



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

**CAROLINE PALACIO DE ARAUJO**

**ÁRVORES FRUTÍFERAS FUNCIONAIS DA FLORESTA ATLÂNTICA:  
DIVERSIDADE FENOTÍPICA E MOLECULAR, COMPOSIÇÃO HORMONAL,  
NUTRICIONAL E ANTIOXIDANTE EM *Lecythis pisonis* E *Lecythis lanceolata***

JERÔNIMO MONTEIRO – ES

2020

**CAROLINE PALACIO DE ARAUJO**

**ÁRVORES FRUTÍFERAS FUNCIONAIS DA FLORESTA ATLÂNTICA:  
DIVERSIDADE FENOTÍPICA E MOLECULAR, COMPOSIÇÃO HORMONAL,  
NUTRICIONAL E ANTIOXIDANTE EM *Lecythis pisonis* E *Lecythis lanceolata***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Florestais na Área de Concentração Ciências Florestais.  
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre  
Coorientador: Prof. Dr. José Carlos Lopes

JERÔNIMO MONTEIRO – ES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de  
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

P153a Palacio de Araujo, Caroline, 1995-  
Árvores frutíferas funcionais da Floresta Atlântica: diversidade  
fenotípica e molecular, composição hormonal, nutricional e  
antioxidante em *Lecythis pisonis* e *Lecythis lanceolata* /  
Caroline Palacio de Araujo. - 2020.  
104 f. : il.

Orientador: Rodrigo Sobreira Alexandre.  
Coorientador: José Carlos Lopes.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e  
Engenharias.

1. sapucaia. 2. sapucaia-mirim. 3. hormônios vegetais. 4.  
germinação. 5. diversidade genética. 6. fenotipagem de muda. I.  
Sobreira Alexandre, Rodrigo. II. Carlos Lopes, José. III.  
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências  
Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 630

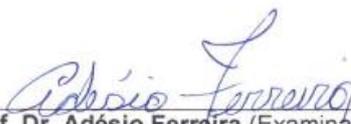
---

**ÁRVORES FRUTÍFERAS FUNCIONAIS DA FLORESTA ATLÂNTICA:  
DIVERSIDADE FENOTÍPICA E MOLECULAR, COMPOSIÇÃO HORMONAL,  
NUTRICIONAL E ANTIOXIDANTE EM *Lecythis pisonis* E *Lecythis lanceolata***

**Caroline Palacio de Araujo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Florestais na Área de Concentração Ciências Florestais.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2020.



---

**Prof. Dr. Adésio Ferreira** (Examinador externo)  
Universidade Federal do Espírito Santo



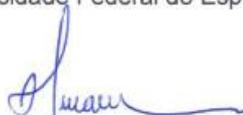
---

**Prof. Dr. Tércio da Silva de Souza** (Examinador externo)  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo



---

**Prof. Dr. José Carlos Lopes** (Coorientador)  
Universidade Federal do Espírito Santo



---

**Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre** (Orientador)  
Universidade Federal do Espírito Santo

## DEDICATÓRIA

Ao meu bondoso Deus

À minha Mãe Lucélia Vidal Palacio de Araujo

Ao meu Pai André de Araujo

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela sua infinita bondade e graça imerecida. Eu não estaria aqui sem a sua infinita misericórdia, Senhor!

Aos meus pais Lucélia Vidal Palacio e André de Araujo por todo apoio, carinho, incentivo e paciência em todos estes anos de estudo. Eu amo vocês!

Ao meu querido irmão Eduardo Palacio de Araujo por toda ajuda e carinho.

Aos meus avós Santinha Vidal Palacio e Maurilio Palacio por todo amor e ajuda em todos estes anos.

Às minhas tias Fernanda Vidal Palacio e Josélia Vidal Palacio Abreu por todo apoio e carinho.

Às minhas amigas Thuanny Lins e Tamyris de Mello pelo apoio e companheirismo.

Às minhas amigas Janete Valani, Aline Mantovani, Kênia Rezende e Vanessa Fagundes, que mesmo distantes, se fazem presentes em meu coração.

Às minhas amigas Talita Oliveira e Amanda Gonçalves, pelos momentos felizes que passamos juntas, contribuindo para que a jornada fosse menos pesada.

Ao meu orientador Rodrigo Sobreira Alexandre, por toda dedicação, apoio e incentivo, nunca duvidando do meu potencial como pesquisadora. O senhor sempre terá todo meu respeito e gratidão.

Ao Ernesto de Moraes Muzzi, Adegmar Ullig Muzzi, César Besteti, Eliana Permanhane, Fassarela, Luiz Fassarela, Gaspar Besse (*in memoriam*), Rosa Besse, Adinea Hese Saick e David Saick por abrirem suas propriedades para a realização deste estudo. Serei eternamente grata.

Ao José de Souza, amigo querido, por todo apoio e ajuda para a realização deste trabalho. Imensamente agradecida.

Ao professor José Carlos Lopes por todo apoio e parceria em todos esses anos, exemplo de sabedoria e gentileza.

Ao professor Adésio Ferreira e ao Guilherme Bravim Canal por todo apoio e paciência na realização das análises estatísticas.

Ao professor Tércio de Souza e o técnico Adriano Azevedo por todo apoio na realização das análises de antioxidantes.

À professora Marcia Flores da Silva Ferreira e a Stéfanie Oliveira pelo apoio na realização da análise molecular.

Ao professor João Paulo Bestete de Oliveira pelo apoio na realização dos mapas e nas coletas em campo.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol), pertencente a Universidade Federal de Viçosa (UFV) e as agência financiadoras (FINEP, CNPq e FAPEMIG) pelos aparelhos utilizados para a realização das análises hormonais.

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais (PPGCFL).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de pesquisa (Edital nº 001/2017).

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES).

A toda a equipe do Laboratório de Sementes Florestais pertencente a UFES.

A todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*Combati o bom combate, acabei a carreira, guardei a fé.*

*2 Timóteo 4:7*

## RESUMO

ARAUJO, Caroline Palacio de. **Árvores frutíferas funcionais da Floresta Atlântica: diversidade fenotípica e molecular, composição hormonal, nutricional e antioxidante em *Lecythis pisonis* e *Lecythis lanceolata***. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre. Coorientador: Prof. Dr. José Carlos Lopes.

As espécies *Lecythis pisonis* Cambess. e *Lecythis lanceolata* Poir. (Lecythidaceae), são castanheiras nativas da Floresta Atlântica, cujas sementes são fontes de alimento para a fauna e seres humanos. O objetivo deste estudo foi estudar as características biométricas, hormonais e químicas de sementes, seus efeitos sobre a emergência e vigor de plântulas, bem como a fenotipagem de mudas e a diversidade molecular entre matrizes de *L. pisonis* e *L. lanceolata*. No primeiro trabalho, analisou-se para cada matriz a biometria e os níveis hormonais das sementes, emergência e vigor de plântulas, fenotipagem de mudas, análise molecular e divergência genética. As análises estatísticas constaram de um teste de Tukey ( $p > 0,05$ ), distância generalizada de Mahalanobis ( $D^2$ ) para as características de hormônios, sementes e muda, diversidade molecular por meio de *primers* ISSR, correlação e diversidade genética pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic). A espécie *L. pisonis* as matrizes *Lp1* e *Lp2* alcançaram as maiores porcentagens de emergência e produção anual de frutos (200 e 300 frutos) e a *Lp2* alcançou a maior massa de endosperma. Árvores de *L. lanceolata* possuem um porte menos elevado, facilitando a colheita de frutos, uma menor relação AIA/ZT no endosperma de sementes e alta capacidade na emissão de brotos em mudas. A matriz *L16* alcançou uma alta produção de frutos (126 frutos) e a *L13* a maior massa do endosperma. O MeJA foi correlacionado negativamente com o crescimento de mudas e acúmulo de massa seca e também houve uma ação antagônica entre a ZTe e ABA para *L. lanceolata*. O tegumento das sementes de ambas as espécies acumula altas concentrações de ABA. Existe uma alta variabilidade genética entre as espécies estudadas, e uma baixa variabilidade genética dentro da espécie. No segundo trabalho, analisaram-se os níveis nutricionais em castanhas, folha e solo (20 e 40 cm) e fenólicos totais, taninos condensados, antocianinas, flavonóis e potencial antioxidante 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) no tegumento e endosperma das castanhas, constando de três

triplicatas. A estatística constou de uma análise descritiva (Box Plot), teste de agrupamento de média Scott-Knott, correlação pelo método UPGMA e análise de componentes principais para os elementos nutricionais da castanha, solo e folha. As castanhas (endosperma) das espécies *L. pisonis* e *L. lanceolata* são ricas fontes de macronutrientes e micronutrientes, sendo o poder antioxidante das sementes mais elevado no tegumento, quando comparado ao endosperma. As matrizes *Lp1*, *Lp2*, *Lp3*, *Lp4* e *Lp6* de *L. pisonis* e *L11*, *L12*, *L14*, *L16* de *L. lanceolata* possuem concentrações adequadas de selênio que permitem o consumo de uma castanha dia<sup>-1</sup>. Para *L. pisonis*, o poder antioxidante (DPPHe) do endosperma (parte comestível) está relacionado principalmente com os conteúdos de FTe. Para *L. lanceolata*, o poder antioxidante do tegumento (DPPHt) aumenta em função da presença de TCt.

**Palavras-chave:** sapucaia, sapucaia-mirim, hormônios vegetais, germinação, diversidade genética, fenotipagem de mudas.

## ABSTRACT

ARAUJO, Caroline Palacio de. **Functional fruit trees in the Atlantic Forest: phenotypic and molecular diversity, hormonal, nutritional and antioxidant composition in *Lecythis pisonis* and *Lecythis lanceolata***. 2020. Dissertation (Master in Forest Sciences) - Federal University of Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Advisor: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre. Co-advisor: Prof. Dr. José Carlos Lopes.

The species *Lecythis pisonis* Cambess. and *Lecythis lanceolata* Poir. (Lecythidaceae), are chestnut trees native to the Atlantic Forest, whose seeds are food sources for fauna and humans. To study the biometric, hormonal and chemical characteristics of seeds, their effects on seedling emergence and vigor, as well as seedling phenotyping and molecular diversity between *L. pisonis* and *L. lanceolata* matrices. In the first study, the biometry and hormonal levels of the seeds, emergence and vigor seedling, seedling phenotyping, molecular analysis and genetic divergence were analyzed from each matrix. The statistical analyzes consisted of a Tukey test ( $p > 0.05$ ), generalized Mahalanobis distance ( $D^2$ ), molecular diversity, correlation and genetic diversity by the UPGMA method (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic). The *L. pisonis* species, the *Lp1* and *Lp2* matrices, reached the highest percentages of emergence and annual fruit production (200 and 300 fruits) and the *Lp2* reached the highest mass of endosperm. *L. lanceolata* trees have a smaller size, facilitating fruit harvesting, a lower AIA/ZT ratio in the seed endosperm and a high capacity for seedling sprouting. The *Ll6* matrix achieved a high fruit production (126 fruits) and *Ll3* the highest mass of the endosperm. MeJA was negatively correlated with seedling growth and dry matter accumulation and there was also an antagonistic action between ZTe and ABAt for *L. lanceolata*. The seed tegument of both species accumulates high concentrations of ABA. There is a high genetic variability between the species studied, and a low genetic variability within the species. In the second study, the nutritional levels in chestnuts, leaves and soil (20 and 40 cm) and total phenolics, condensed tannins, anthocyanins, flavonols and antioxidant potential 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil (DPPH) were analyzed in tegument and endosperm of chestnuts, consisting of three triplicates. The statistics consisted of a descriptive analysis (Box Plot), Scott-Knott average cluster test, correlation by the UPGMA method and analysis of main components for the

nutritional elements of the chestnut, soil and leaf. Chestnuts (endosperm) of the species *L. pisonis* and *L. lanceolata* are rich sources of macronutrients and micronutrients, with the antioxidant power of the seeds being higher in the tegument when compared to the endosperm. The matrices *Lp1*, *Lp2*, *Lp3*, *Lp4* and *Lp6* of *L. pisonis* and *L11*, *L12*, *L14*, *L16* of *L. lanceolata* have adequate concentrations of selenium that allow the consumption of a chestnut day<sup>-1</sup>. For *L. pisonis* the antioxidant power (DPPHe) of the endosperm (edible part) is mainly related to the contents of FTe. For *L. lanceolata* the antioxidant power of the tegument (DPPHt) increases due to the presence of TCt.

**Keywords:** sapucaia, plant hormones, germination, diversity, seedling phenotyping.

## LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: *Lecythis pisonis* Cambess. e *Lecythis lanceolata* Poir.: diversidade genética de matrizes, biometria e composição hormonal de sementes e fenotipagem de mudas.....41

Figura 1. Caracterização morfológica, georreferenciamento e precipitação nas localidades de matrizes de *L. pisonis* e *L. lanceolata*.....43

Figura 2. Concentração endógena dos hormônios AIA, ZT, AIA/ZT, ABA, JA, SA, MeJA e o precursor do etileno ACC presentes em tegumento (barra vermelha) e endosperma (barra verde) de sementes de matrizes de *L. pisonis* (a-h) e *L. lanceolata* (i-p).....51

Figura 3. Correlação das características analisadas para as espécies *L. pisonis* (a) e *L. lanceolata* (b) de comprimento da semente (CS, mm), menor largura da semente (MELS, mm), maior largura da semente (MALS, mm), massa da semente (MS, g), volume da semente (VS, cm<sup>-3</sup>), densidade da semente (DS, g cm<sup>-3</sup>), espessura do tegumento na região de parte aérea (ETPA, mm), espessura do tegumento na região do hilo (ETH, mm), emergência (E, %), índice de velocidade de emergência (IVE), tempo médio de emergência (TME, dias), massa do endosperma (ME, g), massa do tegumento (MT, g), comprimento da parte aérea (CPA, cm), comprimento da raiz principal (CRAP, cm), diâmetro do coleto (DC, mm), número de raízes laterais (NRL), diâmetro da raiz principal (DRP, mm), diâmetro das raízes laterais (DRL, mm), volume de raízes (VR, cm<sup>-3</sup>), densidade das raízes (DR, g cm<sup>-3</sup>), número de folhas (NF), número de brotos (NB), comprimento foliar (CF, cm), largura foliar (LF, cm), espessura foliar (EF, mm), número de hastes (NH), massa seca da parte aérea (MSPA, g), massa seca do sistema radicular (MSRA, g), massa seca total (MST, g), índice de qualidade de Dickson (IQD), colorimetria (L\*, a\*, b\*, C\*, H°), índice SPAD, relações CPA/CRAP, CPA/NF, CPA/NRL, CPA/DC, MSPA/MSRA, NRL/CRAP, NH/CRAP, hormônios no tegumento (t) e endosperma (e) para AIA, ZT, ABA, JA, SA, MeJA, precursores ACC, relação AIA<sub>t</sub>/ZT<sub>t</sub> e AIA<sub>e</sub>/ZT<sub>e</sub>.....60

Figura 4. Dendrogramas de distância genética de Mahalanobis ( $D^2$ ), obtidos por meio do método UPGMA para o agrupamento de matrizes pertencentes às espécies de *L. pisonis* (*Lp*) e *L. lanceolata* (*Ll*) em função das características hormonais e biométricas de sementes e fenotípicas de mudas.....64

Figura 5. Diversidade genética obtida pelo método UPGMA utilizando características biométricas e hormonais de sementes e fenotípicas de mudas para as espécies *L. pisonis* (*Lp*) e *L. lanceolata* (*Ll*), analisando o comprimento da semente (CS, mm), menor largura da semente (MELS, mm), maior largura da semente (MALS, mm), massa da semente (MS, g), volume da semente (VS,  $\text{cm}^{-3}$ ), densidade da semente (DS,  $\text{g cm}^{-3}$ ), espessura do tegumento na região de parte aérea (ETPA, mm), espessura do tegumento na região do hilo (ETH, mm), emergência (E, %), índice de velocidade de emergência (IVE), tempo médio de emergência (TME, dias), massa do endosperma (ME, g), massa do tegumento (MT, g), comprimento da parte aérea (CPA, cm), comprimento da raiz principal (CRAP, cm), número de raízes laterais (NRL), diâmetro da raiz principal (DRP, mm), diâmetro das raízes laterais (DRL, mm), volume de raízes (VR,  $\text{cm}^{-3}$ ), densidade das raízes (DR,  $\text{g cm}^{-3}$ ), número de folhas (NF), número de brotos (NB), largura foliar (LF, cm), espessura foliar (EF, mm), número de hastes (NH), massa seca da parte aérea (MSPA, g), massa seca do sistema radicular (MSRA, g), índice de qualidade de Dickson (IQD), índice SPAD, hormônios no tegumento (t) e endosperma (e) para AIA, ZT, ABA, JA, SA, MeJA e o precursor ACC.....65

CAPÍTULO II: Árvores frutíferas funcionais da Floresta Atlântica: composição química de castanhas, solo e folha e o poder antioxidante de castanhas de *Lecythis pisonis* Cambess. e *Lecythis lanceolata* Poir.....82

Figura 1. Árvore de *L. pisonis* (a) e *L. lanceolata* (b), potencial antioxidante das castanhas (c), radical livre recebendo um  $e^-$  na sua última camada (d), solo nas profundidades 0-20 e 20-40 cm (e), castanha sem tegumento evidenciando a presença de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S), micronutrientes (Fe, Zn, Cu, Mn e Se), fenólicos totais, antocianinas, flavonóis e taninos condensados em sua composição (f).....87

Figura 2. Box plot das concentrações de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (Fe, Zn, Cu, Mn e Se) presentes em castanhas das matrizes de *L. pisonis* (a-j) e *L. lanceolata* (k-t).....90

Figura 3. Box plot com as características dos compostos antioxidantes presentes em castanhas de *L. pisonis* (a-j) e *L. lanceolata* (k-t). DPPHe. 2,2-difenil-1-picril-hidrazil no endosperma, DPPHt. 2,2-difenil-1-picril-hidrazil no tegumento.....93

Figura 4. Correlação de características química para macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (Fe, Zn, Cu, Mn e Se), fenólicos totais (FT, mg 100 g<sup>-1</sup>), antocianinas (A, mg 100 g<sup>-1</sup>), flavonóis (FL, mg 100 g<sup>-1</sup>) e taninos condensados (TC, mg g<sup>-1</sup>) em tegumento (t) e endosperma (e) de castanhas de *L. pisonis* (a) e *L. lanceolata* (b). Legenda: significativo em nível de \*5%, \*\*1% e \*\*\*0,1%.....95

Figura 5. Análise de componente principal (PCA) de acordo com características nutricionais de castanha e folha (a, b); castanha e solo na profundidade p1 (0-20 cm) (c, d) e castanha e solo na profundidade p2 (0-40 cm) (e, f) para matrizes (1, 2, 3, 4, 5 e 6) de *L. pisonis* (a, c, e) e *L. lanceolata* (b, d, f). N. Nitrogênio; P. Fósforo; K. Potássio; Ca. Cálcio; Mg. Magnésio; Fe. Ferro; Zn. Zinco, Cu. Cobre; Mn. Manganês, S. Enxofre; Se. Selênio; pH. Potencial hidrogeniônico em água; Al<sup>+3</sup>. Acidez trocável; H + Al. Acidez potêncial; C. Carbono; MO. Matéria orgânica; CTCt. Capacidade de troca catiônica efetiva; CTCT. Capacidade de troca catiônica; SB. Soma de bases trocáveis; V. Saturação por bases; ISNa. Índice de saturação por sódio para castanha (C), folha (F) e solo nas profundidades p1 (0-20) e p2 (20-40).....98

## LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: *Lecythis pisonis* Cambess. e *Lecythis lanceolata* Poir.: diversidade genética de matrizes, biometria e composição hormonal de sementes e fenotipagem de mudas.....41

Tabela 1. Caracterização de matrizes (M) das espécies (ESP) *L. pisonis* (Lp) e *L. lanceolata* (Ll) avaliando o diâmetro à altura do peito (DAP, cm), diâmetro de copa da matriz (maior e menor, m), circunferência de copa (CC, m), altura da árvore matriz (H, m e número de frutos na árvore matriz (NFM) na safra de 2018.....49

Tabela 2. Análises de biometria e vigor em sementes de diferentes matrizes (M) para as espécies (ESP) *L. pisonis* (Lp) e *L. lanceolata* (Ll) avaliando-se o comprimento da semente (CS, mm), menor largura da semente (MELS, mm), maior largura da semente (MALS, mm), massa da semente (MS, g), volume da semente (VS, cm<sup>-3</sup>), densidade da semente (DS, g cm<sup>-3</sup>), espessura do tegumento na região de parte aérea (ETPA, mm), espessura do tegumento na região do hilo (ETH, mm), emergência (E, %), índice de velocidade de emergência (IVE), tempo médio de emergência (TME, dias), massa do endosperma (ME, g) e massa do tegumento (MT, g).....49

Tabela 3. Fenotipagem de mudas 160 DAS oriundas de sementes de matrizes das espécies (ESP) *L. pisonis* (Lp) e *L. lanceolata* (Ll), analisando-se o comprimento da parte aérea (CPA, cm), comprimento da raiz principal (CRAP, cm), diâmetro do coleto (DC, mm), número de raízes laterais (NRL), diâmetro da raiz principal (DRP, mm), diâmetro das raízes laterais (DRL, mm), volume de raízes (VR, cm<sup>-3</sup>), densidade das raízes (DR, g cm<sup>-3</sup>), número de folhas (NF), número de brotos (NB), comprimento foliar (CF, cm), largura foliar (LF, cm), espessura foliar (EF, mm), número de hastes (NH), massa seca da parte aérea (MSPA, g), massa seca do sistema radicular (MSRA, g), massa seca total (MST, g), índice de qualidade de Dickson (IQD), colorimetria (L\*, a\*, b\*, C\*, H°) das folhas, índice SPAD, relações CPA/CRAP, CPA/NF, CPA/NRL, CPA/DC, MSPA/MSRA, NRL/CRAP e NH/CRAP.....58

Tabela 4. Análise descritiva dos *primers* constando o número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP) e polimorfismo (P, %). (a) Dendrograma de Cluster obtido pelo método UPGMA, baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard, a partir da análise dos polimorfismos para 11 *primers* ISSR entre seis matrizes de *L. pisonis* (*Lp*) e seis matrizes de *L. lanceolata* (*Ll*) e a exemplificação do perfil de amplificação do *primer* ISSR UBC 868. M = marcador de 100 pb.....68

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	21
2.1 Objetivo geral .....	21
2.2 Objetivos específicos .....	21
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	22
3.1 Descrição da espécie <i>Lecythis pisonis</i> Cambess.....	22
3.2 Descrição da espécie <i>Lecythis lanceolata</i> Poir. ....	23
3.3 Germinação de sementes e dormência como mecanismo de defesa.....	23
3.4 Composição nutricional e antioxidante de castanhas .....	24
3.5 Biometria.....	25
3.6 Principais hormônios vegetais endógenos.....	26
3.6.1 Auxina.....	26
3.6.2 Citocininas .....	27
3.6.3 Giberelinas.....	28
3.6.4 Etileno.....	29
3.6.5 Ácido abscísico.....	29
<b>4. REFERÊNCIAS</b> .....	30
<b>CAPÍTULO I: <i>Lecythis pisonis</i> Cambess. e <i>Lecythis lanceolata</i> Poir.: diversidade genética de matrizes, biometria e composição hormonal de sementes e fenotipagem de mudas</b> .....	39
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	41
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
2.1 Georreferenciamento de matrizes.....	42
2.2 Biometria de sementes .....	43
2.3 Análise de hormônios e do precursor ACC em sementes.....	44
2.4 Emergência, vigor e fenotipagem de mudas.....	44
2.5 Diversidade genética por meio de marcadores ISSR.....	45
2.5.1 Extração do DNA genômico.....	45
2.5.2 Reação de amplificação do DNA e eletroforese .....	46
2.6 Análise estatística .....	46
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	47
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	69
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	70

<b>CAPÍTULO II: Árvores frutíferas funcionais da Floresta Atlântica: composição química de castanhas, solo e folha e o poder antioxidante de castanhas de <i>Lecythis pisonis</i> Cambess. e <i>Lecythis lanceolata</i> Poir.....</b>	<b>79</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>82</b>
2.1 Georreferenciamento de matrizes.....	82
2.2 Status nutricional.....	82
2.2.1 Castanha e folha.....	82
2.2.2 Nutrientes disponíveis do solo .....	83
2.3 Análises bioquímicas .....	84
2.3.1 Fenólicos totais .....	84
2.3.2 Antocianinas e flavonóis .....	84
2.3.3 Taninos condensados.....	85
2.3.4 Poder antioxidante pelo método DPPH .....	85
2.4 Análise estatística .....	86
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>99</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>99</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Essências florestais nativas produtoras de castanhas são comumente encontradas dentro da família Lecythidaceae, a exemplo da *L. pisonis* e *L. lanceolata*, contudo ainda são pouco estudadas. A *L. pisonis* produz castanhas ricas em lipídios, proteínas, carboidratos, fibras, ácidos graxos insaturados, macronutrientes e micronutrientes, além de possuírem alto poder antioxidante (VALLILO et al., 1999; CARVALHO et al., 2008; CARVALHO et al., 2012; DEMOLINER et al., 2018a, b), podendo competir no mercado com outras castanhas altamente apreciadas, tais como a castanha do Brasil (PENA MUNIZ et al., 2015), macadamia (SINANOGLOU et al., 2014), noz pecã (KURECK et al., 2018) e castanha de caju (LIU et al., 2018). No entanto, a *L. lanceolata* ainda carece de estudos a respeito da composição nutricional e antioxidante de suas castanhas.

A principal função dos antioxidantes é atuar na inativação de compostos nocivos para o organismo, os quais contribuem para o aparecimento de doenças degenerativas, principalmente o câncer (JABEEN et al., 2018). O selênio (Se) é um composto antioxidante presente em castanhas, devido a capacidade das plantas em absorver-lo do solo, sendo que a sua concentração nos tecidos vegetais varia em função da localização geográfica, hidrologia e pH (STATWICK; SHER, 2017). A partir do Se ocorre a produção de selenoproteínas, as quais estão associadas a muitas funções fisiológicas no organismo, como a manutenção da integridade das membranas celulares, no desenvolvimento de células espermáticas e na regulação de hormônios da tireoide (triiodotironina), sendo que a sua deficiência está associada a algumas doenças que afetam o tecido muscular cardíaco e o ósseo (RAYMAN, 2000).

O estudo de essências florestais nativas que possuem castanhas com potencial alimentício ainda é escasso, comparado à quantidade de recursos disponíveis na biodiversidade mundial. Faz-se necessário investigações iniciais aprofundadas em diversas áreas do conhecimento para identificar matrizes potenciais, principalmente quanto ao teor nutricional, germinação e vigor de sementes.

Um dos fatores que regulam a germinação em sementes é o balanço hormonal endógeno, cuja concentração pode variar em função da espécie e condições estressantes nas quais a matriz ou a semente são submetidas (ZHANG et al., 2017;

WANG et al., 2018; ZHU et al., 2019). O ácido abscísico (ABA) é considerado o hormônio da dormência, produzido principalmente pelo endosperma e transportado até o embrião em desenvolvimento, contribuindo para que as sementes germinem no momento adequado, evitando, por exemplo, casos de viviparidade. Este é precursor de proteínas LEAs (*Late Embryogenesis Abundant*), as quais atuam na capacidade de tolerância a dessecação do embrião (PENFIELD, 2017; BHATTACHARYA et al., 2019; RODRIGUES et al., 2019). Outros hormônios estão envolvidos na germinação de sementes e normalmente atuam antagonicamente com o conteúdo de ABA, como observado em estudos com sementes de *Taxus yunnanensis*, demonstrando que os níveis de ABA diminuem em função do maior tempo de armazenamento, enquanto os hormônios ácido indol-3-acético (AIA), giberelina (GA<sub>3</sub>) e zeatina (ZT) aumentam (BIAN et al., 2018).

Estes estudos, também auxiliam na compreensão de inúmeros estádios do desenvolvimento vegetal e da propagação, que normalmente ocorre via seminífera e em ambientes naturais, já que muitas essências florestais possuem baixa taxa e desuniformidade na germinação e emergência de plântulas, prejudicando a sua produção e comercialização (CONSIDINE; CONSIDINE, 2016). Também torna-se importante compreender a diversidade fenotípica e genotípica destas espécies, visando à seleção de indivíduos superiores para programas de melhoramento genético e conservação de bancos de germoplasmas (SOUZA et al., 2008).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Estudar as características biométricas, hormonais e químicas de sementes, seus efeitos sobre a emergência e vigor de plântulas, bem como a fenotipagem de mudas e a diversidade molecular entre matrizes de *L. pisonis* e *L. lanceolata*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Analisar fenotipicamente sementes e mudas de *L. pisonis* e *L. lanceolata*.
- Analisar o potencial germinativo e o vigor de sementes *L. pisonis* e *L. lanceolata*.

- Estudar a fisiologia hormonal de sementes e a sua relação com a germinação e crescimento de mudas de *L. pisonis* e *L. lanceolata*.
- Analisar a diversidade genética entre os indivíduos dentro e entre espécies de *Lecythis pisonis* e *Lecythis lanceolata*.
- Selecionar matrizes com características superiores na produção de sementes, poder germinativo e vigor.
- Estudar as características nutricionais e poder antioxidante de castanhas de *L. pisonis* e *L. lanceolata*.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Descrição da espécie *Lecythis pisonis* Cambess.

