

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CÂMPUS DE CHAPADÃO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

MAYARA FÁVERO COTRIM

**FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X: DISTRIBUIÇÃO DE MACRONUTRIENTES E
DESEMPENHO FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE *Crotalaria ochroleuca***

CHAPADÃO DO SUL - MS
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CÂMPUS DE CHAPADÃO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

MAYARA FÁVERO COTRIM

**FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X: DISTRIBUIÇÃO DE MACRONUTRIENTES E
DESEMPENHO FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE *Crotalaria ochroleuca***

Orientador: Prof. Dr. Josué Bispo da Silva

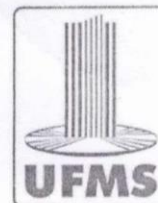
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Charline Zaratin Alves

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, área de
concentração: Produção Vegetal.

CHAPADÃO DO SUL - MS
2019



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Campus de Chapadão do Sul



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

DISCENTE: Mayara Fávero Cotrim

ORIENTADOR (A): Prof. (a) Dr. (a) Josue Bispo da Silva

**Fluorescência de raios x: distribuição de macronutrientes e desempenho
fisiológico de sementes de *Crotalaria ochroleuca***

Prof.(a) Dr.(a) Presidente Josue Bispo da Silva

Prof.(a) Dr.(a) Cid Naudi Silva Campos

Prof.(a) Dr.(a) Hudson Wallace Pereira de Carvalho

Chapadão do Sul, 28 de Fevereiro de 2019.

Dedico

À deus,

*Gratidão a Deus e a
santíssima trindade por todas as
bênçãos concedidas durante toda
minha vida.*

Aos meus pais,

Clóvis e Marlene

*Por todo o amor, dedicação,
renúncias, orações e apoio em
minhas escolhas.*

À minha irmã,

Maríci

*Pela amizade,
cumplicidade, companheirismo e
apoio nos momentos difíceis da
minha vida*

Ao meu avô (in memoriam),

Clóvis

*Pela sabedoria, exemplo e
valores a mim dedicados.*

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus, Jesus e Espírito Santo pelo dom da vida e saúde, por guiar meus passos durante esta jornada e pela força e proteção concedidas para lutar por meus objetivos.

À **Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS, campus Chapadão do Sul** por todo ensinamento durante a graduação e mestrado. Á todos os professores e funcionários desta instituição, que participaram direta e indiretamente deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. **Josué Bispo da Silva** pela confiança, paciência, ensinamentos, oportunidades e auxílio em todo o decorrer do período experimental. A minha querida Co-Orientadora **Charline Zaratin Alves** pela valiosa orientação, conhecimento e paciência, por ter cedido seu tempo para sanar muitas de minhas dúvidas e muitas vezes confortar minhas aflições e ansiedades. Muito obrigada por tudo!

Ao **Laboratório de Tecnologia de Sementes** por todo conhecimento concedido e preparo profissional durante o mestrado. Em especial a técnica do laboratório e Prof. Dra. **Ana Carina da Silva Cândido** pela ajuda, conselhos, auxílio e amizade durante a graduação e mestrado.

Á todos os colegas do Laboratório de Tecnologia de Sementes: **Mariely, Viviane, Anieli, Rhayra, Graziely e Roney**, pelo convívio, ajuda e contribuições para este trabalho.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP) e ao **Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN)** pela oportunidade de aprendizado, conhecimentos, realização do experimento e principalmente ao Prof. Dr. **Hudson Wallace Pereira Carvalho, técnico e demais alunos** por todo auxílio e ensinamentos durante a condução do experimento.

As minhas amigas de coração **Flávia Mendes Lourenço, Daniela Nunes e Joyce Magri** por toda a amizade e confiança, me aconselhando sempre nos momentos bons e ruins, estando presentes mesmo que distantes!

Ao meu companheiro e noivo Prof. Dr. **Ricardo Gava** pelo amor, atenção, incentivo, carinho, amizade e respeito. Você foi essencial neste período e sem você nada disso teria se concretizado!

Aos meus pais **Clóvis Tadeu Cotrim e Marlene Aparecida Fávero, irmã Marici Fávero Cotrim Mariotti e avô Clóvis Cotrim (in memoriam)**, não há palavras que expressem a minha gratidão á vocês. Obrigada por tanta renúncia, dedicação, conselhos e lições. Vocês sempre serão meu porto seguro, meu exemplo de vida, independente de tudo!

EPÍGRAFE

*“Se enxerguei mais longe, foi porque estava
sobre ombros de gigantes.”*

(Isaac Newton)

*“Todos os nossos sonhos podem se tornar
realidade – se tivermos a coragem de
persegui-los.”*

(Autor desconhecido)

*“Compreendi que tudo em nossas vidas, todas as
coisas que gastam tanto do nosso tempo e
da nossa energia para construir, tudo é
passageiro, tudo é feito de areia; o que
permanece é só o relacionamento que
temos com as outras pessoas. Mais cedo ou
mais tarde, uma onda virá e destruirá ou
apagará o que levamos tanto tempo para
construir. E quando isso acontecer,
somente aquele que tiver as mãos de outro
alguém para segurar, será capaz de rir e
recomeçar.”*

(William Shakespeare)

RESUMO

COTRIM, Mayara Fávero. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Fluorescência de raios X: distribuição de macronutrientes e desempenho fisiológico de sementes de *Crotalaria ochroleuca*

Professor Orientador: Dr. Josué Bispo da Silva

Este trabalho apresenta o uso de técnicas de fluorescência de raios X para avaliar a distribuição espacial de nutrientes e associar ao desempenho fisiológico em tecnologia de sementes que apresentam variações no comportamento germinativo. Logo, objetivou-se avaliar as técnicas de fluorescência de raios X para estimar o desempenho fisiológico entre diferentes colorações do tegumento de sementes de *Crotalaria ochroleuca*, com base no teor e distribuição de macronutrientes em suas estruturas. Os tratamentos consistiram na separação das sementes pelas cores do tegumento amarelo, verde, vermelho e o tratamento testemunha (mistura de cores conforme ocorrência natural) em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Para avaliar o desempenho fisiológico foram analisados o teor de água, germinação, primeira contagem de germinação, índice de velocidade de germinação, condutividade elétrica, emergência de plântulas, comprimento e massa seca de plântulas. Através das técnicas de espectroscopia de fluorescência de raios X foram realizadas análises quantitativas (concentração de Ca, P, K e S no tegumento e na semente inteira) e qualitativas (mapeamento dos macronutrientes), com três repetições. Técnicas de EDXRF e μ XRF são eficientes e promissoras para diferenciar o desempenho fisiológico de sementes de *C. ochroleuca* com base nos teores e distribuição de macronutrientes em diferentes estruturas. O Ca predomina-se no tegumento e o K, S e P são encontrados em toda a extensão do eixo embrionário. Sementes de tegumento amarelo e verde possuem maior teor e distribuição de nutrientes no eixo embrionário conferindo alta capacidade germinativa e desempenho fisiológico. Em sementes vermelhas há maior retenção de nutrientes no tegumento e menor assimilação, sendo menos vigorosas, interferindo diretamente na qualidade de lotes comerciais.

PALAVRAS-CHAVE: Tecnologia de sementes. Capacidade germinativa. Morfologia interna.

ABSTRACT

COTRIM, Mayara Fávero. Federal University of Mato Grosso do Sul. X-Rays fluorescence: macronutrient distribution and physiological performance in seeds of *Crotalaria ochroleuca*

Advisor: Dr. Josué Bispo da Silva.

This work presents the use of X - ray fluorescence techniques to evaluate the spatial distribution and the physiological effects of proteins with germination characteristics. The objective of this study was to evaluate the X-ray fluorescence techniques to estimate the physiological performance between different seed coat colorings of *Crotalaria ochroleuca*, based on the macronutrient content in their structures. The treatments consisted of seed separation by the colors of the yellow, green, red tegument and the control treatment (color mixing according to natural occurrence in commercial lots) in a completely randomized design, with four replications. To evaluate the physiological performance was estimated the water content, germination, first germination count, germination speed index, electrical conductivity, seedling emergence, seedling length and dry mass. X-ray fluorescence spectroscopy techniques were analyzed with quantitative analyzes (concentration of Ca, P, K and S in coat and whole seed) and qualitative (macronutrient mapping) analyzes with three replicates. EDXRF and μ XRF techniques are efficient to differentiate the physiological performance of *C. ochroleuca* seeds based on macronutrient contents and distribution in different structures. Ca predominates in the coat and K, S and P are found throughout the embryonic axis. Seeds of yellow and green coat have higher content and distribution of nutrients in the embryonic axis conferring high germinative capacity and physiological performance. In red seeds there is greater retention of nutrients in the tegument and less assimilation, being less vigorous, interfering directly in the quality of commercial lots.

KEY-WORDS: Seed technology. Germinative capacity. Internal morphology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA		PÁGINA
1	Concentração (ppm) dos macronutrientes Ca, P, K e S presentes no tegumento (A) e na semente inteira (B) em função da coloração do tegumento de sementes de <i>C. ochroleuca</i>	28
2	Variáveis canônicas entre os testes de germinação (G), emergência (E) (A) e comprimento do hipocótilo (CH), massa seca do hipocótilo (MSH) (B) e os teores de Ca, P, K e S em função das colorações do tegumento amarelo, verde e vermelho de sementes de <i>C. ochroleuca</i>	30
3	Imagem captada por μ -XRF e respectivo mapa de distribuição de cálcio na região do hipocótilo (H), radícula (R), micrópila (M), cotilédone (C) e tegumento (T) de sementes de <i>C. ochroleuca</i> de tegumento amarelo (a), verde (b) e vermelho (c).....	32
4	Imagem captada por μ -XRF e respectivo mapa de distribuição de fósforo na região do hipocótilo (H), radícula (R), micrópila (M), cotilédone (C) e tegumento (T) de sementes de <i>C. ochroleuca</i> de tegumento amarelo (a), verde (b) e vermelho (c).....	34
5	Imagem captada por μ -XRF e respectivo mapa de distribuição de potássio na região do hipocótilo (H), radícula (R), micrópila (M), cotilédone (C) e tegumento (T) de sementes de <i>C. ochroleuca</i> de tegumento amarelo (a), verde (b) e vermelho (c).....	36
6	Imagem captada por μ -XRF e respectivo mapa de distribuição de enxofre na região do hipocótilo (H), radícula (R), micrópila (M), cotilédone (C) e tegumento (T) de sementes de <i>C. ochroleuca</i> de tegumento amarelo (a), verde (b) e vermelho (c).....	38

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
1	Teor de água (TA), germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), índice de velocidade de germinação (IVG) e emergência de plântulas (E) entre colorações diferentes do tegumento de sementes de <i>C. ochroleuca</i>.....	26
2	Comprimento do hipocótilo (CH), comprimento da radícula (CR), massa seca do hipocótilo (MSH), massa seca da radícula (MSR) e condutividade elétrica (CE) entre colorações do tegumento de sementes de <i>C. ochroleuca</i>.....	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 IMPORTÂNCIA E MORFOLOGIA DA CROTALARIA.....	12
2.3 CONTEÚDO DE RESERVAS.....	13
2.1 DESEMPENHO FISIOLÓGICO E VIGOR DE SEMENTES	14
2.2 TÉCNICAS DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X.....	14
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPÍTULO 1 - FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X: DISTRIBUIÇÃO DE MACRONUTRIENTES E DESEMPENHO FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE <i>Crotalaria ochroleuca</i>.....	20
RESUMO	20
ABSTRACT	21
INTRODUÇÃO	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
ANÁLISES DO DESEMPENHO FISIOLÓGICO.....	23
TÉCNICAS DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X	24
ANÁLISES ESTATÍSTICAS	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

Pesquisas em tecnologia de sementes têm se concentrado nas etapas iniciais do estabelecimento de plântulas, buscando identificar as causas de variação no comportamento germinativo, alinhando-as com o conhecimento da composição química que influenciam a germinação e o potencial de armazenamento.

