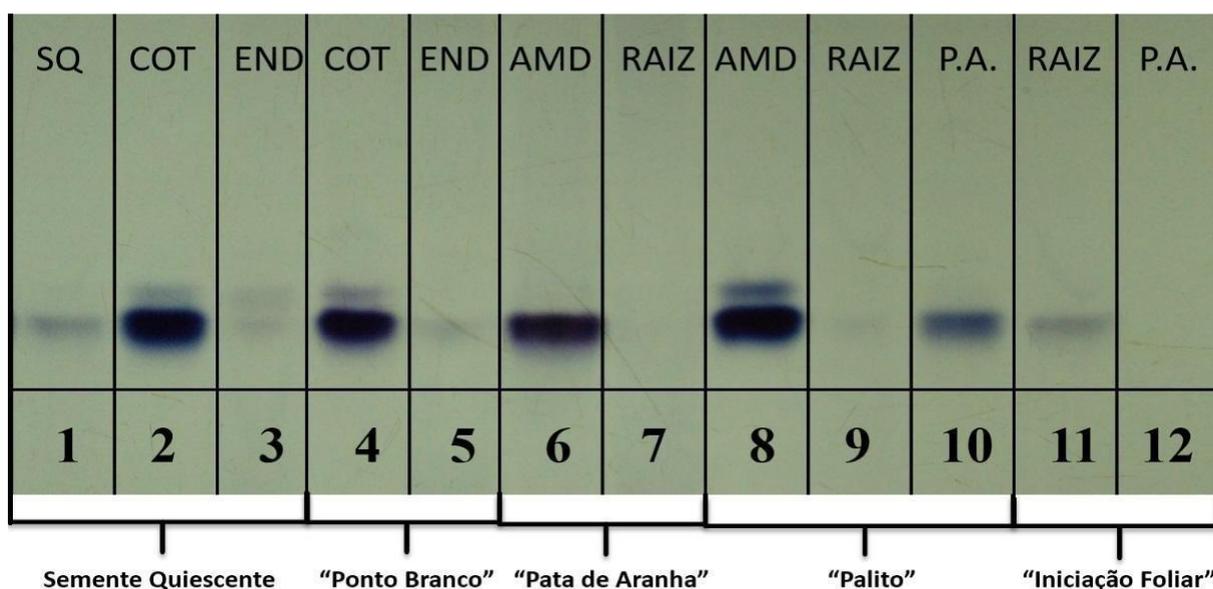
A maior expressão da lipoxigenase foi observada nos cotilédones e amêndoa nas colunas 2,4,6 e 8 (Figura 13). A principal função da LOX é a produção de moléculas de defesa em resposta a fatores de estresse como ferimentos e condições climáticas adversas como a seca (GHANEM et al., 2012). Analisando-se o comportamento enzimático durante a germinação e desenvolvimento dessas sementes, pode-se observar que sua atividade foi predominante no cotilédone nos estádios iniciais, pois ela é a principal proteína constituinte dos corpos lipídicos em fase de mobilização de TAGs (FEUBNER, 1992).

Ocorreu um aumento da expressão enzimática nos cotilédones de SQ para PB (Figura 14) de 23%, decorrente de um possível aumento na peroxidação lipídica. Por se tratar de uma enzima que é ativada em condições de estresse, uma pressão mecânica por parte do endosperma da semente principalmente no momento após sua embebição (coluna – 4; Figura 13), pode favorecer a expressão nesses tecidos.

A amêndoa, no decorrer da germinação, é um órgão fonte de nutrientes a fim de suprir a demanda de crescimento das raízes e da parte aérea que passa por sucessivas transformações metabólicas, ela está exposta a condições adversas como excesso de umidade e entrada de patógenos, fatores que podem favorecer a maior atividade de LOX nesses tecidos, onde ocorre um aumento de 61% da amêndoa de PA para PAL (Figura 14).

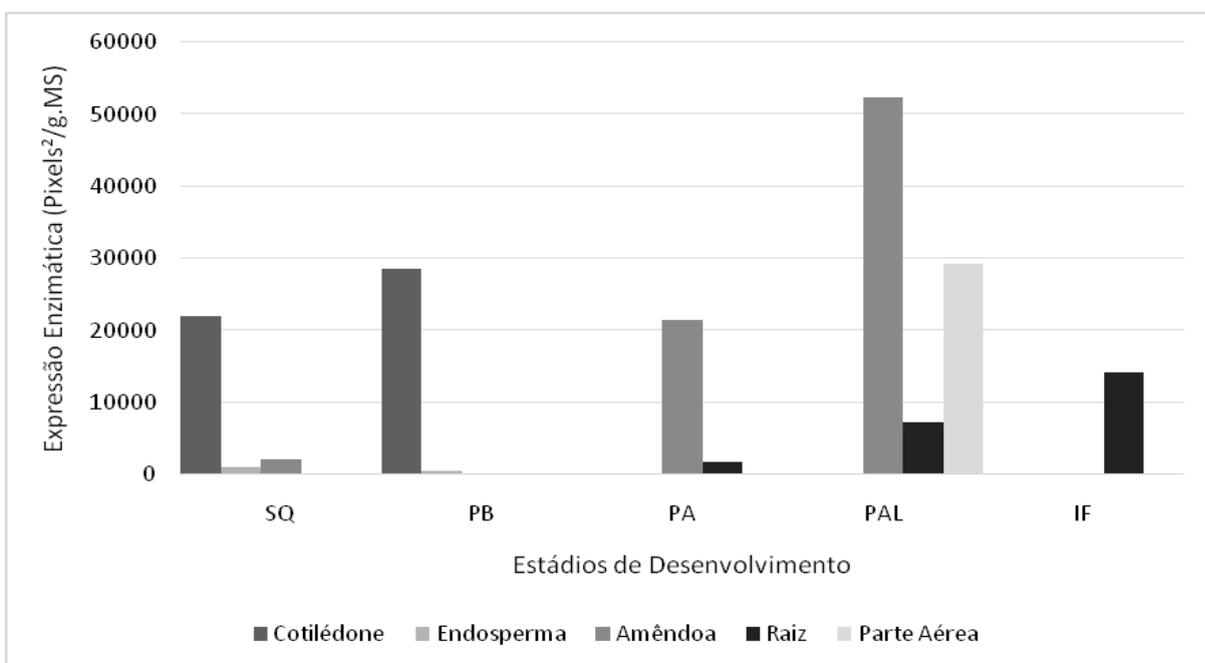
Nos estudos com *Hevea spp*, observa-se que o ácido graxo mais abundante é o linoleico, seguido por esteárico e dos ácidos linolênico e palmítico (SHAN, 2012; LIU et al., 2018), principais substratos para as LOXs (MAZUR et al., 2018). Esses corpos lipídicos se ligam a proteínas, iniciando o processo de degradação lipídica.