A espécie *Lecythis pisonis* Cambess., conhecida popularmente como sapucaia, é uma castanheira ainda pouco estudada, podendo ser encontrada na Floresta Atlântica e Amazônica (LORENZI, 1998; CARVALHO et al., 2006). Destaca-se pelo seu porte elevado e tronco estriado, possuindo folhagens novas de coloração rósea. Suas inflorescências dão origem a frutos do tipo pixídio (seco e deiscente), que carecem de dez a onze meses para completar seu processo de maturação. Sua madeira é apreciada na produção de janelas, estacas, mastros e cabos de ferramentas (LORENZI, 1998; RIBEIRO, 2010). As castanhas de *L. pisonis* são ricas fontes de proteínas, lipídios, carboidratos, macro e micronutrientes essenciais na alimentação de pessoas e animais (SOUZA et al., 2008; CARVALHO et al., 2012). Seu extrativismo ocorre principalmente por índios e produtores rurais, contudo ainda sem fins industriais (OLIVEIRA et al., 2012). Também pode ser utilizada como um recurso agroflorestal no sombreamento de plantações de cacau (RODRIGUES et al., 2015).

Os morcegos são atraídos pelo arilo presente na região do hilo da semente, em função do seu sabor adocicado e estes animais posteriormente abandonam estas sementes no ambiente natural. Os roedores também utilizam as castanhas como fonte de alimento, e muitos possuem o hábito de enterrá-las para um posterior consumo, contudo, algumas destas sementes acabam se perdendo no solo, contribuindo para a sua dispersão. Mamíferos como morcegos, roedores e macacos são os principais agentes dispersores, enquanto, as abelhas atuam na polinização das flores, as quais

possuem sistema reprodutivo alógamo (MORI; PRANCE, 1990; SAMPAIO, 2000; TSOU; MORI, 2007; HAUGAASEN et al., 2012).

A localização das matrizes influencia na constituição química de suas castanhas, na qual, pode atuar como uma espécie fitorremediadora, absorvendo os compostos tóxicos de solos contaminados com metais pesados, a exemplo do chumbo (VALLILO et al., 1998). Em função disto, análises de solo e nutricionais nas castanhas se fazem importantes, visando à indicação para o consumo humano.

### 3.2 Descrição da espécie *Lecythis lanceolata* Poir.

*Lecythis lanceolata* Poir. é uma árvore nativa da Floresta Atlântica, pertencente à família Lecythidaceae e conhecida popularmente como sapucaia-mirim. Suas folhas possuem formato elíptico, com margens serradas, inflorescências axilares, frutos deiscentes do tipo pixídio e suas sementes também possuem arilo na região do hilo (LORENZI, 2002). Estádio sucessional secundária tardia para o gênero *Lecythis* sp. (CARVALHO et al., 2006), sendo esta endêmica de mata costeira, ambientes não alagados (terra firme de planícies), não sendo facilmente encontradas em regiões antropicamente desmatadas (MORI, 1990).

Comunidades próximas a remanescentes florestais reconhecem a importância da preservação ao associar a sua fonte de renda ao extrativismo sustentável, unindo preservação e geração de renda, como observado por Christo et al. (2012), que comprovaram elevado valor de uso (VU) da *L. lanceolata*, podendo ser utilizada como fonte de produtos madeireiros e não madeireiros, contudo possuindo uma baixa densidade relativa no fragmento estudado, indicando que o VU não está associado com à sua abundância.

### 3.3 Germinação de sementes e dormência como mecanismo de defesa

Sementes florestais com tegumento duro e espesso costumam enfrentar dificuldades na germinação e emergência de plântulas, devido à alta resistência a entrada de água para o interior da semente. Carvalho (2006) classifica as sementes de *L. pisonis* de ortodoxas se submetidas ao armazenamento em embalagem semipermeável a uma temperatura de 5 °C por um período de 90 dias. Sementes ortodoxas possuem membranas mais estáveis, devido ao acúmulo de proteínas LEAs,

cujo precursor é o ABA, sendo estas proteínas formadas por aminoácidos resistentes a temperaturas elevadas, o que contribui para a resistência do embrião a dessecação em ambientes desfavoráveis (DELAHAIE et al., 2013).

Muitas espécies florestais possuem algum tipo de dormência, que pode ser ocasionada por fatores intrínsecos, os quais impedem a germinação das sementes mesmo quando lhes são fornecidas todas as condições ambientais necessárias, como luz, oxigênio, temperatura e água. Diferente de quiescência, quando a semente não germina na ausência destas condições e é controlada por fatores exógenos (CONSIDINE; CONSIDINE, 2016). Alguns fatores estão envolvidos na dormência de sementes, dentre eles a impermeabilidade do tegumento a absorção de água (DAYRELL et al., 2016), a imaturidade do embrião (OLVERA-CARRILLO et al., 2009) ou devido a influência hormonal, por exemplo, a deposição de ABA no embrião nos estádios tardios da embriogênese, podendo influenciar no controle do crescimento do eixo-embrionário, impedindo também a germinação em condições desfavoráveis (KANG et al., 2015; PENFIELD, 2017).

A dormência na natureza se faz importante para a manutenção dos bancos de sementes no solo das florestas, permitindo sua germinação em diferentes períodos de tempo ao longo do ano, e favorecendo a dispersão das sementes em lugares inóspitos, além de diminuir a competição entre indivíduos oriundos da mesma planta matriz (PENFIELD, 2017).

### 3. 4 Composição nutricional e antioxidante de castanhas

A *L. lanceolata* é uma castanheira ainda pouco estudada dentro da família Lecythidaceae, principalmente quanto a capacidade nutricional e antioxidante de suas castanhas. Pertence à mesma família da *L. pisonis*, cujas sementes são constituídas quimicamente por lipídios, proteínas, carboidratos, fibras, ácidos graxos insaturados, macronutrientes, micronutrientes e antioxidantes (VALLILO et al., 1999; CARVALHO et al., 2008; CARVALHO et al., 2012; DEMOLINER et al., 2018a, b).

A ação antioxidante de castanhas ocorre em função da presença de alguns compostos, a exemplo do selênio e do ácido linoleico (DEMOLINER et al., 2018a). Os antioxidantes podem ser produzidos naturalmente pelo organismo ou obtidos exógenamente através da alimentação e atuam contra os radicais livres ou espécies

reativas de oxigênio (ERO), doando um elétron para a última camada da ERO, fazendo com que esta se torne estável (JABEEN et al., 2018).

As ERO são compostos originados através de reações biológicas, alimentação ou processos inflamatórios do organismo, e possuem um número ímpar de elétrons em sua última camada, característica esta que os torna altamente reativos e nocivos para o organismo. Estas ERO atuam lesando as células através do rompimento das membranas celulares, contribuindo para o envelhecimento e surgimento de vários tipos de doenças como o câncer, doenças auto-imunes e cardiovasculares. Dentre estas pode-se citar o superóxido ( $O_2^-$ ), hidroperoxila ( $HO_2^-$ ), hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (GALADARI et al., 2017).

### 3.5 Biometria

Dados biométricos podem ser utilizados na compreensão da diversidade genética de indivíduos dentro de uma mesma espécie, por meio da fenotipagem. Estudos em diferentes acessos de sapucaia, apresentaram alta diversidade genética, o que permitiu a indicação destes para programas de melhoramento genético (SOUZA et al., 2008).

Sabe-se da grande necessidade da seleção de indivíduos com características superiores para sistemas de restauração florestal e plantios comerciais. Poggetti et al. (2017) estudaram 220 matrizes de noqueira-comum (*Juglans regia* L.), analisando as características de massa da amêndoa, da casca, espessura da casca, cor do tegumento da castanha e formato do fruto, visando à indicação de alguns acessos para a propagação vegetativa e subsequente distribuição entre os produtores.

Frutos grandes frequentemente englobam uma maior quantidade de sementes de tamanho pequeno ou uma menor quantidade de tamanho grande ou uma mistura de sementes grandes e pequenas. Sementes grandes normalmente possuem maiores porcentagens de germinação quando comparadas com sementes pequenas, provavelmente devido a uma quantidade superior de tecido de reserva destinado a nutrir o embrião (MNG'OMBA; SILESHI, 2015).

A espessura do tecido de revestimento também tem grande influência sobre a germinação, o que explica as baixas taxas de germinação e vigor em espécies florestais, já que a raiz primária pode encontrar uma enorme barreira física durante o

processo de germinação, principalmente quando o tegumento possui deposição de lignina (KONAN et al., 2018).

### 3.6 Principais hormônios vegetais endógenos

#### 3.6.1 Auxina

Charles Darwin e seu filho Francis ao estudar tropismo em alpiste (*Phalaris canariensis*) tinham o interesse em descobrir o que levava a curvatura do coleóptilo em direção a fonte luminosa. Concluindo que o ápice dos coleóptilos percebiam os estímulos, os quais eram transmitidos para a zona de crescimento, promovendo a sua curvatura. Em estudos com aveia (*Avena sativa*) foi comprovado a presença de uma substância que promovia o crescimento no ápice dos coleóptilos, denominando-a auxina (WENT, 1926; TAIZ et al., 2017).

A primeira auxina descoberta foi o ácido indol-3-acético (AIA), sendo a mais abundante entre as plantas superiores, atuando na dominância apical (BARBIER et al., 2017), formação de raízes (COSTA et al., 2018), diferenciação vascular (BERLETH et al., 2000), regulação da abscisão foliar quando associado ao etileno (KUČKO et al., 2019) e desenvolvimento de frutos (MATSUO et al., 2018). As auxinas são conhecidas como homônios do crescimento, sendo sintetizadas principalmente em ápices caulinares, folhas jovens, frutos e sementes em desenvolvimento, associando-se a tecidos que estão em processo de rápida divisão celular (TEALE et al., 2006).

A dominância apical permite que a planta cresça em tamanho, em detrimento do afrouxamento celular causado pela diminuição do pH (acidificação) da parede celular, associado a ação de enzimas, a exemplo das expansinas, codificadas pelos genes EXPA1 e EXPA8 que quebram as ligações de celulose e hemicelulose, culminando para a extensão da parede celular, fator importante para curvatura e alongamento (COSGROVE; JARVIS, 2012; TAIZ et al., 2017). Quando o ápice é podado/cortado, vai existir uma menor relação auxina/citocinina, influenciando no desenvolvimento de gemas laterais e no crescimento lateral da copa (BARBIER et al., 2017).

A auxina pode atuar inibindo a produção de etileno, retardando o processo de abscisão foliar, sendo este um processo geneticamente programado, culminando na separação de um órgão da planta. Ocorre a formação de uma zona de abscisão, local

este onde as células tem suas paredes celulares digeridas, tornando-as frágeis e causando o seu desprendimento. Durante a senescência foliar a fotossíntese é interrompida, e suas reservas são transferidas para outros tecidos, ocorrendo a diminuição dos níveis de auxinas, culminando para aumentos das concentrações de etileno, o qual irá desencadear o processo de senescência do órgão vegetal, findando com a sua abscisão (HIMELBLAU; AMASINO, 2001; TAIZ et al., 2017; KUČKO et al., 2019).

O aminoácido triptofano é o provável precursor do AIA, sendo a rota do ácido indol-3-pirúvico a via mais comum, tendo como substrato inicial o triptofano (Trp), o qual através da Trp transaminase é convertido em ácido indol-3-pirúvico (AIP) por uma desaminação, seguido por uma descarboxilação pela enzima AIP descarboxilase, formando o indol-3-acetaldeído (IAld), o qual sofre uma reação de oxidação mediada pela IAld desidrogenase, dando origem ao AIA (TAIZ et al., 2017; CASANOVA-SÁEZ; VOß, 2019).

O transporte das auxinas ativas é lento, unidirecional (polar), movendo-se do ápice para a região basal, com gasto de energia, sendo o floema sua principal rota de transporte, independente da ação da gravidade, ocorrendo principalmente de célula a célula. O AIA pode entrar na célula passivamente na forma protonada (AIAH), ou na sua forma aniônica  $AIA^-$  no sentido ápice-base. No citosol celular a forma ânionica irá predominar em detrimento do pH neutro do citosol. O  $AIA^-$  sai da célula através de proteínas transportadoras localizadas nas extremidades celulares, denominadas PIN (BARBIER et al., 2017; TAIZ et al., 2017; BARBOSA et al., 2018).

### 3.6.2 Citocininas

Os cientistas visavam descobrir quais os fatores que promoviam a divisão celular de células vegetais. Estudos começaram a ser realizados com vários tipos de tecidos vegetais, como os caulinares *in vitro*, utilizando como suplemento para o meio de cultura o endosperma líquido de coco, sendo este capaz de causar a iniciação da divisão celular em células adultas de plantas, indicando a presença de algum composto com essa característica, que em estudos posteriores foi identificada como zeatina (CAPLIN; STEWARD, 1948; TAIZ et al., 2017).

Em estudos com fumo *in vitro* foi observado que a base nitrogenada adenina possuía algum efeito sobre o processo de divisão celular. Em seguida descobriu-se a

cinetina (6-furfurilaminopurina), uma citocinina sintética, produzida através da quebra de DNA de esperma de arenque (peixe), quando este foi submetido a autoclavagem, culminando com o deslocamento do anel furfúril, derivado da desoxirribose, da posição 9 para a 6 no anel de adenina (TAIZ et al., 2017).

Posteriormente, ao colocar extrato de endosperma de semente imatura de milho (*Zea mays*) em meio de cultura com auxina, Letham (1963) observou que as células eram induzidas a proliferar. A substância responsável foi isolada e denominada trans-6-(4-hidróxi-3-metilbut-2-enilamino) purina, também chamada de zeatina, podendo estar na sua forma *cis* ou *trans* (LACUESTA et al., 2018).

A citocinina é o hormônio da divisão celular, produzida principalmente em ápices radiculares e transportadas pelo xilema para a parte aérea, atuando no desenvolvimento de brotações (GU et al., 2018), melhorando o desenvolvimento de plântulas germinadas *in vitro* (SIMLAT et al., 2019), sinteticamente, contribui para melhorias na produção, aumentando o tamanho final de frutas (KUMAR et al., 2014; FERRER et al., 2017) e atua na regulação da senescência de flores (SHIMIZU-YUMOTO; ICHIMURA, 2013).

### 3.6.3 Giberelinas

Plantadores de arroz no Japão observaram um crescimento anormal em altura (alongamento do entrenó), com coloração pálida e adoentada, o que promovia uma diminuição da produção de sementes. Foi descoberto que este crescimento anormal era causado pela toxina secretada pelo fungo *Gibberella fujikuroi*, a qual foi isolada e denominada de ácido giberélico (KUROSAWA, 1926; DAVIES, 1995; YAMAGUCHI, 2008; TAIZ et al., 2017).

São encontradas principalmente em frutos em desenvolvimento e sementes imaturas. Podem atuar no crescimento de raiz (TAN et al., 2019), quebra de dormência em sementes, indução de hidrolases pela camada de aleurona no endosperma para subsequente quebra de macromoléculas e nutrição do embrião (MIRANSARI; SMITH, 2014), indução de floração (PHARIS et al., 1987), estabelecimento e crescimento de frutos (HOSEIN-BEIGI et al., 2019).

#### 3.6.4 Etileno

Tem como precursor a metionina e o seu intermediário é o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Altas concentrações de etileno são encontradas em folhas em processo de abscisão foliar, senescência de flor, amadurecimento de frutos e quando a planta é submetida a lesões (BARRY; GIOVANNONI, 2007).

A biossíntese de etileno ocorre através da conversão de metionina em S-adenosilmetionina (SAM) e sua posterior conversão em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) por meio da ACC sintase, e por fim é convertida em etileno por meio da ACC oxidase (DUBOIS et al., 2018). A expressão do gene ARGOS em algumas espécies permite que estas se tornem menos sensíveis a ação do etileno, culminando para o aumento da tolerância ao estresse hídrico (SHI et al., 2015). O etileno está envolvido na regulação de genes fundamentais para a divisão celular do procâmbio, e sua interação com estes genes contribui para a manutenção do tecido vascular (ETCHELLS et al., 2012).

Em algumas espécies, baixas concentrações de etileno podem promover crescimento rápido de folhas, e elevadas concentrações acarretam em diminuição do alongamento (FIORANI et al., 2002). Também está envolvido no amadurecimento de frutos, sendo encontrada uma maior quantidade de genes receptores de etileno em frutos climatéricos, quando comparado aos não-climatéricos, o que demanda uma maior concentração deste gás durante o processo de amadurecimento (CHEN et al., 2018).

#### 3.6.5 Ácido abscísico

A biossíntese do ABA pode ocorrer de forma direta, tendo como precursor o farnesil pirofosfato, contudo, ela ocorre principalmente por via indireta, convertendo o isopentenildifosfato (IPP) em trans-violaxantina (C<sub>40</sub>) através da enzima catalizadora zeaxantina epoxidase (ZEP). Esta dará origem a 9'cis-neoxantina, que por meio de uma clivagem resultará no xantoxal, sendo este convertido em ABA (TAIZ et al., 2017).

O ABA atua impedindo casos de viviparidade, comum em plantas ABA-deficientes, processo este que a semente germina ainda no tecido materno (PENFIELD et al., 2017), reduz as lesões promovidas por estresse salino (JAVID et

al., 2011; POÓR et al., 2019), atua no crescimento de pelos radiculares quando associado ao óxido nítrico (LOMBARDO; LAMATTINA, 2018), é precursor de proteínas LEAs, as quais são mais abundantes no final da embriogênese e são constituídas por aminoácidos resistentes a temperaturas elevadas, estando envolvidas na capacidade de tolerância a dessecação do embrião ao promover uma maior estabilidade nas membranas celulares (BHATTACHARYA et al., 2019).

#### 4. REFERÊNCIAS

BARBIER, F. F.; DUN, E. A.; BEVERIDGE, C. A. Apical dominance. **Current Biology**, v. 27, n. 17, p. R864-R865, 2017.

BARBOSA, I. C.; HAMMES, U. Z.; SCHWECHHEIMER, C. Activation and polarity control of PIN-FORMED auxin transporters by phosphorylation. **Trends in Plant Science**, v. 23, n. 6, p. 523-538, 2018.

BARRY, C. S.; GIOVANNONI, J. J. Ethylene and fruit ripening. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 26, n. 2, p. 143, 2007.

BERLETH, T.; MATTSSON, J.; HARDTKE, C. S. Vascular continuity and auxin signals. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 9, p. 387-393, 2000.

BHATTACHARYA, S. et al. Structural, functional, and evolutionary analysis of late embryogenesis abundant proteins (LEA) in *Triticum aestivum*: A detailed molecular level biochemistry using in silico approach, **Computational Biology and Chemistry**, v. 82, p. 9-24, 2019.

BIAN, F. et al. Dormancy release and germination of *Taxus yunnanensis* seeds during wet sand storage. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 3205, 2018.

CAPLIN, S. M.; STEWARD, F. C. Effect of coconut milk on the growth of the explants from carrot root. **Science**, v. 108, p. 655-657, 1948.

CARVALHO, F. A.; NASCIMENTO, M. T.; BRAGA, J. M. A. Composição e riqueza florística do componente arbóreo da Floresta Atlântica Submontana na região de Imbaú, Município de Silva Jardim, RJ. **Acta Botânica Brasílica**, v. 3, n. 20, p. 727-740, 2006.

CARVALHO, I. M. M. et al. Caracterização química da castanha de sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess.) da região da zona da mata mineira. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 6, p. 971-977, 2012.

CARVALHO, M. G. et al. Avaliação dos parâmetros físicos e nutricionais de amêndoas de chichá, sapucaia e castanha-do-gurguéia. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 4, p. 517-523, 2008.

CASANOVA-SÁEZ, R.; VOß, U. Auxin metabolism controls developmental decisions in land plants. **Trends in Plant Science**, v. 24, p. 741-754, 2019.

CHEN, Y. et al. Ethylene receptors and related proteins in climacteric and non-climacteric fruits. **Plant Science**, v. 276, p. 63-72, 2018.

CHRISTO, A. G. et al. Evidence for conservation and sustainable use in a fragment of the Atlantic forest in southeastern Brazil by a traditional human group. **SpringerPlus**, v. 1, n. 1, p. 21, 2012.

CONSIDINE, M. J.; CONSIDINE, J. A. On the language and physiology of dormancy and quiescence in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 11, p. 3189-3203, 2016.

COSGROVE, D. J.; JARVIS, M. C. Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. 204, p. 1-6, 2012.

COSTA, C. T. et al. Comparative adventitious root development in pre-etiolated and flooded *Arabidopsis* hypocotyls exposed to different auxins. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 127, p. 161-168, 2018.

DAVIES, P. J. **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. 833 p.

DAYRELL, R. L. et al. Phylogeny strongly drives seed dormancy and quality in a climatically buffered hotspot for plant endemism. **Annals of Botany**, v. 119, n. 2, p. 267-277, 2016.

DELAHAIE, J. et al. LEA polypeptide profiling of recalcitrant and orthodox legume seeds reveals ABI3-regulated LEA protein abundance linked to desiccation tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 14, p. 4559-4573, 2013.

DEMOLINER, F. et al. Sapucaia nut (*Lecythis pisonis* Cambess) and its by-products: A promising and underutilized source of bioactive compounds. Part I: Nutritional composition and lipid profile. **Food Research International**, v. 112, p. 434-442, 2018a.

DEMOLINER, F. et al. Sapucaia nut (*Lecythis pisonis* Cambess) and its by-products: A promising and underutilized source of bioactive compounds. Part II: Phenolic compounds profile. **Food Research International**, v. 112, p. 434-442, 2018b.

DUBOIS, M.; VAN DEN BROECK, L.; INZÉ, D. The pivotal role of ethylene in plant growth. **Trends in Plant Science**, v. 23, n. 4, p. 311-323, 2018.

ETCHELLS, J. P.; PROVOST, C. M.; TURNER, S. R. Plant vascular cell division is maintained by an interaction between PXY and ethylene signalling. **Plos Genetics**, v. 8, n. 11, p. e1002997, 2012.

FERRER, C. et al. Increase in final fruit size of tangor (*Citrus reticulata* x *C. sinensis*) cv. W. Murcott by application of benzyladenine to flowers. **Scientia Horticulturae**, v. 223, p. 38-43, 2017.

FIORANI, F. et al. Ethylene emission and responsiveness to applied ethylene vary among *Poa* species that inherently differ in leaf elongation rates. **Plant Physiology**, v. 129, n. 3, p. 1382-1390, 2002.

GALADARI, S. et al. Reactive oxygen species and cancer paradox: to promote or to suppress?. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 104, p. 144-164, 2017.

GU, J. et al. Roles of nitrogen and cytokinin signals in root and shoot communications in maximizing of plant productivity and their agronomic applications. **Plant Science**, v. 274, p. 320-331, 2018.

HAUGAASEN, J. M. T. et al. Fruit removal and natural seed dispersal of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa*) in Central Amazonia, Brazil. **Biotropica**, v. 44, n. 2, p. 205-210, 2012.

HIMELBLAU, E.; AMASINO, R. M. Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, n. 10, p. 1317-1323, 2001.

HOSEIN-BEIGI, M. et al. Positive effects of foliar application of Ca, B and GA<sub>3</sub> on the qualitative and quantitative traits of pomegranate (*Punica granatum* L.) cv. 'Malase-Torshe-Saveh'. **Scientia Horticulturae**, v. 254, p. 40-47, 2019.

JABEEN, H. J. et al. Investigating the scavenging of reactive oxygen species by antioxidants via theoretical and experimental methods. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 180, p. 268-275, 2018.

JAVID, M. G. et al. The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 726-737, 2011.

KANG, J. et al. Abscisic acid transporters cooperate to control seed germination. **Nature Communications**, v. 6, p. 8113-8113, 2015.

KONAN, J. A.; KOFFI, K. K.; ZORO, A. I. B. Lignin biosynthesis rate is responsible for varietal difference in fruit rind and seed coat hardness in the bottle gourd *Lagenaria siceraria* (Molina) Standley. **South African Journal of Botany**, v. 117, p. 276-281, 2018.

KUĆKO, A.; WILMOWICZ, E.; OSTROWSKI, M. Spatio-temporal IAA gradient is determined by interactions with ET and governs flower abscission. **Journal of Plant Physiology**, v. 236, p. 51-60, 2019.

KUMAR, R.; KHURANA, A.; SHARMA, A. K. Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 16, p. 4561-4575, 2014.

KURECK, I. et al. Chemical characterization and release of polyphenols from pecan nut shell [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] in zein microparticles for bioactive applications. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 137-145, 2018.

KUROSAWA, E. Experimental studies on the secretion of *Fusarium heterosporum* on rice plants. **Transactions of the Natural History Society of Formosa**, v. 16, p. 213-227, 1926.

LACUESTA, M. et al. The *trans* and *cis* zeatin isomers play different roles in regulating growth inhibition induced by high nitrate concentrations in maize. **Plant Growth Regulation**, v. 85, n. 2, p. 199-209, 2018.

LETHAM, D. S. Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. **Life Sciences**, v. 2, p. 569-573, 1963.

LIU, C. M. et al. Molecular and functional properties of protein fractions and isolate from cashew nut (*Anacardium occidentale* L.). **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 393, 2018.

LOMBARDO, M. C.; LAMATTINA, L. Abscisic acid and nitric oxide modulate cytoskeleton organization, root hair growth and ectopic hair formation in Arabidopsis. **Nitric Oxide**, v. 80, p. 89-97, 2018.

LORENZZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. Ed. Nova Odessa:Plantarum, 2002. 368p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa:Plantarum, 1998. 352p.

MATSUO, S. et al. Transcriptional regulation of auxin metabolic-enzyme genes during tomato fruit development. **Scientia Horticulturae**, v. 241, p. 329-338, 2018.

MIRANSARI, M.; SMITH, D. L. Plant hormones and seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, v. 99, p. 110-121, 2014.

MNG'OMBA, S. A.; SILESHI, G. W. Effect of propagule type and fruiting time on *Uapaca kirkiana* fruit and seed size, seed germination and seedling growth. **Trees**, v. 29, n. 3, p. 655-662, 2015.

MORI, S. Diversificação e conservação das Lecythidaceae neotropicais. **Acta Botânica Brasileira**, v. 4, n. 1, p. 45-68, 1990.

MORI, S. A.; PRANCE, G. T. **Lecythidaceae part II: the zygomorphic-flowered new world genera** (*Couroupita*, *Corythophora*, *Bertholletia*, *Couratari*, *Eschweillera*, & *Lecythis*), with a study of secondary of neotropical lecythidaceae. New York: The New York Botanical Garden, 1990. 375p. (Flora Neotropica. Monograph, 21 II).

OLIVEIRA, V. B. et al. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 170-179, 2012.

OLVERA-CARRILLO, Y. et al. Effect of environmental heterogeneity on field germination of *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae) seeds. **Journal of Arid Environments**, v. 73, n. 4, p. 414-420, 2009.

PENA MUNIZ, M. A. et al. Physicochemical characterization, fatty acid composition, and thermal analysis of *Bertholletia excelsa* HBK oil. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 41, p. 147-151, 2015.

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

PHARIS, R. P.; WEBBER, J. E.; ROSS, S. D. The promotion of flowering in forest trees by gibberellin A47 and cultural treatments: A review of the possible mechanisms. **Forest Ecology and Management**, v. 19, n. 1-4, p. 65-84, 1987.

POGGETTI, L. et al. Morphological and carpological variability of walnut germplasm (*Juglans regia* L.) collected in North-Eastern Italy and selection of superior genotypes. **Scientia Horticulturae**, v. 225, p. 615-619, 2017.

POÓR, P. et al. Comparison of changes in water status and photosynthetic parameters in wild type and abscisic acid-deficient sitiens mutant of tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Rheinlands Ruhm) exposed to sublethal and lethal salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 232, p. 130-140, 2019.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **The Lancet**, v. 356, p. 233-241, 2000.

- RIBEIRO, G. D. **Algumas espécies de plantas reunidas por famílias e suas propriedades**, Embrapa Rondônia, 2010. 179p.
- RODRIGUES, A. B. et al. First microsatellite markers for *Lecythis pisonis* (Lecythidaceae), an important resource for Brazilian fauna. **Conservation Genetics Resources**, v. 7, n. 2, p. 437-439, 2015.
- RODRIGUES, I. V. et al. Fruit development and ABA biosynthesis during *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) seed maturation. **Journal of Plant Growth Regulation**, p. 1-13, 2019.
- SAMPAIO, P. T. B. Castanha-sapucaia (*Lecythis pisonis*). In: CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. R. **Biodiversidade amazônica: exemplos e estratégias de utilização**. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e tecnológico, 2000. p. 141-147.
- SHI, J. et al. Overexpression of ARGOS genes modifies plant sensitivity to ethylene, leading to improved drought tolerance in both *Arabidopsis* and maize. **Plant Physiology**, v. 169, n. 1, p. 266-282, 2015.
- SHIMIZU-YUMOTO, H.; ICHIMURA, K. Postharvest characteristics of cut dahlia flowers with a focus on ethylene and effectiveness of 6-benzylaminopurine treatments in extending vase life. **Postharvest Biology and Technology**, v. 86, p. 479-486, 2013.
- SIMLAT, M. et al. Evaluation on *Stevia rebaudiana* Bertoni seed germination and seedling development under phytohormones treatment. **Scientia Horticulturae**, v. 257, p. 108-117, 2019.
- SINANOGLOU, V. J. et al. Monitoring the quality of  $\gamma$ -irradiated macadamia nuts based on lipid profile analysis and chemometrics. Traceability models of irradiated samples. **Food Research International**, v. 60, p. 38-47, 2014.
- SOUZA, V. A. B. et al. Características físicas de frutos e amêndoas e características químico-nutricionais de amêndoas de acessos de sapucaia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 4, p. 946-952, 2008.

