

SUELEN SANTOS REGO

**TOLERÂNCIA À DESIDRATAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE
Blepharocalyx salicifolius (Kunth) Berg. E *Casearia decandra* Jacq.**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, Departamento de Ciências Florestais, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Florestais.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Nogueira
Co-orientadores: Dr. Álvaro Figueredo dos Santos
Dr. Antônio Carlos de Souza Medeiros
Prof^a Dr^a Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz

CURITIBA
2012

Ficha catalográfica elaborada por Denis Uezu – CRB 1720/PR

Rego, Suelen Santos

Tolerância à desidratação e armazenamento de sementes de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) Berg. E *Casearia decandra* Jacq. / Suelen Santos Rego. – 2012

142 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Nogueira

Coorientadores: Dr. Álvaro Figueredo dos Santos; Dr. Antônio Carlos de Souza Medeiros; Profª. Drª. Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Defesa: Curitiba, 30/08/2012.

Área de concentração: Silvicultura.

1. Sementes - Secagem. 2. Sementes - Anatomia. 3. Sementes - Fisiologia. 4. Sementes - Armazenamento. 5. Teses. 6. Salicaceae. 7. Mirtaceae. I. Nogueira, Antonio Carlos. II. Santos, Álvaro Figueiredo dos. III. Medeiros, Antônio Carlos de Souza. IV. Petkowicz, Carmen Lucia de Oliveira. V. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias. VI. Título.

CDD – 581.4

CDU – 634.0.232.31



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias - Centro de Ciências Florestais e da Madeira
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal

PARECER

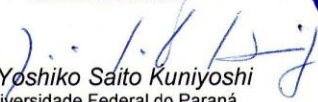
Defesa nº. 935

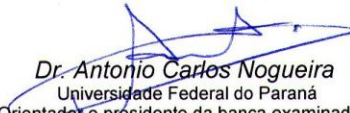
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, após arguir o(a) doutorando(a) *Suelen Santos Rego* em relação ao seu trabalho de tese intitulado "**Tolerância à desidratação e armazenamento de sementes de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) Berg. E *Casearia decandra* Jacq.**", é de parecer favorável à APROVAÇÃO do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de *Doutor* em Engenharia Florestal, área de concentração em SILVICULTURA.


Dr. Daniela Cleide Azevedo de Abreu
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Primeiro examinador


Dr. Gizelda Maia Rêgo
EMBRAPA - Florestas
Segundo examinador

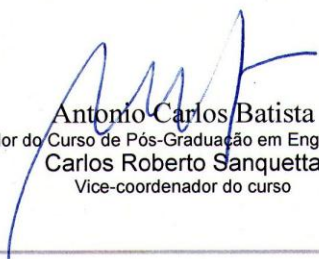

Dr. Celso Garcia Auer
Universidade Federal do Paraná
Terceiro examinador


Dr. Yoshiko Saito Kuniyoshi
Universidade Federal do Paraná
Quarto examinador


Dr. Antonio Carlos Nogueira
Universidade Federal do Paraná
Orientador e presidente da banca examinadora



Curitiba, 30 de agosto de 2012.


Antonio Carlos Batista
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Carlos Roberto Sanquetta
Vice-coordenador do curso

À minha família, pelo apoio, e por cuidar do
Pedro nos momentos de minha ausência

Ao meu filho Pedro, por me ensinar o que é
o amor incondicional

Ao meu esposo Marcelo, pela paciência,
amor e apoio.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar o meu caminho nos momentos difíceis;

Ao Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade e contribuição para o meu crescimento profissional;

A CAPES-REUNI pela bolsa de estudos;

Ao Professor Antonio Carlos Nogueira pela orientação, confiança, amizade e por estar presente nos momentos que mais precisei;

Ao Dr. Álvaro Figueredo dos Santos por ter me orientado desde a graduação e me incentivado a ingressar no Mestrado;

À Professora Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz pela valiosa ajuda com as análises bioquímicas, paciência e dedicação na orientação do trabalho;

Ao Dr. Antônio Carlos de Souza Medeiros pelas dicas para a elaboração do projeto;

À Professora Cleuza Bona por ceder o Laboratório de Botânica Estrutural da UFPR para a realização do trabalho e pelo auxílio nas análises anatômicas.

A Embrapa Florestas pela concessão da infra-estrutura para a coleta de sementes;

Ao Pesquisador da Embrapa Florestas Edilson Batista de Oliveira pelo auxílio com as análises estatísticas;

Aos colegas do Laboratório de Química de Carboidratos da UFPR, Lúcia, Rogério, João e Marília pelo auxílio e cooperação com as análises bioquímicas e amizade;

Ao Biólogo e técnico do Laboratório de Botânica Estrutural da UFPR, Nilson pela valiosa ajuda, e por me ensinar as técnicas de anatomia;

À Professora, Dr^a, e acima de tudo, minha amiga, Daniela Cleide Azevedo de Abreu pelas dicas, apoio, inspiração e incentivo desde a graduação;

Aos funcionários da Embrapa Florestas Wilson, Johann, Paulino, Ozias e Reginaldo pela ajuda na coleta de sementes;

Aos colegas do curso de Pós-Graduação Nelson, Alessandra, Francine, Dagma e Lucas pela amizade e agradável convívio;

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, e que sem eles eu não teria conseguido, o meu muito obrigada.

“Se vi mais longe foi por estar sobre ombros de gigantes.”
(Isaac Newton)

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos desenvolver estudos sobre a tolerância a desidratação das sementes de *Blepharocalyx salicifolius* e *Casearia decandra*, verificar as alterações fisiológicas, bioquímicas e anatômicas nas sementes submetidas a diferentes níveis de secagem e o seu comportamento fisiológico durante o armazenamento. Para verificar os efeitos da secagem nas sementes, estas foram colocadas em dessecadores contendo solução salina saturada de acetato de potássio (23,5% UR) na temperatura de 15°C. Após a obtenção dos graus de umidade desejados as sementes foram colocadas para germinar e submetidas aos testes de vigor, bioquímicos e análises anatômicas. Para o armazenamento, as sementes de *B. salicifolius* com 36% (semente recém colhida), 33%, e 27% de umidade, e as sementes de *C. decandra* com 54% (semente recém colhida), 49% e 38% de umidade foram armazenadas em câmara fria (5°C, 85% UR) em embalagens semipermeáveis de polietileno de 0,10 mm de espessura, 10 cm de largura e 20 cm de comprimento, perfuradas com o auxílio de uma agulha (6 orifícios). A cada 40 dias (*B. salicifolius*) e 30 dias (*C. decandra*) de armazenamento foi retirada uma amostra de sementes para a determinação do grau de umidade, para os testes de germinação, vigor e sanidade. Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que o grau de umidade de segurança para as sementes de *B. salicifolius* e *C. decandra* foram de 37% e 38%, respectivamente, e o grau de umidade crítico e letal foram de 29% e 14% para *B. salicifolius* e de 25% e 8% para *C. decandra*, sendo, portanto classificadas como recalcitrantes. Com relação às alterações anatômicas, nas sementes de *C. decandra*, observou-se diminuição do volume do citoplasma e deformação dos nucléolos, devido à redução da turgidez da célula com a retirada de água, e nas sementes de *B. salicifolius* observaram-se indícios de fragmentação nuclear e maior deposição de compostos fenólicos. Quanto ao conteúdo de reserva, as sementes de *B. salicifolius* podem ser classificadas como amiláceas e as de *C. decandra* como oleaginosas. Com a secagem das sementes de *B. salicifolius* verificou-se degradação do amido em moléculas menores (açúcares solúveis e redutores), aumento da porcentagem de lipídios e modificação na composição monossacarídica de polissacarídeos de parede celular. Nas sementes de *C. decandra* verificou-se a utilização de açúcares solúveis e redutores como substrato para a respiração e modificações na composição da parede celular. Com relação ao armazenamento, as sementes de *B. salicifolius* com 36% e 33% de umidade podem ser armazenadas por mais de 210 dias, nas condições testadas. Para as sementes de *C. decandra* recomenda-se o armazenamento das sementes sem secagem (54% de umidade) até 30 dias, em câmara fria a 5 °C e 85% de UR, em embalagens semipermeáveis de polietileno. A ocorrência de fungos de armazenamento e fungos potencialmente patogênicos contribuiu para a baixa viabilidade das sementes de *B. salicifolius* com 27% de umidade durante o armazenamento e das sementes de *C. decandra* aos 30 e 60 dias de armazenamento.

