

## AVALIAÇÃO DE SEMENTES DE ACEROLA POR MEIO DE RAIOS-X<sup>1</sup>

DANIEL SILVEIRA PINTO NASSIF<sup>2</sup> & SILVIO MOURE CÍCERO<sup>3</sup>

**RESUMO** - O teste de raios-X tem sido utilizado por ser um método rápido, preciso e não-destrutivo. Neste contexto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a possibilidade de sua utilização na detecção de anormalidades em embriões de sementes de acerola. Sementes, dos clones Olivier e Waldy e de “pé-franco”, foram radiografadas (radiação de 16 kv e tempo de exposição de 180 segundos) e classificadas em função das condições em que seus embriões se encontravam (morfologicamente normais, morfologicamente anormais ou ausentes). Após a radiografia, as sementes foram colocadas para germinar e, em seguida, as plântulas e as sementes mortas foram fotografadas e disponibilizadas em computador juntamente com as respectivas imagens de raios-X. A técnica de raios-X permite a detecção de danos e anormalidades em embriões de sementes de acerola que são prejudiciais à germinação.

**Termos para Indexação:** *Malpighia emarginata* D.C., análise de sementes, análise de imagens.

### EVALUATION OF ACEROLA SEEDS BY X-RAY

**ABSTRACT**- The X-ray test has been used for being a fast, accurate and no destructive method. The present paper was carried out with the purpose of verifying the possibility of identifying embryos abnormality of acerola seeds. Seeds from Olivier and Waldy clones and rootstock, were radiographed (16 kv radiation and 180 seconds exposition time) and classified in function of their embryos condition (morphologically normal, morphologically abnormal and absent). After the X-ray, all seeds were submitted to a germination test and, after that, the seedlings and dead seeds were photographed and used in a computer with respective X-ray images. The X-ray method permits the detection of damage and abnormality on embryos of acerola seeds which are harmful to germination.

**Index Terms:** *Malpighia emarginata* D.C., seed analysis, image analysis.

A aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.), também conhecida como “Cereja das Antilhas” ou “Cereja dos Barbados”, da família Malpighiaceae, tem como origem a América Central, é uma planta de porte arbustivo e frutifica praticamente o ano todo em regiões de clima tropical (Araújo & Minami, 1994).

A acerola é importante pelo elevado teor de vitamina C contido em sua polpa (1.500 mg em 100 g de polpa, em média), a qual é totalmente absorvida pelo corpo humano, enquanto somente 50% da vitamina C sintética é aproveitada pelo organismo. Há também o interesse de países, como os Estados Unidos, Japão e Europa pela polpa do fruto que é utilizada na fabricação de cápsulas vitamínicas e no uso do ácido ascórbico, visando à conservação e enriquecimento de alimentos processados (Araújo & Minami, 1994).

O fruto da acerola é pequeno, tipo drupa, com três sementes pequenas e não-albuminadas em seu interior (Araújo & Minami, 1993). Lendim (1998), citado por Gomes (2001), constatou que, frequentemente, a germinação de sementes de acerola é inferior a 50%. Atualmente, a importância das sementes de acerola está restrita à produção de portas-enxerto e programas de melhoramento (Meletti, 2000); portanto, esta baixa germinação se constitui em um obstáculo para estes programas (Araújo & Minami, 1993).

Simão (1960) concluiu que a cereja das Antilhas (acerola) apresenta reduzido número de sementes férteis e que a baixa viabilidade destas deveria estar associada a fatores de ordem biológica ou genética, que na época ainda não tinham sido estudados; porém, Nacif et al. (1996) observaram que é comum que algumas sementes de acerola sejam inviáveis, pois dos três óvulos existentes, apenas um ou dois se desenvolvem completamente em decorrência de fatores como: má-formação do óvulo, degeneração do saco embrionário, falta de fertilização do óvulo, entre outros, podendo resultar em baixa germinação.

Em estudos no município de Sapé (PB), Azeredo et al. (1994) também observaram a baixa porcentagem de embriões no interior das sementes de acerola, sendo que, para cada amostra de 100 sementes, existia, em média, 40% de presença de embriões.

Simplício et al. (1994) encontraram 29,36% de sementes de

acerola com embriões normais, 4,21% com embriões deformados e 66,08% sem embriões.