- STATWICK, J.; SHER, A. A. Selenium in soils of western Colorado. **Journal of Arid Environments**, v. 137, p. 1-6, 2017.
- TAIZ, L. et al. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858 p.
- TAN, H. et al. A Crucial role of GA-regulated flavonol biosynthesis in root growth of *Arabidopsis*. **Molecular Plant**, v. 12, n. 4, p. 521-537, 2019.
- TEALE, W. D.; PAPONOV, I. A.; PALME, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 11, p. 847-859, 2006.
- TEIXEIRA, G. L. et al. Assessment of subcritical propane, supercritical CO<sub>2</sub> and soxhlet extraction of oil from sapucaia (*Lecythis pisonis*) nuts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 133, p. 122-132, 2018.
- TSOU, C. H.; MORI, S. A. Floral organogenesis and floral evolution of the Lecythidoideae (Lecythidaceae). **American Journal of Botany**, v. 94, n. 5, p. 716-736, 2007.
- VALLILO, M. I. et al. *Lecythis pisonis* Camb. nuts: oil characterization, fatty acids and minerals. **Food Chemistry**, v. 66, n. 2, p. 197-200, 1999.
- VALLILO, M. I. et al. Caracterização química parcial das sementes de *Lecythis pisonis* Camb. (sapucaia). **Acta Amazônica**, v. 28, n. 2, p. 131-140, 1998.
- WANG, Y. et al. Reduced bioactive gibberellin content in rice seeds under low temperature leads to decreased sugar consumption and low seed germination rates. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 133, p. 1-10, 2018.
- WENT, F. W. On growth-accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen**, v. 30, p. 10-19, 1926.
- YAMAGUCHI, S. Gibberellin metabolism and its regulation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 225-251, 2008.

ZHANG, X. et al. A significant positive correlation between endogenous *trans*-zeatin content and total arsenic in arsenic hyperaccumulator *Pteris cretica* var. *nervosa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 138, p. 199-205, 2017.

ZHU, Y. F. et al. Tolerance of two apple rootstocks to short-term salt stress: focus on chlorophyll degradation, photosynthesis, hormone and leaf ultrastructures. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 41, n. 87, p. 1-14, 2019.

**CAPÍTULO I:** *Lecythis pisonis* Cambess. e *Lecythis lanceolata* Poir.: diversidade genética de matrizes, biometria e composição hormonal de sementes e fenotipagem de mudas.

## RESUMO

Dentre as Lecythidaceae, a *Lecythis pisonis* e a *Lecythis lanceolata* destacam-se pela capacidade de produção de sementes/castanhas. Entretanto, faz-se necessário mais investigações sobre estas espécies, principalmente a *L. lanceolata*, em que este trabalho é precursor. Objetivou-se estudar a diversidade molecular entre matrizes, as características biométricas e hormonais de sementes, seus efeitos sobre a emergência e vigor de plântulas, bem como a fenotipagem de mudas de *L. pisonis* e *L. lanceolata*. As espécies foram analisadas separadamente, sendo os tratamentos constituídos de seis matrizes. Foi feita a caracterização biométrica, emergência, vigor e análise hormonal de sementes, e fenotipagem de mudas para as duas espécies. Realizadas a correlação de Pearson, a diversidade fenotípica e a diversidade molecular. Para a espécie *L. pisonis* as matrizes *Lp1* e *Lp2* alcançaram as maiores porcentagens de emergência e produção anual de frutos e a *Lp2* alcançou a maior massa de endosperma. O metil jasmonato (MeJA) foi correlacionado negativamente com o crescimento de mudas e acúmulo de massa seca e, também houve uma ação antagônica entre a ZT do endosperma com o ABA do tegumento para *L. lanceolata*. O tegumento das sementes de ambas as espécies possui altas concentrações de ABA. Há alta variabilidade genética entre as espécies estudadas, e baixa variabilidade genética dentro da espécie. As árvores de *L. lanceolata* possuem um porte menos elevado, facilitando a colheita de frutos.

**Palavras-chave:** Sapucaia, sapucaia-mirim, biometria em sementes, emergência de plântulas, hormônios endógenos.

## ABSTRACT

Among Lecythidaceae, *L. pisonis* and *L. lanceolata* stand out for their seed/chestnut production capacity. However, further research on these species is necessary, especially *L. lanceolata*, in which this work is a precursor. The objective was to study the molecular diversity between matrices, the biometric and hormonal characteristics of seeds, their effects on seedling emergence and vigor, as well as the phenotyping of *L. pisonis* and *L. lanceolata* seedlings. The species were analyzed separately, and the treatments consisted of six matrices. Biometric characterization, emergence, vigor and hormonal analysis of seeds were made, and seedling phenotyping for both species. Pearson's correlation, phenotypic diversity and molecular diversity were performed. For the species *L. pisonis* the matrices *Lp1* and *Lp2* reached the highest percentages of emergence and annual fruit production and *Lp2* reached the highest mass of endosperm. Methyl jasmonate (MeJA) was negatively correlated with seedling growth and dry matter accumulation, and there was also an antagonistic action between the endosperm ZT and the tegument ABA for *L. lanceolata*. The seed coat of both species has high concentrations of ABA. There is high genetic variability between the species studied, and low genetic variability within the species. *L. lanceolata* trees have a lower height, facilitating fruit harvesting.

**Keywords:** Sapucaia, sapucaia-mirim, seed biometrics, seedling emergence, endogenous hormones.

## 1. INTRODUÇÃO

A comercialização de recursos florestais não madeireiros por meio do extrativismo sustentável é uma importante ferramenta de conservação de remanescentes florestais e geração de renda para pequenos agricultores (OLIVEIRA et al., 2012). A flora brasileira é rica em espécies nativas com potencial produtivo de alimentos funcionais, que carecem de estudos mais aprofundados, visando à inserção de novos produtos no mercado. Dentre estas espécies, as castanheiras, *Lecythis pisonis* Cambess. e *Lecythis lanceolata* Poir. (Lecythidaceae), apresentam capacidade produtiva de sementes/castanhas, em que já foi identificado para a *L. pisonis* matrizes ricas em lipídios, nutrientes essenciais, compostos antioxidantes, fenóis e ácidos graxos insaturados (DEMOLINER et al., 2018a, b; TEIXEIRA et al., 2018). Entretanto, para a espécie *L. lanceolata* estudos desta natureza necessitam ser iniciados.

Muitas espécies da família Lecythidaceae encontram-se em remanescentes da Floresta Atlântica e da Floresta Amazônica, juntamente com outras espécies ou isoladamente distribuídas numa região com amplas variações de clima, solo e com poucos estudos (MORI et al., 2017). Portanto, faz-se necessário ampliar as investigações em diversas áreas do conhecimento para identificar matrizes potenciais em produção e com castanhas ricas em nutrientes.

Os estudos fenotípicos e genotípicos dentro destas espécies contribuem para a seleção eficiente de matrizes com características morfofisiológicas superiores, visando à conservação de materiais genéticos em bancos de germoplasma para futura utilização em programas de melhoramento genético, restauração florestal ou plantios comerciais (POGGETTI et al., 2017). Castanheiras, a exemplo da *L. pisonis*, podem apresentar enormes variações fenotípicas em relação ao tamanho de sementes, frutos e quantidade de sementes por fruto, levando-os a separação em grupos distintos (ROSA et al., 2019). Esta diversidade fenotípica deve estar aliada a diversidade genotípica, a qual utiliza-se de marcadores moleculares para identificar a variabilidade genética de indivíduos dentro e entre espécies (PORTH; EL-KASSABY, 2014).

Outro fator importante é compreender a fisiologia destas espécies, a iniciar pela fase juvenil, de modo a estudar a germinação das sementes e o crescimento inicial das plântulas. Em todas as etapas do crescimento das plantas, os hormônios e seus precursores estão presentes em praticamente todos os processos fisiológicos,

atuando na divisão celular, dormência, germinação de sementes, crescimento de parte aérea, raiz, florescimento, senescência e abscisão de folhas, flores e frutos (MIRANSARI et al., 2014; PENFIELD, 2017).

Objetivou-se estudar as características biométricas e hormonais de sementes, seus efeitos sobre a emergência e vigor de plântulas, bem como a fenotipagem de mudas e a diversidade molecular entre matrizes de *L. pisonis* e *L. lanceolata*.

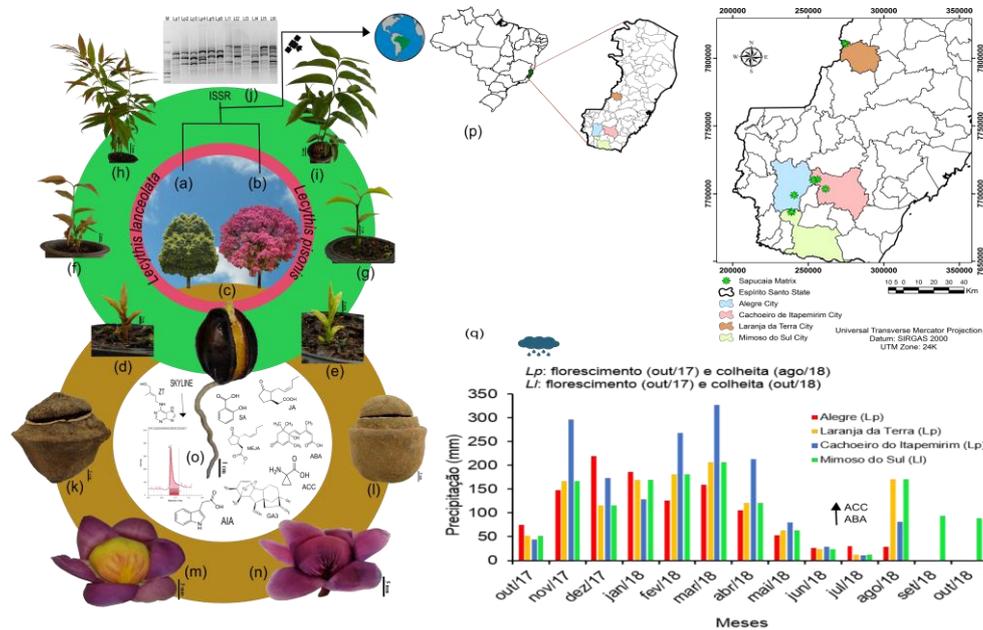
## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Georreferenciamento de matrizes

Foram utilizadas sementes de seis matrizes de *L. pisonis* (*Lp*) e seis de *L. lanceolata* (*Ll*), localizadas nos municípios de Laranja da Terra (matrizes: *Lp1* e *Lp2*), Cachoeiro do Itapemirim (matrizes: *Lp3*; *Lp4* e *Lp5*), Alegre (matriz: *Lp6*) e Mimoso do Sul (matrizes: *Ll1*; *Ll2*; *Ll3*; *Ll4*; *Ll5* e *Ll6*), Espírito Santo, Brasil (Figura 1).

Para aspectos didáticos foi feito um esquema evidenciando as características morfológicas de árvores de *L. lanceolata* (*Ll*, a) e *L. pisonis* (*Lp*, b), semente (c), mudas aos 45 (d, e), 60 (f, g) e 160 DAS (h, i), padrões de bandas de DNA de ambas as espécies evidenciadas em gel de agarose (j), frutos do tipo pixídio (k, l), flor isolada de *Ll* (m) e *Lp* (n), fórmulas estruturais do ácido indol-3-acético (AIA), zeatina (ZT), ácido abscísico (ABA), ácido jasmônico (JA), metil jasmonato (MeJA), ácido salicílico (SA) e o precursor do etileno ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) presentes em tegumentos e endospermas de sementes (o), georreferenciamento das matrizes para as duas espécies (p) e os dados pluviométricos para as regiões de Alegre, Laranja da terra, Cachoeiro de Itapemirim e Mimoso do Sul, Espírito Santo, Brasil (q) (Figura 1).

**Figura 1.** Caracterização morfológica, georreferenciamento e precipitação nas localidades de matrizes de *L. pisonis* e *L. lanceolata*.



Fonte: a autora.

## 2.2 Biometria de sementes

Análises biométricas foram realizadas em 100 sementes de diferentes matrizes de *L. pisonis* e *L. lanceolata*, dispostas em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições de 25 sementes cada. Com o auxílio de um paquímetro digital, precisão de 0,01 mm, mensurou-se o comprimento (CS), a maior (MALS) e menor (MELS) largura das sementes. Determinou-se a massa de cada semente (MS) em balança de precisão de 0,01 g e o volume (VS) por meio de imersão em água, levando-se em consideração o princípio de Arquimedes (densidade<sub>H<sub>2</sub>O</sub> = 1 g cm<sup>-3</sup>), e a densidade da semente (DS) em g cm<sup>-3</sup> pela equação  $D = MS/VS$ .

Foram determinadas a massa do endosperma (ME) e a massa do tegumento (MT) com o auxílio de uma balança de precisão 0,0001 e foi medida a espessura do tegumento na região do hilo (ETH) e a espessura do tegumento na região da parte aérea (ETPA) com paquímetro digital (0,01 mm).

### 2.3 Análise de hormônios e do precursor ACC em sementes

A extração hormonal foi realizada segundo Forcat et al. (2008) em tegumento e endosperma de sementes de *L. pisonis* e *L. lanceolata*, e para cada material utilizado constou de um DIC, com quatro repetições de 0,110 g cada, para a avaliação dos picos do ácido indol-3-acético (AIA), zeatina (ZT), ácido abscísico (ABA), ácido jasmônico (JA), metil jasmonato (MeJA), ácido salicílico (SA) e o precursor do etileno ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC).

As amostras foram maceradas separadamente em cadinho juntamente com o extrator metanol:isopropanol:ácido acético (20:79:1), mantidos em microtubos com volume de 1,5 mL, mantendo-os em gelo (passo 1). Posteriormente foram adicionados 400 µL da solução de extração em cada microtubo, agitando em vortex por 20 segundos, repetindo-se quatro vezes para cada amostra e sonicando por 10 minutos (passo 2). As amostras permaneceram em repouso durante 30 minutos em gelo, em seguida foram sonicadas por 10 minutos e centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante pipetado para microtubos de 2,0 mL (passo 3).

Em seguida foram repetidos os passos 2 e 3, pipetando-se novamente o sobrenadante para os microtubos. As amostras foram filtradas em filtros de seringa PVDF 13 mm e 0,22 µm, visando à remoção de qualquer partícula em suspensão. Para a realização da leitura dos hormônios, as amostras foram injetadas no equipamento UHPLC-triploquadrupolo (QQQ), através de um vial contendo 300 µL da solução extraída. Os resultados foram analisados no Software Skyline para a obtenção das áreas de cada pico e as massas foram calculadas em ng g<sup>-1</sup>.

### 2.4 Emergência, vigor e fenotipagem de mudas

As sementes de *L. pisonis* e *L. lanceolata* foram dispostas em delineamento experimental em blocos casualizados, com quatro repetições de 25 sementes cada, semeadas em tubetes de polipropileno com capacidade de 280 cm<sup>-3</sup> de substrato Vivato®, mantidos em casa de vegetação coberta com tela de poliolefina ou polietileno de baixa densidade (PEBD), com 50% de sombreamento, no Viveiro Florestal da UFES, em Jerônimo Monteiro-ES.

Foram analisadas: emergência (E, %), com contagens diárias (BRASIL, 2009); índice de velocidade de emergência (IVE) (MAGUIRE, 1962) e tempo médio de

emergência (TME, dias) (LABOURIAU, 1983). Após 160 dias, as mudas de cada matriz de ambas as espécies foram separadas em um DBC, constando de quatro repetições de 12 mudas para a realização da fenotipagem. Avaliaram-se o comprimento da parte aérea (CPA, cm), comprimento da raiz principal (CRAP, cm), diâmetro do coleto (DC, mm), número de raízes laterais (NRL), diâmetro da raiz principal (DRP, mm), diâmetro das raízes laterais (DRL, mm), volume de raízes (VR,  $\text{cm}^3$ ), densidade das raízes (DR,  $\text{g cm}^{-3}$ ), número de folhas (NF), número de brotos (NB), comprimento foliar (CF, cm), largura foliar (LF, cm), espessura foliar (EF, mm), número de hastes (NH), massa seca da parte aérea (MSPA, g), massa seca da raiz (MSRA, g), massa seca total (MST, g), índice de qualidade de Dickson (IQD), parâmetros de colorimetria ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  e  $H^\circ$ ) por meio de calorímetro digital, índice SPAD, relações CPA/CRAP, CPA/NF, CPA/NRL, CPA/DC, MSPA/MSRA, NRL/CRAP e NH/CRAP.

## 2.5 Diversidade genética por meio de marcadores ISSR

### 2.5.1 Extração do DNA genômico

O DNA foi extraído de folhas das diferentes matrizes de *L. pisonis* e *L. lanceolata*, sendo estas maceradas em nitrogênio líquido seguindo a metodologia de Doyle e Doyle (1990). Inicialmente cerca de 50 mg de tecido vegetal macerado foi transferido para microtubos de 2 mL, seguido pela adição de 700  $\mu\text{L}$  de solução tampão de extração Tris-HCl pH 7,5 na concentração de 200 mM, NaCl a 288 mM, EDTA (brometo de cetiltrimetilamônio) a 25 mM, SDS (dodecilsulfato de sódio) a 0,5%, betamercatoetanol 0,2% e PVP (polivinilpirrolidona) 1%.

Em seguida as amostras foram levadas para banho seco durante 30 minutos por 65 °C, homogeneizando a cada 10 min. Foi então adicionado 650  $\mu\text{L}$  de Cia (clorofórmio:álcool isoamílico) 24:1 (v/v) e homogeneizando durante 5 min, e centrifugando a 12000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para microtubos, adicionando 650  $\mu\text{L}$  de Cia e as amostras centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos. O processo de transferência do sobrenadante e a adição de Cia + centrifugação foi repetido por duas vezes.

O DNA foi então precipitado com isopropanol gelado + 230  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio, levando a centrífuga a 12000 rpm durante 10 minutos. O precipitado de DNA

foi lavado com 250  $\mu\text{L}$  de álcool 70°, centrifugando a 12000 rpm durante 3 minutos, repetindo este processo por duas vezes. Em seguida as amostras secaram em banho seco, e foram ressuspensas em 40  $\mu\text{L}$  de TE com RNase (40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e deixando em banho seco a 37 °C por 30 minutos.

Utilizou-se o equipamento Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) para analisar a qualidade e a quantidade de DNA. Já a integridade do DNA foi analisada através do fotodocumentador Biorad Gel Doc™ XR, com gel de agarose a 1,2%.

### 2.5.2. Reação de amplificação do DNA e eletroforese

Após a extração do DNA genômico, utilizaram-se 11 *primers* ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) com suas respectivas temperaturas de anelamento para a análise da variabilidade genética das duas espécies estudadas, sendo eles UBC 826 (56 °C), UBC 841 (50 °C), UBC 852 (50 °C), UBC 853 (50 °C), UBC 868 (50 °C), UBC 873 (50 °C), UBC 880 (50 °C), UBC 812 (50°C), UBC 818 (50°C), UBC 808 (56 °C) e UBC 811 (58 ou 56 °C).

As condições de amplificação foram: tampão 1x; taq DNA polimerase 1U em 0,2  $\mu\text{L}$ ; primer 0,8  $\mu\text{M}$ , dNTPs 0,8 mM (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; DNA genômico 7  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  e 7,8  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  para um volume final de 15  $\mu\text{L}$ . Para a amplificação em um termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®), a seguinte programação foi utilizada: quatro minutos de desnaturação a 94 °C, seguidos de 40 ciclos de 60 segundos a 94 °C de desnaturação, 1 minuto a T °C anelamento específica de cada primer e 1 minuto a 72 °C para a extensão e 5 minutos a 72 °C de extensão final.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose a 1,2% submetido a 80 volts durante 2 horas e os padrões de bandas foram corados pelo corante GelRed®. Foi utilizado o fotodocumentador Biorad Gel Doc™ XR para fotodocumentação do gel.

## 2.6 Análise estatística

Foram feitas as seguintes análises estatística: análise de variância e teste de Tukey ( $p > 0,05$ ), para os experimentos em DIC e DBC; distância de similaridade de

Mahalanobis ( $D^2$ ), para as características de mudas, sementes e hormônios, separadamente; e índice de Jaccard por meio de ligação entre grupos (UPGMA), para as estimativas de similaridade genética da análise molecular. Foi feita a diversidade genética utilizando-se as características fenotípicas e hormonais e a correlação das características, por meio do método UPGMA (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2019).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em *L. pisonis*, a altura das matrizes variou de 13,68 a 36,68 m, havendo destaque na produção de frutos para *Lp1* (300 frutos) e *Lp2* (200 frutos) (safra de 2018), com grande diferença quando comparada à *Lp3*, *Lp4*, *Lp5* e *Lp6*, com a produção variando de 23 a 51 frutos. Nota-se também que as matrizes *Lp1* e *Lp2* possuem maior DAP e circunferência de copa (CC), sendo 91,99 cm e 62,83 m (*Lp1*) e 70,35 cm e 56,55 m (*Lp2*), respectivamente (Tabela 1).

Em *L. lanceolata* a altura das matrizes variou de 8 a 14 metros e a *L16* foi a que produziu o maior número de frutos (126) e obteve maior DAP (56,50 cm) e CC (43,35 m). As demais eram dotadas de menor CC, variando de 20,58 a 28,12 m, tendo em média 53,66 frutos por árvore (Tabela 1). O porte menos elevado desta espécie facilitou a colheita de frutos e sementes, principalmente quando comparado ao da *L. pisonis*. Essa característica é visada por alguns produtores, principalmente os de pomares de árvores frutíferas, pois promove facilidades na colheita e tratos culturais (TETSUMURA et al., 2015).

A produção de frutos pode sofrer variações em função da época do ano, localização na copa e microclima das regiões (luminosidade, temperatura e pluviosidade) (ZHANG et al., 2019). Em alguns estudos foi observado que a arquitetura da copa pode influenciar na tonalidade de frutos, composição nutricional, antioxidante, penetração de luminosidade para as regiões mais internas, concentrações de amido, os quais normalmente se acumulam em maiores concentrações nas regiões superiores da copa, decrescendo nas áreas medianas até as mais inferiores (EDWARDS et al., 2010; GULLO et al., 2014).

As duas espécies estudadas possuem sistema reprodutivo álogamo (MORI; PRANCE, 1990), ou seja, realizam polinização cruzada e as sementes formadas

possuem variabilidade genética entre si. Em estudos com macadâmia, a polinização cruzada contribuiu para aumentos significativos na produção anual em termos de quantidade e qualidade (massa do endosperma), sendo observado também, que a origem do grão de pólen possui forte influência genética sobre as características morfológicas de frutos e sementes, refletindo em ganhos na colheita se houver a seleção de materiais genéticos superiores (HERBERT et al., 2019).

**Tabela 1.** Caracterização de matrizes (M) das espécies (ESP) *L. pisonis* (Lp) e *L. lanceolata* (Ll) avaliando o diâmetro à altura do peito (DAP, cm), diâmetro de copa da matriz (maior e menor, m), circunferência de copa (CC, m), altura da árvore matriz (H, m e número de frutos na árvore matriz (NFM) na safra de 2018.

		Crescimento de plantas matrizes					
ESP	M	DAP	Ø COPA		CC	H	NFM
			MAIOR	MENOR			
<i>L. pisonis</i>	Lp1	91,99	19,00	21,00	62,83	32,50	300
	Lp2	70,35	19,00	17,00	56,55	23,00	200
	Lp3	33,00	12,00	8,30	31,89	18,68	51
	Lp4	51,00	19,00	12,80	49,95	36,68	23
	Lp5	27,00	10,50	7,20	27,80	13,68	29
	Lp6	91,80	17,00	15,00	50,26	18,00	25
<i>L. lanceolata</i>	Ll1	28,80	8,50	8,30	26,39	10,00	25
	Ll2	19,60	6,60	6,50	20,58	10,00	48
	Ll3	21,25	9,00	8,90	28,12	10,50	48
	Ll4	20,50	8,80	7,10	24,97	10,50	55
	Ll5	20,00	7,80	7,20	23,56	8,00	20
	Ll6	56,50	14,30	13,30	43,35	14,00	126

Fonte: a autora.

A matriz Lp2 da espécie *L. pisonis* obteve a maior MS (7,70 g), VS (7,90 cm<sup>-3</sup>) e ME (4,62 g), sendo que a variável ME não diferiu para as matrizes Lp3 e Lp5. Para a espécie *L. lanceolata*, a Ll3 obteve a maior MS (9,16 g) e ME (4,5 g) (Tabela 2). Em estudos com *L. pisonis*, o acesso CPAMN 013 se destacou por apresentar características de interesse comercial, como o maior peso médio (3,18 g), total (102,52 g) e de produção (32,24 castanhas por fruto), sendo estes fatores importantes para a indústria alimentícia (SOUZA et al., 2008).

**Tabela 2.** Análises de biometria e vigor em sementes de diferentes matrizes (M) para as espécies (ESP) *L. pisonis* (Lp) e *L. lanceolata* (Ll) avaliando-se o comprimento da semente (CS, mm), menor largura da semente (MELS, mm), maior largura da semente (MALS, mm), massa da semente (MS, g), volume da semente (VS, cm<sup>-3</sup>), densidade da semente (DS, g cm<sup>-3</sup>), espessura do tegumento na região de parte aérea (ETPA, mm), espessura do tegumento na região do hilo (ETH, mm), emergência (E, %), índice de velocidade de emergência (IVE), tempo médio de emergência (TME, dias), massa do endosperma (ME, g) e massa do tegumento (MT, g).

ESP	M	CS	MELS	MALS	MS	VS	DS	ETPA
<i>L. pisonis</i>	Lp1	36,67d <sup>(1)</sup>	17,92bc	21,97ab	5,87c	6,08c	0,97ab	1,95ab
	Lp2	38,66c	18,67ab	22,72a	7,70a	7,90a	0,98ab	1,80b
	Lp3	43,98a	17,83c	21,22b	6,86b	7,22b	0,95ab	1,77b
	Lp4	31,37e	15,24d	19,87c	4,03d	4,13d	1,13a	2,15ab
	Lp5	42,11b	18,99a	22,50a	5,47c	6,58bc	0,83b	2,60a
	Lp6	36,52d	17,32c	21,04b	5,96c	6,02c	0,99ab	2,00ab
<i>L. lanceolata</i>	Ll1	35,88c	18,22b	22,99ab	6,05c	6,57c	0,92ab	2,59ab
	Ll2	42,75b	21,23a	23,55ab	7,66b	9,95a	0,77c	2,39abc
	Ll3	43,32b	20,98a	22,65b	9,16a	9,47ab	0,92ab	2,29bc
	Ll4	33,57d	15,84c	19,11c	4,61d	4,86d	0,95a	2,06c
	Ll5	35,75c	16,93bc	19,16c	4,65d	4,95d	0,94a	2,12c
	Ll6	45,54a	20,90a	24,52a	7,51b	8,46b	0,89b	2,72a
ESP	M	ETH	E	IVE	TME	ME	MT	-
<i>L. pisonis</i>	Lp1	2,25 <sup>ns</sup>	93,00a	0,45a	53,75ab	3,58cd	2,06c	-
	Lp2	2,28	88,00ab	0,38b	62,25a	4,62a	2,90ab	-
	Lp3	2,24	3,00e	0,01e	28,50b	4,17abc	2,42bc	-
	Lp4	2,48	62,67c	0,30c	54,67ab	3,20d	2,29c	-
	Lp5	2,68	46,67d	0,21d	59,00ab	4,34ab	3,29a	-
	Lp6	2,60	81,33b	0,44a	48,65ab	3,69bcd	2,51bc	-
<i>L. lanceolata</i>	Ll1	3,22ab	80,00a	0,34b	63,80bc	3,32b	3,08bc	-
	Ll2	2,87bc	77,33a	0,31bc	68,06b	3,69b	3,04c	-
	Ll3	2,64c	60,00b	0,23c	71,67ab	4,51a	3,64ab	-
	Ll4	2,51c	87,00a	0,39ab	60,59bc	2,13c	1,96d	-
	Ll5	2,49c	87,00a	0,44a	51,58c	2,65c	1,90d	-
	Ll6	3,29a	76,00a	0,22c	82,86a	3,32b	4,06a	-

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05) para *L. pisonis* (Lp) e *L. lanceolata* (Ll) separadamente.

Fonte: a autora.