Palavras-chave: sementes recalcitrantes. secagem de sementes. armazenamento. bioquímica. anatomia.

ABSTRACT

This study aimed to develop studies on the dehydration tolerance of *Blepharocalyx salicifolius* and *Casearia decandra* seeds, check the physiological, biochemical and anatomical seeds submitted to different drying levels and their physiological behavior during storage. To check the effects of drying in the seeds were placed in desiccators containing saturated saline solution of potassium acetate (23.5% RH) at a temperature of 15 °C. After obtaining the desired moisture contents the seeds were germinated and subjected to tests of strength, biochemical and anatomical analyzes. For storage, the seeds of *B. salicifolius* with 36% (newly collected seeds), 33% and 27% humidity, and the seeds of *C. decandra* with 54% (newly collected seeds), 49% and 38% moisture were stored in cold (5 °C, 85% RH) in semipermeable polyethylene 0.10 mm thick, 10 cm wide and 20 cm long, perforated with a needle (6 holes). Every 40 days (*B. salicifolius*) and 30 days (*C. decandra*) storage a sample was obtained from seeds to determine the moisture content, germination, vigor and health. Based on these results we can conclude that the moisture content security for the seeds of *B. salicifolius* and *C. decandra* were 37% and 38% respectively, and the critical moisture content and was lethal to 29% and 14% for *B. salicifolius* and 25% and 8% for *C. decandra* and is therefore classified as recalcitrant. With respect to anatomical changes, the seeds of *C. decandra* observed a decrease of the cytoplasm and nucleolus of the deformation due to the reduction of turgor of the cell with the removal of water, and seeds of *B. salicifolius* observed signs of nuclear fragmentation and increased deposition of phenolic compounds. The contents of the reservation, the seeds of *B. salicifolius* can be classified as starch and seed *C. decandra* as oil seeds. With the drying of the seeds of *B. salicifolius* there was degradation of starch into smaller molecules (soluble and reducing sugars), increasing the percentage of lipids and changes in the monosaccharide composition of cell wall polysaccharides. In seeds *C. decandra* verified the use of soluble and reducing sugars as substrates for the breathing and changes in cell wall composition. In storage, the seeds of *B. salicifolius* with 36% and 33% moisture can be stored for more than 210 days under the conditions tested, while for the seeds of *C. decandra* recommended seed storage without drying (54% humidity) until 30 days in a cold chamber at 5 °C and 85% RH in semipermeable polyethylene. The occurrence of storage fungi and fungal pathogens potentially contributed to the low viability of seeds of *B. salicifolius* with 27% humidity during storage and seeds of *C. decandra* at 30 and 60 days of storage.

Key words: recalcitrant seeds. drying of the seeds. storage. biochemistry. anatomy.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - CURVA DE SECAGEM DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* EM SOLUÇÃO SALINA SATURADA DE ACETATO DE POTÁSSIO (23,5% UR).....56
- FIGURA 2 - PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES E *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.....57
- FIGURA 3 - ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.....59
- FIGURA 4 - TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TM) DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.....60
- FIGURA 5 - TESTE DE TETRAZÓLIO COM AS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.....62
- FIGURA 6 - TESTE DE TETRAZÓLIO COM AS SEMENTES DE *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.....63
- FIGURA 7 - VIABILIDADE PELO TESTE DE TETRAZÓLIO DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.....64
- FIGURA 8 - CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.....66
- FIGURA 9 - SECÇÕES LONGITUDINAIS DE EMBRIÕES DE *Blepharocalyx salicifolius* OBTIDAS DE SEMENTES COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE, CORADOS COM AZUL DE TOLUIDINA – DETALHE DA GLÂNDULA.....70
- FIGURA 10 - SECÇÕES LONGITUDINAIS DE EMBRIÕES DE *Blepharocalyx salicifolius* OBTIDAS DE SEMENTES COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE, CORADOS COM AZUL DE TOLUIDINA – REGIÃO DO HIPOCÓTILO.....71
- FIGURA 11 - SECÇÕES LONGITUDINAIS DE EMBRIÕES DE *Casearia decandra* OBTIDAS DE SEMENTES COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE, CORADAS COM AZUL DE TOLUIDINA.....72

FIGURA 12 - SECÇÕES LONGITUDINAIS DO ENDOSPERMA DE <i>Casearia decandra</i> OBTIDAS DE SEMENTES COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE, CORADAS COM AZUL DE TOLUIDINA	73
FIGURA 13 - SECÇÃO LONGITUDINAL DO HIPOCÓTILO DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> - DETALHE DA GLÂNDULA	74
FIGURA 14- SECÇÕES LONGITUDINAIS DO HIPOCÓTILO DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> OBTIDAS DE SEMENTES COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE, SUBMETIDOS AO TESTE COM SUDAM III	75
FIGURA 15- SECÇÕES LONGITUDINAIS DO ENDOSPERMA DE SEMENTES DE <i>Casearia decandra</i> OBTIDAS DE SEMENTES COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE, SUBMETIDAS AO TESTE COM SUDAM III	76
FIGURA 16- SECÇÕES LONGITUDINAIS DO HIPOCÓTILO DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> OBTIDAS DE SEMENTES COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE, SUBMETIDOS AO TESTE COM LUGOL	77
FIGURA 17- SECÇÕES LONGITUDINAIS DO ENDOSPERMA DE <i>Casearia decandra</i> OBTIDAS DE SEMENTES COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE, SUBMETIDAS AO TESTE COM LUGOL	78
FIGURA 18- SECÇÕES LONGITUDINAIS DO HIPOCÓTILO DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> OBTIDAS DE SEMENTES COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE, SUBMETIDOS AO TESTE COM CLORETO FÉRRICO	79
FIGURA 19- SECÇÕES LONGITUDINAIS DO ENDOSPERMA DE <i>Casearia decandra</i> OBTIDAS DE SEMENTES COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE, SUBMETIDAS AO TESTE COM CLORETO FÉRRICO	80
FIGURA 20- PORCENTAGEM DE LIPÍDIOS NAS SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> E <i>Casearia decandra</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE	81
FIGURA 21- RENDIMENTO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA OBTIDA ATRAVÉS DA EXTRAÇÃO COM DIMETILSULFÓXIDO DAS SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> E <i>Casearia decandra</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE	84
FIGURA 22- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO OBTIDA APÓS EXTRAÇÃO COM DIMETILSULFÓXIDO DAS SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE	86