**Figura 13** - Expressão enzimática da lipoxigenase (LOX) nas colunas: 1- semente quiescente; 2 – cotilédone em SQ; 3 – endosperma em SQ; 4 – cotilédone em PB; 5 - endosperma em PB; 6 – amêndoa em PA; 7 – raiz em PA; 8 – amêndoa em PA; 9 – raiz em PAL; 10 – parte aérea em PAL; 11 – raiz em IF; 12 – parte aérea em IF, de sementes de seringueira.



Fonte: SERPA, 2018.

**Figura 14** - Quantificação em Pixel<sup>2</sup> por mg de matéria seca da expressão enzimática da lipoxigenase (LOX) nos estádios de desenvolvimento: semente quiescente (SQ) para cotilédone, endosperma e semente inteira; —ponto branco (PB) para cotilédone e endosperma; —pata de aranha (PA) para amêndoa e raiz; —palito (PAL) para amêndoa raiz e parte aérea; iniciação foliar (IF) para raiz e parte aérea, de sementes de seringueira.



Fonte: SERPA, 2018.

### 1.13.3 Antioxidantes

#### 1.13.3.1 Catalase

Durante a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de seringueira, observa-se a expressão enzimática da catalase (CAT) em SQ – 0 DAS (Figura 16), podendo esta ser oriunda do processo de formação da semente, sendo sua presença a garantia da redução dos efeitos da peroxidação de compostos vitais para o metabolismo durante a germinação.

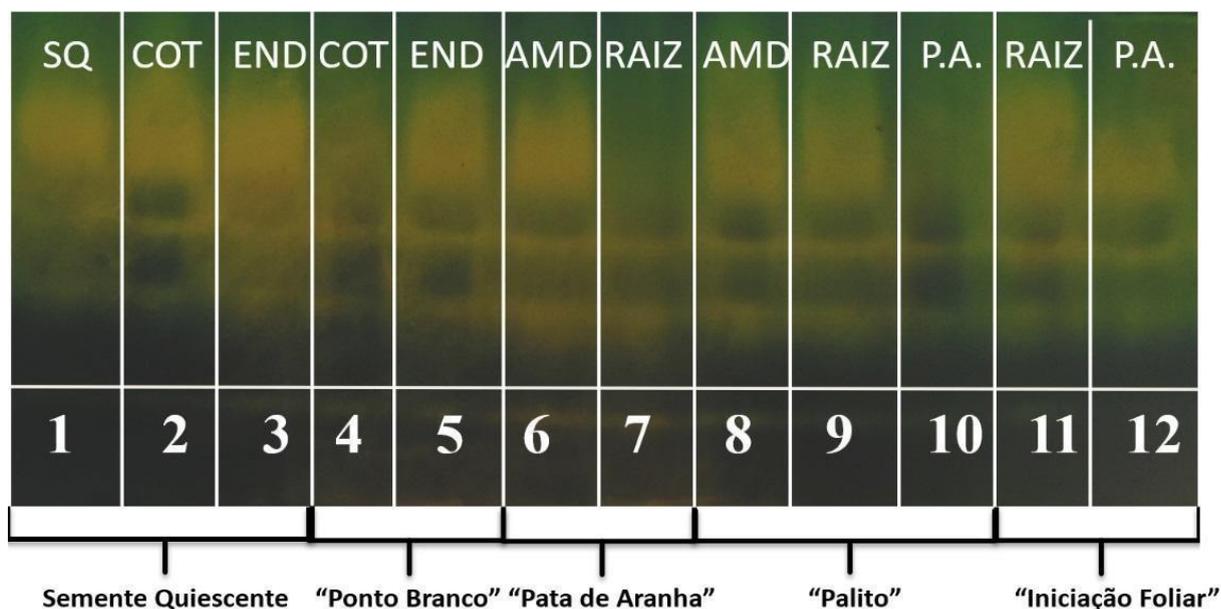
Os valores de CAT nos materiais de endosperma e amêndoa em PA – 13 DAS e PAL – 18 DAS elevam-se gradualmente no decorrer do desenvolvimento germinativo, sendo esta uma característica vantajosa, podendo sua expressão ser considerada como um marcador no processo de degradação nesses tecidos (SANTOS, 2010). Diversos autores observaram a diminuição da expressão da CAT no decorrer do armazenamento das sementes, considerando que essas sementes permanecessem em condições ambientais adequadas para prolongar sua vida útil (GOEL et al., 2003; SUNG; CHIU, 1995; SUNG, 1996; BAILLY 1996).

Na raiz, assim como no endosperma e na amêndoa, ocorreu um aumento na expressão dessa enzima no decorrer do desenvolvimento germinativo, reafirmando sua importância no

processo de remoção das EROS durante os processos metabólicos que auxiliam na expansão celular. A remoção do peróxido de hidrogênio e seu alto nível em praticamente todos os tecidos podem estar associados a necessidade de desintoxicar as células envolvidas na intensa hidrólise de lipídeos naquele momento (JORDY, 2000), e em outros eventos produtores desse peróxido.

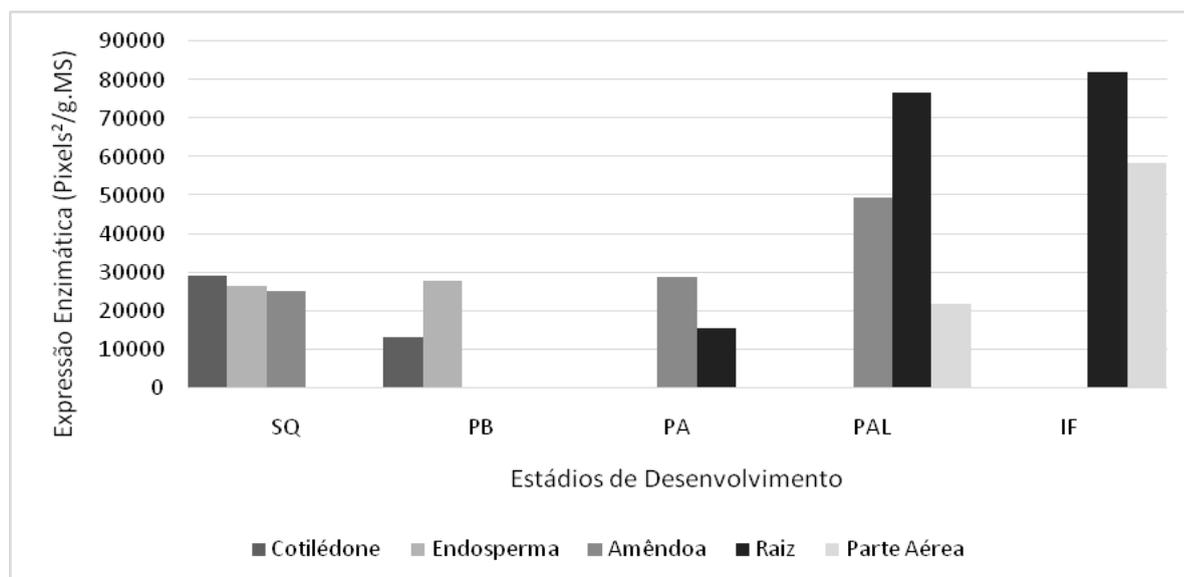
A CAT apresenta uma das maiores taxas de recuperação de todas as enzimas, sendo capaz de converter aproximadamente 6 000.000 (seis milhões) de moléculas de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  por minuto (GIL, TUTEJA, 2010). Atua na remoção do peróxido de hidrogênio, formado nos peroxissomos e nos glioxissomos durante a  $\beta$ -oxidação de lipídeos, fotorrespiração e catabolismo da purina (GIL; TUTEJA, 2010; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011).