Para as sementes de acerola, foi sugerido um comportamento recalcitrante (Harrington, 1972, citado por Neves, 1991), isto é, sementes que não toleram a redução de temperatura e umidade no armazenamento, e o período de viabilidade das mesmas é relativamente curto (King & Roberts, 1980, citado por Neves, 1991).

Aspectos morfológicos das sementes, possivelmente associados à viabilidade, podem ser avaliados pelo teste de raios-X (Copeland & McDonald, 1985). Alguns pesquisadores procuraram relacionar a anatomia das sementes com a germinação ou morfologia das plântulas, cuja correspondência varia de acordo com a espécie (Simak, 1991). Essa correspondência foi verificada em sementes de tomate (Van Der Burg et al., 1994), milho (Cícero et al., 1998), canafístula (Oliveira, 2000), cipreste italiano (Battisti et al., 2000) e aroeira-branca (Machado, 2002), demonstrando ser uma técnica eficiente para determinar a viabilidade de sementes. Entretanto, com maçã, não houve relação entre a morfologia de embriões e a germinação, isto é, sementes anatomicamente perfeitas, conforme observado nos testes de raios-X, podem apresentar desempenho ineficiente durante a germinação (Bouvier et al., 1992). Este fato pode ser observado em decorrência de condições ambientais desfavoráveis à germinação, da presença de sementes com infecções latentes, sementes mortas por causas naturais, em estádios avançados de deterioração ou submetidas a um armazenamento inadequado (Swaminathan & Kamra, 1961; Van Der Burg et al., 1994).

Camargo (1997) ressaltou a importância do desenvolvimento de testes rápidos para avaliação de viabilidade de sementes, principalmente para aquelas com baixa capacidade de armazenamento e germinação lenta, como as sementes de acerola.

O teste de raios-X, padronizado pela Associação Internacional de Análise de Sementes (ISTA, 1996), permite a observação da posição, forma e deformações que ocorrem no eixo embrionário das sementes. Essa técnica tem sido utilizada para a identificação de sementes cheias, vazias, danificadas morfologicamente e para caracterizar e detectar danos internos em

<sup>1</sup> (Trabalho 48-2006). Recebido: 19-04-2006. Aceito para publicação: 06-10-2006. Trabalho de Iniciação Científica financiado pelo PIBIC/CNPq.

<sup>2</sup> Aluno de graduação da ESALQ/USP, bolsista PIBIC/CNPq. dspnassif@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Professor Doutor do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP. smcicero@esalq.usp.br Av. Pádua Dias, 11 – CP 9 – Piracicaba - SP – CEP: 13418-900

sementes (Cícero et al., 1998).

Embora os raios-X sejam potencialmente nocivos às sementes, a baixa dose absorvida durante o teste não lhes causa mutações genéticas e não afeta a sua germinação (Swaminathan & Kamra, 1961). Além disso, trata-se de um teste que não requer tratamento prévio das sementes, o que confere vantagens por ser um método não-destrutivo, rápido e de simples execução. Em razão disso, o seu uso tem sido crescente, trazendo benefícios em diferentes etapas da produção e utilização das sementes, incluindo trabalhos de melhoramento genético.

A utilização de raios-X é um procedimento que permite avaliar a estrutura e o estágio de desenvolvimento de embriões de sementes; por se tratar de método não-destrutivo, as sementes podem ser submetidas a testes fisiológicos e, desta forma, permitir o estabelecimento da relação de causas e efeitos.

O trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Análise de Imagens e de Análise de Sementes do Departamento de Produção Vegetal na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

Foram utilizadas 200 sementes de um “pé-franco” e dos clones Waldy e Olivier, totalizando 600 sementes, que foram divididas em quatro repetições de 50 sementes para cada material. As sementes foram colocadas sobre um recipiente de plástico transparente, especialmente desenvolvido para a condução da análise. Em seguida, elas foram numeradas de acordo com a posição ocupada no recipiente, de modo que pudessem ser identificadas posteriormente. O recipiente foi colocado diretamente sobre um filme de raios-X (Kodak MIN-R 2000, 18 x 24 cm), a uma distância de 35 cm da fonte de raios-X.