FIGURA 23- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO OBTIDA APÓS EXTRAÇÃO COM DIMETILSULFÓXIDO DAS SEMENTES DE <i>Casearia decandra</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.....	87
FIGURA 24- RENDIMENTO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA OBTIDA ATRAVÉS DA EXTRAÇÃO AQUOSA A QUENTE DAS SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> E <i>Casearia decandra</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.....	89
FIGURA 25- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO OBTIDA APÓS EXTRAÇÃO AQUOSA A QUENTE DAS SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.....	90
FIGURA 26- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO OBTIDA APÓS EXTRAÇÃO AQUOSA A QUENTE DAS SEMENTES DE <i>Casearia decandra</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.....	91
FIGURA 27- RENDIMENTO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA OBTIDA ATRAVÉS DA EXTRAÇÃO ALCALINA CORRESPONDENTE A HEMICELULOSE “A” DAS SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> E <i>Casearia decandra</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE..	93
FIGURA 28- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO OBTIDA APÓS EXTRAÇÃO ALCALINA DE HEMICELULOSE “A” DAS SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.....	94
FIGURA 29- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO OBTIDA APÓS EXTRAÇÃO ALCALINA DE HEMICELULOSE “A” DAS SEMENTES DE <i>Casearia decandra</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.....	95
FIGURA 30: RENDIMENTO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA OBTIDA ATRAVÉS DA EXTRAÇÃO ALCALINA CORRESPONDENTE A HEMICELULOSE “B” DAS SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> E <i>Casearia decandra</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE..	96
FIGURA 31- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO OBTIDA APÓS EXTRAÇÃO ALCALINA DE HEMICELULOSE “A” DAS SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.....	97
FIGURA 32- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO OBTIDA APÓS EXTRAÇÃO ALCALINA DE HEMICELULOSE “A” DAS SEMENTES DE <i>Casearia decandra</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.....	98

FIGURA 33- DOSAGEM DE AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS NAS SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> E <i>Casearia decandra</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.....	99
FIGURA 34- DOSAGEM DE AÇÚCARES REDUTORES NAS SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> E <i>Casearia decandra</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.....	101
FIGURA 35- GRAU DE UMIDADE DAS SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> E <i>Casearia decandra</i> DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	104
FIGURA 36- PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> E <i>Casearia decandra</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	106
FIGURA 37- ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> E <i>Casearia decandra</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	108
FIGURA 38- TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> E <i>Casearia decandra</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	110
FIGURA 39- VIABILIDADE PELO TESTE DE TETRAZÓLIO DAS SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> E <i>Casearia decandra</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	112
FIGURA 40- CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DAS SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> E <i>Casearia decandra</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	114
FIGURA 41- INCIDÊNCIA DE <i>Pestalotiopsis</i> sp. EM SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	118
FIGURA 42- INCIDÊNCIA DE <i>Cladosporium</i> sp. EM SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	118
FIGURA 43- INCIDÊNCIA DE <i>Fusarium</i> sp. EM SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	119
FIGURA 44- INCIDÊNCIA DE <i>Penicillium</i> sp. EM SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	120
FIGURA 45- INCIDÊNCIA DE <i>Cladosporium</i> sp. EM SEMENTES DE <i>Casearia decandra</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	122

FIGURA 46- INCIDÊNCIA DE *Fusarium* sp. EM SEMENTES DE *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.....123

FIGURA 47- INCIDÊNCIA DE *Epicoccum* sp. EM SEMENTES DE *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.....124

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- INCIDÊNCIA DE FUNGOS EM SEMENTES DE <i>Blepharocalyx salicifolius</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	117
TABELA 2- INCIDÊNCIA DE FUNGOS EM SEMENTES DE <i>Casearia decandra</i> COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	121

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 TOLERÂNCIA À DESIDRATAÇÃO EM SEMENTES.....	19
2.2 SEMENTES RECALCITRANTES.....	21
2.3 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA TOLERÂNCIA À DESIDRATAÇÃO.....	23
2.3.1 Alterações bioquímicas.....	24
2.3.2 Alterações estruturais.....	31
2.3.3 Acúmulo de substâncias tóxicas e atividade enzimática.....	33
2.4 ARMAZENAMENTO.....	34
2.5 ESPÉCIES DE ESTUDO.....	39
2.5.1 <i>Blepharocalyx salicifolius</i> (H.B.K.) Berg.....	39
2.5.2 <i>Casearia decandra</i> Jacq.....	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 COLETA DE FRUTOS E OBTENÇÃO DE SEMENTES.....	45
3.2 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DAS SEMENTES EM RELAÇÃO À TOLERÂNCIA À DESIDRATAÇÃO.....	46
3.2.1 Grau de umidade das sementes.....	47
3.2.2 Teste de germinação e vigor.....	47
3.2.3 Teste de tetrazólio.....	48
3.2.4 Teste de condutividade elétrica.....	48
3.2.5 Análise anatômica.....	49
3.2.6 Análises bioquímicas.....	49
3.2.6.1 Preparo das amostras.....	50
3.2.6.2 Extração e quantificação de lipídios.....	50
3.2.6.3 Extração e quantificação de açúcares solúveis totais e açúcares redutores.....	50
3.2.6.4 Extração e quantificação de amido.....	51
3.2.6.5 Extração e quantificação de polissacarídeos de parede celular.....	51
3.2.6.6 Determinação da composição monossacarídica.....	52
3.3 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DAS SEMENTES EM RELAÇÃO AO ARMAZENAMENTO.....	53
3.3.1 Avaliações fisiológicas.....	53