**Figura 15** - Expressão enzimática da catalase (CAT) nas colunas: 1- semente quiescente; 2 – cotilédone em SQ; 3 – endosperma em SQ; 4 – cotilédone em PB; 5 – endosperma em PB; 6 – amêndoa em PA; 7 – raiz em PA; 8 – amêndoa em PA; 9 – raiz em PAL; 10 – parte aérea em PAL; 11 – raiz em IF; 12 – parte aérea em IF, de sementes de seringueira.



Fonte: SERPA, 2018.

**Figura 16** - Quantificação em Pixel<sup>2</sup> por mg de matéria seca da expressão enzimática da catalase (CAT) nos estádios de desenvolvimento: semente quiescente (SQ) para cotilédone, endosperma e semente inteira; —ponto branco (PB) para cotilédone e endosperma; —pata de aranha (PA) para amêndoa e raiz; —palito (PAL) para amêndoa raiz e parte aérea; iniciação foliar (IF) para raiz e parte aérea, de sementes de seringueira.



Fonte: SERPA, 2018.

### 1.13.3.2 Glutathiona Peroxidase

A presença da glutathiona peroxidase (GPX) em SQ – 0 DAS, para os materiais de endosperma, cotilédone e amêndoa sugere assim como para CAT (Figura 15), que sua presença seja oriunda do processo de formação da semente (Figura 18).

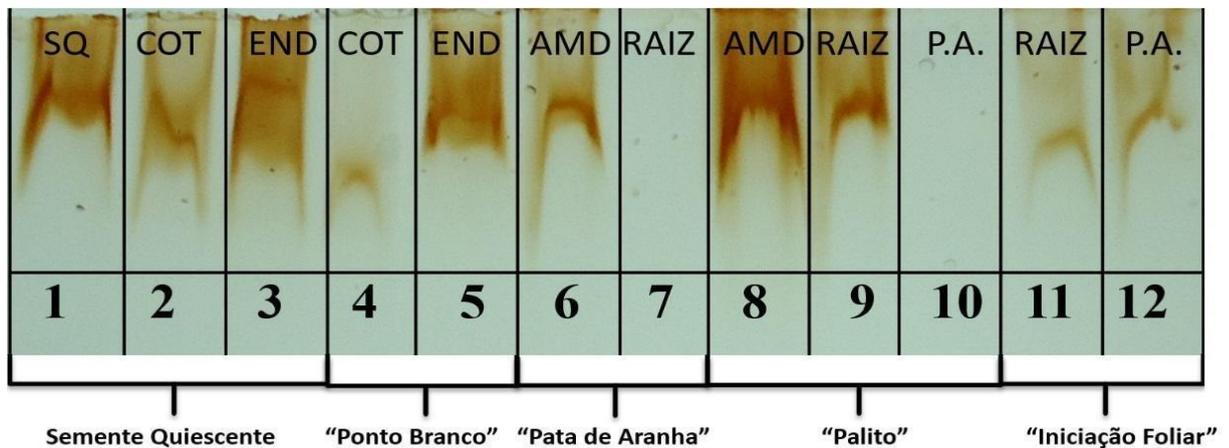
A expressão da GPX apresentou baixa expressão para os materiais de cotilédone em PB, raiz em PA e parte aérea em PAL (Figura 17), comportamento similar ao observado na expressão da CAT nesses materiais. Desse modo, é possível que outras enzimas do sistema antioxidante como a APX estejam atuando na remoção das EROs.

Ocorreu uma elevação na expressão da enzima quando comparados os materiais de endosperma de SQ para PB e de amêndoa de PA para PAL. Este comportamento crescente durante a germinação também foi observado por Andarwulam (1999) no estudo da atividade antioxidante associada a mobilização de lipídeos em sementes de *Pangium edule* Reinw, onde atribuiu-se essa elevação a presença de compostos fenólicos que durante o processo germinativo atuam na lignificação e estruturação das plantas.

Hura et al. (2014), no estudo de sementes de *colza*, observou uma elevação na atividade da GPX em materiais expostos a inoculação fúngica, esses resultados se

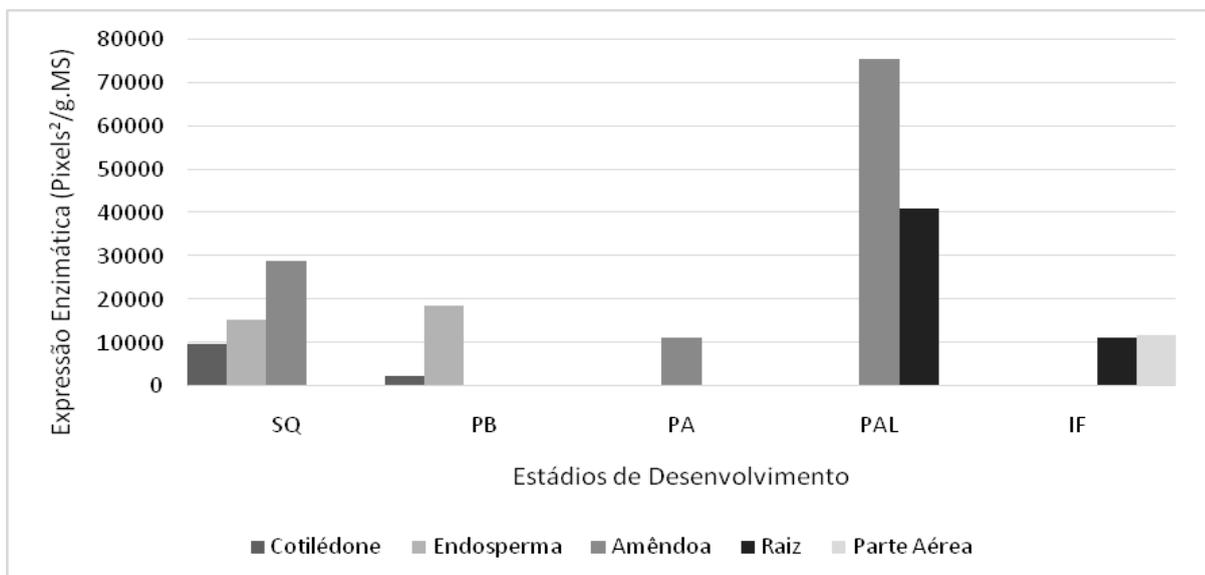
assemelham aos obtidos para amêndoa em PAL, onde as reservas lipídicas já haviam quase que completamente sido exauridas expondo-as a condições de estresse quando observou-se a presença de patógenos nessas sementes.