As matrizes de *L. pisonis* estudadas (Tabela 2) apresentaram grande diferença na emergência e vigor de suas plântulas, variando de 3 a 93% (diferença de 90%), velocidades de emergência de 0,01 a 0,45 em um período de 28 a 62 dias (diferença de 34 dias). Nesta espécie, a matriz *Lp1* apresentou a maior porcentagem (93%) e velocidade de emergência de plântulas em 53 dias, contudo, esta não diferiu da *Lp2*, que apresentou 88%, entretanto, com menor IVE, o que contribuiu para aumentar o TME para 68 dias (diferença de 15 dias). Uma das explicações da elevada emergência em *Lp1* é a maior massa do tegumento, que pode estar relacionada com a menor deposição de lignina nas paredes celulares secundárias, no estágio em que as células se diferenciam terminalmente e isto interfere positivamente, facilitando a degradação deste revestimento protetor e, conseqüentemente, a entrada de água nas sementes. As matrizes de *L. lanceolata* (Tabela 2) *L11* (80%), *L12* (77%), *L14* (87%), *L15* (87%) e *L16* (76%) não apresentaram diferença estatística entre si na emergência de plântulas, com média de 81,4%.

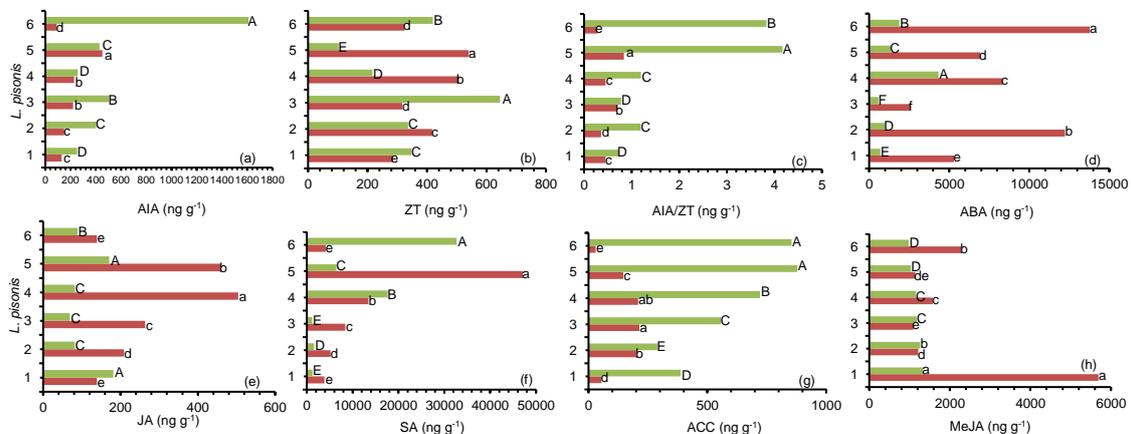
Para ambas as espécies foram encontrados indivíduos com dificuldades na emergência e vigor de suas plântulas (ex.: *Lp3* = 3% e *L13* = 60%) (Tabela 2), podendo ser decorrente de efeitos genéticos instalados na maturação da semente, a exemplo da dormência fisiológica, que é controlada por fatores endógenos, tais como imaturidade do embrião (OLVERA-CARRILLO et al., 2009), balanço hormonal (KANG et al., 2015; PENFIELD, 2017) ou, pela dormência física, na qual as sementes apresentam resistência à absorção de água devido à espessura e dureza tegumentar, decorrente da deposição de compostos como lignina, o que dificulta a sua degradação por fungos e a protrusão da raiz primária (DAYRELL et al., 2016), sabendo-se que tegumentos de sementes de *L. pisonis* podem chegar a ter mais de 60% de lignina em sua constituição (ROSA, 2018). Em estudos com *L. pisonis*, Rosa (2018) também encontraram uma baixa taxa de germinação (0 a 63%) e emergência de plântulas (0 a 50%), sugerindo que existe uma variedade enorme quanto à resposta de germinação e vigor dentro dos indivíduos de uma mesma espécie, já que resultados superiores foram encontrados no presente estudo.

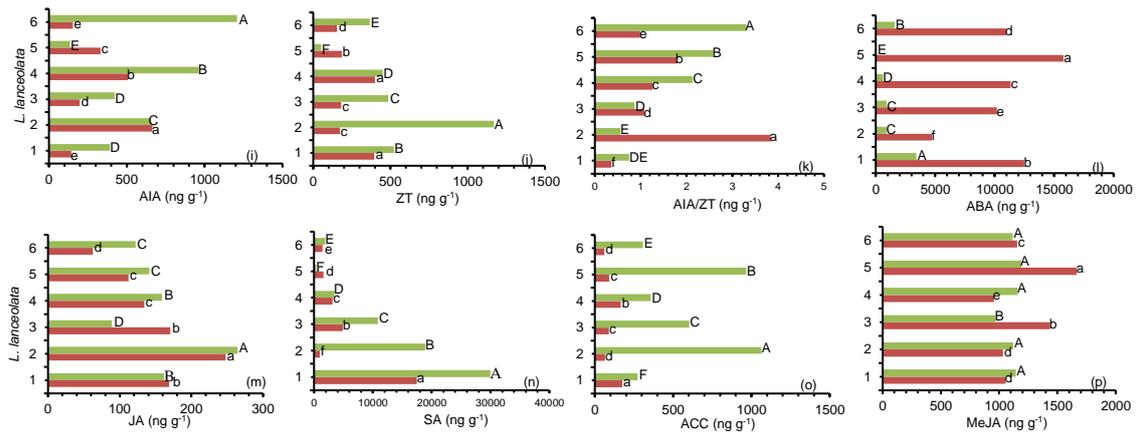
Na natureza, a dormência se tornou um mecanismo de defesa das sementes contra predadores e proteção do material genético da espécie em caso de catástrofes ambientais, contudo, comercialmente se torna prejudicial por aumentar os gastos na produção de mudas em decorrência da emergência lenta e desuniforme ao longo do

tempo (XIAO et al., 2008; ZHANG; ZHANG, 2008; ZHANG et al., 2016; KONAN et al., 2018). Outros fatores que podem influenciar essa germinação é a presença de sementes vazias (ausência de embrião e endosperma), rachadura nos cotilédones ou dessecação do endosperma, aumentando os espaços vazios no interior da semente (AHMED et al., 2018).

Os hormônios atuam em todos os processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, desde a ontogenia, embriogênese, germinação, crescimento de estruturas vegetativas e reprodutivas (MIRANSARI; SMITH, 2014; PENFIELD, 2017). Em *L. pisonis* os maiores valores de AIA foram encontrados no endosperma da *Lp4* (1611,40 ng g<sup>-1</sup>) e tegumento das sementes da *Lp5* (453,33 ng g<sup>-1</sup>); e para *L. lanceolata*, no endosperma da *Ll6* (1208,56 ng g<sup>-1</sup>) e tegumento da *Ll2* (664,29 ng g<sup>-1</sup>) (Figura 2a, i respectivamente). Os maiores valores de ZT foram encontrados em *L. pisonis* no endosperma da *Lp3* (646,04 ng g<sup>-1</sup>) e tegumento da *Lp5* (539,65 ng g<sup>-1</sup>); e em *L. lanceolata*, no endosperma da *Ll2* (1171,83 ng g<sup>-1</sup>) e tegumento da *Ll1* e *Ll4*, que não diferiram estatisticamente, apresentando uma média de 397,83 ng g<sup>-1</sup> (Figura 2b, j). A relação AIA/ZT em sementes de *L. pisonis* apresentou maiores valores no endosperma (4,17) e tegumento (0,84) da *Lp5*, enquanto na *L. lanceolata* foi no tegumento (3,84) da *Ll2* e endosperma da *Ll6* (3,30) (Figura 2c, k).

**Figura 2.** Concentração endógena dos hormônios AIA, ZT, AIA/ZT, ABA, JA, SA, MeJA e o precursor do etileno ACC presentes em tegumento (barra vermelha) e endosperma (barra verde) de sementes de matrizes de *L. pisonis* (a-h) e *L. lanceolata* (i-p).





(<sup>1</sup>) Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula para endosperma e minúsculo para tegumento, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ) para *L. pisonis* (*Lp*) e *L. lanceolata* (*Ll*), separadamente.

Fonte: a autora

Os níveis de ABA foram encontrados em maiores concentrações para *L. pisonis* no tegumento da *Lp6* ( $13773,91 \text{ ng g}^{-1}$ ) e no endosperma da *Lp4* ( $4328,21 \text{ ng g}^{-1}$ ) e para *L. lanceolata* no tegumento da *Ll4* ( $15789,47 \text{ ng g}^{-1}$ ) e no endosperma da *Ll1* ( $3414,25 \text{ ng g}^{-1}$ ) (Figura 2d, l). Durante a formação das sementes, o embrião passa por sucessivos estádios de desenvolvimento e alterações hormonais, como observado em frutos jovens de *Fagopyrum tataricum*, os quais possuem sementes com formação de embrião globular, atingindo a fase cordiforme no fruto verde e à medida que este começa a passar por processos de descoloração da pericarpo forma-se o embrião torpedo, até chegar no ponto de maturidade fisiológica das sementes no fruto maduro, dando origem ao embrião cotiledonar (LIU et al., 2018). Segundo estes autores, durante esses períodos as concentrações de AIA, ZT e ABA atingiram valores de aproximadamente  $21000$ ,  $9080$  e  $15000 \text{ ng g}^{-1}$  no fruto jovem, e no ponto de maturidade fisiológicas (MF) passaram a  $6050$  (redução de  $3,47X$ ),  $980$  (redução de  $9,26X$ ) e  $124930 \text{ ng g}^{-1}$  (aumento de  $83,28X$ ), respectivamente, sendo o ABA associado a maturação, ou seja, a mudança de fase do embrião e dormência das sementes (LIU et al., 2018).

Para a espécie *Caryocar brasiliense*, o aumento do ABA extra-embriônico (endosperma) foi relacionado a capacidade do embrião em tolerar a desidratação e ao início da mobilização e deposição de reservas. As concentrações elevadas de ABA foram encontradas no polo radicular e plúmula, após 90 dias da antese (DAA), que variaram de  $6000$  a  $14000 \text{ ng g}^{-1}$ , respectivamente, sendo que a expressão do gene

ABA1 iniciou aos 40 DAA, com elevado aumento no final da maturação da semente, aos 90 DAA (RODRIGUES et al., 2019). Sendo o ABA1 responsável por codificar a enzima zeaxantina epoxidase e, também pode estar envolvido na regulação de ABA durante o desenvolvimento das sementes (SEO; KOSHIBA, 2002).

O ABA é de grande importância em muitos processos fisiológicos, atuando na dormência de sementes e gemas, diferenciação do sexo em botões florais, senescência, fluxo do floema para o dreno, precursor de proteínas LEAs na fase final da embriogênese, sendo estas fundamentais na aquisição de tolerância a dessecação do embrião, e possui alta expressão em períodos desfavoráveis, principalmente em épocas com déficit hídrico no solo, regulando os processos de abertura e fechamento dos estômatos (LOPEZ et al., 1989; BEWLEY et al. 2013; SUN et al., 2017; ASAMI; NAKAGAWA, 2018; BHATTACHARYA et al., 2019).

O tegumento de sementes de *L. pisonis* e *L. lanceolata* evidenciou ser um reservatório de ABA, com concentrações superiores quando comparado ao endosperma. Esta característica não prejudicou a emergência de mudas para a maioria das matrizes estudadas de *L. pisonis* (*Lp1*, *Lp2* e *Lp6*) e *L. lanceolata* (*L11*, *L12*, *L14*, *L15* e *L16*), que alcançaram valores  $\geq 70\%$ , contudo, pode ser associado a emergência desuniforme, em um longo TME, caracterizando uma possível dormência fisiológica nas sementes. Entretanto, a genética das matrizes *Lp6* e *Lp4* e *L14* e *L11*, por apresentarem os maiores valores de ABA, podem propiciar a manutenção da viabilidade de suas sementes durante um maior período de armazenamento.

Em sementes de trigo a quebra da dormência fisiológica pode estar associada à perda da sensibilidade pelos hormônios ABA e AIA durante a germinação, no qual o ABA atuaria reprimindo a transcrição de genes envolvidos nos processos de germinação e induzindo a produção de genes responsáveis pelo catabolismo de giberelina, podendo diminuir a síntese de  $\alpha$ -amilases e outras hidrolases responsáveis pela quebra de macromoléculas (amido), que irão ser utilizadas na nutrição do eixo-embrionário (LIU et al., 2013). No milho, o ABA atua sob o ciclo celular, influenciando negativamente nas mudanças de fases das células e na presença de citocinina, a mudança de fase é estimulada (SÁNCHEZ et al., 2005). A germinação de sementes carece da associação, regulação e relações de taxas de diferentes compostos, como observado em estudos com *Gnetum parvifolium*, que elevou os níveis de ABA, malonodialdeído e da superóxido dismutase (SOD) no estágio de dormência de suas

sementes, os quais decresceram durante o processo germinativo (CHANG et al., 2018).

O conteúdo de JA em sementes de *L. pisonis* foi superior no tegumento da *Lp4* (504,50 ng g<sup>-1</sup>) e no endosperma da *Lp1* e *Lp5*, as quais não diferiram estatisticamente, apresentando média de 176,07 ng g<sup>-1</sup>. Em sementes de *L. lanceolata* maiores conteúdos foram observados no endosperma e tegumento da *L12*, apresentando 247,62 e 264,43 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 2e, m). As maiores concentrações de MeJA foram encontradas para *L. pisonis*, no tegumento (5686,49 ng g<sup>-1</sup>) e endosperma (1340,61 ng g<sup>-1</sup>) da *Lp1*, enquanto na *L. lanceolata* foi no tegumento da *L15* (1665,50 ng g<sup>-1</sup>) e no endosperma não houve diferença estatística entre as matrizes (à exceção da *L13*), com média de 1166,22 ng g<sup>-1</sup> (Figura 2h, p). Foi observado no presente estudo que sementes de *L. pisonis* possuem maiores concentrações de JA e MeJA no tegumento das sementes, não sendo visível essa diferença para a espécie *L. lanceolata*.

O JA está envolvido na defesa de plantas contra ataques de patógenos e insetos (FARHANGI-ABRIZ et al., 2019), podendo atuar também na expressão de genes (ERF109 e ASA1), que induzem a síntese de auxina em tecidos lesionados (ZHANG et al., 2019). Durante as fases de embebição e ativação metabólica de sementes de arroz, observou-se que o AIA e JA tiveram suas concentrações aumentadas no embrião e no tecido de reserva, enquanto os conteúdos de ABA decresceram. No entanto, na fase de protrusão da raiz primária houve diminuição nos teores de AIA e aumento no JA no tecido de reserva (XIAO et al., 2018).

O MeJA tem origem no JA, que também atua como sinalizador de defesa em plantas lesionadas, sendo sua síntese catalisada pela enzima ácido jasmônico carboxiltransferase (JMT), contudo, a síntese da JMT pode ser inibida pela ação do etileno (SEO et al., 2001). No presente estudo a *Lp5* e *Lp6* de *L. pisonis* apresentou as maiores concentrações do precursor de etileno (ACC) no endosperma das sementes, os quais também apresentaram os menores teores de MeJA. Contudo, para a *L. lanceolata*, o ACC do endosperma não influenciou negativamente as concentrações de MeJA no endosperma nas sementes.

A aplicação de MeJA em plantas de *Arabidopsis* resultou na inibição de brotações em plantas selvagens e mutante *fad7-2*, não tendo efeitos sob o *fad3-2*. O MeJA também prejudicou a permeabilidade seletiva de membranas em células

corticais de raízes em plantas do tipo selvagem no período de 1 h, não influenciando nas plantas mutantes. Estes efeitos podem estar associados à desfosforilação de proteínas integrais (aquaporinas), prejudicando o fluxo de água (LEE; ZWIAZEK, 2019).

As maiores concentrações de SA em *L. pisonis* foram encontradas no tegumento da *Lp5* (47156,36 ng g<sup>-1</sup>) e no endosperma da *Lp6* (32672,36 ng g<sup>-1</sup>), enquanto em sementes de *L. lanceolata*, as maiores concentrações foram encontradas no endosperma e tegumento da *L1*, apresentando 17495,24 e 29978,35 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 2f, n). O SA também é um hormônio vegetal sinalizador de defesa para plantas, podendo induzir a síntese de compostos antioxidantes em períodos de estresse. Em plantas de arroz infectadas pela bactéria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* o SA contribuiu para a liberação de compostos antioxidantes e um bom funcionamento do fotossistema II, não havendo perdas na produtividade (SHASMITA et al., 2019). O SA pode atuar também melhorando o estresse oxidativo, fotossíntese, crescimento e reações bioquímicas em plantas estressadas com o metal tóxico níquel (Ni) (ZAID et al., 2019). Em estudos com *Brassica napus*, a aplicação de SA contribuiu para menores perdas de massa seca em condições de seca e induziu a síntese de sacarose fosfato sintase e de genes envolvidos na quebra do amido (LA et al., 2019).

Para o precursor do etileno ACC foram encontrados os maiores níveis para a *L. pisonis* no tegumento da *Lp3* (214,35 ng g<sup>-1</sup>) e *Lp4* (208,42 ng g<sup>-1</sup>) e no endosperma da *Lp5* (878,29 ng g<sup>-1</sup>) e *Lp6* (853,90 ng g<sup>-1</sup>), enquanto para *L. lanceolata* foram encontrados no endosperma da *L12* (1062,95 ng g<sup>-1</sup>) e no tegumento da *L1* (175,94 ng g<sup>-1</sup>) (Figura 2g, o), notando-se que a maior concentração de ACC está concentrada principalmente no endosperma das sementes. A presença deste precursor também sugere a presença de etileno, sendo que a sua maior expressão pode estar associada a fatores estressantes, principalmente quando a planta se encontra em ambiente com déficit hídrico (DH), podendo prejudicar o crescimento de parte aérea e sistema radicular (ZHANG et al., 2018).

O etileno também atua em processos de senescência e amadurecimento por meio da regulação genes envolvidos na mudança de coloração, geração de radicais livres, autofagia e na hidrólise de parede celular (LI et al., 2019). Todas as matrizes de *L. pisonis* e *L. lanceolata* enfrentaram períodos de menor pluviosidade no início do

florescimento com uma média de 55,6 mm, sendo precedido por maiores índices nos meses de nov/17 a abril/18 (média de 178,16 mm), e menores nos meses de jun/18 (25,3 mm) e jul/18 (16,4 mm), sendo estes os dois últimos meses que antecedem a colheita em *L. pisonis*, podendo ser um fator estressante que contribuiu para a síntese de ACC e ABA nas sementes.

Realizou-se a fenotipagem de mudas após 160 dias da semeadura para ambas as espécies estudadas, visando associar características morfofisiológicas com a qualidade de mudas. O CPA e CRAP dentro das matrizes de cada espécie alcançaram média de 42,64 e 13,12 cm para *L. pisonis* e 39,21 e 14,08 cm para *L. lanceolata*. O índice SPAD para *L. pisonis* foi superior na *Lp1*, contudo, não diferiu estatisticamente da *Lp2*, *Lp3*, *Lp5* e *Lp6*, tendo menor valor na *Lp4*, a qual também apresentou menor MSPA, provavelmente associada ao menor teor de clorofilas, que culmina em menor taxa fotossintética líquida e, conseqüentemente, em decréscimo na massa seca. No entanto, para *L. lanceolata*, o maior SPAD foi alcançado pela *L3* e *L6*, contudo, somente a *L3* apresentou maior MSPA (Tabela 3).

Por ser uma técnica não destrutiva, o índice SPAD contribui na maior economia de mão-de-obra, recursos e tempo, possibilitando a realização de avaliações que possibilitam inferir a qualidade fotossintética de mudas a campo. Em estudos com plantas de *Coffea canephora*, a utilização do índice SPAD foi considerada eficiente para avaliar a integridade do sistema fotossintético, sendo observado que leituras inferiores a 40, para esta espécie, estavam relacionadas a uma diminuição da relação clorofila/carotenóides, possivelmente devido a estresse ambiental, o que pode comprometer as taxas fotossintéticas (TORRES NETTO et al., 2005), contudo, alguns fatores como a localização da folha na planta (DRAY et al., 2012) e a época do ano que foi analisada podem influenciar o teor de clorofila na planta (FU et al., 2014).

Foram analisadas as características de cor nas folhas das mudas para ambas as espécies, cujo  $a^*$  refere-se à coloração vermelha (+) ao verde (-), o  $b^*$  do amarelo (+) ao azul (-), o  $L^*$  expressa a luminosidade em porcentagem, variando do branco (100%) ao preto (0%), o  $C^*$  representa a saturação da cor e o  $H^\circ$  é o ângulo da cor (SHAN et al., 2019). A espécie *L. pisonis* apresentou para cada característica uma média de 34,07 ( $L^*$ ), -11,46 ( $a^*$ ), 21,70 ( $b^*$ ), 24,53 ( $C^*$ ) e 117,93 ( $H^\circ$ ) e para *L. lanceolata* 36,19 ( $L^*$ ), -10,61 ( $a^*$ ), 23,80 ( $b^*$ ), 26,12 ( $C^*$ ) e 114,46 ( $H^\circ$ ).

Para as duas espécies as folhas se caracterizaram por apresentar coloração verde, com o  $a^*$  negativo. Tais resultados estão semelhantes aos encontrados em folhas frescas de variedades de *Olea europea* L. para  $L^*$  e  $a^*$ , cujos maiores valores foram 32,80 (*Zarrazi*) e -9,14 (*Chemchali*) respectivamente, e quando secas por infravermelho (50 e 60°C), as folhas preservaram seus teores de antioxidantes, a sua coloração verde ( $-a^*$ ) e também, houve aumentos da luminosidade ( $L^*$ ) (BOUDHRIOUA et al., 2009). No entanto, em estudos com a *Eruca sativa*, as folhas jovens apresentaram valores de  $H^\circ$  (128,31),  $L^*$  (44,37) e  $C^*$  (28,68), semelhantes ao do presente estudo, sendo observado também que a diminuição do ângulo, juntamente com o amarelecimento, é um indicativo de senescência (KOUKOUNARAS; SIOMOS; SFAKIOTAKIS, 2007).

**Tabela 3.** Fenotipagem de mudas 160 DAS oriundas de sementes de matrizes das espécies (ESP) *L. pisonis* (*Lp*) e *L. lanceolata* (*Ll*), analisando-se o comprimento da parte aérea (CPA, cm), comprimento da raiz principal (CRAP, cm), diâmetro do coleto (DC, mm), número de raízes laterais (NRL), diâmetro da raiz principal (DRP, mm), diâmetro das raízes laterais (DRL, mm), volume de raízes (VR,  $\text{cm}^{-3}$ ), densidade das raízes (DR,  $\text{g cm}^{-3}$ ), número de folhas (NF), número de brotos (NB), comprimento foliar (CF, cm), largura foliar (LF, cm), espessura foliar (EF, mm), número de hastes (NH), massa seca da parte aérea (MSPA, g), massa seca do sistema radicular (MSRA, g), massa seca total (MST, g), índice de qualidade de Dickson (IQD), colorimetria ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $H^\circ$ ) das folhas, índice SPAD, relações CPA/CRAP, CPA/NF, CPA/NRL, CPA/DC, MSPA/MSRA, NRL/CRAP e NH/CRAP.

		Fenotipagem de mudas					
E	M	CPA	CRAP	DC	CPA/DC	CPA/NF	CPA/NRL
<i>L. pisonis</i>	<i>Lp1</i>	44,01ab	13,23b	5,87 <sup>ns</sup>	7,52ab	2,34 <sup>ns</sup>	1,86b
	<i>Lp2</i>	45,55a	12,87bc	5,97	7,67a	2,42	2,39a
	<i>Lp3</i>	42,39ab	12,37c	6,47	6,28c	2,70	1,64bc
	<i>Lp4</i>	36,14b	13,32b	5,91	6,43bc	1,96	1,45c
	<i>Lp5</i>	43,89ab	12,83bc	6,75	6,55abc	2,28	1,66bc
	<i>Lp6</i>	43,92ab	14,15a	6,22	7,54ab	2,55	1,88b
<i>L. lanceolata</i>	<i>Ll1</i>	36,74cd	14,03ab	4,98ab	7,44ab	0,44abc	2,14bc
	<i>Ll2</i>	42,27ab	13,93b	5,07ab	7,74ab	0,51ab	1,96c
	<i>Ll3</i>	43,62a	13,85b	5,79a	7,61ab	0,34c	1,96c
	<i>Ll4</i>	33,91d	14,47a	4,77b	7,16b	0,39bc	1,93c
	<i>Ll5</i>	37,53bcd	14,25ab	5,01ab	7,49ab	0,54a	2,99a
	<i>Ll6</i>	41,21abc	14,00ab	4,72b	8,75a	0,47ab	2,79ab

## Continuação

E	M	NRL	NRL/CRAP	DRP	DRL	VR	DR
<i>L. pisonis</i>	<i>Lp1</i>	23,71a	1,80ab	6,13 <sup>ns</sup>	1,12 <sup>ns</sup>	3,33ab	0,37 <sup>ns</sup>
	<i>Lp2</i>	19,14b	1,49b	6,13	0,95	2,47c	0,34
	<i>Lp3</i>	25,53a	2,09a	6,97	1,05	4,09a	0,38
	<i>Lp4</i>	24,10a	2,00ab	5,97	1,04	2,45c	0,35
	<i>Lp5</i>	26,76a	2,09a	6,53	1,08	3,03bc	0,37
	<i>Lp6</i>	24,96a	1,76ab	6,58	0,95	3,90a	0,32
<i>L. lanceolata</i>	<i>Ll1</i>	18,96ab	1,36abc	4,76 <sup>ns</sup>	0,77bcd	2,33 <sup>ns</sup>	0,35 <sup>ns</sup>
	<i>Ll2</i>	22,27a	1,60ab	5,04	0,70d	2,73	0,35
	<i>Ll3</i>	20,88a	1,65a	5,41	0,86ab	2,70	0,35
	<i>Ll4</i>	17,83ab	1,23bcd	5,19	0,74cd	2,21	0,41
	<i>Ll5</i>	12,73c	0,89d	5,09	0,89a	2,92	0,34
	<i>Ll6</i>	15,13bc	1,08cd	4,83	0,80abc	2,31	0,34
E	M	NF	NB	CF	LF	EF	NH
<i>L. pisonis</i>	<i>Lp1</i>	19,09 <sup>ns</sup>	0,13c	9,18ab	3,28a	0,12b	1,17 <sup>ns</sup>
	<i>Lp2</i>	18,32	0,59a	9,43ab	3,21ab	0,11b	1,36
	<i>Lp3</i>	16,01	0,29bc	9,59ab	3,06ab	0,14a	1,15
	<i>Lp4</i>	19,10	0,38abc	9,01b	2,85b	0,11b	1,24
	<i>Lp5</i>	18,34	0,50ab	10,12ab	3,38a	0,11b	1,07
	<i>Lp6</i>	17,59	0,23bc	10,46a	3,41a	0,11b	1,25
<i>L. lanceolata</i>	<i>Ll1</i>	91,33b	7,77b	6,39b	1,66abc	0,10ab	1,58ab
	<i>Ll2</i>	77,00c	7,64b	7,21a	1,75a	0,09b	2,45a
	<i>Ll3</i>	127,67a	11,78a	7,33a	1,71ab	0,10a	1,97ab
	<i>Ll4</i>	84,28bc	7,67b	5,89b	1,52c	0,09b	1,54ab
	<i>Ll5</i>	72,52c	5,93b	6,27b	1,55bc	0,10ab	1,44b
	<i>Ll6</i>	85,83bc	6,50b	7,08a	1,65abc	0,10a	2,44a
E	M	NH/CRAP	MSPA	MSRA	MST	MSPA/MSRA	IQD
<i>L. pisonis</i>	<i>Lp1</i>	0,09 <sup>ns</sup>	3,04ab	1,22 <sup>ns</sup>	4,26ab	2,56 <sup>ns</sup>	3,13 <sup>ns</sup>
	<i>Lp2</i>	0,11	2,81ab	1,07	4,12ab	2,90	3,40
	<i>Lp3</i>	0,09	3,77a	1,64	5,41a	2,28	3,02
	<i>Lp4</i>	0,09	1,89b	1,08	2,71b	2,43	3,02
	<i>Lp5</i>	0,08	3,76a	1,39	5,37a	2,83	3,64
	<i>Lp6</i>	0,09	3,26a	1,24	4,50a	2,67	3,27
<i>L. lanceolata</i>	<i>Ll1</i>	0,11ab	2,47bc	0,86 <sup>ns</sup>	3,29b	3,09b	3,55bc
	<i>Ll2</i>	0,18a	2,76bc	0,95	3,70b	2,99b	3,45bc
	<i>Ll3</i>	0,16ab	4,12a	0,94	5,06a	4,94a	5,63a
	<i>Ll4</i>	0,11b	2,22c	0,92	3,14b	2,45b	2,90bc
	<i>Ll5</i>	0,10b	2,21c	0,99	3,16b	2,33b	2,75c
	<i>Ll6</i>	0,18a	2,91b	0,76	3,70b	3,71ab	4,14b

## Continuação

E	M	SPAD	L*	a*	b*	C*	H°
<i>L. pisonis</i>	<i>Lp1</i>	35,88a	33,32 <sup>ns</sup>	-10,92a	20,86b	23,47b	118,41 <sup>ns</sup>
	<i>Lp2</i>	34,89ab	34,03	-11,75ab	21,97ab	24,99ab	119,40
	<i>Lp3</i>	34,37ab	33,95	-10,89a	22,18ab	24,61ab	116,18
	<i>Lp4</i>	31,42b	35,77	-12,63b	24,27a	27,25a	115,12
	<i>Lp5</i>	34,44ab	33,81	-11,50ab	20,58b	23,57b	119,74
	<i>Lp6</i>	34,97ab	33,51	-11,08a	20,37b	23,31b	118,77
<i>L. lanceolata</i>	<i>Ll1</i>	30,33b	36,21ab	-10,86bc	25,05a	27,30ab	113,68abc
	<i>Ll2</i>	30,19b	36,11ab	-11,18c	24,11abc	26,69ab	116,10a
	<i>Ll3</i>	34,99a	34,77b	-10,42ab	21,44c	23,92c	116,02ab
	<i>Ll4</i>	29,12b	38,16a	-10,57abc	25,64a	27,68a	112,50c
	<i>Ll5</i>	29,18b	37,25a	-10,21a	24,44ab	26,43abc	113,26bc
	<i>Ll6</i>	33,40a	34,63b	-10,39ab	22,14bc	24,71bc	115,19abc

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ) para *L. pisonis* e *L. lanceolata* separadamente.