3.3.2 Teste de sanidade.....	54
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DAS SEMENTES EM RELAÇÃO À TOLERÂNCIA À DESIDRATAÇÃO.....	55
4.1.1 Grau de umidade das sementes.....	55
4.1.2 Porcentagem de germinação	56
4.1.3 Índice de velocidade de germinação.....	58
4.1.4 Tempo médio de germinação.....	60
4.1.5 Teste de tetrazólio.....	61
4.1.6 Teste de condutividade elétrica.....	65
4.1.7 Análise anatômica.....	67
4.1.8 Análise bioquímica.....	81
4.1.8.1 Extração e quantificação de lipídios.....	81
4.1.8.2. Extração e quantificação amido.....	83
4.1.8.3 Extração e quantificação de polissacarídeos de parede celular.....	88
4.1.8.4 Extração e quantificação de açúcares solúveis totais e açúcares redutores	99
4.2 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DAS SEMENTES EM RELAÇÃO AO ARMAZENAMENTO	102
4.2.1 Grau de umidade das sementes.....	102
4.2.2 Porcentagem de germinação.....	105
4.2.3 Índice de velocidade de germinação.....	107
4.2.4 Tempo médio de germinação.....	109
4.2.5 Teste de tetrazólio.....	111
4.2.6 Teste de condutividade elétrica.....	113
4.2.7 Teste de sanidade.....	116
5 CONCLUSÕES.....	126
REFERÊNCIAS.....	128

1 INTRODUÇÃO

A tolerância à desidratação em sementes é a capacidade de sobrevivência em ausência praticamente completa de água e a recuperação das funções biológicas durante a reidratação (MARCOS FILHO, 2005, p. 362).

Com relação a esta característica, as sementes podem ser classificadas em ortodoxas (tolerantes), recalcitrantes (não tolerantes) e intermediárias (apresentam ora características semelhantes às ortodoxas ora às recalcitrantes) (ROBERTS, 1973; ELLIS *et al.*, 1990).

Várias estratégias para evitar os efeitos deletérios da dessecação já foram identificadas. No entanto, pouco se sabe sobre a razão pela qual sementes de algumas espécies sobrevivem à remoção quase total do seu grau de umidade, enquanto que outras perdem a viabilidade ao serem desidratadas (MEDEIROS; EIRA, 2006, p. 1).

Alguns mecanismos ou processos podem conferir proteção contra à desidratação e sua deficiência ou ausência podem contribuir para graus relativos de sensibilidade à dessecação. Estes mecanismos podem ser de natureza celular como a redução do grau de vacuolização, deposição de compostos insolúveis, integridade do citoesqueleto, conformação do DNA e arquitetura nuclear. Também estão envolvidos mecanismos de natureza bioquímica como a presença e o funcionamento eficaz de sistemas antioxidantes, acumulação de substâncias protetoras, presença de uma camada lipídica, presença e funcionamento de mecanismos de reparação durante a reidratação (BERJAK; PAMMENTER, 2000, p. 44).

A maioria dos estudos envolvendo o comportamento fisiológico de sementes recalcitrantes tem por finalidade apenas a busca de alternativas para amenizar os efeitos da recalcitrância, e não a de elucidar as causas da rápida perda da viabilidade de sementes com estas características. Assim, torna-se necessário a investigação dos eventos fisiológicos, bioquímicos e celulares que ocorrem nas sementes durante a desidratação (BONOME, 2006, p. 2).

Outra característica importante das sementes é a sua capacidade de armazenamento. Sementes ortodoxas podem ser secas a graus de umidade baixos e com isso podem ser armazenadas por longos períodos de tempo, enquanto que as recalcitrantes são dispersas com conteúdos elevados de água

e não podem ser desidratadas a valores tão baixos, não suportando o armazenamento a longo prazo. Por isso, conhecer o comportamento fisiológico das sementes em relação à tolerância a desidratação é essencial para que se possa definir a técnica apropriada para o seu armazenamento. Esse aspecto torna-se mais importante quando se depara com espécies brasileiras, para as quais ainda não existe metodologia para seu armazenamento (MEDEIROS; EIRA, 2006, p. 1).

Blepharocalyx salicifolius e *Casearia decandra* são espécies arbóreas de grande representatividade na Floresta Ombrófila Mista, podendo ser utilizadas para a recuperação de ambientes ciliares, possuindo também potencial uso para a silvicultura, e não se tem informações sobre o comportamento fisiológico das sementes durante a secagem e o armazenamento.

Diante disso, verifica-se a importância de desenvolver estudos sobre o comportamento destas espécies em relação à desidratação e ao armazenamento. Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram:

- Classificar as sementes em ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias;
- Determinar o grau de umidade de segurança, crítico e letal das sementes;
- Verificar as alterações fisiológicas, anatômicas e bioquímicas nas sementes submetidas a diferentes níveis de desidratação;
- Determinar o grau de umidade adequado para o armazenamento das sementes em câmara fria;
- Determinar o período de tempo que as sementes podem ser armazenadas sem perder a viabilidade;
- Avaliar a sanidade das sementes das duas espécies durante o armazenamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TOLERÂNCIA À DESIDRATAÇÃO EM SEMENTES

A tolerância à desidratação é uma das mais importantes propriedades das sementes. É um fenômeno necessário ao ciclo de vida da planta e uma estratégia de adaptação que permite a sobrevivência durante o armazenamento, sob condições adversas do ambiente assegurando a disseminação da espécie (MEDEIROS; EIRA, 2006, p. 1).

O processo de maturação das sementes pode ser dividido em quatro fases. As fases I e II compreendem a divisão e expansão (alongamento) celular; a fase III é caracterizada pelo acúmulo de reservas e o aumento progressivo da massa de matéria seca. Na fase IV, onde ocorre o final do processo de transferência de matéria seca, intensifica-se a desidratação das sementes (MARCOS FILHO, 2005, p. 93).

A perda de água durante a maturação das sementes é o evento terminal e normal no desenvolvimento de muitas espécies, que passam por um período metabolicamente quiescente. O grau de umidade da semente se estabiliza durante a fase III do desenvolvimento, quando há um acúmulo de reservas insolúveis, e então é durante a fase IV (secagem) que ocorre a perda de água. Estas sementes podem permanecer neste estado desidratado de alguns dias a muitos anos, sem perder sua viabilidade. No entanto, há um grupo de sementes que no final da maturação não são capazes de suportar a perda de água, e por isso não passam pela fase IV, necessitando manter um conteúdo relativamente alto de água para se manter viáveis (BEWLEY; BLACK, 1994, p. 136).

A água é encontrada nas sementes na forma livre ou retida (ligada). A livre pode se movimentar de uma região para outra, e pode ser removida de maneira relativamente fácil com a secagem, enquanto a retida exige maior dispêndio de energia para sua movimentação. A água ligada ou subcelular está fortemente associada à superfície de macromoléculas (MARCOS FILHO, 2005, p. 359).

A tolerância à desidratação reflete a habilidade de sobreviver à perda de água estrutural (ligada). Desta forma, pode-se dizer que a natureza das

interações da água estrutural com superfícies macromoleculares é diferente nas células tolerantes e intolerantes, sendo, portanto, um fenômeno complexo. Este processo envolve a interação de ajustes metabólicos e estruturais, permitindo que as células resistam a perdas consideráveis de água sem a ocorrência de prejuízos acentuados. Diferenças nestes fatores resultam em sementes com diferentes níveis de tolerância à desidratação (MARCOS FILHO, 2005, p. 364).