**Figura 17** - Expressão enzimática da glutatona peroxidase (GPX) nas colunas: 1- semente quiescente; 2 – cotilédone em SQ; 3 – endosperma em SQ; 4 – cotilédone em PB; 5 - endosperma em PB; 6 – amêndoa em PA; 7 – raiz em PA; 8 – amêndoa em PA; 9 – raiz em PAL; 10 – parte aérea em PAL; 11 – raiz em IF; 12 – parte aérea em IF, de sementes de seringueira.



Fonte: SERPA, 2018.

**Figura 18** - Quantificação em Pixel<sup>2</sup> por mg de matéria seca da expressão enzimática da glutatona peroxidase (GPX) nos estádios de desenvolvimento: semente quiescente (SQ) para cotilédone, endosperma e semente inteira; —ponto branco (PB) para cotilédone e endosperma; —pata de aranha (PA) para amêndoa e raiz; —palito (PAL) para amêndoa raiz e parte aérea; iniciação foliar (IF) para raiz e parte aérea, de sementes de seringueira.



Fonte: SERPA, 2018.

### 1.13.3.3 Superóxido Dismutase

Observa-se as Figuras 19 e 20, que a expressão da superóxido dismutase (SOD) se manteve elevada em todas as partes da semente e plântula, durante o processo germinativo, isso pode estar relacionado abaixo formação e acumulação de espécies reativas ao oxigênio, que culminam em uma redução na qualidade fisiológica das sementes.

A primeira barreira enzimática no sistema antioxidante em condições de estresse é a SOD, sua dismutação gera o peróxido ( $H_2O_2$ ) que deve ser removido da célula para evitar a conversão de radicais livres (PERL-TREVES; PERL, 2002). Na literatura são encontrados relatos da redução da atividade de SOD em sementes de espécies oleaginosas em função do nível de qualidade das mesmas. Em sementes viáveis de soja foi constatada a presença de SOD já nas primeiras horas da embebição, porém naquelas não viáveis não houve atividade (STEWART; BEWLEY, 1980).

Em sementes de seringueira, houve um aumento na expressão enzimática da SOD indicando a viabilidade das sementes utilizadas, resultado contrário ao observado em sementes de algodão (GOEL et al., 2003) e de amendoim (SUNG; JENG, 1994) que estavam em declínio. Rafii et al. (2012), avaliando o comportamento enzimático de sementes de pinhão manso em vários estágios de desenvolvimento observaram que a SOD reduzia sua atividade a medida que o teor de umidade das sementes decrescia, assim como podemos observar em SQ. A medida que o tecido embrionário reinicia sua hidratação esta enzima retoma sua atividade, como visto em PB (Figura 20).

Pode-se observar na Figura 19, a baixa atividade da SOD em todos os materiais de SQ – 0 DAS, quando comparada ao demais materiais. Isso se deve pois por se tratar de uma espécie recalcitrante, as sementes já são dispersas com seu grau de maturidade elevado, iniciando-se seu processo degradativo. Após a germinação e embebição dos tecidos, que pode ser observado no estágio de PB – 9 DAS, em diante a atividade dessa enzima se eleva.

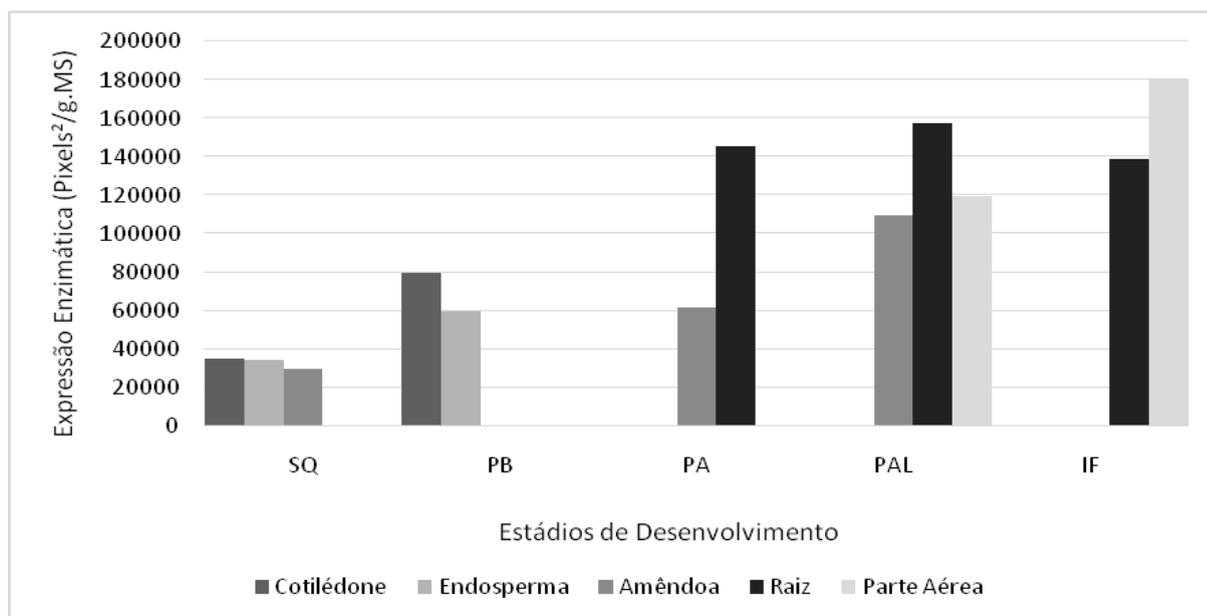
O perfil eletroforético obtido também chama a atenção para o tempo pós-colheita dessas sementes, pois apesar de terem sido colhidas e semeadas cerca de dois dias após a dispersão, sua senescência já pode ter sido iniciada. Como sementes de seringueira possuem elevado teor de óleo (47%), pressupõe-se que estas estejam mais vulneráveis à deterioração por peroxidação de lipídeos (CORTE et al., 2010).