As Crotalárias são cultivadas anualmente em diversas regiões tropicais e subtropicais por seu potencial de fixação de nitrogênio, alta produção de biomassa (PISSINATI; MOREIRA; SANTORO, 2018), controle de fitonematoides, resistência a estresses hídricos, ciclagem de nutrientes (WANG et al., 2009), supressão de plantas daninhas pelo efeito alelopático (MIYAZAWA et al., 2010), além de apresentar fibras de alta qualidade utilizada na fabricação de papéis especiais (SENGUPTA; DEBNATH, 2018). Portanto, o cultivo destas leguminosas torna-se importante para culturas em sucessão, proporcionando sustentabilidade aos sistemas de produção.

Sementes de *Crotalaria ochroleuca* se diferenciam quanto à coloração do tegumento, característica das famílias Fabaceae e Euphorbiaceae, podendo estar associada a maturação das sementes e/ou caráter genético (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012; CASTELLANI; AGUIAR; PAULA, 2009). Segundo Dongen et al. (2003) uma das principais funções do tegumento é a distribuição de nutrientes para o embrião.

Dentre os nutrientes, o Potássio (K) é o íon inorgânico presente em grandes concentrações nas sementes, geralmente superando os teores de Cálcio (Ca) (MARCOS FILHO, 2015). A translocação adequada de Enxofre (S) aos tecidos é importante para maximizar o funcionamento das proteínas (HAWKESFORD; DE KOK, 2006), interferindo diretamente no vigor.

White e Veneklaas (2012) asseguraram que em um meio sem fósforo (P), as reservas das sementes com o nutriente sustentam o crescimento de plântulas de milho por diversas semanas após a germinação, até que a planta obtenha três ou mais folhas e um sistema radicular vigoroso. Em sementes de *Vigna radiata* L., o crescimento do eixo embrionário na fase I e II da germinação, depende do influxo de Cálcio (Ca) do apoplasto e sua inibição está associada a participação de peroxidase apoplástica influenciando a germinação e o crescimento inicial das plântulas (SINGH; CHAUDHURI; KAR, 2015).

A concentração e localização mineral no interior das sementes, obtidas através de técnicas de fluorescência de raios X, possibilitam a compreensão dos processos fisiológicos e bioquímicos (GREGORY et al., 2017; MATHERS et al., 2017; ZAMAN et al., 2018), melhoram o entendimento sobre a redistribuição elementar durante o desenvolvimento das sementes (IWAI et al., 2012), determinam a localização dos elementos nos grãos (KYRIACOU et al., 2014) e. contribuem ainda para o desenvolvimento tecnológico de processos de biofortificação (AJIBOYE et al., 2015).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar as técnicas de fluorescência de raios X para estimar o desempenho fisiológico entre diferentes colorações do tegumento de sementes de *Crotalaria ochroleuca*, com base no teor e distribuição de macronutrientes em suas estruturas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância e morfologia da Crotalaria

O cultivo de Crotalárias tem ganhado destaque no mercado sementeiro devido sua eficiência no controle de nematoides, fixação de nitrogênio (PISSINATI; MOREIRA; SANTORO, 2018; GARRIDO et al., 2008) e por ser uma alternativa para agricultura sustentável (PEREIRA et al., 2017). Apresentam crescimento determinado, mas o florescimento e desenvolvimento das sementes são desuniformes (CALEGARI et al., 1993), ocasionando em uma mesma planta sementes em diversos estádios de maturação. Logo, para o sucesso da cultura à campo é necessário o uso de sementes de boa qualidade que apresentam similaridade de comportamento, para garantir estabelecimento de plantas adequado, característica importante nos sistemas de produção.

A *Crotalaria ochroleuca* L. é uma leguminosa forrageira caracterizada como planta herbácea, rústica, ereta, pouco ramificada, caule glabro, vagens cilíndricas que variam em cerca de 4 a 6 cm de comprimento e podem conter em uma única vagem, aproximadamente, cinquenta sementes, as quais apresentam variações na coloração do tegumento (FLORES; TOZZI, 2018). Diversos estudos relacionaram a coloração do tegumento de sementes de Fabaceae com a viabilidade e o vigor (BORJI; GHORBANLI; SARLAK, 2007; ERTEKIN; KIRDAR, 2010), como também a influência da composição química do revestimento da semente (LEE et al, 2017).

As sementes em desenvolvimento são constituídas de vários tecidos maternos que passam por modificações desde a fertilização até a maturação. Dentre eles, o tegumento (em dicotiledôneas) desempenha diversas funções, como por exemplo, a atuação no direcionamento de vários compostos ao embrião durante a germinação (SREENIVASULU; WOBUS, 2013).

2.3 Conteúdo de reservas

O conhecimento da composição química e dos mecanismos de deposição e mobilização de reservas é imprescindível para a tecnologia de produção de sementes, considerando-se que tanto a germinação e o vigor, quanto o potencial de armazenamento, são influenciados pelos compostos presentes (BEWLEY et al., 2013). Sob o ponto de vista fisiológico, os compostos armazenados podem funcionar como fontes de energia para sustentar processos metabólicos em funcionamento, ou como fontes de nutrientes para a construção de novos tecidos vegetais que irão originar uma plântula (COCUCCI; MARIATH, 2004).

Dentre os componentes essenciais, destaca-se o amido, sendo o principal constituinte de grãos de cereais, armazenado principalmente na forma de amilose e amilopectina, ambas hidrolisadas pela enzima α e β amilase durante o metabolismo normal e na germinação, exigindo a presença de Ca (MARCOS FILHO, 2015). Assim, as alterações nas propriedades funcionais do amido devido à falta ou excesso de Ca, influenciam diretamente o potencial fisiológico de sementes. Por outro lado, baixas concentrações de S reduzem a conversão de aminoácidos e subsequentemente em proteínas (HANEKLAUSS et al., 2007), interferindo diretamente no metabolismo e influenciando a qualidade das sementes.

O K atua na síntese de proteínas, de forma que, em plantas com baixos teores, há redução na síntese, com acúmulo de aminoácidos, amidas, aminas e nitratos (MALAVOLTA, 2006). Outro nutriente importante como fonte de energia aos processos metabólicos na fase inicial da germinação, é o P, com cerca de 60 a 80% na forma de ácido fítico (GUPTA; GANGOLIYA; SINGH, 2015). Em nível sistêmico, o crescimento radicular é favorecido pelo crescimento de brotações, indicativo de maximizar a exploração do solo e, assim, a absorção de nutrientes (GRUBER et al., 2013). Em condições limitantes de Pi nas reservas há mudanças radicais no crescimento e metabolismo das plantas (MATTHUS et al., 2019).

2.1 Desempenho fisiológico e vigor de sementes

A utilização de sementes com alto potencial fisiológico é importante principalmente para a garantia de estabelecimento de plantas uniformes e pela redução de falhas no plantio. Logo, o desenvolvimento de métodos padronizados que forneçam dados confiáveis e precisos para a estimativa do desempenho de plântulas é essencial.

O teste de germinação tem sido aceito internacionalmente para aferir o potencial fisiológico de sementes (ISTA, 2009), porém possui limitações que predizem o desempenho em condições favoráveis, raramente encontradas a campo (MARCOS FILHO, 2015). Para tanto, são necessários a utilização de testes alternativos que, indiretamente, procuram avaliar atributos que se relacionam com a emergência a campo (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

Os testes baseados no desempenho ou característica de plântulas como por exemplo: índice de velocidade de germinação, primeira contagem, emergência, comprimento e massa seca de plântulas e condutividade elétrica, foram desenvolvidos para estimar a eficiência dos mecanismos de reparo, atuando nas fases I e II da embebição, isto é, quando há maior consumo de energia para atividades metabólicas, há prejuízos a velocidade de germinação e ao desenvolvimento de plântulas (MARCOS FILHO, 2015). Desta forma, sementes vigorosas geram plântulas mais desenvolvidas, refletindo a eficiência da ação de mecanismos de reparo, mobilização de reservas e síntese de novos tecidos durante a germinação.

Embora os testes de vigor permitam informações úteis para vários segmentos da indústria de sementes, muitos consomem período de tempo relativamente longo e são subjetivos, dependendo de critérios estabelecidos pelos próprios analistas. Logo, uma alternativa promissora para conferir maior rapidez e consistência de informações obtidas, pode ser a utilização de técnicas de fluorescência de raios X para estimar o desempenho fisiológico com base nos teores de nutrientes presentes.

2.2 Técnicas de fluorescência de raios X

Atualmente, técnicas de análise de imagens estão sendo cada vez mais utilizadas para a avaliação da morfologia interna e do vigor de sementes. Estas

técnicas caracterizam-se por empregar recursos computadorizados, o que reduz o tempo para a análise e aumenta a padronização dos resultados.

A espectroscopia de fluorescência de raios X (XRF) é uma técnica analítica elementar para avaliação qualitativa e quantitativa, permitindo a avaliação de vários nutrientes ao mesmo tempo, em curto período de tempo, conferindo maior rapidez no processo e, conseqüentemente, melhor tomada de decisão sobre o destino do produto. Dentre as técnicas, o uso da fluorescência de micro raios X (μ -XRF) pode ser utilizada para monitorar a composição elementar mineral de um único ponto ou produzir linhas e imagens 2D (RODRIGUES et al., 2018).

A energia emitida pelos fótons é característica de cada elemento químico, portanto, pode-se usar essa energia como uma impressão digital que permite a identificação elementar (GRIEKEN; MARKOWICZ, 1993). Além disso, o número de fótons emitidos é diretamente proporcional a quantidade de átomos emissores, assim, a área do pico de XRF produz informação quantitativa (RODRIGUES et al., 2018).

A medição da concentração e localização mineral no interior das sementes pode facilitar a compreensão dos processos fisiológicos e bioquímicos (GREGORY et al., 2017; MATHERS et al., 2017; ZAMAN et al., 2018), aprimorar a compreensão da redistribuição elementar durante o desenvolvimento das sementes (IWAI et al., 2012), permitir a localização dos elementos em suas estruturas (KYRIACOU et al., 2014) e ainda auxiliar o desenvolvimento tecnológico dos processos de biofortificação (AJIBOYE et al., 2015).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJIBOYE, B.; CAKMAK, I.; PATERSON, D.; de JONGE, M.D.; HOWARD, D.L., STACEY, S.P. et al. X-ray fluorescence microscopy of zinc localization in wheat grains biofortified through foliar zinc applications at different growth stages under field conditions. **Plant Soil**, v.392, p.357-370, 2015.