Nas células de organismos tolerantes existe um mecanismo que transforma o citoplasma em um líquido altamente viscoso, que impede ou retarda todas as reações químicas que requerem difusão molecular, retardando ou prevenindo a desnaturação de proteínas e mantendo-as em seu estado estável. Este processo é chamado de vitrificação ou estado vítreo, que também impede que a água da semente torne-se congelável (BEWLEY; BLACK, 1994, p. 137).

A condição fisiológica das sementes em relação à tolerância à dessecação foi inicialmente estudada por Roberts (1973), que classificou as sementes em ortodoxas (tolerantes) e recalcitrantes (não tolerantes). Mais tarde, Ellis *et al* (1990) introduziram o classe das intermediárias, cujo comportamento durante a secagem e armazenamento possui ora características semelhantes às ortodoxas, ora às recalcitrantes. De acordo com esta classificação, são consideradas como ortodoxas aquelas que podem ser desidratadas a valores muito baixos de água, entre 2% e 5%, sem perderem a viabilidade. A longevidade das sementes desse grupo é, dependendo da espécie, aumentada progressivamente com a redução do seu grau de umidade e o armazenamento em baixas temperaturas (ROBERTS, 1973, p. 511-512). Em condições de baixa umidade relativa do ar e de baixa temperatura ambiente, as sementes desse grupo podem ficar armazenadas por muitos anos sem que ocorra perda significativa em sua viabilidade (MEDEIROS, 2001, p. 10).

As sementes classificadas como recalcitrantes são aquelas que, de forma oposta às ortodoxas são muito sensíveis à dessecação (ROBERTS, 1973, p. 513-514), possuem elevado grau de umidade ao se desprenderem da planta mãe, no final da maturação, e morrem quando seu grau de umidade é reduzido a valores abaixo do seu nível crítico de umidade (15 a 50%). Além

disso, não suportam o armazenamento sob temperaturas negativas. Dessa forma a longevidade das sementes recalcitrantes, mesmo em condições favoráveis é curta (MEDEIROS; EIRA, 2006, p. 10; MEDEIROS, 2001, p. 12).

As sementes intermediárias possuem comportamento fisiológico entre as duas classes citadas anteriormente. Ou seja, essas sementes sobrevivem moderadamente à dessecação até atingirem em torno de 8 a 12% de umidade. Entretanto, valores de umidade abaixo deste valor, assim como o armazenamento em temperaturas negativas são prejudiciais à sua longevidade, demonstrando comportamento diferente das sementes tolerantes à dessecação. Assim, sementes com características intermediárias podem ser armazenadas em ambientes bem definidos e controlados a temperaturas baixas (acima de 0°C), por períodos não muito longos (MEDEIROS; EIRA, 2006, p.10; MEDEIROS, 2001, p. 13). A temperatura e o ambiente de armazenamento, bem como a embalagem utilizada, devem ser definidos para cada espécie, ou ainda para cada cultivar, pois as respostas das sementes intermediárias ao armazenamento são muito variáveis (MEDEIROS, 2001, p. 13).

2.2 SEMENTES RECALCITRANTES

A interpretação do significado do termo “recalcitrante” tem sido debatida exaustivamente em inúmeras oportunidades. O significado da palavra remete ao seu desempenho, que foge aos padrões exibidos pelas sementes da maioria das espécies, que são ortodoxas (MARCOS FILHO, 2005, p. 354).

Termos alternativos têm sido propostos, como sensível à dessecação ou não sensível à dessecação, para descrever o comportamento das sementes recalcitrantes e ortodoxas, respectivamente (MARCOS FILHO, 2005, p. 355). Berjak *et al* (1989, p. 101) propuseram o termo “homohydrus” (homohidratado, homoaquoso) para designar as características deste grupo.

Recentemente, a idéia de recalcitrante, ou intolerante à desidratação foi modificada de um fator de “tudo ou nada” para um fator mais quantitativo. Com essa nova perspectiva, sugere-se que sementes recalcitrantes devem ser categorizadas por um valor mínimo de potencial de água que elas poderiam

suportar. Sendo que, o valor mínimo de água irá variar de acordo com a espécie (WALTERS, 2000, p. 8).

Farrant *et al.* (1988, p. 163-165) sugeriram que existem diferentes tipos de sementes recalcitrantes: minimamente, moderadamente e altamente recalcitrantes, e que suas características estão relacionadas, em parte, com o seu habitat. Nas espécies minimamente recalcitrantes, as sementes podem suportar a perda de graus de umidade maiores, e podem permanecer viáveis por períodos mais longos. Estas espécies possuem uma distribuição subtropical, e por isso também toleram temperaturas baixas. Exemplos são sementes de *Quercus* sp., *Araucaria hunsteinii* e *Podocarpus henkelii*. As moderadamente recalcitrantes toleram a perda de conteúdos moderados de água e são sensíveis a temperaturas baixas. Possuem distribuição tropical, como por exemplo, *Theobroma cacao* e *Hevea brasiliensis*. As altamente recalcitrantes toleram a perda de conteúdos de umidades mínimos e não toleram temperaturas baixas. Ocorrem em florestas tropicais e em áreas alagadas e de mangue como *Avicennia marina*.

Na dessecação de sementes recalcitrantes devem ser considerados o grau de umidade de segurança, o grau de umidade crítico e o grau de umidade letal para cada espécie. O grau de umidade de segurança corresponde ao grau de umidade que poderá ser atingido com a secagem sem prejuízos à viabilidade das sementes (HONG; ELLIS, 1992, p. 452); o grau de umidade crítico refere-se ao grau de umidade no qual é detectado o início da perda da viabilidade (ANDRADE; CUNHA, 1996, p. 2), e o grau de umidade letal equivale ao valor a partir da qual todas as sementes perdem a viabilidade (HONG; ELLIS, 1992, p. 452).

Sun e Liang (2001, p. 318) utilizaram diferentes soluções salinas para determinar o nível crítico de secagem de sementes de várias espécies recalcitrantes e intermediárias: *Acer platanooides*, *Acer pseudoplatanus*, *Andira inermis*, *Artocarpus heterophyllus*, *Avicennia alba*, *Azadirachta indica*, *Bruguiera cylindrica*, *Carica papaya*, *Castanea sinensis*, *Citrus aurantifolia*, *Coffea arabica*, *Ginkgo biloba*, *Hevea brasiliensis*, *Lansium domesticum*, *Litchia chinensis*, *Lumitzera racemosa*, *Nephelium lappaceum*, *Quercus rubra*, *Theobroma cacao*, e verificaram níveis de tolerância à desidratação entre -4 e

-73 MPa. Walters (2000, p. 7) relata níveis semelhantes de tolerância à desidratação para várias espécies recalcitrantes (de -1,8 a -50 MPa).