**Figura 19** - Expressão enzimática da superóxido dismutase (SOD) nas colunas: 1- semente quiescente; 2 – cotilédone em SQ; 3 – endosperma em SQ; 4 – cotilédone em PB; 5 - endosperma em PB; 6 – amêndoa em PA; 7 – raiz em PA; 8 – amêndoa em PA; 9 – raiz em PAL; 10 – parte aérea em PAL; 11 – raiz em IF; 12 – parte aérea em IF, de sementes de seringueira.

SQ	COT	END	COT	END	AMD	RAIZ	AMD	RAIZ	P.A.	RAIZ	P.A.
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Semente Quiescente		"Ponto Branco"			"Pata de Aranha"		"Palito"			"Iniciação Foliar"	

Fonte: SERPA, 2018.

**Figura 20** - Quantificação em Pixel<sup>2</sup> por mg de matéria seca da expressão enzimática da superóxido dismutase (SOD) nos estádios de desenvolvimento: semente quiescente (SQ) para cotilédone, endosperma e semente inteira; —ponto branco (PB) para cotilédone e endosperma; —pata de aranha (PA) para amêndoa e raiz; —palito (PAL) para amêndoa raiz e parte aérea; iniciação foliar (IF) para raiz e parte aérea, de sementes de seringueira.



Fonte: SERPA, 2018.

## CONCLUSÃO

Nas sementes de seringueira, pode ser evidenciado um decréscimo progressivo no conteúdo de lipídeos e nos valores de matéria seca ao longo da mobilização de reservas. A variação nos valores de matéria seca de sementes quiescentes deve-se a alta variabilidade genética das progênes.

As isoformas de invertase apresentaram valores variados para os diferentes tecidos analisados pois atuam em compartimentos celulares diferentes com atividades específicas. A atividade de IAV encontra-se mais acentuada em tecidos maduros. A atividade de IAP foi maior em comparação com IAV e INC pois é característica de zonas de crescimento ativo. Já a atividade de INC é relativamente inferior as invertases ácidas, pois é uma enzima expressa em tecidos visando a manutenção dos carboidratos.

O ciclo do glioxilato está ativo em sementes de *Hevea spp.* devido a presença da enzima exclusiva isocitrato liase (ICL) já nas primeiras horas do crescimento ativo de sementes quiescentes, fato este ligado à sua —síntese de novo|| oriunda do processo de formação da semente.

A máxima proporção de degradação de lipídeos e sacarose ocorre na raiz aos 13 DAS, onde observa-se taxas reduzidas de sacarose no endosperma.

A expressão da lipoxigenase (LOX) em cotilédones ocorre, pois ela é a principal proteína constituinte dos corpos lipídicos em fase de mobilização de triacilgliceróis. Ocorre ainda expressivo aumento de LOXs em amêndoa de PA para PAL, pois elas são órgãos fonte que estão sendo sujeitas a sucessivos processos metabólicos para suprir a demanda dos órgãos dreno.

A elevada atividade da CAT e GPX em SQ sugerem que essas enzimas são oriundas do processo de formação da semente. A atividade da SOD foi superior as da CAT e GPX pois ela é a primeira barreira de desintoxicação celular. O aumento da atividade de SOD no decorrer do processo germinativo denota a boa hidratação desses tecidos, reduzindo a formação de EROs. A manutenção da atividade das enzimas CAT, SOD e GPX no sistema antioxidante auxiliam na remoção de EROS que podem causar danos celulares e afetar a qualidade das sementes.

## REFERÊNCIAS

- ABDUL-BAKI, A. A.; ANDERSON, J. D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. **Seed biology**, v. 2, p.283-316, 1972.
- ALENCAR, MAA de. **Mobilização e distribuição de reservas de sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) durante a germinação e o crescimento inicial**. Lavras: UFLA. Dissertação (Mestrado), 2003.
- ALFENAS, A.C. Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos. **Viçosa: UFV**, 2006. 627p.
- ALMAGRO, L.; GÓMEZ-ROS, L. V.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; ROSBARCELO, A.; PEDREÑO, M. A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 2, p. 377-390, 2008.
- ALVES, R. M. M.; LEMOS, G. B. de; BOTELHO, M. do N.; OLIVEIRA, L. E. M. de; LIMA, D. U. Distribuição das reservas durante a germinação e desenvolvimento inicial da planta de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) em função da disponibilidade de nutrientes no substrato. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., 1995, Lavras. Resumos**. Lavras: UFLA, 1995. p. 258.
- ANJUM, N.A; SOFO A; SCOPA, A; ROYCHOUDHURY, A; GILL, S.S; IGBAL, M; LUKATIN, A.S; PEREIRA, E; DUARTE, A.C; AHMAD, I. Lipids and proteins—major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants. **Environmental Science and Pollution Research**. V. 22, n. 6, p. 4099–4121, 2015.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual review of plant biology**, v. 50, n. 1, p. 601-639, 1999.
- AXELROD, B; CHEESBROUGH, T. M.; LAAKSO, S. [53] Lipoxygenase from soybeans: EC 1.13. 11.12 Linoleate: oxygen oxidoreductase. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1981. p. 441-451.
- BAILLY, C.; BENAMAR, A.; COBINEAU, F.; CÔME, D. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Physiologia Plantarum**, v. 97, n. 1, p. 104-110, 1996.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, n. 1, p. 93-107, 2004.
- BARBOSA, M.R.; SILVA, M.M.A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T.R. Plant generation and enzymatic detoxification of reactive oxygen species. **Ciência Rural** v. 44, n. 3, p. 453–460, 2014.
- BARROS, J. G. A. Efeito do inibidor de protease Kunitz sobre níveis de lipoxigenases em sementes de soja. **Ciência Agrotécnica**, v. 32, n. 4, p. 11261132, 2008.