BEWLEY, J. D et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. New York: Springer, 2013. 392 p.

BORJI, M.; GHORBANLI, M.; SARLAK, M. Some seed traits and their relationship to seed germination, emergence rate, and electrical conductivity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Asian Journal of Plant Science**, v.6, p.781-787, 2007.

CALEGARI, A. et al. Caracterização das principais espécies de adubo verde. In: COSTA, M.B.B. (Coord.). **Adubação verde no Sul do Brasil**. 2. ed. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1993. p. 207-328.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4^a Ed. Jaboticabal, Funep, 2012. 588 p.

CASTELLANI, E. D.; AGUIAR, I. B.; PAULA, R. C. Bases para a padronização do teste de germinação em três espécies de *Solanum* L. **Revista Brasileira de Sementes**, v.3, n.2, p.77-85, 2009.

COCUCCI, A. E.; MARIATH, J. E. A. Gametogênese, fecundação, seleção do gametófito mais apto, embriogênese e diásporo maduro. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Ed.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 15-30.

DONGEN, J. T. van et al. Structure of the developing pea seed coat and the post phloem transport pathway of nutrients. **Ann. Bot**, v.91, p.729-737, 2003.

ERTEKIN, M.; KIRDAR, E. Effects of seed coat colour on seed characteristics of honeylocust (*Gleditsia triacanthos*). **African Journal of Agricultural Research**, v.5, p. 2434-2438, 2010.

FLORES, A. S.; TOZZI, A. M. Uma sinopse do gênero Crotalária (Leguminosae) no Brasil. **Phytotaxa**, v.346, n.1, p.31-58, 2018.

GARRIDO, M. S. et al. Management of crotalaria and pigeon pea for control of yam nematode diseases. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.3, p.222-227, 2008.

GREGORY, P. J. et al. Approaches to reduce zinc and iron deficits in food systems. **Glob. Food Sec**, v.15, p.1-10, 2017.

GRIEKEN, R. E. van; MARKOWICZ, A. A. **Manual de Espectrometria de Raios-X: Métodos e Técnicas**. Nova York, NY: Marcel Dekker Incorporated. 1993.

GRUBER, B. D. et al. Plasticity of the Arabidopsis root system under nutrient deficiencies. **Plant Physiology**, 163, pp. 161–79, 2013.

GUPTA, R. K.; GANGOLIYA, S. S.; SINGH, N. K. Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. **Journal Food Science Technology**, Mysore, v. 52, p. 676-684, 2015.

HANEKLAUSS, S. et al. Sulfur and plant diseases. In: Mineral nutrition and plant diseases. **The American Phytopathological Society**, p. 278, 2007.

HAWKESFORD, M. J.; DE KOK, L. J. Managing sulphur metabolism in plants. **Plant Cell Environment**, v. 29, p. 382-395, 2006.

ISTA. **International rules for seed testing**. International Seed Testing Association. Bassersdorf, Switzerland. 2009.

IWAI, T. et al. Dynamic changes in the distribution of minerals in relation to phytic acid accumulation during rice seed development. **Plant Physiol**, v.160, p.2007-2014, 2012.

KYRIACOU, B. et al. Localization of iron in rice grain using synchrotron X-ray fluorescence microscopy and high resolution secondary ion mass spectrometry. **J. Cereal Sci**, v.59, p.173-180, 2014.

LEE, J. et al. Seed coat color and seed weight contribute differential responses of targeted metabolites in soybean seeds. **Food Chemistry**, v.214, p.248-258, 2017.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 631 p.

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

MATHERS, A. W. et al. Determining the fate of selenium in wheat biofortification: an isotopically labelled field trial study. **Plant Soil**, v.1, p.1-17, 2017.

MATTHUS, E. et al. Phosphate starvation alters abiotic stress-induced cytosolic free calcium increases in roots. **Plant Physiology**, 2019. doi: 10.1104/pp.18.01469.

MIYAZAWA, K. et al. Intercropping green manure crops - effects on rooting patterns. **Plant Soil**, v.331, p.231-239, 2010.

PEREIRA, A. P. et al. Nutrient cycling in summer cover crops. **Revista de Ciências Agrárias**, v.40, n.4, p.120-129, 2017.

PISSINATI, A.; MOREIRA, A.; SANTORO, P. H. Yield components and nutrients content in summer cover plants used in crop rotation in no-tillage system. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.49, n.13, p.1604-1616, 2018.

RODRIGUES, E. S. et al. Laboratory microprobe X-ray fluorescence in plant science: Emerging applications and case studies. **Frontier Plant Science**, v.9, p.1-15, 2018.

SREENIVASULU, N.; WOBUS, U. Seed-Development Programs: A Systems Biology–Based Comparison Between Dicots and Monocots. **Annual Review of Plant Biology**, 64, p.189-217, 2013.

SINGH, K.L.; CHAUDHURI, A.; KAR, R.K. Superoxide and its metabolism during germination and axis growth of *Vigna radiata* (L.) Wilczek seeds. **Plant Signal Behavior**, 2014.

SENGUPTA, S.; DEBNATH, S. Development of sunnhemp (*Crotalaria juncea*) fibre based unconventional fabric. **Industrial Crops and Products**, v.116, p.109-115, 2017.

ZAMAN, Q.U.Z. et al. Zinc biofortification in rice: leveraging agriculture to moderate hidden hunger in developing countries. Arch. Agron. **Soil Sci**, v.64, p.147-161, 2018.

WANG, Q. et al. Cover crops and organic mulch to improve tomato yield and soil fertility. **Agronomy journal**, Madison, v. 101, n. 2, p. 345-351, 2009.

WHITE, P. J.; VENEKLAAS, E. J. Nature and nurture: the importance of seed phosphorus content. **Plant and Soil**, v. 357, ed. 1-2, p. 1-8, 2012.

FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X: DISTRIBUIÇÃO DE MACRONUTRIENTES E DESEMPENHO FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE *Crotalaria ochroleuca*

RESUMO - Este artigo descreve o uso da espectroscopia de fluorescência de raios X na tecnologia de sementes. Objetivou-se avaliar as técnicas de fluorescência de raios X para estimar o desempenho fisiológico entre diferentes colorações do tegumento de sementes de *Crotalaria ochroleuca*, com base no teor e distribuição de Ca, P, K e S em suas estruturas. Os tratamentos consistiram na separação das sementes pelas cores do tegumento amarelo, verde, vermelho e o tratamento testemunha (mistura de cores conforme ocorrência natural em lotes comerciais) em delineamento inteiramente casualizado. Para avaliar o desempenho fisiológico foram analisados o teor de água, germinação, primeira contagem de germinação, índice de velocidade de germinação, condutividade elétrica, emergência de plântulas, comprimento e massa seca de plântulas, com quatro repetições. Por meio das técnicas de espectroscopia de fluorescência de raios X foram realizadas análises quantitativas (teores de Ca, P, K e S no tegumento e na semente inteira) e qualitativas (mapeamento dos macronutrientes), com três repetições. Técnicas de EDXRF e μ -XRF são eficientes e promissoras para diferenciar o desempenho fisiológico de sementes de *C. ochroleuca* com base nos teores e distribuição de Ca, P, K e S em diferentes estruturas. O Ca predomina-se no tegumento e o K, S e P são encontrados em toda a extensão do eixo embrionário. Sementes de tegumento amarelo e verde possuem maior teor e distribuição de nutrientes no eixo embrionário, conferindo alta capacidade germinativa e desempenho fisiológico. Em sementes vermelhas há maior retenção de nutrientes no tegumento e menor assimilação, sendo menos vigorosas, interferindo diretamente na qualidade de lotes comerciais.

Palavras-chave: Tecnologia de sementes. Capacidade germinativa. Morfologia interna.

CHAPTER 1 - X-RAYS FLUORESCENCE: MACRONUTRIENT DISTRIBUTION AND PHYSIOLOGICAL PERFORMANCE IN SEEDS OF *Crotalaria ochroleuca*

ABSTRACT - This paper describes the use of X-ray fluorescence spectroscopy in seed technology. The objective of this study was to evaluate the X-ray fluorescence techniques to estimate the physiological performance between different seed coat colorings of *Crotalaria ochroleuca*, based on the content and distribution of Ca, P, K e S in their structures. The treatments consisted of seed separation by the colors of the yellow, green, red tegument and the control treatment (color mixing according to natural occurrence in commercial lots) in a completely randomized design, with four replications. To evaluate the physiological performance were analyzed the water content, germination, first germination count, germination speed index, electrical conductivity, seedling emergence, seedling length and dry mass. X-ray fluorescence spectroscopy techniques were analyzed with quantitative analyzes (concentration of Ca, P, K and S in coat and whole seed) and qualitative (macronutrient mapping) analyzes with three replicates. EDXRF and μ -XRF techniques are efficient to differentiate the physiological performance of *C. ochroleuca* seeds based on Ca, P, K e S contents and distribution in different structures. Ca predominates in the coat and K, S and P are found throughout the embryonic axis. Seeds of yellow and green coat have higher content and distribution of nutrients in the embryonic axis conferring high germinative capacity and physiological performance. In red seeds there is greater retention of nutrients in the tegument and less assimilation, being less vigorous, interfering directly in the quality of commercial lots.

Keywords: Seed technology. Germinative capacity. Internal morphology.

INTRODUÇÃO

A compreensão do funcionamento da plântula em seus estádios iniciais é essencial para garantir um bom estabelecimento a campo. Nos primeiros dias de vida as sementes absorvem poucos nutrientes do solo, dependendo exclusivamente das reservas armazenadas durante o processo de maturação.

Tendo em vista que o conteúdo de macronutrientes, bem como sua localização nas estruturas da semente são importantes para prever o desempenho fisiológico inicial de

plântulas, uma das técnicas analíticas e microscópicas para investigar a nutrição mineral é a utilização de métodos de fluorescência de raios X (XRF). A partir dos mapas elementares obtidos, é possível extrair informações de vários nutrientes, simultaneamente, fornecendo resultados científicos práticos, úteis e rápidos (KOPITTKKE et al., 2018; RODRIGUES et al., 2018).

Reservas com fósforo (P), sustentam o crescimento de plântulas de milho por duas semanas após a germinação, até que a planta obtenha três ou mais folhas e um sistema radicular vigoroso, em um meio sem P (WHITE E VENEKLAAS, 2012). O nutriente Cálcio (Ca) se encontra em maior concentração no tegumento, como verificado em sementes de soja e feijão comum (MORAGHAN; ETCHEVERS; PADILLA, 2006). Em sementes de arroz, após 48 horas de germinação, o potássio (K) é altamente mobilizado e concentrado nas estruturas da radícula e plúmula, quando estas começam a se diferenciar (LU et al., 2013). A translocação de enxofre (S) adequado aos tecidos das sementes é necessário para maximizar a produção e melhorar diretamente a qualidade das proteínas (CAPALDI et al., 2015; HAWKESFORD; DE KOK, 2006), interferindo no vigor das sementes.