Espécies que possuem sementes recalcitrantes são comuns em florestas tropicais, assim, possuem melhores condições para a germinação e estabelecimento das plântulas, devido às ótimas condições de temperatura e precipitação. Com isso não houve nenhuma pressão para a aquisição da tolerância à dessecação, ou a característica foi secundariamente perdida. Sementes recalcitrantes geralmente são produzidas por espécies clímax e não são frequentemente encontradas no banco de sementes do solo e não possuem dormência, germinam rapidamente, persistindo no solo como um banco de plântulas. São grandes e geralmente não são dispersas pelo vento. Como uma generalização, espécies recalcitrantes de regiões temperadas são geralmente mais tolerantes à dessecação e de vida mais longa do que as de origem tropical (PAMMENTER; BERJAK, 2000, p. 56-69).

Estas espécies adotaram no decorrer do processo evolutivo, uma estratégia de reprodução: sofrem redução menos drástica no grau de umidade durante a maturação e não apresentam período de repouso pós-maturidade. São liberadas da planta-mãe em estado hidratado, com intervalos regulares, em ambientes úmidos e temperaturas elevadas, onde germinam rapidamente. Esta característica representa vantagem na competição com outras espécies. Ao contrário, nas ortodoxas, a desidratação representa um mecanismo de defesa, evitando a germinação em condições desfavoráveis (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998, p. 149).

2.3 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA TOLERÂNCIA À DESIDRATAÇÃO

A tolerância à desidratação é adquirida durante as últimas fases do desenvolvimento das sementes ortodoxas. É nesta fase que ocorrem os processos de acumulação de reservas, redução do volume vacuolar e diminuição do metabolismo. (KERMODE; FINCH-SAVAGE, 2002, p. 149)

Ao contrário das sementes ortodoxas, as sementes recalcitrantes possuem uma ampla variabilidade no grau de umidade no momento da dispersão e também muita variabilidade nas respostas com relação à desidratação. Três tipos de injúria relacionados à desidratação são

visualizados: injúria mecânica associada à redução do volume celular, degradação oxidativa em solução aquosa, decorrente do metabolismo desregulado que ocorre em conteúdos intermediários de água e dano biofísico as estruturas macromoleculares que ocorre quando se remove água em conteúdos muito baixos (PAMMENTER; BERJAK, 2000, p. 56-58).

O primeiro tipo de injúria ocorre somente em sementes com células altamente vacuoladas, e não deve ser muito comum. Em condições normais de secagem lenta, é o segundo tipo de injúria que leva à morte das sementes recalcitrantes, assim a resposta à desidratação depende da atividade metabólica da semente e da taxa de desidratação. É o terceiro tipo de injúria que é letal para tecidos que foram desidratados muito rapidamente (PAMMENTER; BERJAK, 2000, p. 56-58).

Componentes essenciais da tolerância à desidratação em sementes incluem o acúmulo de substâncias protetoras, que limitam os prejuízos induzidos pela perda de água, bem como a capacidade de reparar componentes celulares mediante posterior reidratação. Acredita-se que os açúcares (dissacarídeos, como a sacarose e oligossacarídeos, como a rafinose) desempenham um papel protetor sob condições de déficit hídrico, estabilizando membranas e outros sistemas sensíveis (KERMODE; FINCH-SAVAGE, 2002, p. 164).

Substâncias de reserva (carboidratos, lipídios, proteínas) desempenham papel importante na tolerância à desidratação atuando como protetores por meio do impedimento a ruptura de componentes celulares e a perda de água. Desta forma, verifica-se que mais do que um mecanismo confere tolerância à dessecação em sementes (KERMODE; FINCH-SAVAGE, 2002, p. 164).

2.3.1 Alterações bioquímicas

De um modo geral, os carboidratos, as proteínas e os lipídios são as principais substâncias de reserva das sementes, mas as proporções de cada um desses componentes variam de acordo com a espécie, podendo ser classificadas de acordo com o tipo de reserva predominante em amiláceas, aleuro-amiláceas, oleaginosas, aleuro-oleaginosas e córneas (MARCOS FILHO, 2005, p. 150).

Carboidratos: entre os principais carboidratos de reserva em plantas estão o amido, as frutanas, os oligossacarídeos e os polissacarídeos de reserva de parede celular (BUCKERIDGE *et al.* 2000, p. 138-141).

O amido é uma substância metabolicamente inativa, e depositada em organelas celulares denominadas amiloplastos. O amido é armazenado na forma de amilose e amilopectinas, constituídos por cadeias longas de glucose, sendo a primeira uma cadeia linear e a segunda uma cadeia ramificada (MARCOS FILHO, 2005, p. 152).

Bonome (2006, p. 1) armazenou sementes de *Hevea brasiliensis* e verificou diminuição no teor de amido e açúcares solúveis e redutores. A redução foi atribuída à utilização destes compostos como substratos para a respiração. Em sementes de *Araucaria angustifolia* e *Eugenia uniflora* também foi verificado uma queda no teor de amido, no entanto, o teor de açúcares solúveis totais aumentou, devido à degradação do amido (RAMOS; SOUZA, 1991, p. 22-23; BORDIGNON, 2000, p. 61).

As frutanas, ao lado do amido e da sacarose, são os carboidratos de armazenamento mais abundantes metabolizáveis encontrados nas plantas, por serem formados essencialmente por frutose. Além da função de reserva, as frutanas também atuam como um crio-protetor para a sobrevivência de gramíneas resistentes durante o inverno e também como moléculas que contribuem para a regulação osmótica durante outros tipos de stress ambiental. Por outro lado, os estados de baixa compactação e alta solubilidade das frutanas estão relacionados com uma segunda função desses compostos: controlar o potencial osmótico das células (AVIGAD; DEY, 1997, p. 170).

Como compostos de reserva, o amido e as frutanas possuem as vantagens de serem formados por glucose e frutose respectivamente. Esses açúcares são prontamente utilizados pelo metabolismo de geração de energia e também fornecem carbono para a biossíntese da maioria das biomoléculas presentes em células vegetais (BUCKERIDGE *et al.* 2000, p. 138).

Os polissacarídeos de reserva de parede celular são classificados em três grupos: mananas, que inclui as mananas puras, galactomananas e glucomananas; xiloglucanas e (arabino) galactanas (REID; EDWARDS, 1997, P. 158).

Apesar das diferenças marcantes nas estruturas químicas, os polímeros das mananas, xiloglucanas e (arabino) galactanas possuem propriedades físico-químicas semelhantes. Têm em comum a função de reserva, uma vez que são completamente degradados após a germinação da semente e seus produtos são utilizados como fontes de carbono e energia para o crescimento inicial das plântulas. Por outro lado, cada um deles possui funções secundárias: mananas estão associadas à dureza em endospermas de sementes de palmeiras, tomate e alface; xiloglucanas e galactomananas com relações hídricas em cotilédones e em endosperma de leguminosas e as galactanas no controle da expansão celular nos cotilédones de lupino e em sementes de feijão e soja (BUCKERIDGE *et al.* 2000, p. 140).