- BAUD, S; J. P., MIGUEL, M., LEPINIEC, L., & ROCHAT, C. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 151-160, 2002.
- BERJAK, P, PAMMENTER, N.W. From Avicennia to Ziziana: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**. v. 101, n. 2, p.213–228, 2007.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: **Plenum Press**, 1994. 445p.
- BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: **Science Publishers**, 2010. p.1-30.
- BORGES, R.C.F.; COLLAÇO JUNIOR, J.C.; SCARPARO, B.; NEVES, M.B.; CONEGLIAN, A. Caracterização da curva de embebição de sementes de pinhão-mansô. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v. 8, n. 13, p. 1-8, 2009.
- BONOME, L.T.S.; MOREIRA, S.A.F.; OLIVEIRA, L.E.M.; SOTERO, A. J. Metabolism of carbohydrates during the development of seeds of the brazilian rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. De Juss) Muell.- Arg.]. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 211–219, 2011.
- BORISJUK, L; WALENTA, S., ROLLETSCHEK, H., MUELLER-KLIESER, W., WOBUS, U., & WEBER, H. Spatial analysis of plant metabolism: sucrose imaging within *Vicia faba* cotyledons reveals specific developmental patterns. **The Plant Journal**, v. 29, n. 4, p. 521-530, 2002.
- CAIRO, P. A. R. et al. Atividade da rubisco e das enzimas de síntese de hidrólise de sacarose, associada à produtividade de látex, em clones de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd ex. ADR. De Juss.) Muell-Arg] cultivados em Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p.369-376, 2009.
- CARMO, CAF de S.; GOMES, R. Formação de mudas e instalação de seringal. **Informe Agropecuário**, n. 21, p. 18-25, 1985.
- CARVALHO, E. R. et al. Alterações isoenzimáticas em sementes de cultivares de soja em diferentes condições de armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 12, p. 967-976, 2014.
- CHENG, W; CHOUREY, P. S. Genetic evidence that invertase-mediated release of hexoses is critical for appropriate carbon partitioning and normal seed development in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 3-4, p. 485-495, 1999.
- CHING, T. M.; SCHOOLCRAFT, I. Physiological and Chemical Differences in Aged Seeds 1. **Crop Science**, v. 8, n. 4, p. 407-409, 1968.
- CIONI, M.; PINZAUTI, G.; VANNI, P. Comparative biochemistry of the glyoxylate cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 70, n. 1, p. 1-26, 1981.

COPELAND, L.: Enzymes of sucrose metabolism. **Methods in Plant Biochemistry**. v. 3, p. 73-85, 1990.

CORTE VB, BORGES EEL, LEITE HG, PEREIRA BLC, GONÇALVES JFC (2010). Estudo enzimático da deterioração de sementes de *Melanoxylon braúna* submetidas ao envelhecimento natural e acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1, p. 83-91, 2010.

DE GARA, L; LOCATO, V.; DIPIERRO, S.; & DE PINTO, M. C. Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 173, p. S13-S19, 2010.

DE OLIVEIRA, D.A., PIOVESAN, N.D., JOSÉ, I.C., DE BARROS, E.G., CUNHA, D., DIAS, F.D.S. e MOREIRA, M.A. LIPOXIGENASES E TEOR DE ÁCIDO LINOLÊNICO RELACIONADOS À QUALIDADE DE SEMENTES DE SOJA1. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28 n. 1, p.30-35, 2006.

DE SOUZA GONÇALVES, P; CARDOSO, M; ORTOLANI, A.A.. Origem, variabilidade e domesticação da Hevea; uma revisão. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 25, n. 2, p. 135-156, 1990.

DELOUCHE, J. C. Physiology of seed storage. In: **Amer Seed Trade Assoc Hybrid Corn Indus Res Conf Proc**. v. 23, p. 83-90, 1968.

DIETZ, K. J. Thiol-based peroxidases and ascorbate peroxidases: why plants rely on multiple peroxidase systems in the photosynthesizing chloroplast? **Molecules and Cells**. v. 39, n. 1, p. 20-25, 2016.

EEK, P.; JARVING, R.; JARVING, I.; GILBERT, N. C.; NEWCOMER, M. E, & SAMUEL, N. Structure of a calcium-dependent 11R-lipoxygenase suggests a mechanism for Ca<sup>2+</sup> regulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 26, p. 22377-22386, 2012.

EVANGELISTA, C. M., & ARCE, R. D. Spectrophotometric analysis of the lipoxygenase action on soybeans soaked at different temperatures. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 17, n. 3, p. 270-274, 1997.

FAZAL, M.A., HASEEB, A.S.M.A., MASJUKI, H.H., **Comparative corrosive characteristics of petroleum diesel and palm biodiesel for automotive materials Fuel Processing Technology** (91) 1308-1315, 2010.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. 2014, **Ciência e agrotecnologia**, vol. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FEUßNER, I; HELMUT, K. "A lipoxygenase is the main lipid body protein in cucumber and soybean cotyledons during the stage of triglyceride mobilization." *Febs Letters* 298, no. 2-3 (1992): 223-225.

FEUSSNER, I; KÜHN, H; WASTERACK, C. Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. **Trends in plant science**, v. 6, n. 6, p. 268-273, 2001.

- GARCIA, A.; VIEIRA, R. D. Germinação, armazenamento e tratamento fungicida de sementes de seringueira. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 128-133, 1994.
- GHANEM, M. E., GHARS, M. A., FRETTEINGE, P., PÉREZ-ALFOCEA, F., LUTTS, S., WATHELET, J. P., ... & FAUCONNIER, M. L. Organ-dependent oxylipin signature in leaves and roots of salinized tomato plants (*Solanum lycopersicum*). **Journal of plant physiology**, v. 169, n.11, p. 1090-1101, 2012.
- GIL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.
- GOEL, A.; GOEL, A.K.; SHEORAN, I.S. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum L.*). **Journal of Plant Physiology**, v.160, p. 1093-1100, 2003.
- GONÇALVES, P. S., ORTOLANI, A. A. & CARSOSSO, M. **Melhoramento genético da seringueira: uma revisão**. Documentos IAC, 54. Instituto Agronômico, Campinas. 55 p, 1997.
- GONÇALVES, P. S.; BATAGLIA, O. C.; ORTOLONI & F. da S FONSECA. **Manual de heveicultura para o Estado de São Paulo**. Boletim Técnico IAC n. 189, 2001, 78 p.
- GONÇALVES, P. de S.; MARQUES, J. R. B. **Melhoramento genético da seringueira: passado, presente e futuro**. ALVARENGA, A. de P.; CARMO, CAF de S. do (Coord.). Seringueira. Viçosa: EPAMIG, p. 399-498, 2008.
- GONÇALVES, P. S.; FONTES, J. R. A. Domesticação e melhoramento de seringueira. In: ALUÍZIO BORÉM; MARIA TEREZA G. LOPES; CHARLES R. CLEMENT. (ORG.). **Domesticação e melhoramento-Espécies amazônicas**. 1ed., 2009, p. 395-423.
- GRAHAM, I. A. Seed storage oil mobilization. **Annual Review Plant Biology**, v. 59, p. 115-142, 2008.
- GULSEN, O.; EICKHOFF, T.; HENG-MOSS, T.; SHEARMAN, R.; BAXENDALE, F.; SARATH, G.; LEE, D. Characterization of peroxidase changes in resistant and susceptible warm-season turf grasses challenged by *Blissus occiduus*. **ArthropodPlant Interact**, v. 4, n. 1, p. 45-55, 2010.
- HARRINGTON, J. F. Armazenamento e longevidade das sementes. **Biologia de sementes**, v. 3, p. 145-245, 1972.
- HILDEBRAND, David F. Lipoxygenases. **Physiologia Plantarum**, v. 76, n. 2, p. 249-253, 1989.
- HIRAGA, S.; SASAKI, K.; HIROYUKI, I.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidase. **Plant Cell Physiology**, v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001.
- HIROSE, T; TAKANO, M; TERAOKA, T. Cell wall invertase in developing rice caryopsis: molecular cloning of OsCIN1 and analysis of its expression in relation to its role in grain filling. **Plant and Cell Physiology**, v. 43, n. 4, p. 452-459, 2002.