A *Crotalaria ochroleuca* L. é utilizada por seu potencial de fixação de nitrogênio (DEBIASI et al., 2016), tolerância ao estresse hídrico (SIKUKU et al., 2013), redução da população de fitonematoides, ciclagem de nutrientes ao solo (WANG et al., 2009) e produção de biomassa (USDA, 2011). Entretanto, apesar das diversas vantagens do cultivo desta leguminosa, o principal desafio de seu cultivo está na baixa disponibilidade, desvalorização comercial e qualidade de sementes no mercado sementeiro. Haja vista que nos últimos anos tem ocorrido maior demanda de sementes, principalmente devido a sua utilização para redução de fitonematóides, torna-se indispensável o uso de sementes de qualidade, pois isso se reflete no estabelecimento uniforme e satisfatório das plantas.

Em consequência do florescimento e maturação desuniformes, na colheita de Crotalárias há o surgimento de sementes heterogêneas quanto à composição química, cor do tegumento, tamanho, germinação e vigor (BORJI; GHORBANLI; SARLAK, 2007; ERTEKIN; KIRDAR, 2010; SILVA et al., 2016). Logo, os estudos da composição química do tegumento (LEE et al., 2017) e dos compostos armazenados, tornam-se importantes por serem responsáveis pela distribuição dos nutrientes para o embrião no momento da germinação (DONGEN et al., 2003).

Pesquisas em tecnologia de sementes têm se concentrado nas etapas iniciais do estabelecimento de plântulas, buscando identificar as causas de variação de comportamento germinativo, alinhando-as com o conhecimento da composição química, que influenciam a germinação e o potencial de armazenamento. Diante do exposto, objetivou-se avaliar as técnicas

de fluorescência de raios X para estimar o desempenho fisiológico entre diferentes colorações do tegumento de sementes de *Crotalaria ochroleuca*, com base no teor e distribuição de macronutrientes em suas estruturas.

MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *C. ochroleuca* provenientes de lotes comerciais foram acondicionadas em embalagens de papel e armazenadas em câmara fria a 17 °C e 50% de umidade relativa do ar, durante todo o período experimental. Os tratamentos consistiram na separação manual das três colorações do tegumento (amarela, verde e vermelho) e o tratamento testemunha (amostra com 18% de sementes com tegumento de coloração vermelha, 34% verde e 48% amarela, conforme sua ocorrência natural) em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições.

Análises do desempenho fisiológico

Consistiram na determinação do teor de água, primeira contagem de germinação, germinação, índice de velocidade de germinação, condutividade elétrica, emergência, comprimento e massa seca de plântulas.

Teor de água: utilizou-se o método da estufa a 105 ± 3 °C durante 24 horas (BRASIL, 2009), com duas sub-amostras contendo aproximadamente 2 g para cada tratamento.

Primeira contagem e germinação: ambos os testes foram conduzidos simultaneamente com quatro repetições de 50 sementes por tratamento, dispostas em caixas plásticas tipo gerbox (11 x 11 x 3 cm) sobre papel mata borrão, umedecidas com quantidade de água destilada equivalente a 2,5 vezes a massa do papel não hidratado, mantidos a temperatura alternada de 20-30 °C e fotoperíodo de oito horas (BRASIL, 2009). As avaliações consistiram na porcentagem de plântulas normais verificadas no quarto e décimo dia após a instalação do teste.

Índice de velocidade de germinação: juntamente ao teste de germinação, efetuou-se a contagem diária das sementes com raiz primária superior a 2 mm, e o índice calculado segundo a fórmula de Maguire (1962).

Condutividade elétrica: quatro repetições de 50 sementes, tiveram a massa determinada em balança analítica de precisão (0,0001 g) e foram colocadas em copos plásticos contendo 50 mL de água destilada, mantidas a 25 °C. Após o período de 60 minutos de embebição, realizou-se a leitura da condutividade elétrica por meio de condutivímetro (MARCOS FILHO; VIEIRA, 2009).

Emergência de plântulas: quatro sub-amostras de 25 sementes, foram semeadas em bandeja de poliestireno expandido com 128 células, com uma semente por célula, a 1,5 cm de profundidade, contendo substrato comercial Maxxi (composto de esterco de aves com calcário, cascas processadas descompostas e vermiculita expandida), mantidas em casa de vegetação, com duas regas diárias. A contagem de plântulas normais emergidas foi efetuada a partir da abertura do primeiro par de folhas, realizada no décimo dia após a implantação do teste.

Comprimento e massa seca de plântulas: as plântulas consideradas normais obtidas no teste de emergência, foram avaliadas quanto ao comprimento do hipocótilo (parte aérea) e radícula. Para determinar a massa seca, ambas as partes das plântulas foram separadas com lâmina de aço inoxidável, acondicionadas em sacos de papel e mantidas em estufa com circulação forçada de ar a 80 °C por 24 horas (NAKAGAWA, 1999), posteriormente foram pesadas em balança analítica.

Técnicas de fluorescência de raios-X

Análises de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) e fluorescência de micro raios X (μ -XRF) foram realizadas no Laboratório de Instrumentação Nuclear no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP). A EDXRF permitiu determinar o conteúdo de Ca, K, S e P nas sementes (amarela, verde e vermelha), separadas em duas sub-amostras: tegumento retirado antes da emissão da radícula e sementes inteiras, com três repetições. Na análise qualitativa foi realizado o mapeamento da distribuição dos nutrientes mencionados anteriormente, com utilização de μ -XRF.

Análise quantitativa

As duas sub-amostras (tegumento e sementes inteiras), foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 105 ± 3 °C durante 24 horas [17]. Em seguida, foram trituradas em moinho de esfera para alcance de baixa granulometria (60 mesh) para obtenção de 1 g, pesadas em balança analítica e acondicionadas em copo de amostra de 6,3 mm (n° 3577 - Spex Ind. Inc., EUA), vedados com filme de polipropileno de 5 μ m de espessura (n° 3520 - Spex Ind. Inc., EUA). Logo, foram levadas ao equipamento EDXRF-720 para quantificação dos teores de Ca, K, P e S. Para isto, empregou-se calibração padrão comparando materiais de referência certificados: folhas de maçã (NIST 1515), de pêssego (NIST 1547) e caule de milho (NIST 8412).

Análise qualitativa

As sementes foram cortadas longitudinalmente dividindo os cotilédones com lâmina de aço inoxidável, colocando-os em porta-amostras de 6,3 mm (nº 3577 - Spex Ind. Inc., EUA), vedados com filme de polipropileno de 5 µm de espessura (nº 3520 - Spex Ind. Inc., EUA) com o lado interno da semente voltado para cima. Para verificar a intensidade dos elementos Ca, P, K e S presentes na amostra, operou-se a análise de µ-XRF (Orbis PC EDAX, EUA) com tubo de raios X de Rh configurados a 40 kV, corrente de 100 µA, feixe de 30 µm por ponto, com vácuo e tempo morto de análise de aproximadamente 3%. A matriz foi de 64 x 50 µm e os pixels produzidos foram interpolados utilizando o Excel e o software Origin Lab 8.0 versão 2016. A partir dos mapas, dos nutrientes Ca, P, K e S, foi possível identificar a localização dos elementos nas regiões do eixo embrionário, tegumento, radícula, cotilédone e micrópila.

Análises Estatísticas

O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Para comparação de médias foi realizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Em seguida, empregou-se a análise de variáveis canônicas para estudar a inter-relação entre as variáveis do desempenho fisiológico com o conteúdo de nutrientes nas sementes inteiras separadas por tratamento, efetuadas pelo programa Rbio (BHERING, 2017).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desempenho fisiológico

O teor de água (TA) variou entre 1,91% (Tabela 1), sendo considerado uniforme, estando dentro da faixa de variação tolerável (<2%) (MARCOS FILHO, 2015). O teste de germinação (G) identificou alta capacidade germinativa de sementes de tegumento amarelo e verde, sendo consideradas superiores ao mínimo necessário para a comercialização de sementes de *C. ochroleuca*, fixado em 75% no Brasil (BRASIL, 2008). Sementes de tegumento vermelho germinaram menos, e a presença desta coloração, representado pelo tratamento testemunha, interferiu na qualidade do lote. Bewley et al. (2013) explicaram que a diminuição na germinação pode estar atribuída à menor mobilização de reservas, síntese de atividades enzimáticas ou mudanças no turgor celular.

Tabela 1. Teor de água (TA), germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), índice de velocidade de germinação (IVG) e emergência de plântulas (E) entre colorações diferentes do tegumento de sementes de *C. ochroleuca*

Coloração	TA	G %	PCG	IVG -	E %
Testemunha	9.93	79 ¹ b	70 b	33 b	68 b
Amarelo	9.64	99 a	80 a	39 a	79 a
Verde	9.41	97 a	84 a	39 a	77 a
Vermelha	11.32	55 c	50 c	27 c	8 c
Cor	-	1246.66*	692.00*	97.67*	3389.42*
Erro	-	39.33	5.00	1.72	1.33
CV (%)	-	8.00	3.15	3.80	1.99

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si (Tukey $p \leq 0,05$). * Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. CV: Coeficiente de Variação.

Comportamento semelhante das colorações amarelo e verde foram encontrados nos testes de primeira contagem de germinação (PCG), índice de velocidade de germinação (IVG) e emergência de plântulas (E). A baixa capacidade germinativa verificada em sementes vermelhas pode estar associada ao processo de deterioração devido ao atraso da colheita, ocasionando assim, aumento na respiração e metabolismo de reservas por condições de estresses a campo. Portanto, os dados indicam que as colorações amarela e verde são ideais para a coleta e obtenção de sementes de *Crotalaria ochroleuca* a campo, e a classificação pela cor do tegumento pode melhorar a qualidade do lote comercial.

Na Tabela 2 encontram-se os resultados do comprimento (CH), massa seca do hipocótilo (MSH) e condutividade elétrica (CE) confirmando a interferência da coloração vermelha no tratamento testemunha e ressaltando ainda, o alto desempenho fisiológico de sementes de coloração amarelo e verde. Entretanto, os testes de comprimento (CR) e massa seca de radícula (MSR) não se mostraram sensíveis para diferenciar o comportamento fisiológico entre cores do tegumento.

Tabela 2. Comprimento do hipocótilo (CH), comprimento da radícula (CR), massa seca do hipocótilo (MSH), massa seca da radícula (MSR) e condutividade elétrica (CE) entre colorações do tegumento de sementes de *C. ochroleuca*

Coloração	CH cm planta ⁻¹	CR	MSH g plântula ⁻¹	MSR	CE ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)
Testemunha	2.86 ¹ ab	2.59	1.40 bc	1.36	104.44 b
Amarelo	3.74 a	2.75	1.50 ab	1.38	47.40 a
Verde	3.88 a	2.89	1.51 a	1.44	72.09 a
Vermelha	1.96 b	2.90	1.36 c	1.48	329.32 c
Cor	2.37*	0.06 ^{ns}	0.02*	0.01 ^{ns}	50283.43*
Erro	0.14	0.34	0.01	0.02	126.06
CV (%)	13.34	20.91	2.95	3.46	8.12

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si (Tukey $p \leq 0.05$). ^{ns} e * correspondem, a não significativo e significativos ao nível de probabilidade $p \leq 0.05$ pelo teste F, respectivamente. CV: Coeficiente de variação.