As funções de reserva e embebição da galactomanana parecem estar associadas quase que exclusivamente às leguminosas, ao passo que em espécies não-leguminosas é mais evidente a função de dureza e proteção do embrião. Além do papel de reserva, a galactomanana influencia no fluxo de água devido a sua maior solubilidade nos primeiros estágios da germinação. Este polissacarídeo absorve, proporcionalmente, grande quantidade de água e a distribui ao redor do embrião. O endosperma embebido protege o embrião contra perda de água através de um efeito conhecido como “tampão de água”, durante períodos de seca pós-embebição (REID; BEWLEY, 1979, p. 148).

Em sementes de *Coffea arabica*, o acúmulo de galactomananas nas paredes celulares das células parenquimáticas do endosperma podem ser responsáveis pela manutenção do alto teor de umidade das sementes maduras. Como nesta semente o endosperma envolve completamente o embrião, ele estaria protegendo o mesmo de possível injúria por dessecação (BEGNAMI, 1998, p.63).

Além da função de reserva, e de outras funções secundárias como, relações hídricas e controle da expansão celular, os polissacarídeos de reserva também são constituintes da parede celular e podem ser divididos em domínios independentes: celulose-hemicelulose e pectinas, onde as microfibrilas de celulose são envolvidas por hemiceluloses, que são imersos em uma matriz de polímeros pécticos, que cimenta todo o sistema (BUCKERIDGE *et al.* 2000, p. 152).

Os oligossacarídeos consistem de cadeias curtas de monossacarídeos contendo de dois a dez monômeros. São comumente encontrados como reservas menores no embrião e em tecidos de reserva (MARCOS FILHO, 2005, p. 154). Duas classes de oligossacarídeos são encontrados em plantas: os oligossacarídeos primários, e os que são produzidos como resultado da degradação de hidratos de carbono, denominados oligossacarídeos secundários. Os oligossacarídeos primários de armazenamento mais comuns são a galactose, derivados de polióis, a sacarose, a rafinose e a estaquiase (AVIGAD; DEY, 1997, p. 170).

A rafinose é encontrada em maiores concentrações no final da fase de maturação das sementes, quando elas perdem água, e durante a germinação a rafinose e os seus homólogos superiores são degradados em galactose e sacarose. A acumulação de rafinose está muitas vezes ligada à resistência ao frio, e seus níveis podem ser regulados pela temperatura e pelo fotoperíodo (AVIGAD; DEY, 1997, p. 170).

A sacarose é um dissacárido, principal produto de fixação de carbono durante a fotossíntese. Fornece substrato para a síntese de matéria celular e outros produtos de armazenamento, tais como amido e frutanas. A sacarose acumulada nas folhas e em tecidos de armazenamento são mobilizados e utilizados durante a germinação, crescimento e desenvolvimento da planta. A sacarose é armazenada principalmente no vacúolo, que compreende cerca de 70% do volume da célula (AVIGAD; DEY, 1997, p. 170).

A trehalose é um dissacárido não redutor, amplamente distribuído na natureza. Além de servir como armazenamento de energia, a trehalose é vista como tendo um papel importante na proteção da viabilidade celular durante exposição a episódios de estresse, tais como dessecação, aumento da pressão osmótica e temperaturas muito altas, ou muito baixas (AVIGAD; DEY, 1997, p. 170).

A presença de açúcares do tipo rafinose, sacarose, estaquiase e verbascose, acumulados durante a maturação contribuem para a formação de um líquido altamente viscoso no citoplasma das sementes, caracterizando o estado vítreo, que retarda as reações deteriorativas durante a secagem das sementes ortodoxas (MARCOS FILHO, 2005, p. 335; BEWLEY; BLACK, 1994, p. 128). Esses compostos geralmente ocorrem em concentrações mais baixas

nas sementes intolerantes à dessecação, enquanto os monossacarídeos glucose, manose, frutose e galactose predominam (BEWLEY; BLACK, 1994, p. 126).

Bernal-Lugo e Leopold (1992, p. 1207) verificaram que a rafinose presente no embrião de *Zea mays* pode servir como importante componente de protecção contra a deterioração durante o armazenamento, e Blackman *et al.* (1992, p. 225) concluíram que a estaquiose desempenha um papel importante na tolerância à dessecação.

No entanto, Farrant *et al.* (1993, p. 9) relataram alta concentração de sacarose e oligossacarídeos durante o desenvolvimento de sementes recalcitrantes, sugerindo assim que a tolerância à dessecação não ocorreria apenas devido à presença desses açúcares. Fato também observado por Rodrigues *et al.* (2005, p. 75) para as sementes de *Syagrus coronata*, onde o aumento destes açúcares não evitou os efeitos da dessecação na viabilidade das sementes.

Mello (2008, p. 58-62) verificou que à medida que as sementes de *Inga vera* e *Eugenia uniflora* foram secas ocorreu aumento no teor dos carboidratos solúveis, e uma leve redução de amido nas sementes de *I. vera*. O aumento de açúcares solúveis é geralmente associado a mecanismos de protecção a estresses ambientais, como a seca e o frio. No mesmo trabalho, a quantificação de açúcares solúveis das sementes de *Caesalpinia echinata*, *Eritryna speciosa*, *Eugenia uniflora* e *Inga vera* permitiu enquadrá-las em duas categorias: sementes que apresentam maior quantidade de carboidratos solúveis e sementes que apresentam menor quantidade desses compostos. No primeiro grupo enquadram-se as sementes de *C. echinata* e *E. speciosa*, ambas ortodoxas e no outro grupo, as sementes de *I. vera* e *E. uniflora*, que apresentam sensibilidade à dessecação (MELLO, 2008, p. 58-62).

Mello (2008, p. 58-62) também observou que sementes de *Inga vera*, *E. uniflora* e cotilédones de *C. echinata* possuem grande proporção de amido (42-63%), enquanto que os eixos de *C. echinata* e eixos e cotilédones de *E. speciosa* possuem menos de 10% desse polissacarídeo. Essa baixa quantidade de amido poderia ser compensada pela alta proporção de açúcares solúveis. Com a embebição e conseqüente início da germinação, os tecidos embrionários necessitam de energia de rápida mobilização, o que poderia

explicar o acúmulo de açúcares mais facilmente metabolizáveis, como mono ou dissacarídeos, mais eficientes para o desenvolvimento inicial das plântulas.

Lipídios: os lipídios de reserva são os triacilgliceróis, sendo predominantemente nas sementes aqueles com ácidos graxos insaturados. Os ácidos graxos de ocorrência mais comum são os ácidos oléico, linoléico e linolênico, e dentre os ácidos graxos saturados, o palmítico e o esteárico (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000, p. 77). Os lipídios são armazenados em organelas específicas conhecidas como corpos lipídicos (BUCKERIDGE *et al.* 2004, p.44).

A instabilidade química dos lipídios constitui um dos fatores preponderantes na queda da viabilidade das sementes de várias espécies. As principais alterações em lipídios durante a deterioração são devido à hidrólise enzimática, à peroxidação e à autooxidação. Como resultado, há a formação de glicerol e ácidos graxos livres, além de radicais livres e produtos tóxicos como aldeídos, ácidos, alcoóis e cetonas (MARCOS FILHO, 2005, p. 308).