- HOLMAN, RT. Crystalline lipoxidase. 11Lipoxidase Activity. **Archives Biochemistry**, v. 15, p. 403-413, 1947.
- HUANG, T. C., WANG, S. T., & GROBBELAAR, N. (1993). Circadian rhythm mutants of the prokaryotic *Synechococcus* RF-1. **Current Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 249-254, 1993.
- HURA, K.; HURA, T.; BĄCZEK-KWINTA, R.; GRZESIAK, M.; PŁAŻEK, A. Induction of defense mechanisms in seedlings of oilseed winter rape inoculated with *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). **Phytoparasitica**. v. 42, n. 2, 2014.
- KARUPPANAPANDIAN, T. et al. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 709-725, 2011.
- KIM, Y.H.; KWAK, S.S. The role of antioxidant enzymes during leaf development. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: **Science Publishers**, p.129-150, 2010.
- ImageJ<sup>®</sup>, **IMAGE PROCESSING AND ANALYSIS IN JAVA**. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/>. Acesso em: 13/01/18.
- INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS - IAC. **Programa Seringueira**. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/seringueira/>>. Acesso em: 17 nov. 2017.
- INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP - IRSG. **Production and consumption of natural rubber**. Rubber industry Report. Statistics [Online]. Disponível <em: <http://www.rubberstudy.com> > Acesso em: 17 fev de 2017.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill Book Company, Inc.; London, 1940.
- JORDY, M. N.; DANTI, S., FAVRE, J. M., & RACCCHI, M. L. Histological and biochemical changes in *Pinus spp.* seeds during germination and post-germinative growth: triacylglycerol distribution and catalase activity. **Functional Plant Biology**, v. 27, n. 12, p. 1109-1117, 2000.
- KAGAWA, T.; MCGREGOR, D. I.; BEEVERS, Harry. Development of enzymes in the cotyledons of watermelon seedlings. **Plant physiology**, v. 51, n. 1, p. 66-71, 1973.
- KRAUS, J. E; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: Edur, 1997.
- KOCH, K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Current opinion in plant biology**, v. 7, n. 3, p. 235-246, 2004.
- KORNBERG, H. L.; KREBS, e HA. Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle. **Nature**, v. 179, n. 4568, p - 988, 1957.
- KORNBERG, H. L. The metabolism of C2 compounds in micro-organisms. 1. The incorporation of [2-14C] acetate by *Pseudomonas fluorescens*, and by a *Corynebacterium*, grown on ammonium acetate. **Biochemical Journal**, v. 68, n. 3, p. 535, 1958.

LADO, P.; SCHWENDIMANN, M.; MARRE, E. Repression of isocitrate lyase synthesis in seeds germinated in the presence of glucose. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis**, v. 157, n. 1, p. 140-148, 1968.

LEEGOOD, R.C. & LEA, P. J. **Plant biochemistry and molecular biology** (2 ed). John Wiley, Chichester; New York, 1999.

LI AVONCHANKA, A; FEUSSNER, I. Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. **Journal of plant physiology**, v. 163, n. 3, p. 348-357, 2006.

LI, M.; LI, L.; DUNWELL, J. M.; QIAO, X.; LIU, X.; & ZHANG, S. Characterization of the lipoxygenase (LOX) gene family in the Chinese white pear (*Pyrus bretschneideri*) and comparison with other members of the Rosaceae. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 444, 2014.

Li, Z. & FOX, J. Mapping rubber tree growth in mainland Southeast Asia using time-series MODIS 250 m NDVI and statistical data. **Applied Geography**, 32(2), 420–432, 2011.

LIU, Shujin et al. HbNIN2, a cytosolic alkaline/neutral-invertase, is responsible for sucrose catabolism in rubber-producing laticifers of *hevea brasiliensis* (para rubber tree). **New Phytologist**, v. 206, n. 2, p. 709-725, 2015.

LIU, Jin-Ping et al. Molecular mechanism of ethylene stimulation of latex yield in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) revealed by de novo sequencing and transcriptome analysis. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 257, 2016.

LIU, P. et al. Performance characteristics of rubber seed oil biodiesel. In: **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. IOP Publishing, 2018. p. 012073.

MANIVONG, V. & R.A. CRAMB. Economics of smallholder rubber expansion in Northern Laos. **Agroforestry Systems**, v. 74, n. 2, p.113–125, 2008.

MATOS, A. R; PHAM-THI, A.T. Lipid deacylating enzymes in plants: Old activities, new genes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 491-503, 2009.

MAZUR, R.; TRZCINSKA-DANIELEWICZ, J.; KOZLOWSKI, P.; KOWALEWSKA, Ł.; RUMAL, I.; SHIELL, B. J.; ... & GARSTKA, M. et al. Dark-chilling and subsequent photo-activation modulate expression and induce reversible association of chloroplast lipoxygenase with thylakoid membrane in runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 122, p. 102-112, 2018.

MCDONALD, M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science Technologic**, v. 27, p. 177–237, 1999.

MELAN, M. A; DONG, X.; ENADARA, M. E.; DAVIS, K. R.; AUSUBEL, F. M., & PETERMAN, T. K. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, v. 101, n. 2, p. 441-450, 1993.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, v.7, n. 9, p.405-410, 2002.

MOREIRA, S. A. F. **Morpho-anatomical, physiological and biochemical characterization of developmen of rubber tree (*Hevea spp.*) seeds.** 2009.