A menor capacidade de reorganização das membranas celulares durante o processo de embebição obtida pela CE (Tabela 2), foi observada em sementes de coloração vermelha, confirmando o baixo vigor. As colorações verde e amarela lixivaram menos exsudados totais e se distinguiram das demais colorações, corroborando resultados obtidos anteriormente. Esse teste avalia a quantidade de eletrólitos liberados pelas sementes durante a embebição, que está diretamente relacionada com a integridade das membranas celulares (TILLMANN; MENEZES, 2012).

Desta forma, quanto maior a velocidade de restabelecimento da integridade das membranas, menor será a quantidade de lixiviados liberados para o meio externo e, conseqüentemente, maior o vigor da semente. Portanto, os testes de desempenho fisiológico aqui apresentados demonstraram alta capacidade germinativa e vigor das colorações do tegumento amarelo e verde, e comportamento fisiológico inferior da coloração vermelha, interferindo na qualidade do lote.

Fluorescência de raios-X

Resultados quantitativos

Os resultados de EDXRF de bancada convencional nas estruturas do tegumento e semente inteira (Figura 1A e 1B) demonstraram diferenças entre as colorações das sementes quanto aos teores de nutrientes. A coloração vermelha (Figura 1A) apresentou maior retenção de nutrientes na estrutura do tegumento em comparação com as demais colorações, com maior teor de Ca e K. Logo, para uma mesma espécie, a variação de cores do tegumento influenciam na quantificação de nutrientes translocados da planta-mãe para a semente.

O tecido de revestimento das sementes, em geral, desempenha diversos papéis essenciais, como acúmulo temporário de compostos para posterior transferência ao embrião em desenvolvimento, proteção das estruturas internas, junção das partes, auxílio nas trocas gasosas entre a semente e o ambiente, controle da dormência, controle da dispersão e germinação (RADCHUK e BORISJUK, 2014). Além destas funções, vale ressaltar que o floema tem suas últimas ramificações no tecido de revestimento, o que infere participação desta estrutura na translocação de elementos essenciais para o endosperma e embrião (MARCOS FILHO, 2015).

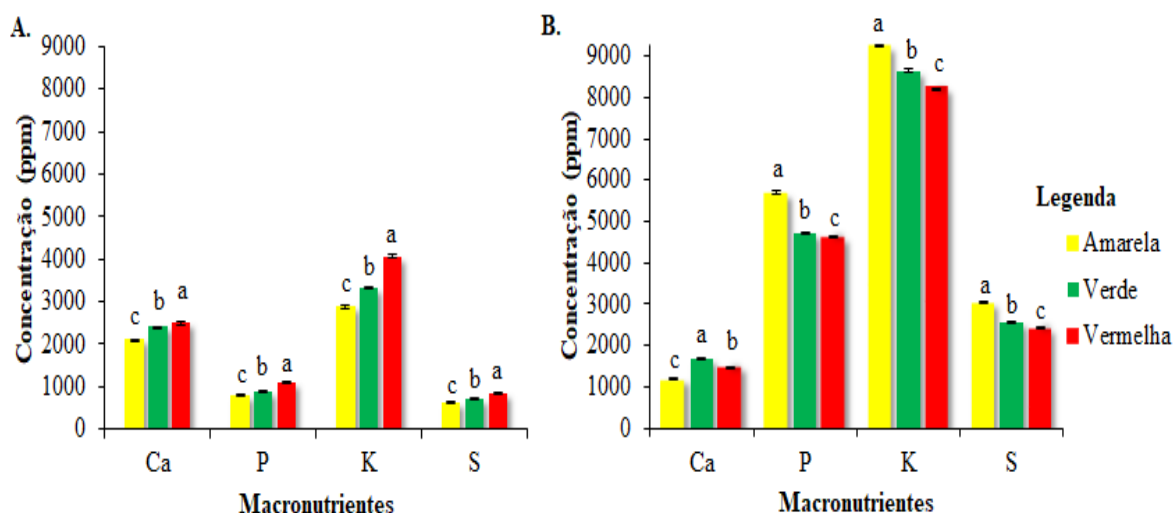


Figura 1. Concentração (ppm) dos macronutrientes Ca, P, K e S presentes no tegumento (A) e na semente inteira (B) em função da coloração do tegumento de sementes de *C. ochroleuca*. As barras indicam o desvio padrão da média (n=3). Letras diferentes indicam que há diferença entre as médias (Tukey, $p \leq 0,05$). CVa(%)=0,79 (Ca), 1,72 (P), 0,96 (K) e 1,39 (S). CVb(%)=1,25 (Ca), 0,71 (P), 0,22 (K) e 0,61 (S).

As colorações amarela e verde destacaram-se quanto aos teores de P, K e S, enquanto a vermelha apresentou menor assimilação (Figura 1B). Deste modo, observa-se maior absorção

destes nutrientes do que retenção no tegumento, evidenciado pelos teores de P e S na semente inteira. Em contrapartida, o comportamento do Ca variou nas estruturas, demonstrando maior retenção na coloração vermelha e maior assimilação na verde.

O teor de P é um importante atributo agrícola, promovendo o estabelecimento de plântulas vigorosas, o que pode impactar positivamente a produtividade (WHITE e VENEKLAAS, 2012). Em estudo com o tegumento de sementes de *Arabidopsis thaliana*, constataram que o teor de P presente nesta estrutura no estágio de maturidade fisiológica é maior em comparação ao estágio de sementes maduras e secas, indicando que o P anteriormente retido foi redistribuído para o embrião, conforme observado no presente estudo (VOGIATZAKI et al., 2017).

Portanto, a utilização de EDXRF permite estimar de maneira eficaz o teor de Ca, P, K e S em sementes com desempenho fisiológico contrastantes. Esta ferramenta afere o conteúdo dos diferentes elementos essenciais simultaneamente e de forma rápida, permitindo assegurar a adoção de procedimentos como o tratamento de sementes com micronutrientes, macronutrientes e a biofortificação.

A análise de variáveis canônicas foi utilizada para verificar a contribuição de cada variável nas colorações do tegumento de sementes de *C. ochroleuca* (Figura 2). Para representação dos scores em gráfico bidimensional é necessário que a porcentagem de variância retida seja superior a 80% (MINGOTI, 2015). Neste trabalho, as variâncias acumuladas nas duas principais variáveis canônicas foram de 99,4 e 99,7%, respectivamente, para cada gráfico (Figura 2), possibilitando sua interpretação de forma precisa.

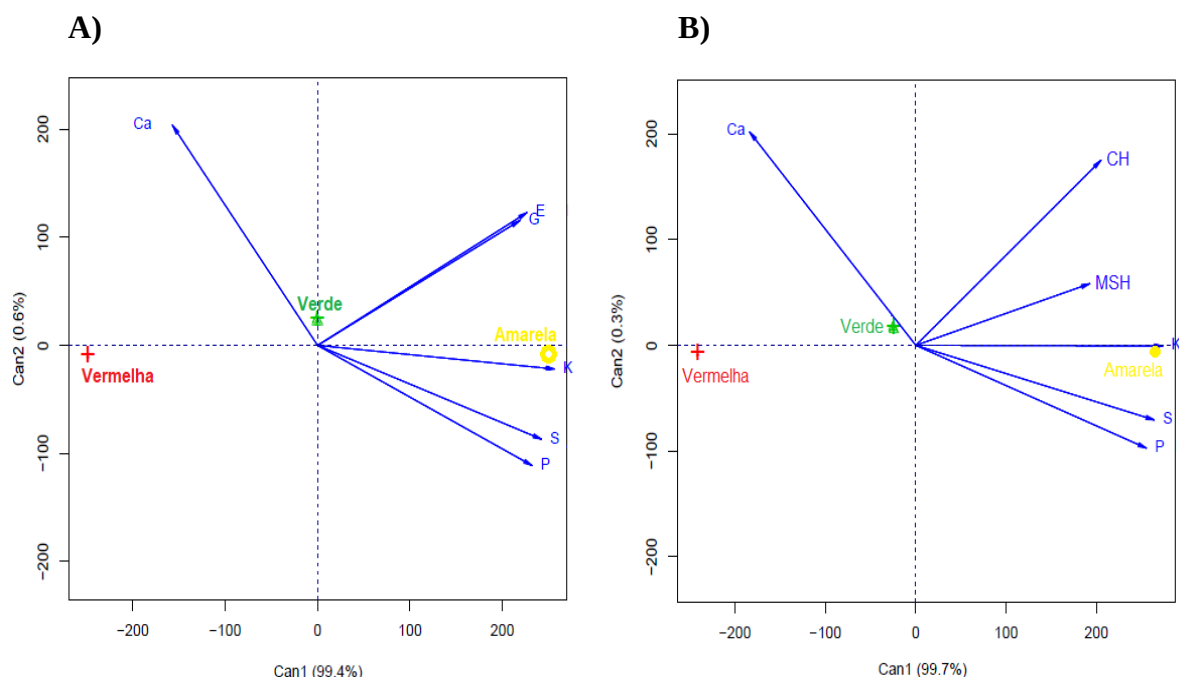


Figura 2. Variáveis canônicas entre os testes de germinação (G), emergência (E) (A) e comprimento do hipocótilo (CH), massa seca do hipocótilo (MSH) (B) e os teores de Ca, P, K e S em função das colorações do tegumento amarelo, verde e vermelho de sementes de *C. ochroleuca*.

Os ângulos entre os vetores menores que 90° informam correlação entre os macronutrientes P, S e fortemente o K em sementes de tegumento amarelo (Figura 2). Em contrapartida, o Ca obteve correlação moderadamente baixa com o tegumento verde, demonstrando desempenho intermediário. Assim, quanto maior o teor dos nutrientes supracitados, maior a germinação (G), emergência (E), comprimento (CH) e massa seca do hipocótilo (MSH) para a coloração amarela.