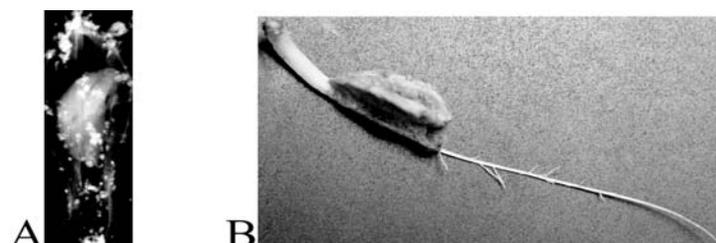
As radiografias foram obtidas em equipamento FAXITRON X-Ray, modelo MX-20 e a revelação dos filmes foi efetuada em uma processadora Hope X-Ray, modelo 319 Micromax. Posteriormente, as imagens dos filmes de raios-X foram capturadas por um Escâner Umax, modelo Powerlook 1100, para visualização e ampliação em um computador Pentium III. Foram feitos testes preliminares com diferentes intensidades de radiação (kv) e tempos de exposição (segundos): 15kv/300s; 13kv/300s; 20kv/45s; 16kv/180s; 18kv/135s;

**TABELA 1** - Valores médios (%) relativos ao teste de raios-X observado nos clones Olivier e Waldy e no “pé-franco”.

	Olivier	Waldy	“pé-franco”
Embrião morfologicamente normal	43,0 %	40,0 %	30,0 %
Embrião morfologicamente anormal	10,0 %	6,0 %	4,0 %
Sem embrião	48,0 %	54,0 %	66,0 %

**TABELA 2** - Valores médios (%) relativos ao teste de germinação observado nos clones Olivier e Waldy e no “pé-franco”.

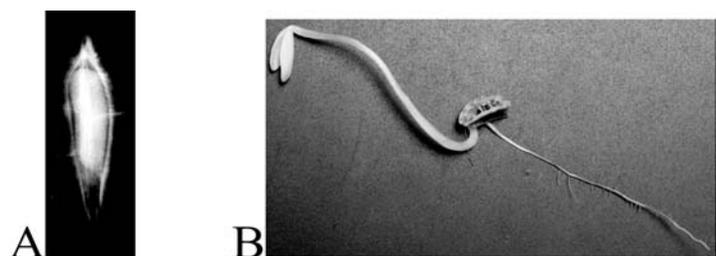
	Olivier	Waldy	“pé-franco”
Plântula normal	18,0 %	6,0 %	8,0 %
Plântula anormal	26,0 %	16,0 %	12,0 %
Semente morta	56,0 %	78,0 %	80,0 %



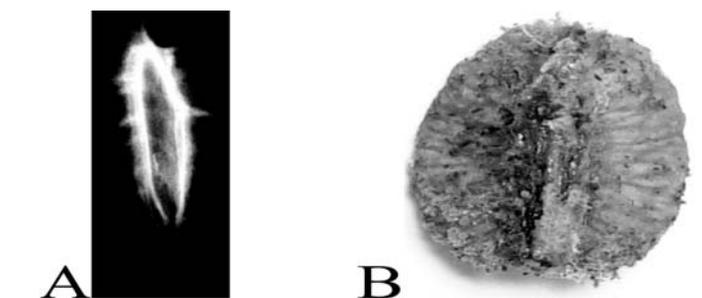
**FIGURA 1** - Semente do clone Olivier com embrião morfologicamente anormal (A) (3x) que resultou em plântula anormal (B) (0,7x).



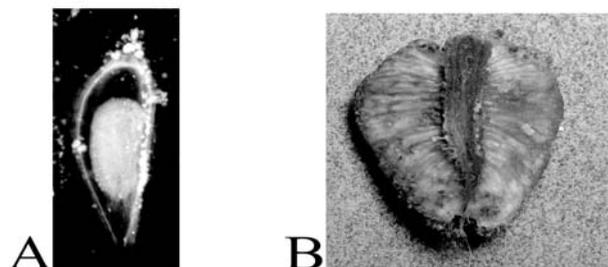
**FIGURA 3** - Semente do “pé-franco” com embrião morfologicamente normal (A) (1,5x) que resultou em plântula anormal (B) (1x).