Fonte: a autora.

As mudas de *L. pisonis* das matrizes *Lp1*, *Lp3*, *Lp4*, *Lp5* e *Lp6* não diferiram estatisticamente entre si para a variável NRL, apresentando média de 25 raízes. No entanto, para *L. lanceolata*, os maiores valores foram encontrados em *Ll2* e *Ll3*, com média de 21,58 raízes, mas não diferindo estatisticamente da *Ll1* e *Ll4* (Tabela 3). Esta característica é fundamental na qualidade das mudas, já que raízes finas estão envolvidas principalmente na absorção de água, nutrientes e associações simbióticas (QUIROGA et al., 2019; ZHANG et al., 2020). A qualidade de mudas esta relacionada com características que permitam uma melhor adaptabilidade a fatores bióticos, abióticos, absorção de nutrientes, água e sustentação da planta ao solo (CHEN; GHANEM; SIDDIQUE, 2016).

O NB variou de 0,13 (*Lp1*) a 0,59 (*Lp2*) para as mudas de *L. pisonis* e 5,93 (*Ll5*) a 11,78 (*Ll3*) brotos para as mudas de *L. lanceolata* (Tabela 3). Verifica-se, portanto, que a *Lp* em relação a *Ll* apresenta baixíssima capacidade de emissão de brotos. Relações hormonais é um fator influenciador desta emissão, sabendo-se que indivíduos com menor relação auxina/citocinina emitem maior número de brotações e possuem amplo desenvolvimento lateral de parte aérea, sendo esta uma característica observada nas matrizes em campo, as quais possuem maior crescimento lateral e menor crescimento em altura (dominância apical reduzida).

No presente estudo a média de AIA/ZT do endosperma entre as matrizes estudadas foi de 1,98 para *L. pisonis* e 1,70 para *L. lanceolata* (Figura 2c, k). A capacidade de brotação reflete no NF para ambas as espécies, não apresentando diferença estatística entre as mudas de *L. pisonis*, com média de 18 folhas cada, as quais alcançaram média de CF e LF de 9,63 e 3,20 cm. No entanto, a *L. lanceolata* apresentou o maior NF nas mudas da LB (127 folhas), com média de CF e LF de 6,70 e 1,64 cm, respectivamente (Tabela 3).

Os hormônios vegetais auxina e citocinina controlam o desenvolvimento de meristemas, sendo a auxina responsável pela dominância apical, promovendo o crescimento em altura e a citocinina pelo crescimento de gemas laterais, dando origem a ramificações (AZIZI et al., 2015). Uma maior e mais densa arquitetura de parte aérea colabora para maiores taxas de assimilação de carbono e acúmulo de massa seca (RAHMAN et al., 2018). Outro fator importante é o balanço hormonal endógeno, e uma menor relação auxina/citocinina em gemas, induz o crescimento de ramos laterais (brotos), diminuindo o enraizamento e a dominância apical (YE et al., 2018).

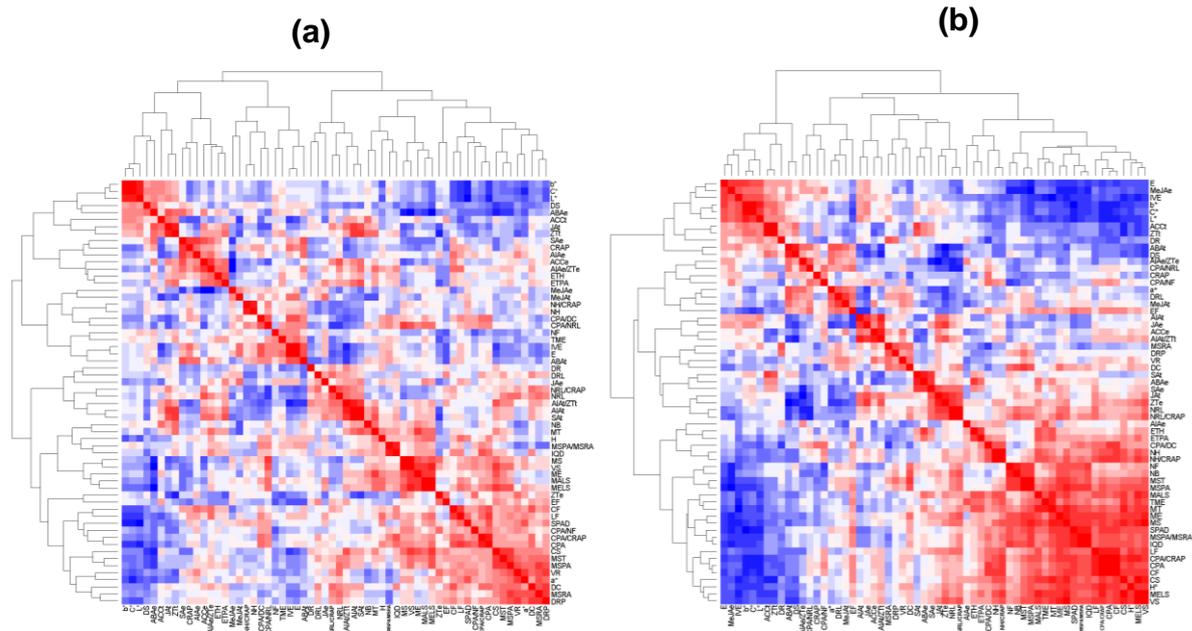
Análises de correlação se fazem importantes, pois é possível determinar se uma variável pode ter influência sobre outras. No presente estudo as variáveis com alta correlação positiva encontradas para *L. pisonis* foram (DRP com DC e MSRA), (MSPA/MSRA com IQD), (E com IVE), (JAt com ZTt), (SAAt com AIAAt), (AIAe com SAe), (AIAe/ZTe com ACCe). E as variáveis com alta correlação negativa foram (SPAD com L\* e C\*), (ABAe com VS e MS), (ZTt com ZTe), (AIAAt/ZTt com ABAt) e (MeJAe com SAe e ACCe) (Figura 3a).

Para *L. lanceolata* as variáveis de alta correlação positiva foram (NB com NF e MSPA), (CPA com CF, LF), (MSPA com NF e MS), (IQD com SPAD), (MS com CS e VS), (ZTe com JAt), (ABAe com SAAt), (ZTt com ACCt), (AIAAt/ZTt com ACCe) e (E com MeJAe). E as de alta correlação negativa foram (CPA com b\*), (SPAD com L\* e C\*), (IVE com CS e TME), (ZTe com ABAt), (AIAe/ZTe com SAe), (CS com ACCt) e (MeJAe com NF, NB, MSPA e MST) (Figura 3b).

Sementes de trigo em diferentes estádios de maturação do fruto, os conteúdos de proteína, ZT e ABA foram altamente correlacionados com a maturidade fisiológica das sementes e a ZT obteve correlação negativa com o ABA (LIU et al., 2018). Segundo estes autores, mais de 200 genes encontrados em sementes de trigo estão

relacionados com quatro hormônios principais (ABA, AIA, ZT e GA<sub>3</sub>), sendo estes genes fundamentais para manter a estabilidade nos processos de biossíntese, atividade metabólica, ação receptora, resposta a sinais, transdução de sinais e transporte.

**Figura 3.** Correlação das características analisadas para as espécies *L. pisonis* (a) e *L. lanceolata* (b) de comprimento da semente (CS, mm), menor largura da semente (MELS, mm), maior largura da semente (MALS, mm), massa da semente (MS, g), volume da semente (VS, cm<sup>-3</sup>), densidade da semente (DS, g cm<sup>-3</sup>), espessura do tegumento na região de parte aérea (ETPA, mm), espessura do tegumento na região do hilo (ETH, mm), emergência (E, %), índice de velocidade de emergência (IVE), tempo médio de emergência (TME, dias), massa do endosperma (ME, g), massa do tegumento (MT, g), comprimento da parte aérea (CPA, cm), comprimento da raiz principal (CRAP, cm), diâmetro do coleto (DC, mm), número de raízes laterais (NRL), diâmetro da raiz principal (DRP, mm), diâmetro das raízes laterais (DRL, mm), volume de raízes (VR, cm<sup>-3</sup>), densidade das raízes (DR, g cm<sup>-3</sup>), número de folhas (NF), número de brotos (NB), comprimento foliar (CF, cm), largura foliar (LF, cm), espessura foliar (EF, mm), número de hastes (NH), massa seca da parte aérea (MSPA, g), massa seca do sistema radicular (MSRA, g), massa seca total (MST, g), índice de qualidade de Dickson (IQD), colorimetria (L\*, a\*, b\*, C\*, H°), índice SPAD, relações CPA/CRAP, CPA/NF, CPA/NRL, CPA/DC, MSPA/MSRA, NRL/CRAP, NH/CRAP, hormônios no tegumento (t) e endosperma (e) para AIA, ZT, ABA, JA, SA, MeJA, precursores ACC, relação AIA<sub>t</sub>/ZT<sub>t</sub> e AIA<sub>e</sub>/ZT<sub>e</sub>.



Fonte: a autora.

A ZT do endosperma foi correlacionada negativamente com o ABA presente no tegumento de sementes de *L. lanceolata* (Figura 3b). O ABA e a ZT possuem ação antagônica em muitos processos fisiológicos, sendo observado que compostos que participam da via de sinalização da citocinina, a exemplo da proteína do tipo ARRs (ou ARR5) do tipo B, interrompe a ação da quinase SnRK2s dependente de ABA. E efeitos contrários são promovidos pela ARR5 do tipo A, que atua negativamente na biossíntese de citocinina, promovendo a ativação de genes sensíveis ao ABA, por meio de um processo de fosforilação pela SnRK2s, sendo estes processos de maior ou menor expressão mediados em função das condições que a planta se encontra, sejam elas normais ou estressantes, o que irá refletir na taxa de produtividade das culturas (HUANG et al., 2018).

Para *L. lanceolata*, a ZT do tegumento se correlaciona positivamente com o ACC do tegumento e para *L. pisonis* a relação AIA/ZT no endosperma com a concentração do ACC no endosperma (Figura b, a). Resultados semelhantes foram observados para *Arabidopsis* mutantes (eto1-1) com capacidade de produção acentuada de etileno e em *Arabidopsis* do tipo selvagem, na qual o etileno influenciou positivamente na síntese de citocinina e ABA, atuando na expressão dos genes IPT3 e NCED3, respectivamente (LI et al., 2018).

Sementes de tremoço que possuem germinação superior a 90%, tiveram sua germinação prejudicada, quando submetidas a tratamentos com concentrações de MeJA, contudo, este hormônio evidenciou ter influência sobre a produção de flavonóides em mudas (ZALEWSKI et al., 2020). Resultados diferentes foram observados para a espécie *L. pisonis*, que apresentou uma correlação positiva entre a emergência de plântulas com o acúmulo de MeJA, todavia, foi observado que castanhas de *L. pisonis* são ricas em compostos fenólicos e flavonóides (Demoliner et al., 2018b), sugerindo que a concentração endógena deste hormônio poderia estar envolvida em alguns processos de síntese de compostos antioxidantes.

Mesmo sendo associado positivamente a emergência, o MeJA contido em endosperma de sementes evidenciou-se prejudicial no crescimento de mudas de *L. lanceolata*, correlacionando-se negativamente com NF, NB, MSPA e MST. O MeJA pode atuar impedindo o crescimento de brotações e de mudas de *Arabidopsis*, atuando sobre proteínas integrais de membrana e no fluxo de água (LEE et al., 2019).

Para *L. pisonis* encontrou-se correlação positiva entre AIA e SA, tanto no endosperma quanto no tegumento. Essa associação também pode ser observada em estudos com sementes de *Abelmoschus esculentus*, pré-tratadas com SA e AIA, contribuindo na adaptação das plantas ao estresse salino, devido ao aumento da atividade de enzimas, como a catalase e glutathione peroxidase, importantes no combate de radicais livres e o aumento na produção de pigmentos fotossintéticos (ESAN et al., 2017).

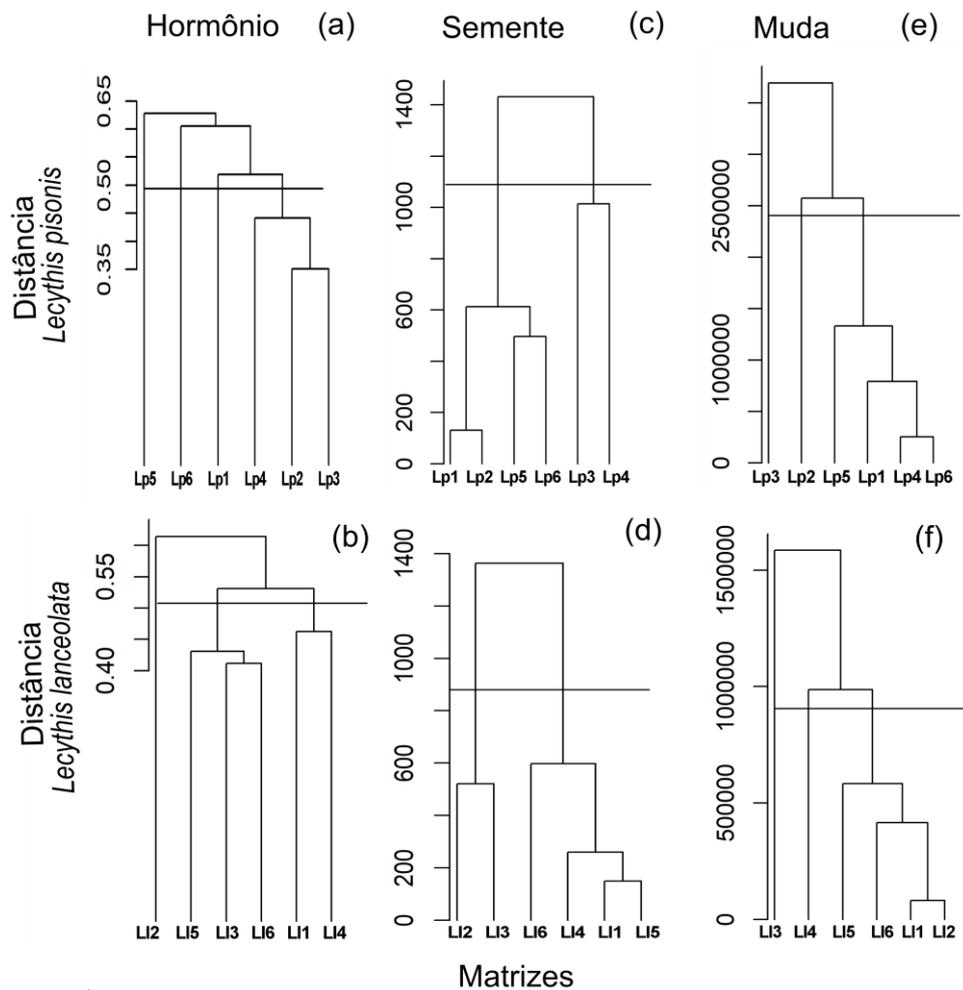
Por meio da distância genética de Mahalanobis fez-se um agrupamento das matrizes de cada espécie em função das variáveis estudadas dentro de hormônios, sementes e mudas. Dentro de hormônios, as matrizes de *L. pisonis* foram separadas em quatro grupos distintos, sendo eles, I (*Lp5*), II (*Lp6*), III (*Lp1*) e IV (*Lp4*, *Lp2* e *Lp3*), no qual a *Lp5* é a mais divergente (Figura 4a), apresentando maiores valores para as características AIA, ZT, AIA/ZT e SA no tegumento e AIA/ZT, JA e ACC no endosperma e os menores para ZT e MeJA no endosperma e MeJA no tegumento (Figura 2). E para *L. lanceolata* foram separadas em três grupos, I (*Ll2*), II (*Ll5*, *Ll3* e *Ll6*) e III (*Ll1* e *Ll4*), sendo a *Ll2* a mais divergente (Figura 4b), com os maiores valores para AIA, AIA/ZT e JA no tegumento e JA, ACC, ZT e MeJA no endosperma e os menores para AIA/ZT no endosperma e ABA, SA e ACC no tegumento (Figura 2).

Dentro de sementes, as matrizes de *L. pisonis* foram separadas em dois grupos, I (*Lp1*, *Lp2*, *Lp5* e *Lp6*) e II (*Lp3* e *Lp4*) (Figura 4c), sendo que o grupo II se diferencia dos demais por apresentar uma maior DS e ETPA e uma menor MT (Tabela 2). E para *L. lanceolata*, as matrizes também foram separadas em dois grupos, I (*L12* e *L13*) e II (*L16*, *L14*, *L11* e *L15*) (Figura 4d), sendo que o grupo I se difere das demais por apresentar maiores valores para MELS, MALS, VS e TME e menores para ETPA, ETH e IVE (Tabela 2).

As características de mudas contribuíram para a formação de três grupos para *L. pisonis*, sendo eles, I (*Lp3*), II (*Lp2*) e III (*Lp5*, *Lp1*, *Lp4* e *Lp6*), sendo a *Lp3* a mais divergente (Figura 4e), se destacando por apresentar maiores valores para CPA, SPAD, NRL, NRL/CRAP, VR, CF, LF, EF, MSPA, MST,  $a^*$ ,  $b^*$  e  $C^*$  e menores valores para CRAP, CPA/DC e NB (Tabela 3). E para *L. lanceolata*, três grupos, I (*L13*), II (*L14*) e III (*L15*, *L16*, *L11* e *L12*), sendo a *L13* mais divergente (Figura 4f), com maiores valores para CPA, SPAD, DC, CPA/DC, NRL, NRL/CRAP, DRL, NF, NB, CF, LF, EF, NH, NH/CRAP, MSPA, MST, MSPA/MSRA, IQD,  $a^*$  e  $H^\circ$  e os menores valores para CRAP, CPA/NF, CPA/NRL,  $L^*$ ,  $b^*$  e  $C^*$  (Tabela 3).

Análises fenotípicas contribuem para o agrupamento de indivíduos e a seleção de características de interesse, como observado em estudos com a espécie *Juglans regia* L., cuja avaliação biométrica em sementes de matrizes coletadas em diferentes regiões, agrupou matrizes com alta e baixa produtividade, de maior massa da castanha e as que possuíam menores espessuras do tegumento (MAHMOODI et al., 2019). A seleção também pode ser realizada visando à antecipação do florescimento, adaptabilidade a seca, inundações e ataques de pragas (ENJALBERT et al., 2013).

**Figura 4.** Dendrogramas de distância genética de Mahalanobis ( $D^2$ ), obtidos por meio do método UPGMA para o agrupamento de matrizes pertencentes às espécies de *L. pisonis* (*Lp*) e *L. lanceolata* (*Ll*) em função das características hormonais e biométricas de sementes e fenotípicas de mudas.

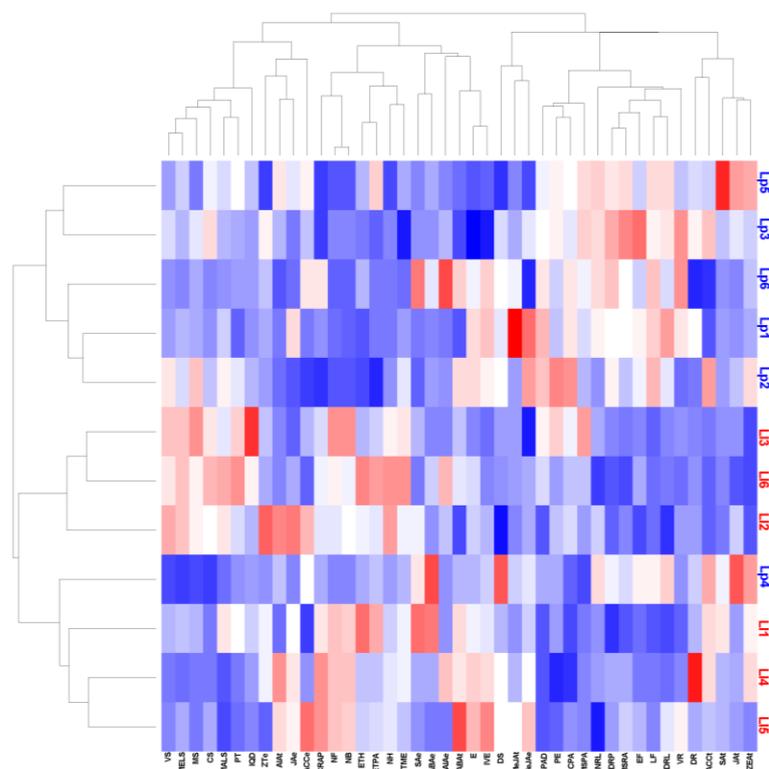


Fonte: a autora.

Características que estão envolvidas em processos fisiológicos de crescimento e desenvolvimento de plantas, a exemplo do balanço hormonal, também são importantes, já que podem influenciar na dormência e atividade enzimática de sementes (CHANG et al., 2018; LIU et al., 2018), síntese de proteínas de estresse (LEAs), (BHATTACHARYA et al., 2019), senescência e maturação de frutos (LI et al., 2019), processos de sinalização contra insetos, patógenos, metais pesados (FANG et al., 2018; FARHANGI-ABRIZ et al., 2019) e estresse salino (ESAN et al., 2017).

O estudo da diversidade genética utilizando características fenotípicas e hormonais separou as matrizes de *L. pisonis* em dois grupos, I (*Lp2*, *Lp1* e *Lp6*) e II (*Lp3* e *Lp5*). A *Lp4* possui características fenotípicas que a distanciaram das outras matrizes de *L. pisonis*, sendo inserida dentro do grupo composto por matrizes de *L. lanceolata*, que foram separadas em grupo I (*LI5*, *LI4*, *LI1* e *Lp4*) e II (*LI2*, *LI6* e *LI3*) (Figura 5).

**Figura 5.** Diversidade genética obtida pelo método UPGMA utilizando características biométricas e hormonais de sementes e fenotípicas de mudas para as espécies *L. pisonis* (*Lp*) e *L. lanceolata* (*Ll*), analisando o comprimento da semente (CS, mm), menor largura da semente (MELS, mm), maior largura da semente (MALS, mm), massa da semente (MS, g), volume da semente (VS, cm<sup>-3</sup>), densidade da semente (DS, g cm<sup>-3</sup>), espessura do tegumento na região de parte aérea (ETPA, mm), espessura do tegumento na região do hilo (ETH, mm), emergência (E, %), índice de velocidade de emergência (IVE), tempo médio de emergência (TME, dias), massa do endosperma (ME, g), massa do tegumento (MT, g), comprimento da parte aérea (CPA, cm), comprimento da raiz principal (CRAP, cm), número de raízes laterais (NRL), diâmetro da raiz principal (DRP, mm), diâmetro das raízes laterais (DRL, mm), volume de raízes (VR, cm<sup>-3</sup>), densidade das raízes (DR, g cm<sup>-3</sup>), número de folhas (NF), número de brotos (NB), largura foliar (LF, cm), espessura foliar (EF, mm), número de hastes (NH), massa seca da parte aérea (MSPA, g), massa seca do sistema radicular (MSRA, g), índice de qualidade de Dickson (IQD), índice SPAD, hormônios no tegumento (t) e endosperma (e) para AIA, ZT, ABA, JA, SA, MeJA e o precursor ACC.



Fonte: a autora.

A matriz *Lp4* se difere das demais *L. pisonis* por apresentar maiores valores de DS, ETPA, TME, ABAe, JAAt, ACCt, NRL e NB e menores valores para CS, MELS, MALS, MS, VS, ME, MT, AIAe, JAe, MeJAAt, CPA, SPAD, VR, LF, EF e MSPA (Tabela 3). Dentre estas, podemos observar que possui um maior NB e um menor CPA e LF, sendo estas características marcantes dentro de *L. lanceolata*.

Em estudos com 21 matrizes de *L. pisonis*, Rosa (2018) evidenciou uma alta diversidade genética, observado também, que a presença de alguns nutrientes nas castanhas da matriz 5 (K e P), 8 (Mn) e 21 (Se) contribuíram para torná-las mais divergentes. Avaliações biométricas de frutos e sementes de 12 matrizes de *L. pisonis*, também contribuíram para a separação destas em grupos com capacidade de produzir o maior número de sementes por fruto (matriz 1) e o maior tamanho da semente (matrizes 2 e 7), fazendo-se a indicação para programas de melhoramento genético (ROSA et al., 2019).

Em estudos com *Elaeis guineenses*, Myint et al. (2019) sugeriram a retirada de indivíduos pertencentes ao mesmo agrupamento em plantios, em função da alta similaridade genética, o que pode contribuir para diminuição das áreas de plantios e gastos na produção e mão-de-obra. Para a espécie *Juglans regia*, o agrupamento de árvores de nozes em grupos mais próximos (6 e 14) preconizou que estes devem ser descartados como possíveis progenitores em programas de hibridação, diferentemente dos indivíduos inseridos em grupos distantes geneticamente (5 e 8), sendo também feita a separação de matrizes com características de interesse, a exemplo, do grupo 8 e 14, cujos indivíduos possuem as castanhas de maior massa (SHARMA; SHARMA, 2001). Khadivi et al. (2019) também agruparam matrizes em função da massa das nozes, selecionando 329 indivíduos com potenciais para o melhoramento genético.

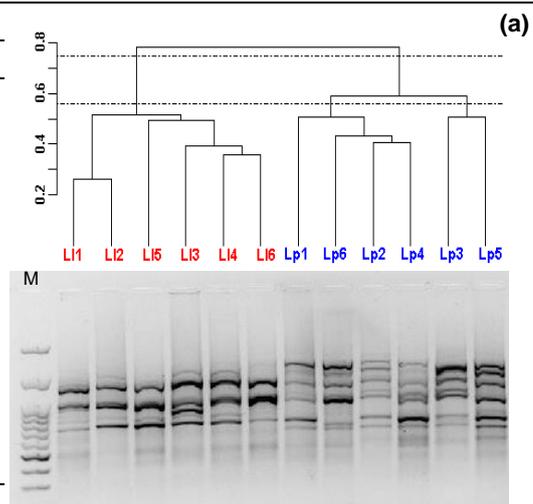
As espécies *L. pisonis* e *L. lanceolata* foram separadas em dois grupos distintos, por meio da análise de Cluster, evidenciando alta variabilidade genética entre as duas espécies. As matrizes de *L. lanceolata* se agruparam dentro de um mesmo grupo (*L1*, *L2*, *L5*, *L3*, *L4* e *L6*), enquanto, as matrizes de *L. pisonis* foram agrupadas em dois grupos distintos, sendo eles, I (*Lp1*, *Lp6*, *Lp2* e *Lp4*) e II (*Lp3* e *Lp5*), no qual a *Lp1* é a mais divergente (Tabela 4a). Observou-se uma baixa variabilidade genética entre as matrizes dentro de cada espécie, que apresentaram

50,98% de bandas polimórficas para *L. lanceolata* e 69,56% para *L. pisonis* (Tabela 4a).

Um dos fatores que influenciam a baixa variabilidade genética é a polinização entre indivíduos com parentesco alto devido à localização geográfica próxima. Por meio de marcadores genéticos, analisou-se que pomares de *Eucalyptus urophylla* oriundos de sementes tiveram perda de variabilidade genética de suas proles em função da endogamia e que uma distância de 600 metros entre as populações não foi suficiente para evitar a contaminação (PUPIN et al., 2019). Em estudos com *Baillonella toxisperma*, árvore de baixa densidade por hectare, observou-se que o cruzamento entre indivíduos geneticamente próximos promoveu a endogamia e a formação de proles que sofrem efeitos negativos da seleção natural, morrendo nos estádios iniciais de crescimento vegetativo (DUMINIL et al., 2016).

**Tabela 4.** Análise descritiva dos *primers* constando o número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP) e polimorfismo (P, %). (a) Dendrograma de Cluster obtido pelo método UPGMA, baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard, a partir da análise dos polimorfismos para 11 *primers* ISSR entre seis matrizes de *L. pisonis* (Lp) e seis matrizes de *L. lanceolata* (Ll) e a exemplificação do perfil de amplificação do *primer* ISSR UBC 868. M = marcador de 100 pb.