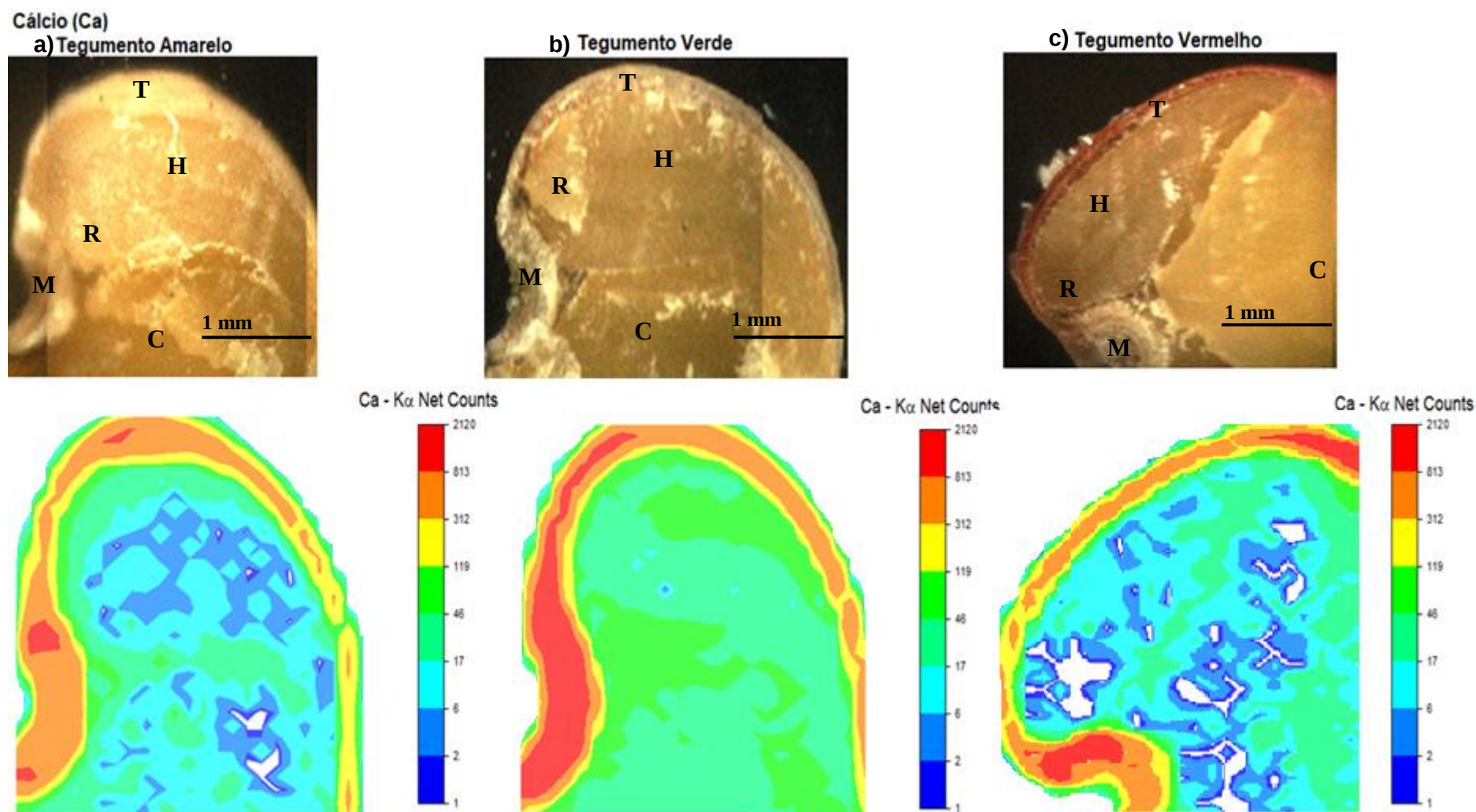
É importante observar que as sementes de coloração vermelha não estão associadas a nenhuma das variáveis, demonstrado pela distância dos vetores, reforçando os resultados obtidos pela análise de variância convencional para o desempenho fisiológico (Tabela 1) e conteúdo de nutrientes nas sementes inteiras (Figura 1B). De tal maneira, a quantificação do teor de nutrientes em função da coloração do tegumento torna-se importante para a tecnologia de sementes, visto que possui influência direta no desempenho fisiológico, podendo ainda otimizar o beneficiamento, armazenamento e qualidade do lote, selecionando adequadamente as cores para adequado estabelecimento da cultura em campo.

Resultados qualitativos

Através das análises de μ -XRF (Figura 3) foi possível localizar com precisão a distribuição dos nutrientes em cada estrutura da semente, destacando a região do eixo embrionário. O Ca foi verificado em maior intensidade no tegumento (T) e micrópila (M), sendo mais absorvido em sementes verdes, confirmando as análises de EDXRF (Figuras 1 e 2), apresentadas anteriormente. Nesta coloração, observa-se maior intensidade deste nutriente na região da micrópila e esta estrutura é considerada importante nas sementes em geral, pois é onde o cordão vascular se rompe após a maturidade fisiológica, representando uma área de descarga de nutrientes, além de ser importante conexão entre os tecidos maternos (STADLER; LAUTERBACH; SAUER, 2005). Pesquisas constataram que o Ca aumenta a resistência do tegumento das sementes de soja aos danos mecânicos, o que pode ser benéfico para a produção de sementes em condições de campo, dificultando assim a entrada de patógenos (BEVILAQUA; SILVA FILHO; POSSENTI, 2002).

A presença de íons cálcio (Ca^{2+}) na membrana plasmática formam as anexinas, proteínas capazes de interagir de forma seletiva e não covalente com fosfolipídios, e estão presentes em todos os eucariotos (CLARK et al., 2012). Assim, a parede celular primária de células vegetais é constituída por microfibrilas de celulose (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucano, inseridas em uma matriz de polissacarídeos, proteínas estruturais, fenilpropanóides e uma zona de junção com Ca (TAIZ e ZEIGER, 2017). Deste modo, este nutriente atua como pectato na lamela média, funcionando como “agentes cimentantes” entre células próximas (MALAVOLTA, 2008), além de servir como mensageiro importante na transdução de sinal de vários fito-hormônios, dentre eles o ácido abscísico que regula o desenvolvimento de plantas, participando diretamente na germinação e crescimento da plântula (LU et al., 2013).

Além do envolvimento na rigidez da parede celular através da formação de complexos de pectato, o Ca confere um papel de sinalização através da regulação de seu nível no citosol (HEPLER, 2005). Em sementes de *Vigna radiata* L., o crescimento do eixo embrionário na fase I e II da germinação depende do influxo de Ca do apoplasto e sua inibição está associada a participação de peroxidase apoplástica influenciando a germinação e crescimento inicial (SINGH; CHAUDHURI; KAR, 2015).



350

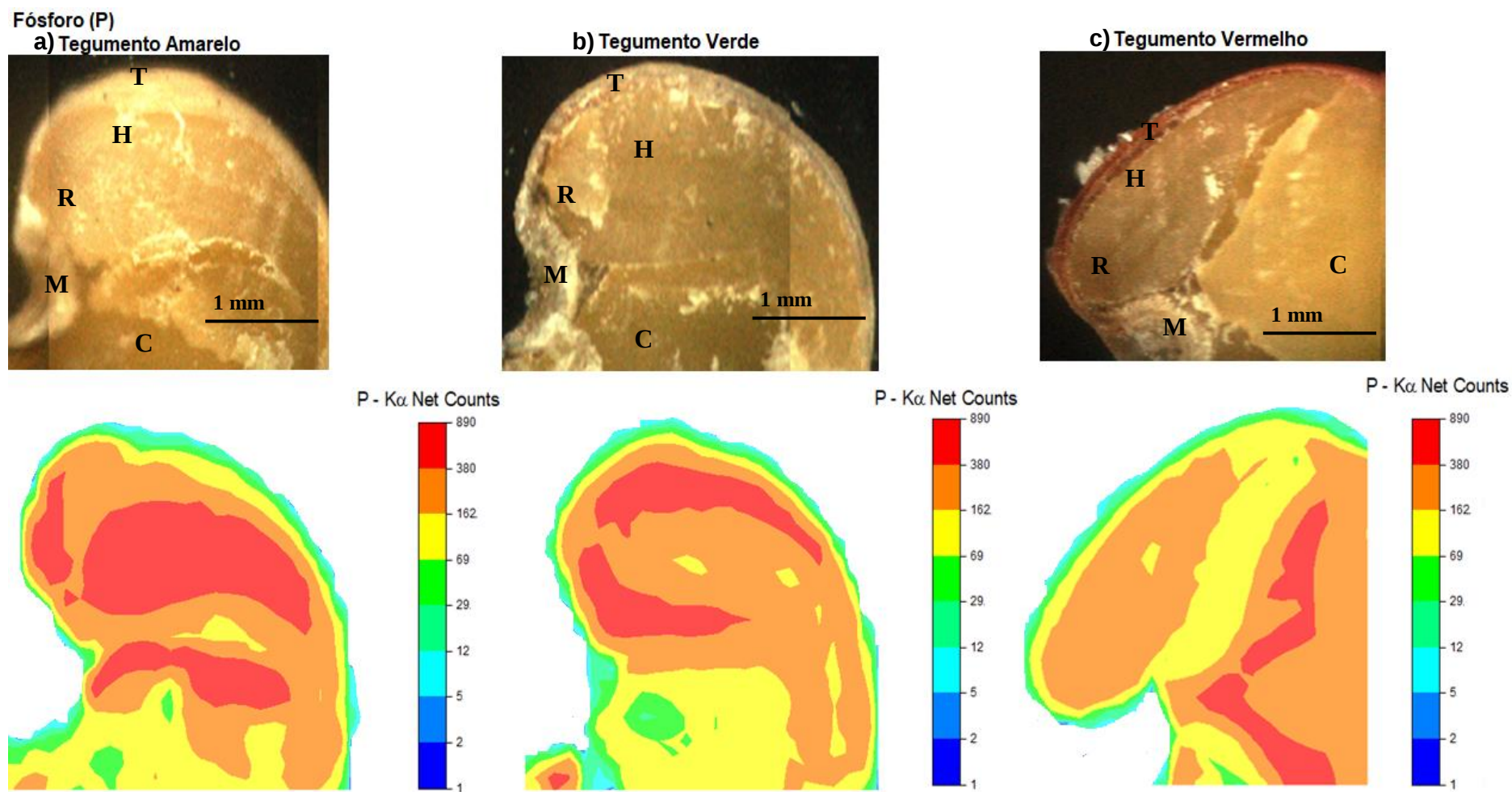
351 **Figura 3.** Imagem captada por μ -XRF e respectivo mapa de distribuição de cálcio na região do hipocótilo (H), radícula (R), micrópila (M),

352 cotilédone (C) e tegumento (T) de sementes de *C. ochroleuca* de tegumento amarelo (a), verde (b) e vermelho (c).

O P encontra-se distribuído em toda a extensão do eixo embrionário (Figura 4), precisamente na radícula (R) e hipocótilo (H) em sementes de colorações amarela e verde, porém nas vermelhas houve menor intensidade nestas estruturas. No tecido de revestimento nota-se inexpressiva distribuição de P, corroborando as análises obtidas pelo EDXRF (Figura 1). Alta intensidade deste nutriente nas estruturas da radícula, escutelo e camada interna de aleurona que envolve o endosperma e o embrião foi observado em sementes de trigo (RAMOS et al., 2016). O embrião é a estrutura mais importante do ponto de vista de economia de energia da semente, por ser considerado mais eficiente em armazenar elementos essenciais para funções enzimáticas, energia luminosa, manutenção do turgor à medida que as células se expandem no embrião do que usar energia para mover esses nutrientes dos tecidos de armazenamento (LU et al., 2013).

Nas sementes, cerca de 60 a 80% do P ocorre na forma de ácido fítico (GUPTA; GANGOLIYA; SINGH, 2015), constituindo importante fonte de energia aos processos metabólicos na fase inicial da germinação (RABOY, 2009). Trata-se de um nutriente importante em numerosos compostos orgânicos, tais como ácidos nucleicos, fosfolipídios e fosfatos ésteres (incluindo proteínas, açúcares e nucleotídeos) (TAIZ e ZEIGER, 2013).