MURPHY, D.J.; VANCE, J. Mechanisms of lipid-body formation. **Trends Biochemical Science**, v. 24, n. 3, p. 109–115, 1999.

OKAZAKI, Y; SAITO, K. Roles of lipids as signaling molecules and mitigators during stress response in plants. **The Plant Journal**, v. 79, n. 4, p. 584-596, 2014.

ONOJI, S. E.; IYUKE, S. E.; IGBAFE, A. I. *Hevea brasiliensis* (Rubber seed) oil: Extraction, characterization, and kinetics of thermo-oxidative degradation using classical chemical methods. **Energy Fuels**, v. 30, n. 12, p. 10555– 10567.

PRABPREE, A., SANGSIL, P., NUALSRI, C., & NAKKANONG, K. Expression profile of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and phenolic content during early stages of graft development in bud grafted *Hevea brasiliensis*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 88-95, 2018.

PERL-TREVES, R; PERL, A. Oxidative stress: an introduction. **Oxidative stress in plants**, p. 1-32, 2002.

RAFII, M. Y; AROLU, I. W.; OMAR, M. H. A.; & LATIFF, M. A. Genetic variation and heritability estimation in *Jatropha curcas* L. population for seed yield and vegetative traits. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 11, p. 2178-2183, 2012.

REN, F. Z., CHEN, S. H., LI, L. H., ZHANG, X. X., ZHENG, Z. H., & DONG, A. H. Chemical constituents of the seed shell of *Hevea brasiliensis*. **Chinese Journal of New Drugs**, v. 19, n. 20, 2012.

REPETTO, M., SEMPRINE, J., & BOVERIS, A. Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. In **Lipid peroxidation**. InTech. 2012.

RESHAD, A. S.; TIWARI, P.; GOUD, V. V. Extraction of oil from rubber seeds for biodiesel application: Optimization of parameters. **Fuel**. v. 150, p. 636– 644, 2015.

RICHARDSON, D. E; REGINO, C. A.; YAO, H.; & JOHNSON, J. V. Methionine oxidation by peroxymonocarbonate, a reactive oxygen species formed from CO<sub>2</sub>/bicarbonate and hydrogen peroxide. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 12, p. 1538-1550, 2003.

ROACH, T. IVANOVA, M., BECKETT, R. P., MINIBAVEVA, F. V., GREEN, I., PRITCHARD, H. W., & KRANNER, I. An oxidative burst of superoxide in embryonic axes of recalcitrant sweet chestnut seeds as induced by excision and desiccation. **Physiologia plantarum**, v. 133, n. 2, p. 131-139, 2008.

SANTOS, H.O. **Conservação de sementes de mamona (*Ricinus communis L.*)**. Lavras, 2010. 104p. Dissertação (M.S.)-Universidade Federal de Lavras.

SHABAN, M. Aging in orthodox seeds is a problem. **International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research**, v. 1, n 11, p. 1296–1301, 2013.

SHARON, H. KARUPPASAMY, K., SOBAN KUMAR, D.R. A test on DI diesel engine fueled with methyl esters of used palm oil. **Renewable Energy**, v. 47, p. 160-166 , 2012.

SHIGEMATSU, A., MIZOUE, N., KAJISA, T., & Yoshida, S. Importance of rubberwood in wood export of Malaysia and Thailand. **New Forests**, v. 41, n. 2, p. 179-189.

SHIMADA, T. L.; HAYASHI, M; HARA-NISHIMURA, I. Membrane Dynamics and Multiple Functions of Oil Bodies in Seeds and Leaves. **Plant physiology**, v. 176, n. 1, p. 199-207, 2018.

SIEDOW, J. N. Plant lipoxygenase: structure and function. **Annual review of plant biology**, v. 42, n. 1, p. 145-188, 1991.

SUNG, J.M.; CHIU, C.C. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. **Plant Science**, v. 110, n. 1, p. 45-52, 1995.

SUNG, J. M.; JENG, T. L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. **Physiologia Plantarum**, v. 91, n. 1, p. 51-55, 1994.

STEWART, R. R.C; BEWLEY, J. D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. **Plant Physiology**, v. 65, n. 2, p. 245-248, 1980.

TAKEUCHI, C. M. **Aspectos produtivos e econômicos da Hevea brasiliensis [(Wild. Ex ADR de Juss.) Muell. Arg] no Estado do Acre**. Monografia em especialização em economia e meio ambiente. 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 6. ed, Porto Alegre: Artmed, 2017.

TOMLINSON, K.L.; MCHUGH, S.; LABBE, H.; GRAINGER, J.L.; JAMES, L.E.; POMEROY, K.M.; MULLIN, J.W.; MILLER, S.S.; DENNIS, D.T.; MIKI, B.L.A. Evidence that the hexose-to-sucrose ratio does not control the switch to storage product accumulation in oilseeds: analysis of tobacco seed development and effects of overexpressing apoplastically invertase. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n. 406, p. 2291-2303, 2004.

VIEIRA, R. D.; BERGAMASCHI, M.C.M.; MINOHARA, L. Qualidade fisiológica de sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) tratadas com benlate durante o armazenamento. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 52, n. 1, p. 151-157, 1995.

WANG, Bin et al. Transcriptomic analyses reveal complex and interconnected sucrose signaling cascades in developing seeds of castor bean. **Journal of plant physiology**, v. 221, p. 1-10, 2018.

WALTERS, C., BERJAK, P., PAMMENTER, N., KENNEDY, K., & RAVEN, P. Preservação de sementes recalcitrantes. **Science**, v. 339, n. 6122, p. 915-916, 2013.

WAR, A. R.; PAULRAJ, M. G.; AHMAD, T.; BUHROO, A. A.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA H. C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 10, p. 1306-1320, 2012.

WINTER, H.; HUBER, Steven C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in plant sciences**, v. 19, n. 1, p. 31-67, 2000.

WOBUS, U; WEBER, H. Sugars as signal molecules in plant seed development. **Biological chemistry**, v. 380, n. 7-8, p. 937-944, 1999.

WORLD AGROFORESTRY DATABASE. **A tree species reference and selection guide**. Disponível em: <http://www.worldagroforestrycentre.org/sea/Products/AFDbases/AF/asp/SpeciesInfo.asp?SpID=17>. Acesso: 30 de Julho de 2016.

ZIEGLER, A.D., J. Fox and J. Xu. The rubber juggernaut. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1024–1025, 2009.

ZUMA, B; DANA, M B.; WANG, D. Prolonged expression of a putative invertase inhibitor in micropylar endosperm suppressed embryo growth in Arabidopsis. **Frontiers in plant science**, v. 1, n. 9, p. 61, 2018.