**FIGURA 2** - Semente do clone Olivier com embrião morfologicamente normal (A) (2x) que resultou em plântula normal (B) (0,33x).



**FIGURA 4** - Semente do clone Waldy sem embrião (A) (2x) que resultou em semente morta (B) (2x).



**FIGURA 5** - Semente do clone Waldy com embrião morfologicamente normal (A) (3x) que resultou em semente morta (B) (1,5x).

19kv/90s. Após as análises dos raios-X, o que demonstrou com maior nitidez o embrião das sementes foi 16kv/180s. As sementes analisadas nos raios-X foram classificadas em sementes com embrião morfologicamente perfeito, sementes com embrião morfologicamente imperfeito e sementes sem embrião.

Em seguida, foi conduzido o teste de germinação com as sementes já identificadas (numeradas) provenientes do teste de raios-X, divididas em grupos de dez. Estas sementes foram imersas individualmente em hipoclorito de sódio (2,0%) para uma desinfestação por três minutos e, posteriormente, lavadas em água corrente por mais três minutos. Após a desinfestação, os grupos de sementes foram colocados sobre duas folhas de papel-toalha "Germitest" (previamente umedecidas com água em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso das mesmas), distribuídas no terço superior do substrato para um desenvolvimento individualizado das plântulas. Estas foram cobertas com mais uma folha de papel-toalha (também previamente umedecida como as anteriores) e enroladas. Os rolos foram colocados em germinador com temperatura de 30°C, por 30 dias, determinados em testes preliminares, pois não há registro do teste de germinação para acerola nas Regras para Análise de Sementes. Após esse período, as plântulas normais, anormais e as sementes mortas foram retiradas do substrato e fotografadas por uma câmera digital Nikon, modelo D1, acoplada ao computador.

As imagens de raios-X e suas respectivas classificações quanto aos embriões foram disponibilizadas no computador juntamente com as imagens das plântulas ou das sementes mortas relativas a cada semente. Desta maneira, todas as imagens puderam ser examinadas simultaneamente na tela do monitor, permitindo fazer um diagnóstico para cada semente.

Nas Tabelas 1 e 2, pode-se observar que, no caso do clone Olivier, em média, 10,0% eram embriões morfologicamente anormais e 48,0% estavam sem embriões, sendo que todos evoluíram em plântulas anormais ou em sementes mortas (Figura 1). Os outros 43,0% das sementes estavam com os embriões morfologicamente normais, sendo que, destas, somente 18,0% evoluíram para plântulas normais (Figura 2), e o restante, em plântulas anormais ou em sementes mortas.

No "pé-franco", 70,0% das sementes, em média, estavam sem embriões ou com embriões morfologicamente anormais, sendo que, em todos estes casos, houve uma evolução para plântulas anormais (Figura 3) ou em sementes mortas. Os 30,0% restantes das sementes estavam com embriões morfologicamente normais, porém somente 8,0% destas sementes evoluíram para plântulas normais, e o restante, em plântulas anormais ou em sementes mortas.

No clone Waldy, 60,0% das sementes, em média, apresentaram embriões morfologicamente anormais e sem embriões e, nestes casos, todas evoluíram para plântulas anormais ou em sementes mortas (Figura 4). Os outros 40,0% das sementes, apresentavam embriões morfologicamente normais, sendo que, destas, somente 5,5% evoluíram para plântulas normais, e o restante, em plântulas anormais ou em sementes mortas (Figura 5).

A baixa presença de embriões nas sementes dos clones e do "pé-franco", observadas no presente trabalho, foi, também, relatada

por Azeredo et al. (1994) e Simplício et al. (1994). Por outro lado, Nacif et al. (1996) afirmaram que é comum a baixa viabilidade de sementes de acerola e que tal comportamento é atribuído a fatores como ausência de fertilização e má-formação do óvulo e à degeneração do saco embrionário.

No presente trabalho, observou-se que sementes com embriões morfologicamente normais, detectados pelos raios-X, não resultaram em plântulas normais; tal fato pode ser explicado em decorrência de infecções latentes, sementes mortas por causas naturais, em estádios avançados de deterioração ou submetidas a armazenamento inadequado (Swaminathan & Kamra, 1961; Van Der Burg et al., 1994).