O P é essencial para garantir altas produtividades, devido sua participação nas membranas celulares (fosfolipídeos), nos ácidos nucléicos e como constituinte de compostos armazenadores de energia, como por exemplo o ATP (trifosfato de adenosina) (MARSHNER, 1995). Essa energia é utilizada nas fases da germinação e sua deficiência pode impactar mecanismos reguladores do crescimento, bem como diminuir enzimas que ativam o metabolismo da giberelina, conforme verificado em sementes de *Arabidopsis thaliana* (JIANG et al., 2007). O conteúdo de reservas de P endógeno em sementes de soja e milho, evidenciaram que elevados teores do nutriente podem produzir plântulas vigorosas, principalmente em condições de deficiência do elemento no solo (NADEEM et al., 2011; SOARES et al., 2014).

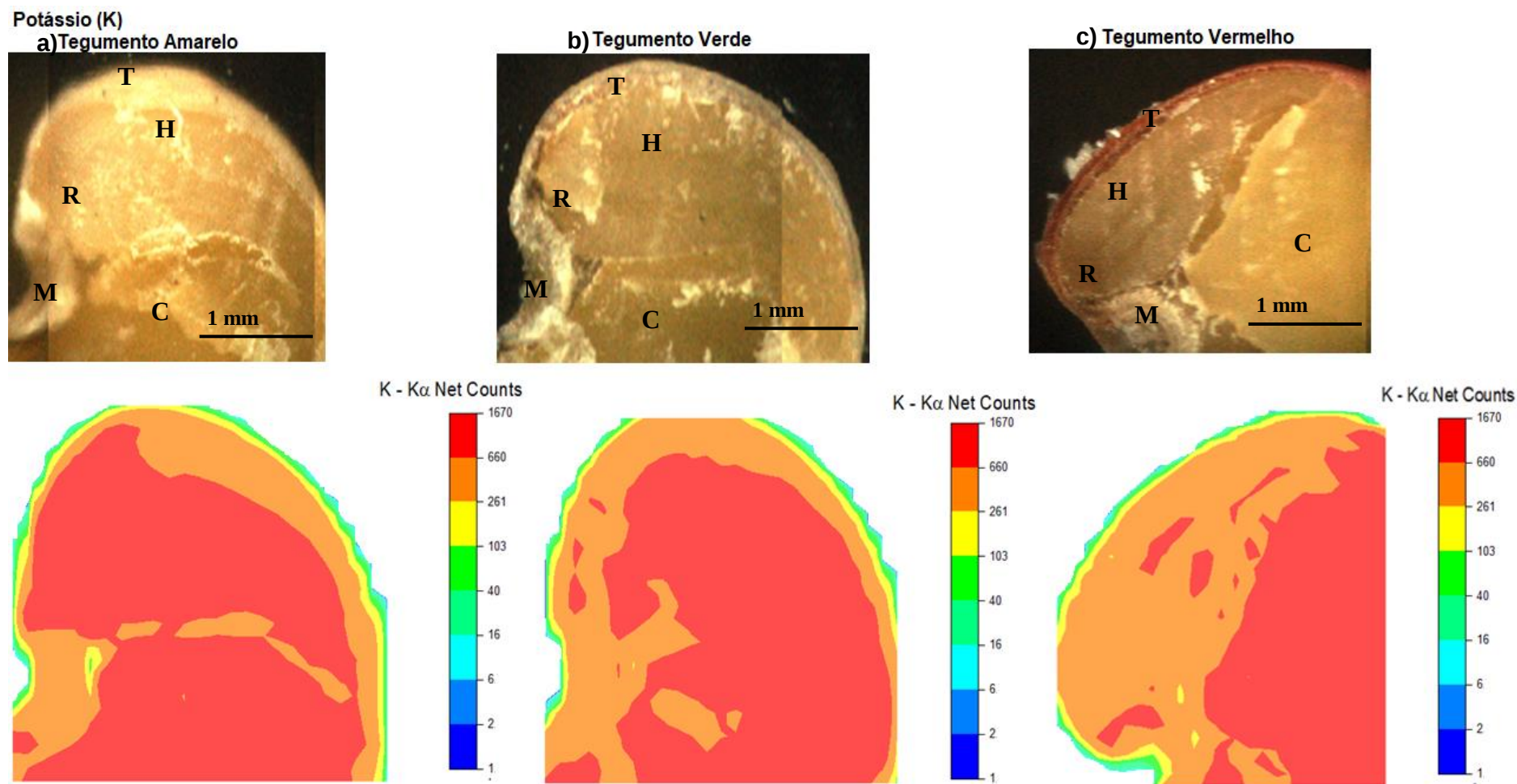


378
379 **Figura 4.** Imagem captada por μ -XRF e respectivo mapa de distribuição de fósforo na região do hipocótilo (H), radícula (R), micrópila (M),
380 cotilédone (C) e tegumento (T) de sementes de *C. ochroleuca* de tegumento amarelo (a), verde (b) e vermelho (c).

Os pontos de intensidade de K (Figura 5) foram verificados na estrutura do eixo embrionário em sementes de coloração amarela e verde, e em menor proporção em sementes de coloração vermelha. O K é o íon inorgânico presente em grandes concentrações nas sementes, geralmente superando os teores de Cálcio (Ca) (MARCOS FILHO, 2015). É importante para a viabilidade das sementes, uma vez que possui diversas funções no metabolismo das plantas, como controle da absorção de água, ativação enzimática, crescimento dos tecidos meristemáticos, síntese de proteínas e carboidratos e translocação de assimilados (MALAVOLTA, 2008). Também participa na neutralização elétrica de ânions e macromoléculas inorgânicas e orgânicas, na homeostase do pH, no controle do potencial elétrico da membrana e na regulação da pressão osmótica celular, desempenhando importante papel nos movimentos de células e órgãos controlados pelo turgor (NIEVES-CORDONES; AL SHIBLAWI; SENTENAC, 2016).

Em sementes de arroz, após 48 horas de germinação o K é altamente mobilizado e concentrado nas regiões da radícula e plúmula, quando estas começam a se diferenciar (LU et al., 2013). Assim, o crescimento das plantas desde a fase inicial requer grandes quantidades de íons K⁺, pois durante a fase de embebição há alta lixiviação de sais para o meio aquoso.

Nas sementes maduras, em geral, o equilíbrio entre tecido de reserva e embrião é fundamental para o controle da germinação das sementes (STEINBRECHER; LEUBNER, 2017). O tecido de reserva, em geral, é capaz de detectar sinais luminosos e interagir com o embrião através de comunicação bidirecional durante a germinação (YAN et al., 2014). Isso indica que esta estrutura não atua somente no direcionamento de nutrientes, mas também é controlada por sinais embrionários, auxiliando a protrusão radicular e início da germinação.



403

404

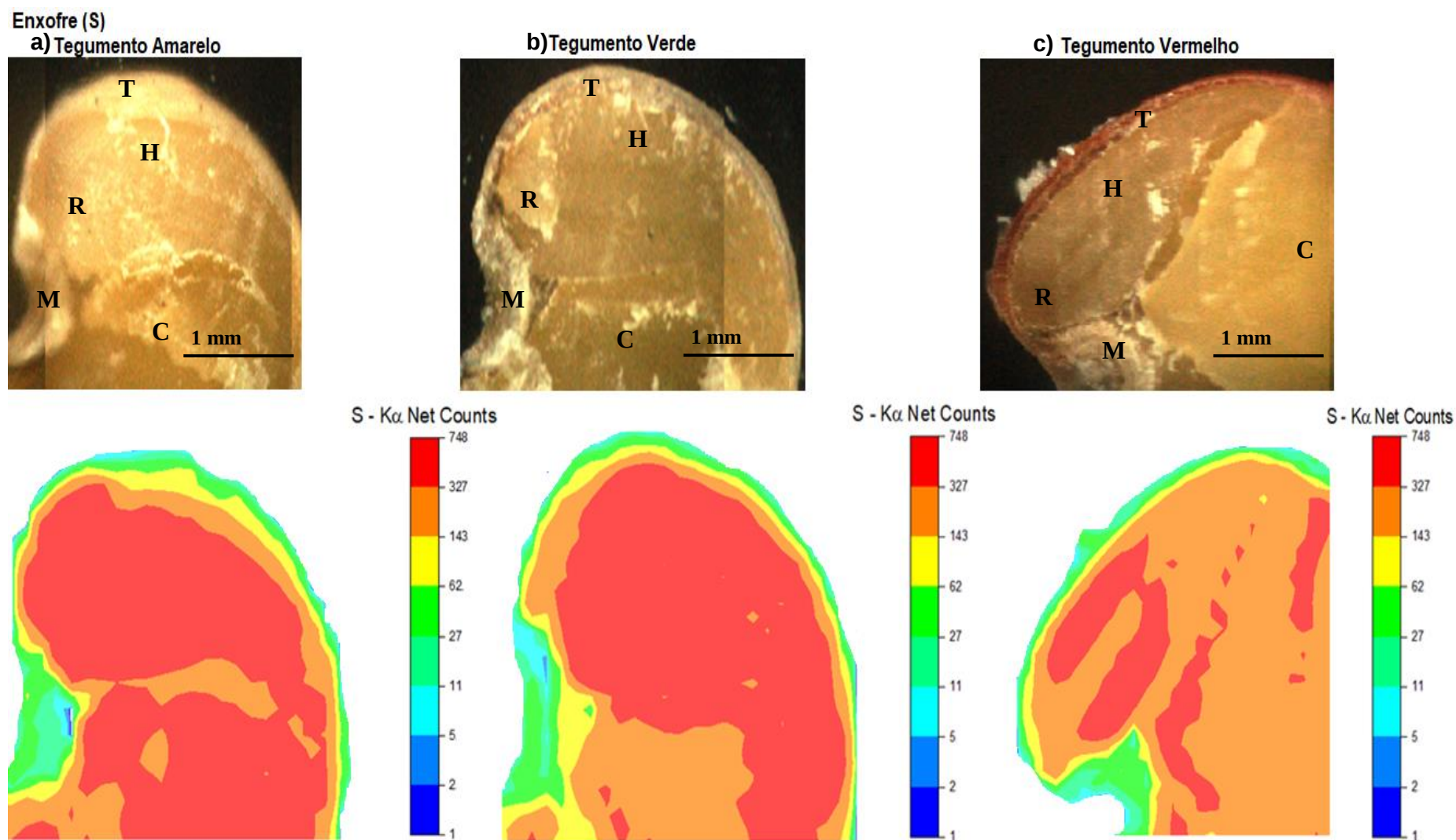
405

Figura 5. Imagem captada por μ -XRF e respectivo mapa de distribuição de potássio (K) na região do hipocótilo (H), radícula (R), micrópila (M), cotilédone (C) e tegumento (T) de sementes de *C. ochroleuca* de tegumento amarelo (a), verde (b) e vermelho (c).

A presença de S foi observada em maior intensidade em toda a extensão do eixo embrionário em sementes de colorações amarela e verde e, em menor teor na vermelha (Figura 6). Este nutriente atua em processos fundamentais como transporte de elétrons e produção de oxigênio fotossintético, de tal modo que compostos de defesa contendo enxofre (enxofre elementar, sulfeto de hidrogênio, glutatona, fitoquelatinas, proteínas ricas em S e outros metabolitos secundários) são cruciais para a sobrevivência das plantas durante estresses bióticos e abióticos em campo (CAPALDI et al., 2015).