Primers UBC	NTB	Ll		Lp	
		NBP	P (%)	NBP	P (%)
808	7	2	25,00	7	100,00
811	14	8	57,14	12	85,71
812	8	3	37,50	5	62,50
818	5	1	20,00	2	40,00
826	12	7	58,33	10	83,33
841	10	7	70,00	5	50,00
852	6	4	66,67	4	66,67
853	10	4	40,00	8	80,00
868	10	8	80,00	5	50,00
873	10	6	60,00	7	70,00
880	13	6	46,15	10	76,92
Total	105	56	50,98	75	69,56



Fonte: a autora.

A exploração das florestas e a sua fragmentação isola populações de uma mesma espécie, causando a perda da variabilidade genética em função do

cruzamento de indivíduos geneticamente próximos, como observado em estudos com quatro populações de castanheiras-do-brasil, que encontraram maior diversidade genética entre populações (95,56%) e menor entre os indivíduos de uma mesma população (2,68%), sugerindo então, que a colheita de sementes seja realizada em árvores distantes geograficamente umas das outras, visando à propagação de materiais genéticos com alta diversidade (BALDONI et al., 2020).

Em estudos com 21 matrizes de *L. pisonis* localizadas em diferentes regiões no norte do Espírito Santo, foi observado uma alta porcentagem de polimorfismo (96,7%) com a utilização de 13 *primers* ISSR, provavelmente devido ao fato de se localizarem geograficamente distantes (ROSA, 2018). Borges et al. (2016) também encontraram alto polimorfismo (94,79%) em 17 acessos de sapucaia utilizando 11 *primers* ISSR, os quais foram coletados em quatro regiões localizadas no Piauí e Maranhão.

#### 4. CONCLUSÕES

Árvores de *L. lanceolata* apresentam porte menos elevado, facilitando a colheita de frutos.

As matrizes de *L. pisonis* Lp1 e Lp2 alcançaram as maiores emergências de plântulas e produção anual de frutos. Para *L. lanceolata* a L16 se destacou pela maior produção de frutos.

A Lp2 de *L. pisonis* e a L13 de *L. lanceolata* apresentaram as maiores massas dos endospermas, característica importante para a comercialização de castanhas.

A espécie *L. lanceolata* possui altas concentrações de ZT e uma menor relação AIA/ZT no endosperma de suas sementes, bem como uma alta capacidade na emissão de brotos em mudas.

As espécies *L. pisonis* e *L. lanceolata* apresentam alta concentração de ABA no tegumento das sementes.

Há ação antagônica entre a ZT do endosperma e o ABA presente no tegumento de sementes para *L. lanceolata*, sugerindo ser um fator influenciador na germinação de sementes.

O MeJA foi correlacionado negativamente com o crescimento de mudas e acúmulo de massa seca para *L. lanceolata*.

Existe uma alta variabilidade genética entre as espécies estudadas, e uma baixa variabilidade genética dentro da espécie.

## 5. REFERÊNCIAS

A HMED, M. R. et al. X-ray CT image analysis for morphology of muskmelon seed in relation to germination. **Biosystems Engineering**, v. 175, p. 183-193, 2018.

ASAMI, T; NAKAGAWA, Y. Preface to the Special Issue: Brief review of plant hormones and their utilization in agriculture. **Journal of Pesticide Science**, v. 43, n. 3, p. 154-158, 2018.

AZIZI, P. et al. Understanding the shoot apical meristem regulation: A study of the phytohormones, auxin and cytokinin, in rice. **Mechanisms of Development**, v. 135, p. 1-15, 2015.

BALDONI, A. B. et al. Genetic diversity of Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) in southern Brazilian Amazon. **Forest Ecology and Management**, 458, 117795, 2020.

BEWLEY, J. D. et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. Springer, New York. 2013. 408p

BHATTACHARYA, S. et al. Structural, functional, and evolutionary analysis of late embryogenesis abundant proteins (LEA) in *Triticum aestivum*: A detailed molecular level biochemistry using in silico approach, **Computational Biology and Chemistry**, v. 82, p. 9-24, 2019.

BORGES, R. C. et al. Investigating genetic diversity in sapucaia using inter simple sequence repeat markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, p. 1-13, 2016.

BOUDHRIOUA, N. et al. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 29, n. 2-3, p. 412-419, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. MAPA/DAS/ACS. 395p. 2009.

CHANG, E. et al. Proteome-Level analysis of metabolism-and stress-related proteins during seed dormancy and germination in *Gnetum parvifolium*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 11, p. 3019-3029, 2018.

CHEN, Y.; GHANEM, M. E.; SIDDIQUE, K. H. M. Characterising root trait variability in chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 8, p. 1987-1999, 2016a.

DAYRELL, R. L. et al. Phylogeny strongly drives seed dormancy and quality in a climatically buffered hotspot for plant endemism. **Annals of Botany**, v. 119, n. 2, p. 267-277, 2016.

DEMOLINER, F. et al. Sapucaia nut (*Lecythis pisonis* Cambess) and its by-products: A promising and underutilized source of bioactive compounds. Part II: Phenolic compounds profile. **Food Research International**, v. 112, p. 434-442, 2018b.

DEMOLINER, F. et al. Sapucaia nut (*Lecythis pisonis* Cambess) and its by-products: A promising and underutilized source of bioactive compounds. Part I: Nutritional composition and lipid profile. **Food Research International**, v. 112, p. 434-442, 2018a.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

DRAY JR, F. A.; CENTER, T. D.; MATTISON, E. D. In situ estimates of waterhyacinth leaf tissue nitrogen using a SPAD-502 chlorophyll meter. **Aquatic Botany**, v. 100, p. 72-75, 2012.

DUMINIL, J. et al. High selfing rate, limited pollen dispersal and inbreeding depression in the emblematic African rain forest tree *Baillonella toxisperma* – Management implications. **Forest Ecology and Management**, v. 379, p. 20-29, 2016.

EDWARDS, D.; JOLLIFFE, P.; EHRET, D. Canopy profiles of starch and leaf mass per area in greenhouse tomato and the relationship with leaf area and fruit growth. **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 4, p. 637-647, 2010.

ENJALBERT, J. N. et al. Brassicaceae germplasm diversity for agronomic and seed quality traits under drought stress. **Industrial Crops and Products**, v. 47, p. 176-185, 2013.

ESAN, A. M. et al. Comparative effects of indole acetic acid and salicylic acid on oxidative stress marker and antioxidant potential of okra (*Abelmoschus esculentus*) fruit under salinity stress. **Scientia Horticulturae**, v. 216, p. 278-283, 2017.

FANG, X. A. et al. Determination of four salicylic acids in aloe by in vivo solid phase microextraction coupling with liquid chromatography-photodiode array detection. **Talanta**, v. 184, p. 520-526, 2018.

FARHANGI-ABRIZ, S.; GHASSEMI-GOLEZANI, K. Jasmonates: Mechanisms and functions in abiotic stress tolerance of plants. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, p. 101210, 2019.

FORCAT, S. et al. A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress. **Plant Methods**, v. 4, n. 1, p. 16, 2008.

FU, X. Y. et al. Shoot growth pattern and quantifying flush maturity with SPAD value in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). **Scientia Horticulturae**, v. 174, p. 29-35, 2014.

GULLO, G. et al. Rootstock and fruit canopy position affect peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] (cv. Rich May) plant productivity and fruit sensorial and nutritional quality. **Food Chemistry**, 153, p. 234-242, 2014.

HERBERT, S. W.; WALTON, D. A.; WALLACE, H. M. Pollen-parent affects fruit, nut and kernel development of Macadamia. **Scientia Horticulturae**, v. 244, p. 406-412, 2019.

HUANG, X. et al. The antagonistic action of abscisic acid and cytokinin signaling mediates drought stress response in Arabidopsis. **Molecular Plant**, v. 11, n. 7, p. 970-982, 2018.

KANG, J. et al. Abscisic acid transporters cooperate to control seed germination. **Nature Communications**, v. 6, p. 8113-8113, 2015.

KHADIVI, A. et al. The pomological characterization of walnut (*Juglans regia* L.) to select the superior genotypes – An opportunity for genetic improvement. **Scientia Horticulturae**, v. 248, p. 29-33, 2019.

KONAN, J. A.; KOFFI, K. K.; ZORO, A. I. B. Lignin biosynthesis rate is responsible for varietal difference in fruit rind and seed coat hardness in the bottle gourd *Lagenaria siceraria* (Molina) Standley. **South African Journal of Botany**, v. 117, p. 276-281, 2018.

KOUKOUNARAS, A.; SIOMOS, A. S.; SFAKIOTAKIS, E. Postharvest CO<sub>2</sub> and ethylene production and quality of rocket (*Eruca sativa* Mill.) leaves as affected by leaf age and storage temperature. **Postharvest Biology and Technology**, v. 46, n. 2, p. 167-173, 2007.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: OEA. 174p. 1983.

LEE, S. H.; ZWIAZEK, J. J. Regulation of water transport in Arabidopsis by methyl jasmonate. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 139, p. 540-547, 2019.

LI, T. et al. The molecular mechanism for the ethylene regulation of postharvest button mushrooms maturation and senescence. **Postharvest Biology and Technology**, v. 156, p. 110930, 2019.

LI, W. et al. Effects of overproduced ethylene on the contents of other phytohormones and expression of their key biosynthetic genes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 128, p. 170-177, 2018.

LIU, A. et al. Regulation of wheat seed dormancy by after-ripening is mediated by specific transcriptional switches that induce changes in seed hormone metabolism and signaling. **PLoS One**, v. 8, n. 2, e56570, 2013.

LIU, M. et al. Insights into the correlation between Physiological changes in and seed development of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.). **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 648. 2018.

LOPEZ, R.; DATHE, W.; SEMBDNER, G. Absciscic acid in different parts of the developing soybean fruit. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, v. 184, n. 3-4, p. 267-276, 1989.

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

MAHMOODI, R. et al. Development of a core collection in Iranian walnut (*Juglans regia* L.) germplasm using the phenotypic diversity. **Scientia Horticulturae**, v. 249, p. 439-448, 2019.

MIRANSARI, M.; SMITH, D. L. Plant hormones and seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, v. 99, p. 110-121, 2014.

MNG'OMBA, S. A.; SILESHI, G. W. Effect of propagule type and fruiting time on *Uapaca kirkiana* fruit and seed size, seed germination and seedling growth. **Trees**, v. 29, n. 3, p. 655-662, 2015.

MORI, S. A.; PRANCE, G. T. **Lecythidaceae part II: the zygomorphic-flowered new world genera (*Couroupita*, *Corythophora*, *Bertholletia*, *Couratari*, *Eschweillera*, & *Lecythis*)**, with a study of secondary of neotropical lecythidaceae. New York: The New York Botanical Garden, 1990. 375p. (Flora Neotropica. Monograph, 21 II).

MORI, S. A. et al. Thiers, B. Observations on the phytogeography of the Lecythidaceae clade (Brazil nut family). **Phytoneuron**, v. 30, p. 1-85, 2017.

MYINT, K. A. et al. Genetic diversity and selection criteria of MPOB-Senegal oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) germplasm by quantitative traits. **Industrial Crops and Products**, v. 139, 111558, 2019.

OLIVEIRA, V. B. et al. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 170-179, 2012.

OLVERA-CARRILLO, Y. et al. Effect of environmental heterogeneity on field germination of *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae) seeds. **Journal of Arid Environments**, v. 73, n. 4, p. 414-420, 2009.

- PENFIELD, S. Seed dormancy and germination. **Current Biology**, v. 27, n. 17, p. R874-R878, 2017.
- POGETTI, L. et al. Morphological and carpological variability of walnut germplasm (*Juglans regia* L.) collected in North-Eastern Italy and selection of superior genotypes. **Scientia Horticulturae**, v. 225, p. 615-619, 2017.
- PORTH, I.; EL-KASSABY, Y. Assessment of the genetic diversity in forest tree populations using molecular markers. **Diversity**, v. 6, n. 2, p. 283-295, 2014.
- PUPIN, S. et al. Effects of pollen contamination and non-random mating on inbreeding and outbreeding depression in a seedling seed orchard of *Eucalyptus urophylla*. **Forest Ecology and Management**, v. 437, p. 272-281, 2019.
- QUIROGA, G. et al. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to the regulation of radial root water transport in maize plants under water deficit. **Environmental and Experimental Botany**, v. 167, p. 103821, 2019.
- R Development Core Team. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2017.
- RAHMAN, S. et al. Leaf canopy architecture determines light interception and carbon gain in wild and domesticated *Oryza* species. **Environmental and Experimental Botany**, v. 155, p. 672-680, 2018.
- RODRIGUES, I. V. et al. Fruit development and ABA biosynthesis during *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) seed maturation. **Journal of Plant Growth Regulation**, p. 1-13, 2019.
- ROSA, T. L. M. Diversidade genética, comportamento morfofisiológico e status nutricional de *Lecythis pisonis* CAMBESS. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo. Espírito Santo, p. 46, 2018.
- ROSA, T. L. M. et al. Biometry and genetic diversity of paradise nut genotypes (*Lecythidaceae*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, p. e00240, 2019.

SÁNCHEZ, M. D. L. P. et al. Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 412, p. 515-523, 2005.

SEO, H. S. et al. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 8, p. 4788-4793, 2001.

SEO, M.; KOSHIBA, T. Complex Regulation of ABA Biosynthesis in Plants. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 41-48, 2002.

SHAN, Y. et al. First insight into diversity of leaf color of loquat (*Eriobotrya*) and its potential value on taxonomy. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 66, n. 1, p. 143-163, 2019.

SHARMA, O. C.; SHARMA, S. D. Genetic divergence in seedling trees of Persian walnut (*Juglans regia* L.) for various metric nut and kernel characters in Himachal Pradesh. **Scientia Horticulturae**, v. 88, n. 2, p. 163-171, 2001.

SHASMITA et al. Priming with salicylic acid induces defense against bacterial blight disease by modulating rice plant photosystem II and antioxidant enzymes activity. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 108, p. 101427, 2019.

SOUZA, V. A. B. et al. Características físicas de frutos e amêndoas e características químico-nutricionais de amêndoas de acessos de sapucaia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 4, p. 946-952, 2008.

SUN, P. et al. Endogenous phytohormone profiles in male and female floral buds of the persimmons (*Diospyros kaki* Thunb.) during development. **Scientia Horticulturae**, v. 218, p. 213-221, 2017.

TEIXEIRA, G. L. et al. Assessment of subcritical propane, supercritical CO<sub>2</sub> and soxhlet extraction of oil from sapucaia (*Lecythis pisonis*) nuts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 133, p. 122-132, 2018.

TETSUMURA, T. et al. Growth and production of adult Japanese persimmon (*Diospyros kaki*) trees grafted onto dwarfing rootstocks. **Scientia Horticulturae**, v. 187, p. 87-92, 2015.

TORRES NETTO, A. T. et al. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. **Scientia Horticulturae**, v. 104, n. 2, p. 199-209, 2005.

XIAO, H. M. et al. Spatio-temporal profiling of abscisic acid, indoleacetic acid and jasmonic acid in single rice seed during seed germination. **Analytica Chimica Acta**, v. 1031, p. 119-127, 2018.

XIAO, Z.; CHANG, G.; ZHANG, Z. Testing the high-tannin hypothesis with scatter-hoarding rodents: experimental and field evidence. **Animal Behaviour**, v. 75, n. 4, p. 1235-1241, 2008.

YE, X. et al. Expression of grape ACS1 in tomato decreases ethylene and alters the balance between auxin and ethylene during shoot and root formation. **Journal of Plant Physiology**, v. 226, p. 154-162, 2018.

ZAID, A. et al. Salicylic acid enhances nickel stress tolerance by up-regulating antioxidant defense and glyoxalase systems in mustard plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 180, p. 575-587, 2019.

ZALEWSKI, K. et al. The influence of exogenous methyl jasmonate on the germination and, content and composition of flavonoids in extracts from seedlings of yellow and narrow-leafed lupine. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 87, p. 103398, 2020.

ZHANG, G. et al. Effects of the inoculations using bacteria producing ACC deaminase on ethylene metabolism and growth of wheat grown under different soil water contents. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 125, p. 178-184, 2018.

ZHANG, G. et al. Jasmonate-mediated wound signalling promotes plant regeneration. **Nature Plants**, v. 5, n. 5, p. 491-497, 2019.

ZHANG, H.; ZHANG, Z. Endocarp thickness affects seed removal speed by small rodents in a warm-temperate broad-leaved deciduous forest, China. **Acta Oecologica**, v. 34, n. 3, p. 285-293, 2008.

ZHANG, X. et al. Effects of long-term nitrogen addition and decreased precipitation on the fine root morphology and anatomy of the main tree species in a temperate forest. **Forest Ecology and Management**, v. 455, p. 117664, 2020.

ZHANG, X. et al. A significant positive correlation between endogenous *trans*-zeatin content and total arsenic in arsenic hyperaccumulator *Pteris cretica* var. *nervosa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 138, p. 199-205, 2017.

ZHANG, Y. Q. et al. Spatio-temporal effects of canopy microclimate on fruit yield and quality of *Sapindus mukorossi* Gaertn. **Scientia Horticulturae**, v. 251, p. 136-149, 2019.

ZHANG, Z. et al. Trade-off between seed defensive traits and impacts on interaction patterns between seeds and rodents in forest ecosystems. **Plant Ecology**, v. 217, n. 3, p. 253-265, 2016.

**CAPÍTULO II:** Árvores frutíferas funcionais da Floresta Atlântica: composição química de castanhas, solo e folha e o poder antioxidante de castanhas de *Lecythis pisonis* Cambess. e *Lecythis lanceolata* Poir.

## RESUMO

As espécies *Lecythis pisonis* Cambess. e *Lecythis lanceolata* Poir. (Lecythidaceae), são árvores nativas da Floresta Atlântica, com grande capacidade na produção de castanhas. Objetiva-se compreender as relações nutricionais entre castanhas, solo e folha e a composição química e antioxidante de castanhas das espécies *L. pisonis* e *L. lanceolata*, visando apresentar duas novas espécies com capacidade produtiva de alimento funcional. Inicialmente foi feita a análise de micronutrientes e macronutrientes em castanhas, folhas e solos (0-20 e 20-40 cm) e análises bioquímicas de fenólicos totais, antocianinas, flavonóis e potencial antioxidante 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) em amostras de tegumento e endosperma, constando de três triplicatas. Realizaram-se análises descritivas em box plot, teste de agrupamento de média Scott Knott, e correlação pelo método UPGMA para as análises nutricionais de castanhas e antioxidantes. E análise de componente principal (PCA), para os elementos nutricionais de castanha, solo em duas profundidades (0-20 e 20-40 cm) e folhas. As castanhas (endosperma) das espécies *L. pisonis* e *L. lanceolata* são ricas fontes de macronutrientes e micronutrientes, sendo o poder antioxidante das sementes mais elevado no tegumento, quando comparado ao endosperma. As matrizes *Lp1*, *Lp2*, *Lp3*, *Lp4* e *Lp6* de *L. pisonis* e *L11*, *L12*, *L14* e *L16* de *L. lanceolata* possuem concentrações adequadas de selênio, que permitem o consumo de uma castanha dia<sup>-1</sup>. Para *L. pisonis* o poder antioxidante (DPPHe) do endosperma (parte comestível) está relacionado principalmente com os conteúdos de fenólicos totais do endosperma (FTe). Para *L. lanceolata* o poder antioxidante do tegumento (DPPHt) aumenta em função da presença de taninos condensados no tegumento TCt.

**Palavras-chave:** sapucaia, sapucaia-mirim, selênio, alimento funcional, mercado de castanhas.

## ABSTRACT

The species *Lecythis pisonis* Cambess. and *Lecythis lanceolata* Poir. (Lecythydaceae), are trees native to the Atlantic Forest, with great capacity in the production of chestnuts. The objective is to understand the nutritional relationships between nuts, soil and leaves and the chemical and antioxidant composition of nuts of the species *L. pisonis* and *L. lanceolata*, aiming to present two new species with productive capacity of functional food. Initially, the analysis of micronutrients and macronutrients in chestnuts, leaves and soil (0-20 and 20-40 cm) and biochemical analyzes of total phenolics, anthocyanins, flavonols and antioxidant potential 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) in tegument and endosperm samples, consisting of three triplicates. Descriptive analyzes were performed in box plot, Scott Knott average cluster test, and correlation by the UPGMA method for the nutritional analysis of nuts and antioxidants. Moreover, principal component analysis (PCA), for the nutritional elements of chestnut, soil at two depths (0-20 and 20-40 cm) and leaves. Chestnuts (endosperm) of the species *L. pisonis* and *L. lanceolata* are rich sources of macronutrients and micronutrients, with the antioxidant power of the seeds being higher in the tegument when compared to the endosperm. The matrices *Lp1*, *Lp2*, *Lp3*, *Lp4* and *Lp6* of *L. pisonis* and *Ll1*, *Ll2*, *Ll4*, *Ll6* of *L. lanceolata* have adequate concentrations of selenium that allow the consumption of a chestnut day<sup>-1</sup>. For *L. pisonis* the antioxidant power (DPPHe) of the endosperm (edible part) is mainly related to the contents of total phenolics of the endosperm (FTe). For *L. lanceolata* the antioxidant power of the integument (DPPHt) increases due to the presence of condensed tannins on the tegument (TCt).

**Keywords:** sapucaia, sapucaia-mirim, selenium, functional food, chestnut market.

## 1. INTRODUÇÃO

As Florestas Atlântica e Amazônica abrigam espécies arbóreas nativas com grande capacidade produtiva de recursos não madeireiros, os quais são fontes de renda e subsistência para milhares de famílias (RIBEIRO et al., 2014). Os seus recursos podem ser utilizados *in natura* ou em forma de derivados como sucos, corantes, especiarias, aromas, bebidas, doces, óleos e chás, visando principalmente, a capacidade antioxidante destes alimentos (OLIVEIRA et al., 2012). Dentre estas, podemos citar a família Lecythidaceae, que inclui espécies com grande capacidade na produção de castanhas, as quais são ricas fontes de nutrientes essenciais e compostos antioxidantes, a exemplo da *L. pisonis* e *Bertholletia excelsa* (DEMOLINER et al., 2018a, b; BRITO et al., 2019).

O selênio é um dos compostos antioxidantes presentes em castanhas, sendo recomendada a concentração fixa de  $55 \mu\text{g dia}^{-1}$ , contudo, é aceitável a ingestão máxima de  $400 \mu\text{g dia}^{-1}$ , sem causar nenhum sintoma de toxicidade ao organismo (MONSEN, 2000). Outro constituinte muito importante presente em algumas castanhas é a serotonina, a qual foi quantificada em altas concentrações em castanhas de *B. excelsa* ( $3,80 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e atua como neurotransmissor, regulando a respiração, sono, excitação, batimentos cardíacos e a sua desregulação pode causar crises epiléticas (YILMAZ et al., 2019; PETRUCCI et al., 2020).

Alimentos funcionais, os quais são ricos em compostos antioxidantes, atuam na inativação de espécies reativas de oxigênio (ERO), ao doar um elétron para a última camada da ERO, promovendo a sua estabilidade (JABEEN et al., 2018). Estes radicais podem ser produzidos naturalmente pelo organismo por meio de inflamações, processos biológicos ou externamente pela ingestão de alimentos, destacando-se o superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), hidroperoxila ( $\text{HO}_2^-$ ), hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), os quais atuam no rompimento de membranas celulares, ocasionando o aparecimento de doenças degenerativas, principalmente o câncer (GALADARI et al., 2017; JABEEN et al., 2018).

Objetiva-se compreender as relações nutricionais entre castanhas, solo e folha e a composição química e antioxidante de castanhas das espécies *L. pisonis* e *L. lanceolata*, visando apresentar duas novas espécies com capacidade produtiva de alimento funcional.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Georreferenciamento de matrizes

Foram utilizadas sementes de seis matrizes de *L. pisonis* (Lp) e seis de *L. lanceolata* (Ll), localizadas nos municípios de Laranja da Terra (matrizes: Lp1 e Lp2), Cachoeiro do Itapemirim (matrizes: Lp3; Lp4 e Lp5), Alegre (matriz: Lp6) e Mimoso do Sul (matrizes: Ll1; Ll2; Ll3; Ll4; Ll5 e Ll6), Espírito Santo, Brasil.

### 2.2 Status nutricional

#### 2.2.1 Castanha e folha

Foram realizadas análises nutricionais de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (Fe, Zn, Cu, Mn) em castanhas e folhas de *L. pisonis* e *L. lanceolata* (SILVA, 2009), utilizando-se a digestão nítrico-perclórica com 0,50 g de amostra, acarretando na formação de um extrato concentrado. Já o Se foi analisado em Fluorímetro segundo Olson et al. (1975).

Para a leitura do fósforo (P), parte deste extrato foi diluída em água destilada, acrescentando-se solução tampão 725 e ácido ascórbico 2%, realizando-se a leitura em espectrofotômetro (725 nm). O enxofre (S) foi lido em espectrofotômetro (420 nm) por meio da diluição do extrato, mais solução tampão (estoque de Buffer) e reagente de trabalho (cloreto de bário + goma arábica). A leitura do K ocorreu em fotômetro de chama fazendo-se a diluição do extrato em água destilada. Para análise do cálcio (Ca) e magnésio (Mg) o extrato foi diluído em água destilada e em solução de cloreto de estrôncio, fazendo-se a leitura em espectrofotômetro de absorção atômica. A leitura do cobre (Cu), manganês (Mn) e zinco (Zn) foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica diretamente no extrato.

Para análise do nitrogênio utilizou-se 0,1 g de tecido vegetal realizando-se a digestão sulfúrica, sendo utilizado 1 mL deste extrato, o qual foi diluído em água destilada, tartarato de sódio 10% e reagente de Nessler (2,5 mL), sendo a leitura realizada através do espectrofotômetro (480 nm).

### 2.1.2 Nutrientes disponíveis do solo

Foram coletadas três amostras de solos de cada localidade das matrizes estudadas nas profundidades de 0-20 e 20-40 cm, sendo o material homogeneizado, seco em ambiente ventilado e peneirado em peneira de 10 mesh, com posterior análise química segundo Teixeira et al. (2017).

Inicialmente o pH foi aferido em água, medindo-se 30 cm<sup>3</sup> de amostra com posterior medição em potenciômetro. Para a realização do teor de carbono no solo o material foi misturado em solução de dicromato de potássio, seguido por um repouso em placa aquecedora. Após o resfriamento adicionou-se água destilada, ácido fosfórico e o indicador difenilamina, titulando em sulfato ferroso amoniacal.

Para a análise de Al trocável foram utilizados 10 cm<sup>3</sup> de solo, com posterior adição de KCl 1 mol L<sup>-1</sup>, agitando-se com posterior repouso de 16 horas. Em parte do extrato foi acrescentado cloreto de estrôncio e indicador azul de bromotimol 1%, titulando em hidróxido de sódio (NaOH) 0,025 mol L<sup>-1</sup>. Para a realização de H+Al mediu-se 5 cm<sup>3</sup> de solo, com posterior adição de acetato de cálcio 0,5 mol L<sup>-1</sup> a pH 7,0 agitando-se e seguido de repouso de 16 horas. Em parte do extrato foi colocado gotas de fenolftaleína e hidróxido de sódio, com posterior titulação em NaOH 0,025 mol L<sup>-1</sup>.

Para Ca e Mg foram utilizados 10 cm<sup>3</sup> de solo, adicionando-se KCl 1 mol L<sup>-1</sup>, sendo mantidos sob agitação, seguido de repouso durante 16 h. Posteriormente foi adicionado em parte do extrato cloreto de estrôncio, seguido pela leitura em espectrofotômetro de absorção atômica.

Pesou-se 10 cm<sup>3</sup> de cada amostra separadamente, adicionando-se solução extratora de Mehlich, agitando-se. Em seguida realizou-se a leitura de Na e K em espectrofotômetro de emissão em chama. Para a leitura do P o extrato ficou em repouso durante ±16 horas, utilizando parte do sobrenadante mais reagente de trabalho (solução 725 + ácido ascórbico diluídos em água destilada), sendo a leitura realizada em fotocolorímetro (725 nm). E para a análise do N do solo, utilizaram-se extrato diluído em H<sub>2</sub>O destilada mais tartarato 10% e reagente de Nessler. Os micronutrientes Zn, Fe, Mn e Cu foram analisados diretamente do extrato, em espectrofotômetro de absorção atômica.

## 2.3 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas em tegumento e endosperma triturados de sementes de *L. pisonis* e *L. lanceolata*, triturados em moinho e peneirados, utilizando-se o material que passou pela peneira de 60 mesh.