A técnica de raios-X permite a detecção de danos e anormalidades em embriões de sementes de acerola que são prejudiciais à germinação.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, P.S.R de; MINAMI, K. **Acerola**. Campinas: Fundação Cargill, 1994, 81p.
- ARAÚJO, P.S.R de; MINAMI, K. **Cultura da acerola**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, 1993, 115p.
- AZEREDO, G.A.; MATOS, V.P.; GERMENO, M.L.A.R.; LIMA, A.A. Efeito da temperatura e períodos de embebição na germinação de sementes de acerola (*Malpighia glabra* L.) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13., 1994. Salvador. **Anais...** Salvador: SBF. v.1, p.68-69.
- BATTISTI, A.; CANTINI, R.; FECI, E.; FRIGIMELICA, G.; GUIDO, M.; ROQUES, A. Detection and evaluation of seed damage of cypress, *Cupressus sempervirens* L. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.28, n.3, p. 729-738, 2000.
- BOUVIER, L.; CHAVAGNAT, A.; ZHANG, Y.X.; LESPINASSE, Y. Using radiography to attempt to screen for haploid embryos in apple seeds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.52, n.3, p. 215-221, 1992.
- CAMARGO, J.P. **Estudos sobre a propagação da castanheira do Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.)**. 1997. 126f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.
- CÍCERO, S.M.; VAN DER HEIDJEN, G.W.A.M.; VAN DER BURG, W.J.; BINO, R.J. Evaluation of mechanical damage in sedes of maize (*Zea mays* L.) by X-ray and digital imaging. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.26, n.3, p. 603-612, 1998.
- COPELAND, L.O.; MCDONALD, M.B. **Principles of seed science and technology**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Macmillan, 1985. 321p.
- GOMES, J.E. Aspectos botânicos, físico-químico, genéticos e influências meteorológicas em aceroleiras (*Malpighia emarginata* DC.) no processo seletivo de genótipos de Itápolis, Viradouro e Jaboticabal, SP. 2001. 250f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.
- ISTA - INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Rules for seed testing**. Switzerland, 1996. 323 p.
- MACHADO, C.F. Metodologia para a condução do teste de germinação e utilização de raios-X para a avaliação da qualidade de sementes de aroeira-branca (*Lithraea molleoides* (Vell.) Engl.). 2002. 51f. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- MELETTI, L.M.M. **Propagação de frutíferas tropicais**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 239p.
- NACIF, S.R.; GUARDIA, M.C.; MORAES, P.L.R. de. Morfologia e anatomia das sementes de acerola (*Malpighia glabra* L. (Malpighiaceae)). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 43, n. 249, p. 597-610, 1996.

- NEVES, C.S.V.J. **Avaliação de Métodos para Conservação de Sementes de Abacateiro (*Persea sp.*)**. 1991. 80 f. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.
- OLIVEIRA, L.M. de. **Avaliação da qualidade de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) pelos testes de germinação, tetrazólio e raios-X**. 2000. 111f. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- SIMAK, M. Testing of Forest tree and shrub seeds by X-radiography. In: GORDON, A.G.; GOSLING, P.G.; WANG, B.S.P. (Ed.). **Tree and shrub seed handbook**. Zurich: International Seed Testing Association, 1991. p.14-1 – 14-28.
- SIMÃO, S. Viabilidade das sementes da cereja das antilhas. **O Solo**, Piracicaba, 1960, p.77-80.
- SIMPLÍCIO, J.B.; SILVA, A.K.S.; SOUZA JÚNIOR, U.S.; OKASAKI, W.Y.; MUSSER, R.S. Avaliação da presença de embrião em sementes de duas seleções de acerola (*Malpighia glabra* L.) na Zona da Mata de Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13., 1994, Salvador. **Anais...** p.81.
- SWAMINATHAN, M.S.; KAMRA, S.K. X-ray analysis of the anatomy and viability of seeds of some economic plants. **Indian Journal of Genetics & Plant Breeding**, India. v.4, n.2, p. 129-135, 1961.
- VAN DER BURG, W.J.; AARTSE, J.W.; VAN ZWOL, R.A.; BINO, R.J. Predicting tomato seedling morphology by X-ray analysis of seeds. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.119, n.2, p. 258-263, 1994.