O S é primeiramente oxidado a sulfato para depois ser absorvido pelas plantas, atuando na conversão dos nitratos em aminoácidos e posteriormente em proteínas (GOTOR et al., 2015; STULEN; DE KOK, 2012; TAKAHASHI et al., 2011). Deste modo, quando os níveis de S se encontram baixos, há redução na conversão de aminoácidos e subsequentemente em proteínas, ocasionando perda da qualidade de sementes (HANEKLAUSS et al., 2007). Logo, a translocação de S adequado aos tecidos das sementes é necessária para maximizar a produção e melhorar a qualidade da proteína (HAWKESFORD; DE KOK, 2006), interferindo diretamente no vigor.

Avanços na tecnologia poderão fornecer complementos aos resultados atuais, pois estes são importantes para a compreensão da fisiologia da semente em relação à assimilação e transporte de nutrientes durante o momento da germinação. Portanto, pesquisas futuras devem ser desenvolvidas para melhor investigar o papel dos nutrientes (Ca, K, P e S) no desempenho fisiológico das sementes, visto que as técnicas descritas aqui tornam-se promissoras para diferenciar lotes comerciais com alta capacidade germinativa e vigor.



427

428 **Figura 6.** Imagem captada por μ -XRF e respectivo mapa de distribuição de enxofre na região do hipocótilo (H), radícula (R), micrópila (M),

429 cotilédone (C) e tegumento (T) de sementes de *C. ochroleuca* de tegumento amarelo (a), verde (b) e vermelho (c).

CONCLUSÕES

Técnicas de EDXRF e μ -XRF são promissoras para diferenciar o desempenho fisiológico de sementes de *C. ochroleuca* com base nos teores e distribuição de macronutrientes em diferentes estruturas. O Ca predomina-se na estrutura do tegumento e o K, S e P são encontrados em toda a extensão do eixo embrionário.

Sementes de tegumento amarelo e verde possuem maior teor e distribuição de nutrientes no eixo embrionário conferindo alta capacidade germinativa e desempenho fisiológico. Em sementes vermelhas há maior retenção de nutrientes no tegumento e menor assimilação, sendo menos vigorosas, interferindo diretamente na qualidade de lotes comerciais.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. V.; SILVA, M. A. D. Avaliação do potencial fisiológico de sementes de *Encholirium spectabile* Mart. ex Schult. & Schult. f.¹. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p. 56-66, 2018.

BEVILAQUA, G. A. P.; SILVA FILHO, P. M.; POSSENTI, J. C. Aplicação foliar de cálcio e boro e componentes de rendimento e qualidade de sementes de soja. **Ciência Rural**, Pelotas, v. 32, p. 31-34, 2002.

BEWLEY, J. D. et al. **Seeds: Physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. New York: Springer, 2013. 392 p.

BHERING, L. L. Rbio: a tool for biometric and statistical analysis using the R platform. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 17, p. 187-190, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 395p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e de Abastecimento. Instrução Normativa n. 30, de 21/05/2008. **Normas e padrões para produção e comercialização de sementes de espécies forrageiras de clima tropical**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Anexo IV. Available from: <http://www.adagri.ce.gov.br/docs/legislacao_vegetal/IN_30_de_21.05.2008.pdf> Accessed: Nov, 04, 2018.

BORJI, M.; GHORBANLI, M.; SARLAK, M. Some seed traits and their relationship to seed germination, emergence rate, and electrical conductivity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Asian Journal of Plant Science**, Arak, v. 6, p. 781-787, 2007.

CAPALDI, F. R. et al. Sulfur metabolism and stress defense responses in plants. **Tropical Plant Biology**, v. 8, p. 60-73, 2015.

CLARK, G. B. et al. Evolutionary adaptation of plant annexins has diversified their molecular structures, interactions and functional roles. **New Phytologist**, v. 196, p. 695-712, 2012.

- DEBIASI, H. et al. Cultural practices during the soybean off-season for the control of *Pratylenchus brachyurus*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 51, n. 10, 2016.
- DONGEN, J. T. van et al. Structure of the developing pea seed coat and the post phloem transport pathway of nutrients. **Annals of Botany**, v. 91, p. 729-737, 2003.
- ERTEKIN, M.; KIRDAR, E. Effects of seed coat color on seed characteristics of honey locust (*Gleditsia triacanthos*). **African Journal of Agricultural Research**, v. 5, p. 2434-2438, 2010.
- FLORES, A. S.; TOZZI, A. M. Uma sinopse do gênero Crotalária (Leguminosae) no Brasil. **Phytotaxa**, v. 346, n. 1, p. 31-58, 2018.
- GOTOR, C. et al. Signaling in the plant cytosol: cysteine or sulfide? **Amino Acids**, 47, p. 2155-2164, 2015.
- GUPTA, R. K.; GANGOLIYA, S. S.; SINGH, N. K. Redução do ácido fítico e aumento de micronutrientes biodisponíveis em grãos alimentícios. **Journal Food Science Technology**, Mysore, v. 52, p. 676-684, 2015.
- HANEKLAUSS, S. et al. Sulfur and plant diseases. In: Mineral nutrition and plant diseases. **The American Phytopathological Society**, p. 278, 2007.
- HAWKESFORD, M. J.; DE KOK, L. J. Managing sulphur metabolism in plants. **Plant Cell Environment**, v. 29, p. 382-395, 2006.
- HEPLER, P. K. Calcium: a central regulator of plant growth and development. **Plant Cell**, 17, p. 2142-2155, 2005.
- JIANG, C. et al. Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the gibberellin-DELLA signaling pathway in arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 145, n. 4, p. 1460-1470, 2007.
- KOPITTKKE, P. M. et al. Synchrotron based X-ray fluorescence microscopy as a technique for imaging of elements in plants. **Plant Physiology Preview**, 2018.
- LEE, J. et al. Seed coat color and seed weight contribute differential responses of targeted metabolites in soybean seeds. **Food Chemistry**, v. 214, p. 248-258, 2017.
- LU, L. et al. The distribution of metallic elements in rice seeds (*Oryza sativa* L.) and the reallocation during germination based on X-ray fluorescence of Zn, Fe, K, Ca and Mn. **Plos One**, v. 8, ed. 2, p. 57360, 2013.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-77, 1962.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo, Ceres, 1980. 251 p.
- MALAVOLTA, E. **O futuro da nutrição de plantas tendo em vista aspectos agrônômicos, econômicos e ambientais**. Piracicaba: IPNI, 2008. 10 p.

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

MARCOS-FILHO, J.; VIEIRA, R. D. Seed vigor tests: principles - conductivity tests. In: BAALBAKI, R. et al. (Org.). **Seed Vigor Testing Handbook**. Contribution n° 32 to the Handbook on Seed Testing, 2009, p. 77-90.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. London: Academic Press, 1995, 889 p.

MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: Uma abordagem aplicada**. 1. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005. 295 p.

MORAGHAN, J. T.; ETCHEVERS, J. D.; PADILLA, J. Contrasting accumulations of calcium and magnesium in seed coats and embryos of common bean and soybean. **Food Chemistry**, Easton, v. 95, n. 4, p. 554-561, 2006.

NADEEM, M. et al. Relative contribution of seed phosphorus reserves and exogenous phosphorus uptake to maize (*Zea mays* L.) nutrition during early growth stages. **Plant and Soil**, v. 11, n. 1-2, p. 231-244, 2011.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho de plântulas. In: KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 2, p. 24.

NIEVES-CORDONES, M.; AL SHIBLAWI, F. R.; SENTENAC, H. Roles and transport of sodium and potassium in plants. In: SIGEL, A.; SIGEL, H.; SIGEL, R.K.O(eds). **The alkali metal ions: their role for life**. Berlin: Springer-Verlang, 2016. v. 16, p. 628.

RABOY, V. Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus. **Plant Science**, v. 177, p. 281-296, 2009.

RADCHUK, V.; BORISJUK, L. Physical, metabolic and developmental functions of the seed coat. **Frontier Plant Science**, v. 5, p. 510, 2014.

RAMOS, L. et al. Elemental mapping of biofortified wheat grains using micro X-ray fluorescence. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 16, p. 30-36, 2016.

RODRIGUES, E. S. et al. Laboratory microprobe X-ray fluorescence in plant science: Emerging applications and case studies. **Frontier Plant Science**, v. 9, p. 1-15, 2018.

SIKUKU, P. et al. Responses of slender leaf rattlebox (*Crotalaria ochroleuca*) to water deficit. **Journal of Biodiversity and Environmental Sciences**, v. 3, p. 245-252, 2013.

SILVA, A. G. et al. Influência da cor do tegumento e da temperatura na germinação e vigor de sementes de *Crotalaria ochroleuca* L. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 11, n. 2, p. 49-54, 2016.

SINGH, K. L.; CHAUDHURI, A.; KAR, R. K. Superoxide and its metabolism during germination and axis growth of *Vigna radiata* (L.) Wilczek seeds. **Plant Signal Behavior**, 2014.

SOARES, M. M. et al. Endogenous level of phosphorous in soybean seeds and the relationship with physiological quality, oil and protein content. **Seed Science and Technology**, v. 42, p. 433-443, 2014.

STADLER, R.; LAUTERBACH, C.; SAUER, N. Cell-to-cell movement of green fluorescent protein reveals post-phloem transport in the outer integument and identifies symplastic domains in Arabidopsis seeds and embryos. **Plant Physiology**, v. 139, n. 2, p. 701-712, 2005.

STEINBRECHER, T.; LEUBNER-METZGER, G. The biomechanics of seed germination. **Journal Experimental Botany**, v. 68, p. 765-783, 2017.

STULEN, I.; DE KOK, L. J. Foreword: Exploring interactions between sulfate and nitrate uptake at a whole plant level. In: DE KOK, L. et al. (Eds). **Sulfur Metabolism in Plants**. Proceedings of the International Plant Sulfur Workshop, Dordrecht, v. 1, 2012.

TILLMANN, M. A. A.; MENEZES, N. L. de. Análise de sementes. 3. ed. In: PESKE, S. T.; VILLELA, F. A.; MENEGHELLO, G. E. (Eds). **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. 2012. cap. 3, p. 161-272.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 857 p.

TAKAHASHI, H. et al. Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 62, p. 157-184, 2011.

USDA. United States Department of Agriculture. **“Tropic Sun” Sunn hemp for cover crop use during the sugarcane fallow period**. Natural resources conservation service, Alexandria, Louisiana, 2011. Available in: <https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_PLANTMATERIALS/publications/lapmctn10579.pdf>. Access in: Nov 15, 2018.

VOGIATZAKI, E. et al. PHO1 exports phosphate from the chalazal seed coat to the embryo in developing Arabidopsis seeds. **Current biology**, v. 27, n. 19, p. 2893-2900, 2017.

WANG, Q. et al. Cover crops and organic mulch to improve tomato yield and soil fertility. **Agronomy journal**, Madison, v. 101, n. 2, p. 345-351, 2009.

WHITE, P. J.; VENEKLAAS, E. J. Nature and nurture: the importance of seed phosphorus content. **Plant and Soil**, v. 357, ed. 1-2, p. 1-8, 2012.

YAN, D. et al. The functions of the endosperm during seed germination. **Plant Cell Physiology**, v. 55, p. 1521-1533, 2014.