### 2.3.1 Fenólicos totais

Para a determinação do teor de fenólicos totais foi adaptado o método espectrofotômetro de Folin Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999), pesando-se 0,25 g de cada amostra em tubos de ensaio, adicionando-se 5 mL de solução extratora de ácido clorídrico (HCl) 2 N. As amostras foram mantidas em banho-maria a 95 °C por 30 min, com posterior resfriamento e filtração. Em seguida foram pipetados 50 µL do filtrado (extrato), mantidos em tubos de ensaio, adicionando-se 2,5 mL de Folin-Ciocalteu 1:10 (v v<sup>-1</sup>). Após 5 min foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4% (m v<sup>-1</sup>), mantendo-se as soluções em câmara escura por um período de 2 horas. O conteúdo de fenólicos totais foi quantificado no comprimento de ondas de 760 nm, em triplicata e a curva de calibração utilizada foi  $\hat{Y} = 0,04193 + 0,76973x$  (R = 0,99), sendo o conteúdo expresso em mg 100 g<sup>-1</sup> de amostra.

### 2.3.2 Antocianinas e flavonóis

Para a determinação de antocianinas e flavonóis utilizou-se a metodologia proposta por Lees e Francis (1972), pesando-se 0,150 g de amostra em tubos de ensaio, seguido pela adição de 4 mL da solução extratora etanol 96% em HCl 1,5 mol L<sup>-1</sup> (85:15). As amostras foram homogeneizadas e deixadas em repouso durante um período de 24 horas em câmara escura, com posterior filtração para análise em espectrofotômetro no comprimento de ondas de 535 nm (antocianina) e 374 nm (flavonóis). Para a quantificação do teor de antocianina utilizou-se a equação TA (mg 100 g<sup>-1</sup>) = (abs\*V\*10<sup>5</sup>)/982\*L\*m e para a quantificação do teor de flavonóis, a equação TF (mg 100g<sup>-1</sup>) = (abs\*V\*10<sup>5</sup>)/766\*L\*m. Sendo, abs = absorbância obtida pelos comprimentos de ondas; V = o volume da solução extratora utilizada em mL; L = caminho óptico (1 cm) e m = a massa da amostra em (g), sendo o resultado final expresso em mg 100 g<sup>-1</sup> de amostra.

### 2.3.3 Taninos condensados

Foi pesado 1 g da amostra em tubos de ensaio, adicionando-se como solução extratora 30 mL de metanol:água (8:2), deixando-se em repouso em câmara escura por 24 horas. Posteriormente, as soluções foram filtradas e levadas a banho-maria a 40 °C por 60 minutos, visando à evaporação do metanol. Do extrato bruto foi retirada uma alíquota de 1 mL, diluindo-a em água destilada até o volume de 25 mL. Foram pipetados em triplicata 2 mL do extrato, diluído em tubos de ensaio + 4 mL de uma solução de vanilina em ácido sulfúrico 70% na concentração de 10 g L<sup>-1</sup>, mantendo-se as amostras em banho-maria a 50 °C por 15 min. A leitura da absorbância foi realizada em um comprimento de ondas de 500 nm e o conteúdo de taninos condensados foi expresso pela equação  $T \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = (\text{abs} + 0,06917) / 0,01346 / 25 * m$  (R = 0,99), utilizando-se a água destilada como branco e a curva de calibração preparada com catequina (2; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 µg mL<sup>-1</sup>) seguindo a metodologia de Hagerman (2006).

### 2.3.4 Poder antioxidante pelo método DPPH

Analisou-se a capacidade antioxidante do tegumento e endosperma de castanhas pelo método de captura do radical livre DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil), adaptado de Nascimento et al. (2011). Inicialmente foi feito um extrato etanólico pesando-se 0,187 g da amostra, para um volume final de 10 mL em balão volumétrico, homogeneizando-se durante 10 min, para posterior filtragem. Utilizou-se 1 mL do filtrado para uma segunda diluição até completar o volume de 10 mL em balão volumétrico.

Foi preparado um controle constituído por um branco (3 mL de etanol) e 3 triplicatas (1 mL de etanol + 2 mL de DPPH a 150 µM) e os tratamentos constaram de um branco (1 mL de filtrado + 2 mL de etanol) e 3 triplicatas (1 mL de filtrado + 2 mL de DPPH a 150 µM). Os tubos foram armazenados por 1 hora em câmara escura e a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de ondas de 515 nm. O DPPH (%) foi obtido pela fórmula  $A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}} \times 100 / A_{\text{controle}}$ . sendo A = absorbância.

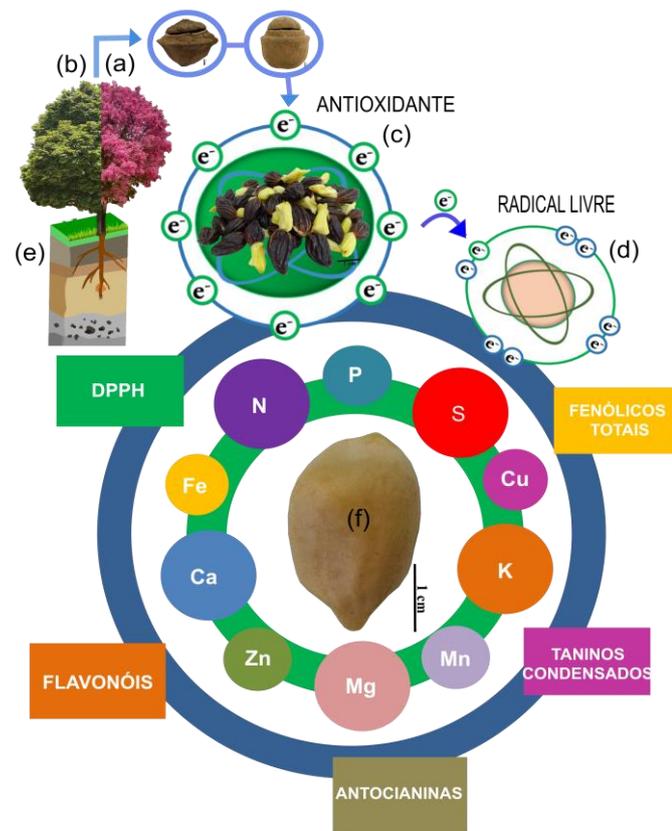
## 2. 4 Análise estatística

O delineamento utilizado para todas as análises foi o inteiramente casualizado (DIC), e as médias foram analisadas pelo teste de agrupamento Scott Knott ( $p > 0,05$ ). Também se aplicou box plot e correlação pelo método UPGMA para as análises nutricionais de castanhas e antioxidantes. Foi feita a análise de componente principal (PCA), para os elementos nutricionais de castanha e solo em duas profundidades (0-20 e 20-40 cm) e folhas.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo com as espécies *L. pisonis* (Figura 1a) e *L. lanceolata* (Figura 1b) busca apresentá-las ao mercado de castanhas em função de suas características nutricionais e poder antioxidante. Após a absorção de nutrientes do solo (Figura 1e) estes são transportados até a parte aérea e drenos fortes (frutos e sementes), contribuindo para a produção de castanhas ricas em compostos antioxidantes, macronutrientes e micronutrientes (Figura 1c, f), conferindo a estas castanhas características funcionais. Os antioxidantes, atuam doando um elétron para a última camada da ERO, tornando os radicais livres estáveis e impedindo que estes lesionem as células do organismo (Figura c, d).

**Figura 1.** Árvore de *L. pisonis* (a) e *L. lanceolata* (b), potencial antioxidante das castanhas (c), radical livre recebendo um  $e^-$  na sua última camada (d), solo nas profundidades 0-20 e 20-40 cm (e), castanha sem tegumento evidenciando a presença de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S), micronutrientes (Fe, Zn, Cu, Mn e Se), fenólicos totais, antocianinas, flavonóis e taninos condensados em sua composição (f).



Fonte: a autora.

Para a espécie *L. pisonis*, o teor de nitrogênio (N) variou de 30474,49 (*Lp6*) a 37273,37  $\mu\text{g g}^{-1}$  (*Lp4*) e para *L. lanceolata* de 24492,53 (*Ll5*) a 29473,11  $\mu\text{g g}^{-1}$  (*Ll4*) (Figura 2a, k). O nitrogênio está envolvido na síntese de proteínas e aminoácidos (glutamina, prolina e arginina) em sementes (ZUO et al., 2016), sendo muito encontrado em castanha-de-sapucaia (19,86 g 100  $\text{g}^{-1}$ ) (VALLILO et al., 1998), castanha do Brasil (15,52 g 100  $\text{g}^{-1}$ ), castanha-de-caju (18,4 g 100  $\text{g}^{-1}$ ), amendoim (25,2 g 100  $\text{g}^{-1}$ ), pistache (15,2 g 100  $\text{g}^{-1}$ ), amêndoas (20,8 g 100  $\text{g}^{-1}$ ), nozes (14,1 g 100  $\text{g}^{-1}$ ) e macadâmia (8,7 g 100  $\text{g}^{-1}$ ) (CARDOSO et al., 2017).

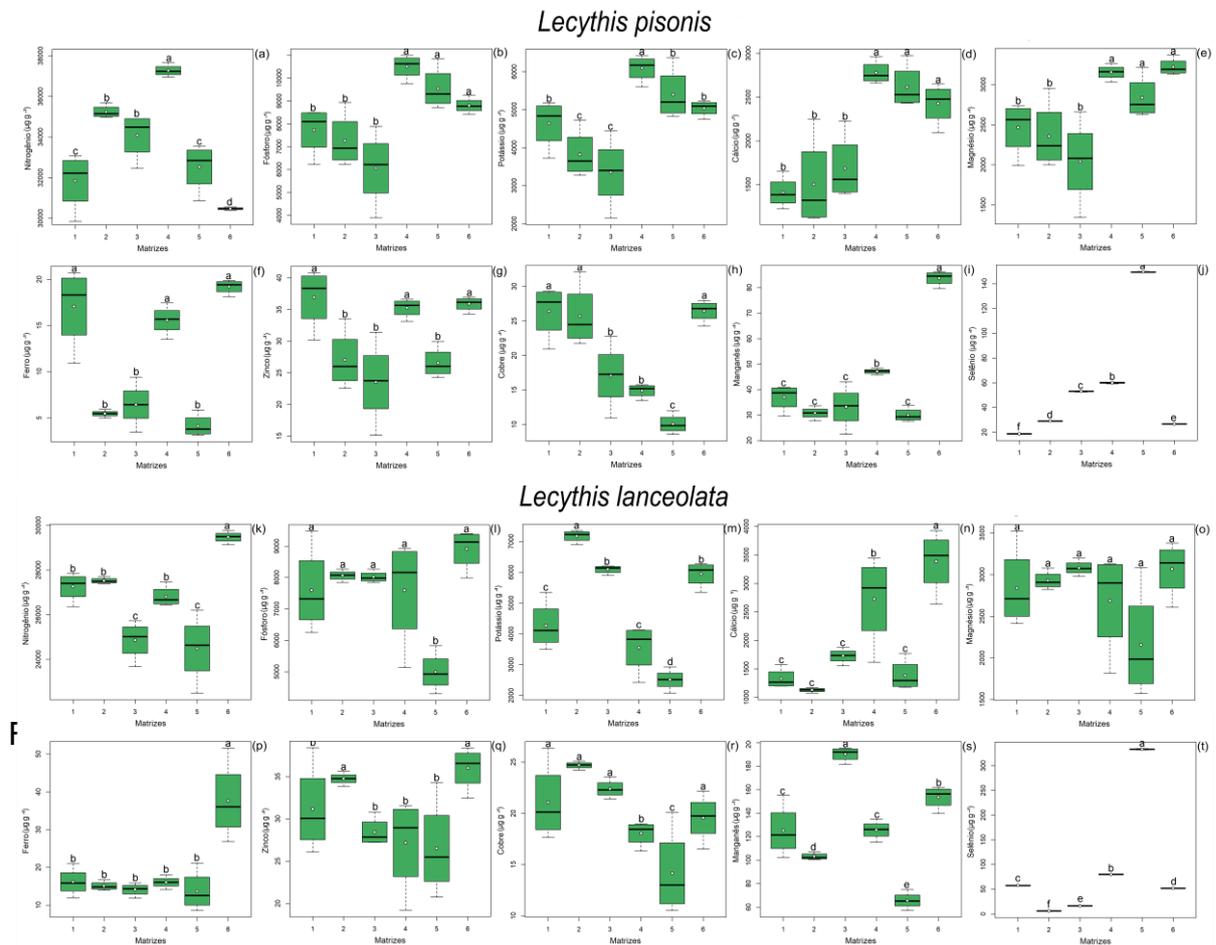
O teor de fósforo (P) variou de 6058,60 (*Lp3*) a 10503,97  $\mu\text{g g}^{-1}$  (*Lp4*) para *L. pisonis*, não apresentando diferença estatística entre matrizes que apresentaram os maiores teores (*Lp4*, *Lp5* e *Lp6*). Similarmente, em *L. lanceolata*, que apresentaram teores variando de 4995,78 (*Ll5*) a 8911,65  $\mu\text{g g}^{-1}$  (*Ll6*), não houve diferença estatística entre as matrizes com os maiores teores (*Ll1*, *Ll2*, *Ll3*, *Ll4* e *Ll6*) (Figura 2b, l). Segundo Monsen (2000), a dose recomendada de P é de 700  $\text{mg dia}^{-1}$  para homens

e mulheres de 19 a > 70 anos. Este nutriente está envolvido na manutenção de pH, produção de poder redutor na forma de fosfato inorgânico, componente estrutural de fosfolipídios de membranas celulares, nucleotídeos e ácidos nucleicos; participa de processos de fosforilação e ativação de enzimas e, a sua deficiência pode ocasionar anemia, anorexia, infecções e fraqueza muscular (COMBET; BUCKTON, 2019). O teor de potássio (K) variou de 3350 (*Lp3*) a 6091,67  $\mu\text{g g}^{-1}$  (*Lp4*) para *L. pisonis* e 2508,33 (*L15*) a 7175  $\mu\text{g g}^{-1}$  (*L12*) para *L. lanceolata* (Figura 2c, m) e sua ingestão recomendada para humanos é de 3500  $\text{mg dia}^{-1}$  (ESTEVE-LLORENS et al., 2019), estando envolvido na regulação da pressão osmótica, processos cardiovasculares, respiratórios, digestivos, endócrinos e divisão celular (COMBET; BUCKTON, 2019).

O teor de cálcio (Ca) variou de 1410,44 (*Lp1*) a 2780,33  $\mu\text{g g}^{-1}$  (*Lp4*) para *L. pisonis*, não apresentando diferença estatística entre as matrizes que apresentaram os maiores teores (*Lp4*, *Lp5* e *Lp6*), enquanto para *L. lanceolata* a variação foi de 1129,33 (*L12*) a 3386,67  $\mu\text{g g}^{-1}$  (*L16*) (Figura 2d, n). Seu consumo indicado é de 1000  $\text{mg dia}^{-1}$  para homens e mulheres de idade entre 19 e 50 anos (MONSEN, 2000). O  $\text{Ca}^{2+}$  lisossômico está envolvido no bom funcionamento da autofagia celular e a sua instabilidade alterada pode promover defeitos durante a formação de proteínas, sendo que problemas na autofagia e produção de  $\text{Ca}^{2+}$  lisossômico estão associados a alguns tipos de doenças (LIU; LIEBERMAN, 2019).

O teor de magnésio (Mg) variou de 2041,33 (*Lp3*) a 3219,50  $\mu\text{g g}^{-1}$  (*Lp6*) para *L. pisonis*, não apresentando diferença estatística entre as matrizes que apresentaram os maiores teores (*Lp4*, *Lp5* e *Lp6*). Similarmente, para *L. lanceolata* não houve diferença significativa entre as matrizes estudadas, cujo teor variou de 2157,50 (*L15*) a 3080,67  $\mu\text{g g}^{-1}$  (*L13*) (Figura 2e, o). Seu consumo indicado é 400  $\text{mg dia}^{-1}$  para homens e 310  $\text{mg dia}^{-1}$  para mulheres com idade variando de 19 a 30 anos. De 31 a 70 anos indica-se 420 e 320  $\text{mg dia}^{-1}$  para homens e mulheres, respectivamente (MONSEN, 2000). O Mg atua em processos enzimáticos fundamentais para o organismo, estando envolvido no desenvolvimento do tecido esquelético e no transporte de células associadas ao sistema nervoso e muscular (COMBET; BUCKTON, 2019).

**Figura 2.** Box plot das concentrações de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (Fe, Zn, Cu, Mn e Se) presentes em castanhas das matrizes de *L. pisonis* (a-j) e *L. lanceolata* (k-t).



O teor de ferro (Fe) variou de 4,13 (*Lp5*) a 19,22  $\mu\text{g g}^{-1}$  (*Lp6*) para *L. pisonis*, não apresentando diferença estatística entre as matrizes que apresentaram os maiores teores (*Lp1*, *Lp4* e *Lp6*). Já para *L. lanceolata* a variação foi de 14,09 (*Ll3*) ao maior teor de 37,63  $\mu\text{g g}^{-1}$  (*Ll6*) (Figura 2f, p). Seu consumo indicado é de 10 mg dia<sup>-1</sup> para homens (19 a 51 anos) e para mulheres 15 mg dia<sup>-1</sup> (11 a 50 anos) e acima de 50 anos 10 mg dia<sup>-1</sup> (MONSEN, 2000). Deficiência de Fe no organismo humano pode acarretar o aparecimento de anemia, baixo desempenho e problemas na captação de oxigênio, estando este envolvido em vários processos de sinalização celular, crescimento e expressão de genes (BOONE et al., 2019; MAGRÌ et al., 2019).

O teor de zinco (Zn) variou de 23,53 (*Lp3*) a 36,94  $\mu\text{g g}^{-1}$  (*Lp1*) para *L. pisonis*, não apresentando diferença estatística entre os maiores teores encontrados para as

matrizes *Lp1*, *Lp4* e *Lp6*, similarmente, as sementes das matrizes de *L. lanceolata* apresentaram valores variando de 26,51 (*L15*) a 35,99  $\mu\text{g g}^{-1}$  (*L16*), sem, contudo, haver diferença entre os maiores teores encontrados, que foram nas matrizes *L16* e *L12* (Figura 2g, q). O consumo de Zn indicado para consumo é 15  $\text{mg dia}^{-1}$  para homens e 12  $\text{mg dia}^{-1}$  para mulheres (MONSEN, 2000), devido à sua importante função no sistema imunológico, possui função neuroprotetora, se liga a proteínas importantes no combate de radicais livres e a sua deficiência está associada a doença degenerativas, a exemplo da esclerose múltipla (MEZZARROBA et al., 2019).

O teor de cobre (Cu) variou de 10,07 (*Lp5*) a 26,46  $\mu\text{g g}^{-1}$  (*Lp1*) para *L. pisonis*, não apresentando diferença estatística entre os maiores teores encontrados para as matrizes *Lp1*, *Lp2* e *Lp6*. E para a *L. lanceolata* a variação foi de 14,16 (*L15*) a 24,69  $\mu\text{g g}^{-1}$  (*L12*), não apresentando diferença estatística entre os maiores teores encontrados para as matrizes *L11*, *L12*, *L13* e *L16* (Figura 2 h, r). Segundo TRUMBO et al. (2001) a dose de Cu recomendada para homens e mulheres é de 900  $\mu\text{g dia}^{-1}$ . O transporte do cobre é importante para a síntese de enzimas e um bom funcionamento neural, pois atua na produção de neurotransmissores (KANTHLAL et al., 2016).

O teor de manganês (Mn) variou de 30,01 (*Lp5*) a 83,73  $\mu\text{g g}^{-1}$  (*Lp6*) para *L. pisonis* e 65,53 (*Lp5*) a 190,33  $\mu\text{g g}^{-1}$  (*Lp3*) para *L. lanceolata* (Figura 2i, s). A dose de Mn recomendada segundo Trumbo et al. (2001) é de 2300 e 1800  $\mu\text{g dia}^{-1}$  para homens e mulheres respectivamente. O Mn é responsável pelo bom funcionamento de alguns tipos de enzimas do organismo e a sua deficiência pode ocasionar um retardamento no crescimento de partes do corpo (cabelo e unhas), inflamação na pele e baixo peso (COMBET; BUCKTON, 2019).

Considerando o teor de selênio (Se), nas sementes de *L. pisonis* a variação foi de 18,67 (*Lp1*) a 149,55 (*Lp5*)  $\mu\text{g g}^{-1}$ , enquanto para *L. lanceolata* os valores oscilaram entre 5,73 (*L12*) a 333,27 (*L15*)  $\mu\text{g g}^{-1}$ , sendo que os maiores valores foram encontrados para a matriz 5 de ambas as espécies (Figura 2j, t). Seu consumo indicado é de 55  $\mu\text{g dia}^{-1}$  para homens e mulheres com idade variando de 19 a > 70 anos, podendo ter um consumo máximo de 400  $\mu\text{g dia}^{-1}$  (MONSEN, 2000). De acordo o teor de selênio encontrado multiplicado pela média da massa do endosperma (parte comestível) das sementes de cada matriz, para ambas as espécies, tem-se o valor em  $\mu\text{g Se castanha}^{-1}$  para a *L. pisonis* *Lp1* (66,83  $\mu\text{g}$ ), *Lp2* (134,35  $\mu\text{g}$ ), *Lp3* (221,26  $\mu\text{g}$ ), *Lp4* (191,68  $\mu\text{g}$ ), *Lp5* (649,05  $\mu\text{g}$ ) e *Lp6* (98,33  $\mu\text{g}$ ) e para *L. lanceolata* *L11* (190,99  $\mu\text{g}$ ), *L12* (21,14  $\mu\text{g}$ ),

*L3* (73,82  $\mu\text{g}$ ), *L4* (169,84  $\mu\text{g}$ ), *L5* (883,16  $\mu\text{g}$ ) e *L6* (172,21  $\mu\text{g}$ ) (dados não mostrados). Levando em consideração a faixa do valor de referência de ingestão mínima e máxima, todas as matrizes de *L. pisonis* podem ser indicadas para o consumo humano de uma castanha  $\text{dia}^{-1}$ , à exceção da *Lp5*, que ultrapassa o valor máximo, recomendando-se meia castanha  $\text{dia}^{-1}$ . Para *L. lanceolata*, também se recomenda a ingestão de uma castanha  $\text{dia}^{-1}$  para todas as matrizes, à exceção da *L2*, que possui valores inferiores, necessitando de pelo menos três castanhas  $\text{dia}^{-1}$ , enquanto a *L5*, que possui concentrações superiores, sugere-se a ingestão de 1/3 de uma castanha  $\text{dia}^{-1}$ , para equivaler aos valores aceitáveis (55 a 400  $\mu\text{g g}^{-1}$ ).

Em estudos com quatro matrizes de *L. pisonis* localizadas nos estados do Piau e Minas Gerais, Demoliner et al. (2018a) encontraram concentrações de selênio variando de 26,4 e 46,9  $\mu\text{g g}^{-1}$ , resultados bem inferiores aos encontrados no presente estudo, tendo uma diferença de 149,55  $\mu\text{g g}^{-1}$  para *L. pisonis* e 286,37  $\mu\text{g g}^{-1}$  para *L. lanceolata*, quando comparado as matrizes com maior teor de Se. Em amostras do estado do Pará, Brito et al. (2019) encontraram concentrações de Se variando de 1,2 a 151  $\mu\text{g g}^{-1}$  e para 71 matrizes de castanha do Brasil distribuídas nas regiões do Acre, Mato Grosso, Roraima, Amapá e Amazonas, os teores de Se encontrados variaram de < 0,5 a 146,6  $\mu\text{g g}^{-1}$ , sendo observado que a concentração deste composto na castanha pode ser influenciada pelo pH do solo, geologia e hidrologia (SILVA JUNIOR et al., 2017; STATWICK; SHER, 2017).

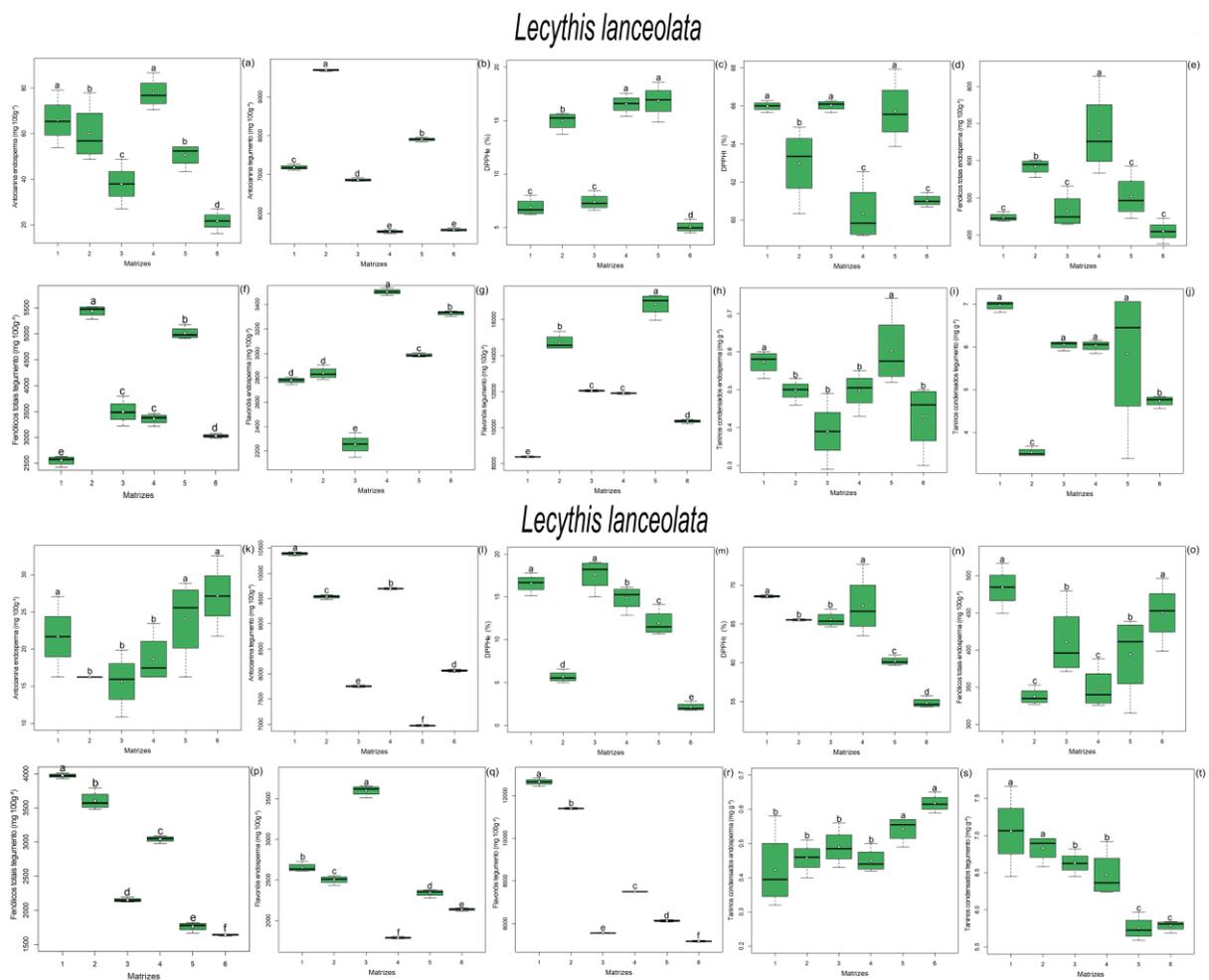
Os maiores teores de antocianina foram encontrados para *L. pisonis* no endosperma da *Lp1* e *Lp4*, com média de 71,79  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  e no tegumento da *Lp2* (9691,24  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) (Figura 3a, b), enquanto em sementes de *L. lanceolata* os maiores valores foram encontrados no endosperma da *L1*, *L5* e *L6*, com média de 24,28  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  e no tegumento da *L1* (10393,30  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) (Figura 3k, l). As antocianinas são pigmentos do grupo dos flavonoides envolvidas na coloração de plantas, frutos, sementes e flores. Podem ser encontradas em muitas frutas, a exemplo da *Plinia trunciflora* (MANNINO et al., 2020) e *Prunus avium* (LIANG et al., 2020).

Antocianinas atuam como compostos antioxidantes no combate de radicais livres, sendo comprovado, por exemplo, que idosos tiveram melhoras cognitivas quando tratados com ingestão de mistilo (KRIKORIAN et al., 2020). A ingestão de

suco de cranberry contribuiu para a redução de triglicérides, pressão arterial e glicemia em idosos (NOVOTNY et al., 2015).

No presente estudo foi encontrado um menor DPPH no endosperma de castanhas, quando comparado ao tegumento, sendo que as maiores porcentagens de DPPH para *L. pisonis*, foram encontradas no endosperma da *Lp4* e *Lp5*, e no tegumento da *Lp1*, *Lp3* e *Lp5* (Figura 3c, d). E para *L. lanceolata* no endosperma da *L1* e *L3* e no tegumento da *L1* e *L4* (Figura 3m, n). Resultados semelhantes foram encontrados por Demoliner et al. (2018b) para *L. pisonis*, que apresentaram uma maior atividade antioxidante no tegumento, quando comparado ao endosperma.

**Figura 3.** Box plot com as características dos compostos antioxidantes presentes em castanhas de *L. pisonis* (a-j) e *L. lanceolata* (k-t). DPPHe. 2,2-difenil-1-picril-hidrazil no endosperma, DPPHt. 2,2-difenil-1-picril-hidrazil no tegumento.



Fonte: a autora

Os maiores teores de fenólicos totais foram encontrados para *L. pisonis* no endosperma da *Lp4* (674,19 mg 100 g<sup>-1</sup>) e no tegumento da *Lp2* (5439,93 mg 100 g<sup>-1</sup>) (Figura 3e, f). E para *L. lanceolata* no endosperma da *Ll1* e *Ll6*, com média de 466,72 mg 100 g<sup>-1</sup> e no tegumento da *Ll1* (3972,51 mg 100 g<sup>-1</sup>) (Figura 3o, p). Em estudos com *L. pisonis* o maior teor de fenólicos totais encontrado foi de 4134 mg 100 g<sup>-1</sup> para o endosperma e 37764 mg 100 g<sup>-1</sup> para o tegumento, sendo identificado 14 e 22 compostos fenólicos, respectivamente (DEMOLINER et al., 2018b). Também foram encontrados os seguintes valores para castanha do Brasil (169,2 mg 100 g<sup>-1</sup>), castanha-de-caju (316,4 mg 100 g<sup>-1</sup>), avelã (314,8 mg 100 g<sup>-1</sup>), macadâmia (497,8 mg 100 g<sup>-1</sup>), amendoim (645,9 mg 100 g<sup>-1</sup>), noqueira-pecã (1463,9 mg 100 g<sup>-1</sup>), pinhão (152,9 mg 100 g<sup>-1</sup>), pistache (571,8 mg 100 g<sup>-1</sup>) e nozes (1580,5 mg 100 g<sup>-1</sup>) (YANG, 2009).

Os maiores teores de flavonóis (subclasse dos flavonoides) foram encontrados para *L. pisonis* no endosperma da *Lp4* (3505,23 mg 100 g<sup>-1</sup>) e no tegumento da *Lp5* (16862,49 mg 100 g<sup>-1</sup>) (Figura 3g, h). E para *L. lanceolata* no endosperma da *Ll3* (3599,65 mg 100 g<sup>-1</sup>) e no tegumento da *Ll1* (12637,08 mg 100 g<sup>-1</sup>) (Figura 3q, r). Foram quantificados os seguintes teores de flavonoides para castanha do Brasil (107,8 mg 100 g<sup>-1</sup>), castanha-de-caju (63,7 mg 100 g<sup>-1</sup>), avelã (113,7 mg 100 g<sup>-1</sup>), macadâmia (137,9 mg 100 g<sup>-1</sup>), amendoim (189,8 mg 100 g<sup>-1</sup>), noqueira-pecã (704,7 mg 100 g<sup>-1</sup>), pinhão (45,00 mg 100 g<sup>-1</sup>), pistache (143,3 mg 100 g<sup>-1</sup>) e nozes (744,8 mg 100 g<sup>-1</sup>) (YANG, 2009). A catequina é o flavonoide mais encontrado em casca de sementes de *L. pisonis* segundo Demoliner et al. (2018b) e atuam como fortes antioxidantes capturando espécies reativas de oxigênio, podendo ter propriedades quelantes sobre íons metálicos, os quais atuariam na produção de espécies reativas de oxigênio (BERNATONIENE; KOPUSTINSKIENE, 2018).

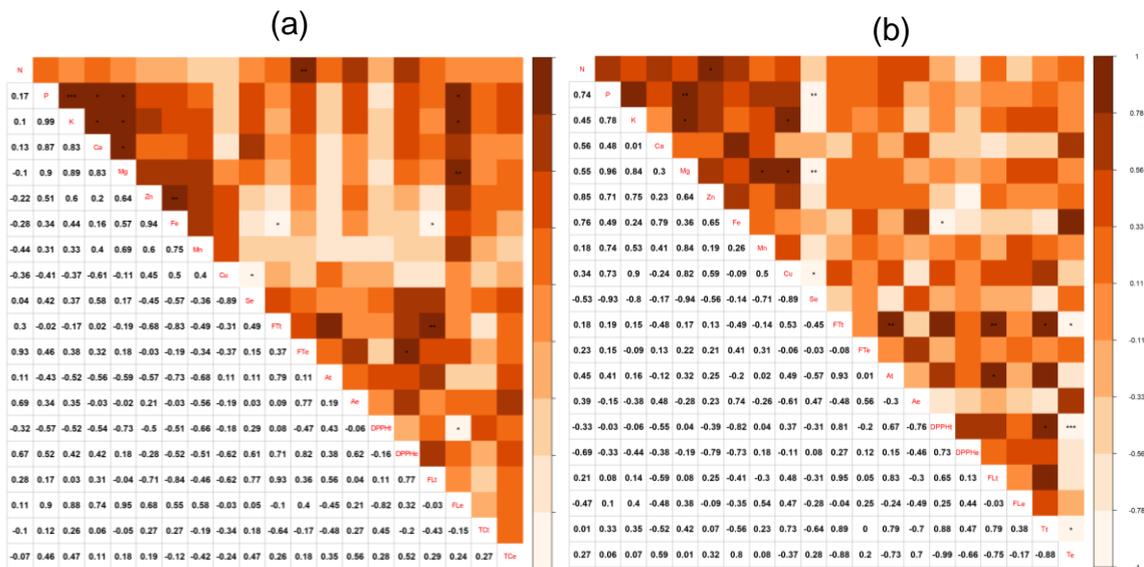
Os maiores teores de taninos condensados foram encontrados para *L. pisonis* no endosperma da *Lp1* e *Lp5*, com média de 0,58 mg g<sup>-1</sup> e no tegumento da *Lp1*, *Lp3*, *Lp4* e *Lp5*, com média de 6,22 mg g<sup>-1</sup> (Figura 3i, j). E para *L. lanceolata* no endosperma da *Ll5* e *Ll6*, com média de 0,58 mg g<sup>-1</sup> e no tegumento da *Ll1* e *Ll2*, com média de 6,84 mg g<sup>-1</sup> (Figura 3s, t). Em estudos com *L. pisonis*, Demoliner et al. (2018b) encontraram altos teores de taninos condensados no tegumento de sementes (123,81 mg g<sup>-1</sup>), não sendo identificado taninos no endosperma, cujo valor foi superior ao encontrado nos tegumentos das sementes em estudo. Os taninos são metabólitos

secundários, podendo atuar como agente de defesa em plantas contra predadores, como observado por Zhang et al. (2013) em estudos com roedores, que tiveram uma maior preferência em se alimentar de sementes com baixo teor de tanino. Também possuem efeitos antioxidantes, como observado em testes com sementes de cevada, cujas cultivares com maiores teores de taninos condensados e fenólicos totais apresentaram um maior poder antioxidante e proteção contra danos ao DNA (SALAR et al., 2017).

Para *L. pisonis*, o poder antioxidante do endosperma (parte comestível) (DPPHe) esta relacionado principalmente com os conteúdos de FTe. Também foram observadas alta correlações positivas entre (P com K, Ca, Mg e FLe), (K com Ca, Mg e FLe), (Mg com Ca e FLe), (Zn com Fe), (FTt com FLt), e (N com FTe) (Figura 4a).

Para *L. lanceolata* o FTt possui uma alta correlação positiva com a presença de At, FLt e TCt, sendo que o poder antioxidante do tegumento (DPPHt) aumenta em função da presença de TCt. Outras correlações positivas encontradas foram (N com Zn), (Mg com P, K, Cu e Mn), (K com Cu), (At com FLt) (Figura 4b). O Se é um dos antioxidantes mais importantes presentes na composição das castanhas, apresentando correlação negativa com o Cu para *L. pisonis* (Figura 4a) e com o P, Mg e Cu para *L. lanceolata* (Figura 4b).

**Figura 4.** Correlação de características química para macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (Fe, Zn, Cu, Mn e Se), fenólicos totais (FT, mg 100 g<sup>-1</sup>), antocianinas (A, mg 100 g<sup>-1</sup>), flavonóis (FL, mg 100 g<sup>-1</sup>) e taninos condensados (TC, mg g<sup>-1</sup>) em tegumento (t) e endosperma (e) de castanhas de *L. pisonis* (a) e *L. lanceolata* (b). Legenda: significativo em nível de \*5%, \*\*1% e \*\*\*0,1%.



Fonte: a autora.

O poder antioxidante do tegumento de castanhas de *L. pisonis* foi associado à presença de compostos fenólicos (DEMOLINER et al., 2018b). Contudo, esta também é rica em taninos, composto característico pela sua coloração amarronzada (ROBIL; TOLENTINO, 2015), sendo esta a coloração marcante do tegumento das castanhas de ambas as espécies, e este possui alta correlação com o poder antioxidante do tegumento, como observado no presente estudo para a *L. lanceolata*, enquanto o poder antioxidante do endosperma foi correlacionado positivamente com os fenólicos totais. Em estudos com *B. excelsa*, John e Shahidi (2010) encontraram maiores concentrações de compostos fenólicos na película marrom que cobre a castanha ( $1236,07 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ), enquanto na noz inteira a concentração foi de  $519,11 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ . Em *Garcinia mangostana*, a casca também possui as maiores concentrações de compostos fenólicos quando comparado a parte comestível (NACZK et al., 2011).

Observa-se também uma maior associação positiva entre o Fe e Zn presentes em castanhas de *L. pisonis*. Em estudos com castanha-de-caju, Xavier et al. (2019) observaram que estes nutrientes se associam a proteínas e que apenas 1/3 será absorvido durante a digestão nos seres humanos. Em análise com diferentes tipos de vegetais, observou-se também que o fósforo não estava presente em tecidos que possuíam Fe e Zn com alto peso molecular (DELL'AQUILA; NEAL; SHEWRY, 2020).

No endosperma de castanhas de *L. pisonis*, o teor de FT foi correlacionado positivamente com as concentrações de nitrogênio presentes no endosperma. O teor

de nitrogênio se correlaciona positivamente (0,99) com produção de proteínas em sementes (ALIAKBARKHANI et al., 2017). E estas podem se tornar mais solúveis e modificar a constituição de seus aminoácidos na presença de compostos fenólicos (YAN et al., 2020).

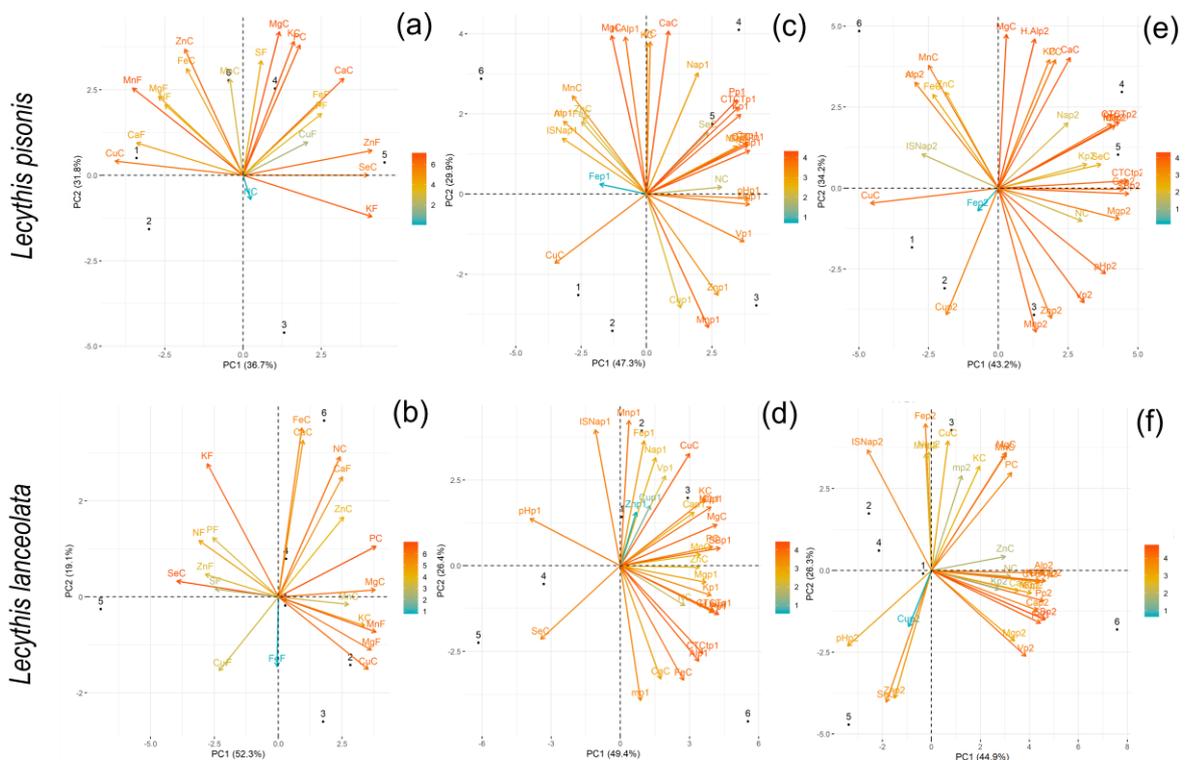
Sementes de café são ricas fontes de compostos antioxidantes, apresentando em seu pericarpo imaturo altas concentrações de taninos e compostos fenólicos e na semente madura a concentração de taninos decresce (PATAY et al., 2016). No presente estudo as concentrações de tanino foram maiores no tegumento, quando comparado ao endosperma das sementes, sugerindo que além de atuar como um antioxidante, também pode estar relacionado com a proteção das sementes no ambiente natural.

A PCA das concentrações de nutrientes presentes em castanhas e folhas para a espécie *L. pisonis* explicou 68,5% (PC1 + PC2) da variação, cujas características de maior contribuição foram o MgC, MnF, CaC, KF, KC, PC, ZnF, ZnC, CuC e SeC. A *Lp4* e *Lp6* estão próximas da maioria dos nutrientes e a *Lp5* esta mais próxima do Se, o qual possui uma forte associação com Zn e K da folha (Figura 5a). Para a *L. lanceolata* a PCA explicou 71,4% da variação (PC1 + PC2), cujas características de maior contribuição foram o SeC, PC, KF, MnF, CuC, MgF, MgC, NC, FeC, CaF, KC e CaC. A maior parte dos nutrientes presentes nas folhas e castanhas esta mais próxima das matrizes *L1*, *L2* e *L4*. Nota-se também uma forte associação entre o Se da castanha com os micronutrientes Zn e S da folha (Figura 5b).

Para a PCA das concentrações de nutrientes presentes em castanhas e solo na profundidade p1 (0-20 cm) em *L. pisonis*, observa-se que a PCA explicou 77,2% da variação (PC1 + PC2), sendo as variáveis que mais contribuíram o Pp1, MgC, CaC, CTCTp1, Kp1, SBp1, Mnp1, Cap1, H + Alp1, Mgp1, Vp1, pHp1, CuC, PC, KC, MnC e Znp1. A maior parte das características químicas do solo esta mais próxima da *Lp5*, estando o Se da castanha associado a elas com maior intensidade, principalmente com a CTCT, Pp1 e Kp1 (Figura 5c). E para *L. lanceolata*, pode-se observar que a PCA explicou 75,8% da variação (PC1 + PC2), sendo as características de maiores contribuições o Pp1, CuC, Alp1, SBp1, MgC, FeC, Cp1, Mop1, CTCTp1, H+Alp1, Mnp1, KC, pHp1, ISNap1, SeC, PC, mp1 e Kp1. A maior parte das variáveis esta localizada no lado direito da PCA, próximo as matrizes *L1*, *L2* e *L3*, os quais se

associam negativamente com o SeC, que esta mais próximo das matrizes *L1* e *L4* (Figura 5d).

**Figura 5.** Análise de componente principal (PCA) de acordo com características nutricionais de castanha e folha (a, b); castanha e solo na profundidade p1 (0-20 cm) (c, d) e castanha e solo na profundidade p2 (0-40 cm) (e, f) para matrizes (1, 2, 3, 4, 5 e 6) de *L. pisonis* (a, c, e) e *L. lanceolata* (b, d, f). N. Nitrogênio; P. Fósforo; K. Potássio; Ca. Cálcio; Mg. Magnésio; Fe. Ferro; Zn. Zinco, Cu. Cobre; Mn. Manganês, S. Enxofre; Se. Selênio; pH. Potencial hidrogeniônico em água; Al<sup>3+</sup>. Acidez trocável; H + Al. Acidez potêncial; C. Carbono; MO. Matéria orgânica; CTCt. Capacidade de troca catiônica efetiva; CTCT. Capacidade de troca catiônica; SB. Soma de bases trocáveis; V. Saturação por bases; ISNa. Índice de saturação por sódio para castanha (C), folha (F) e solo nas profundidades p1 (0-20) e p2 (20-40).



Fonte: a autora.

A PCA das concentrações de nutrientes presentes em castanha e solo na profundidade p2 (20-40 cm) para *L. pisonis* explicou 77,4% da variação (PC1 + PC2).

As características que mais contribuíram foram H + Alp2, CTCTp2, CaC, MgC, Vp2, SBp2, pHp2, Mnp2, CuC, Cp2, Mop2, MnC, Pp2, Cap2, PC, Znp2, Mgp2, Alp2, mp2, KC e Cup2. A maioria das características se encontra do lado direito superior da PCA, sendo este mais próximo das matrizes *Lp4* e *Lp5*. Observa-se também que o SeC possui uma alta associação positiva com o Kp2, CTCtp2, Cap2 e SBp2 (Figura 5e). E para a *L. lanceolata* pode-se observar que a PCA explicou 71,2% da variação (PC1 + PC2) dos dados, sendo as características de maior contribuição o SBp2, FeC, MgC, Pp2, CTCtp2, Vp2, MnC, Alp2, ISNap2, Cap2, Fep2, CTCTp2, PC, SeC, H+Alp2, Znp2, Cp2, Mop2 e pHp2. A maioria das características químicas do solo estão próximas da *L/6* e estes apresentam uma associação negativa com o ISNap2. O SeC esta mais próximo da *L/5* e apresenta associação positiva com o Znp2, Cup2 e pHp2 do solo (Figura 5f).

No presente estudo o Se presente nas castanhas apresentou uma associação negativa com o Cu do solo, na profundidade de 0-20 cm, enquanto na profundidade de 20-40 cm se associou positivamente. O teor de Se em castanha pode sofrer influência do pH do solo, condições geológicas e hidrológicas, sendo correlacionado positivamente com a argila e enxofre do solo nas profundidades de 0-20 e 20-40 (SILVA JUNIOR et al., 2017; STATWICK; SHER, 2017).

Em estudos com *Brassica napus* L. observou-se que o pH e o teor de enxofre e sulfato no solo estão relacionados com a absorção do Se pelas plantas, e que os conteúdos de enxofre e sulfato contribuem para um decréscimo do pH do solo (LIU et al., 2017). Em plantas com capacidade excessiva na acumulação de Se, observou-se uma maior afinidade dos transportadores pelo Se, quando comparado ao S (PILON-SMITS et al., 2009).

A absorção de nutrientes por árvores frutíferas e seu transporte até os drenos fortes (frutos e sementes) é um processo importante para a formação de alimentos ricos em compostos minerais e benéficos para o consumo humano (BARKER; STRATTON, 2020). Os nutrientes presentes nas plantas durante o período reprodutivo, variam em função do transporte para os drenos, como observado por Maity et al. (2017), que durante a formação de frutos de *Punica granatum* L. houve aumento dos nutrientes Ca, Mg, Mn e Cu, seguido pelo decréscimo do N, P, K, S, Fe e Zn nas folhas. Em cultivares de feijão observa-se que os micronutrientes Fe, Zn e Se reduziram na vagem durante o processo de maturação, indicando que estes foram

translocados para a semente e que os polifenóis presentes afetam a biodisponibilidade do Fe (FIGUEIREDO et al., 2017).

#### 4. CONCLUSÕES

As castanhas (endosperma) das espécies *L. pisonis* e *L. lanceolata* são ricas fontes de macronutrientes e micronutrientes.

As matrizes *Lp1*, *Lp2*, *Lp3*, *Lp4* e *Lp6* de *L. pisonis* e *L11*, *L12*, *L14*, *L16* de *L. lanceolata* apresentam concentrações adequadas de selênio que permitem o consumo humano de uma castanha dia<sup>-1</sup>.

O poder antioxidante das sementes é mais elevado no tegumento quando comparado ao endosperma.

Para *L. pisonis*, o poder antioxidante do endosperma (DPPHe) (parte comestível) está relacionado principalmente com os conteúdos de fenólicos totais do endosperma e, para *L. lanceolata*, o poder antioxidante do tegumento (DPPHt) aumenta em função da presença de taninos condensados no tegumento.

#### 5. REFERÊNCIAS

BARKER, A. V.; STRATTON, M. L. Nutrient density of fruit crops as a function of soil fertility. In: SRIVASTAVA, A. K.; CHENGXIAO, H. (Org.). **Fruit crops: Diagnosis and Management of Nutrient Constraints**. 1ed.Oxford: Elsevier, 2020, v. 1, p. 13-31.

BERNATONIENE, J.; KOPUSTINSKIENE, D. The role of catechins in cellular responses to oxidative stress. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 965, 2018.

BOONE, S. et al. Identificação e manejo da anemia ferropriva no pronto-socorro. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 57, n. 5, p, 637-645, 2019.

BRITO, R. C. M.; JUNIOR, J. B. P.; DANTAS, K. D. G. F. Quantification of inorganic constituents in Brazil nuts and their products by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **LWT**, v. 116, p. 108383, 2019.

CARDOSO, B. R. et al. Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects. **Food Research International**, v. 100, p. 9-18, 2017.

OMBET, E.; BUCKTON, C. Micronutrient deficiencies, vitamin pills and nutritional supplements. **Medicine**, v. 47, p. 145-151, 2019.

DELL'AQUILA, C.; NEAL, A. L.; SHEWRY, P. R. Development of a reproducible method of analysis of iron, zinc and phosphorus in vegetables digests by SEC-ICP-MS. **Food Chemistry**, v. 308, p. 125652, 2020.

DEMOLINER, F. et al. Sapucaia nut (*Lecythis pisonis* Cambess) and its by-products: A promising and underutilized source of bioactive compounds. Part I: Nutritional composition and lipid profile. **Food Research International**, v. 112, p. 434-442, 2018a.

DEMOLINER, F. et al. Sapucaia nut (*Lecythis pisonis* Cambess) and its by-products: A promising and underutilized source of bioactive compounds. Part II: Phenolic compounds profile. **Food Research International**, v. 112, p. 434-442, 2018b.

ESTEVE-LLORENS, X. et al. Towards an environmentally sustainable and healthy Atlantic dietary pattern: Life cycle carbon footprint and nutritional quality. **Science of the Total Environment**, v. 646, p. 704-715, 2019.

FIGUEIREDO, M. A. et al. Zinc and selenium accumulation and their effect on iron bioavailability in common bean seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 111, p. 193-202, 2017.

GALADARI, S. et al. Reactive oxygen species and cancer paradox: to promote or to suppress?. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 104, p. 144-164, 2017.

HAGERMAN, A. E. **Tannin Chemistry**. Disponível em: <<http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2020.

JABEEN, H. J. et al. Investigating the scavenging of reactive oxygen species by antioxidants via theoretical and experimental methods. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 180, p. 268-275, 2018.

JOHN, J. A.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 3, p. 196-209, 2010.

KANTHLAL, S. K. et al. Neural effects in copper deficient Menkes disease: ATP7A-a distinctive marker. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 6, n. 8, p. 668-672, 2016.

KRIKORIAN, R. et al. Cognitive performance in relation to urinary anthocyanins and their flavonoid-based products following blueberry supplementation in older adults at risk for dementia. **Journal of Functional Foods**, v. 64, p.103667, 2020.

LEES, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analyses in cranberries. **HortScience**, v. 7, n. 1, p. 83-84, 1972.

LIAKBARKHANI, S. T. et al. Variation of nutrients and antioxidant activity in seed and exocarp layer of some Persian pistachio genotypes. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 62, n. 1, p. 39-44, 2017.

LIANG, D. et al. PacCOP1 negatively regulates anthocyanin biosynthesis in sweet cherry (*Prunus avium* L.). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 203, p. 111779, 2020.

LIU, E. A.; LIEBERMAN A. P. The intersection of lysosomal and endoplasmic reticulum calcium with autophagy defects in lysosomal diseases. **Neuroscience Letters**, v. 697, p. 10-16, 2019.

LIU, X. et al. Effects of sulfur and sulfate on selenium uptake and quality of seeds in rapeseed (*Brassica napus* L.) treated with selenite and selenate. **Environmental and Experimental Botany**, v. 135, p. 13-20, 2017.

MAGRÌ, D. et al. Anemia and iron deficiency in heart failure: clinical and prognostic role. **Heart Failure Clinics**, v. 15, n. 3, p. 359-369, 2019.

MAITY, A. et al. Seasonality of nutrients vis-à-vis fruit quality of pomegranate cv. Bhagwa on vertisol. **Journal of Plant Nutrition**, v. 40, n. 9, p. 1351-1363, 2017.

MANNINO, G. et al. Phytochemical profile and antioxidative properties of *Plinia trunciflora* fruits: A new source of nutraceuticals. **Food Chemistry**, v. 307, p. 125515, 2020.

MEZZAROBA, L. et al. The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases. **Neurotoxicology**, v. 74, p. 230-241, 2019.

MONSEN, E. R. Dietary reference intakes for the antioxidant nutrients: vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 100, n. 6, p. 637, 2000.

NACZK, M. et al. Protein-binding and antioxidant potential of phenolics of mangosteen fruit (*Garcinia mangostana*). **Food Chemistry**, v. 128, n. 2, p. 292-298, 2011.

NASCIMENTO, J. C. et al. Antioxidant determination activity by DPPH method and assay for total flavonoids in leaves extracts of *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, p. 327-332, 2011.

NOMAN, A. et al. Deciphering physio-biochemical, yield, and nutritional quality attributes of water-stressed radish (*Raphanus sativus* L.) plants grown from Zn-Lys primed seeds. **Chemosphere**, v. 195, p. 175-189, 2018.

NOVOTNY, J. A. et al. Cranberry juice consumption lowers markers of cardiometabolic risk, including blood pressure and circulating C-reactive protein, triglyceride, and glucose concentrations in adults. **The Journal of Nutrition**, v. 145, n. 6, p. 1185-1193, 2015.

OLSON, O. E.; PALMER, I. S.; CARY, E. E. Modification of the official fluorimetric method for selenium in plants. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. v. 58, p. 117-1221, 1975.

PATAY, É. B. et al. Antioxidant potential, tannin and polyphenol contents of seed and pericarp of three Coffea species. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 4, p. 366-371, 2016.

PETRUCCI, A. et al. Serotonin and sudden unexpected death in epilepsy. **Experimental Neurology**, v. 325, p. 113145, 2020.

PILON-SMITS, E. A. et al. Physiological functions of beneficial elements. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 3, p. 267-274, 2009.

RIBEIRO, G. D. **Algumas espécies de plantas reunidas por famílias e suas propriedades**, Embrapa Rondônia, 2010. 179p.

ROBIL, J. L. M.; TOLENTINO, V. S. Histological localization of tannins at different developmental stages of vegetative and reproductive organs in *Medinilla magnifica* (Melastomataceae). Flora-Morphology, Distribution, **Functional Ecology of Plants**, v. 217, p. 82-89, 2015.

SALAR, R. K.; PUREWAL, S. S.; SANDHU, K. S. Relationships between DNA damage protection activity, total phenolic content, condensed tannin content and antioxidant potential among Indian barley cultivars. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 201-206, 2017.

SILVA JUNIOR, E. C. et al. Natural variation of selenium in Brazil nuts and soils from the Amazon region. **Chemosphere**, v. 188, p. 650-658, 2017.

SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2 ed. Embrapa Informação Tecnológica, Rio de Janeiro, Brasil. 2009. 627p.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

STATWICK, J.; SHER, A. A. Selenium in soils of western Colorado. **Journal of Arid Environments**, v. 137, p. 1-6, 2017.

TANG, C. H. Nanostructured soy proteins: Fabrication and applications as delivery systems for bioactives (a review). **Food Hydrocolloids**, v. 91, p. 92-116, 2019.

TEIXEIRA, P. C. et al. **Manual de métodos de análise de solo**. 3. ed. Revista e Ampliada, Brasília, DF:Embrapa, 2017. 574 p.

TRUMBO, P. et al. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 101. n. 3, p. 294-301, 2001.

VALLILO, M. I. et al. Caracterização química parcial das sementes de *Lecythis pisonis* Camb. (sapucaia). **Acta Amazônica**, v. 28, n. 2, p. 131-140, 1998.

XAVIER, A. D. S. et al. Bioaccessibility of Fe and Zn (associated to proteins) in cashew nut. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 83, p. 103259, 2019.

YAN, X. et al. Influence of phenolic compounds on physicochemical and functional properties of protein isolate from *Cinnamomum camphora* seed kernel. **Food Hydrocolloids**, v. 102, 105612, 2020.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p. 1573-1580, 2009.

YILMAZ, C. et al. Determination of serotonin in nuts and nut containing products by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, 272, 347-353. 2019.

ZHANG, M.; STEELE, M. A.; YI, X. Reconsidering the effects of tannin on seed dispersal by rodents: Evidence from enclosure and field experiments with artificial seeds. **Behavioural Processes**, v. 100, p. 200-207, 2013.

ZUO, Q. et al. Effects of nitrogen rate and genotype on seed protein and amino acid content in canola. **The Journal of Agricultural Science**, v. 154, n. 3, p. 438-455, 2016.