De acordo com Bewley e Black (1994, p. 409) a peroxidação de lipídios inicia-se com a remoção de um hidrogênio de um grupo metil adjacente à dupla ligação de um ácido graxo insaturado, para produção de um radical livre. Este reage com o oxigênio molecular, resultando em um rearranjo na cadeia do ácido graxo, culminando com a formação de um radical peróxido. O radical peróxido, por sua vez, reage com outro ácido graxo insaturado, formando um hidroperóxido, o qual é instável e se degrada favorecendo a formação de novos radicais livres, perpetuando o processo.

Segundo Abdul-Baki e Anderson (1972, p. 292) em sementes oleaginosas, uma das principais alterações associadas à deterioração é sua acidificação, responsável pelo aumento de ácidos graxos, fosfatos ácidos e de aminoácidos, produzidos pela ação das lípases, fitases e proteases.

Bonome (2006, p. 1) armazenou sementes de *Hevea brasiliensis* e observou biossíntese, degradação, peroxidação e coalescência de corpos lipídicos, fatores fortemente correlacionados com a deterioração de sementes. A diminuição no número de glóbulos lipídicos também foi observada em sementes de *Melanoxylon brauna* envelhecidas artificialmente, e sementes inviáveis de *Coffea arabica* (CORTE, 2008, p 113-115; BEGNAMI, 1998, p. 44-45).

Mello (2008, p. 78-80) estudando sementes recalcitrantes e ortodoxas, observou que eixos embrionários e cotilédones de *Eritryna speciosa* e *Caesalpinia echinata* apresentaram rendimento de lipídios muito superior às sementes recalcitrantes estudadas (*Inga vera* e *Eugenia uniflora*), dando indícios de que a maior quantidade de lipídios poderia estar associada a mecanismos de proteção contra estresse hídrico.

Proteínas: as proteínas são os componentes básicos de toda célula viva. São polímeros de aminoácidos sintetizados biologicamente na célula e funcionam como enzimas, componentes estruturais e materiais de reserva. Observa-se que, dentre os componentes químicos da semente, as proteínas sempre se apresentam em menor proporção do que os carboidratos ou os lipídios (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000, p. 83).

Os principais grupos de proteínas de reserva estão divididas em prolaminas, gluteínas, globulinas e albuminas, de acordo com a sua solubilidade (BUCKERIDGE *et al.* 2004, p. 47), e encontram-se normalmente depositadas em organelas celulares denominadas corpúsculos de proteína. Estes corpúsculos podem ocorrer em todo o embrião ou endosperma, ou, outras vezes, restringirem-se a uma camada (camada de aleurona) (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000, p. 86).

Podem ser destacadas as seguintes alterações relacionadas às proteínas durante a deterioração: decréscimo do teor e síntese de proteínas, acréscimo no teor de aminoácidos e decréscimo no conteúdo de proteínas solúveis (MARCOS FILHO, 2005, p. 311).

Outro fenômeno importante na deterioração são as reações de Amadori e Maillard, que durante o envelhecimento das sementes produzem substâncias semelhantes à peroxidação de lipídios, com ações prejudiciais à atuação das proteínas. Esta reação ocorre por meio do ataque de açúcares redutores aos grupos amino das proteínas (MARCOS FILHO, 2005, p. 310).

A destruição de aminoácidos durante a deterioração de sementes, devido à síntese ou ativação de grande quantidade de enzimas proteolíticas pode provocar sérias perturbações no funcionamento das células, em função de sua importância como precursores de substâncias essenciais, participação em reações metabólicas vitais e por constituírem unidades básicas para a síntese de proteínas (BONOME, 2006, p. 18). Este mesmo autor verificou que

os teores de proteínas solúveis decresceram durante o armazenamento de sementes de *Hevea brasiliensis*, provavelmente devido à degradação de proteínas com o aumento da atividade proteolítica.

Um grupo de proteínas denominadas *late embryogenesis abundant* (LEA) tem recebido grande atenção por parte dos pesquisadores, e dentre elas, as da família LEA D11, também conhecidas por deidrinas. Além de se acumularem nas sementes no final da maturação, essas proteínas são produzidas por partes vegetais da planta, em resposta a estresses ambientais, como o hídrico. Atualmente, as deidrinas, por sua natureza anfipática, de comportamento tanto hidrofóbico como hidrofílico, são capazes de inibir a desnaturação de várias macromoléculas e estabilizar estruturas intracelulares sob condições de estresse, e até agir como substitutas para a película de água (MARCOS FILHO, 2005, p. 368; BEWLEY; BLACK, 1994, p. 128).

As proteínas do tipo LEA têm sido detectadas em várias espécies recalcitrantes de clima temperado, mas sua ação não tem sido identificada de maneira consistente. Sendo assim, a simples constatação da presença delas não seria suficiente para conferir a resistência ou tolerância à desidratação (MARCOS FILHO, 2005, p. 368).

2.3.2 Alterações estruturais

Uma das indicações mais evidentes do estresse hídrico é a redução da turgidez celular, podendo ocorrer colapso na célula e a desorganização das membranas. Nas sementes mais tolerantes à dessecação, a redução do volume celular é mais discreta (BEWLEY; BLACK, 1985, p. 110-112), devido a redução do volume dos vacúolos (MARCOS FILHO, 2005, p. 366).

Pammenter e Berjak (2000, p. 56-59) estudaram sementes de *Phaseolus vulgaris*, *Avicennia marina* e *Aesculus hippocastanum* em três estádios de desenvolvimento e verificaram que as células de *A. marina*, a espécie mais sensível à desidratação, se apresentaram altamente vacuolizadas, enquanto que as mais tolerantes mostraram uma diminuição na vacuolização com o desenvolvimento.

A desidratação também pode promover a desintegração do citoesqueleto, do citoplasma e do núcleo devido a perda da capacidade de

regeneração quando a semente é novamente hidratada, fato geralmente observado em sementes recalcitrantes (MARCOS FILHO, 2005, p. 366).

Cho *et al* (2001, p. 125-134) acondicionaram sementes de *Machilus thunbergii* em 100% e 75% de umidade relativa do ar e realizaram análises anatômicas para verificar os danos ocorridos nas sementes. Nas acondicionadas em 100% UR não foi observado alterações estruturais. No entanto, nas armazenadas em 75% UR, a dessecação causou danos celulares (vacuolização). Sendo que, após uma semana de secagem, as mitocôndrias das células da plúmula e radícula estavam menos organizadas, e houve um aumento acentuado na vacuolização. Após duas semanas de secagem ocorreram danos na membrana das células.

Justo *et al.* (2007, p. 539-551) estudando os efeitos da secagem em sementes de *Eugenia pyriformis* também verificaram vacuolização em algumas células da medula do eixo embrionário, característica típica de sementes recalcitrantes com limitada tolerância à dessecação. Foi observada também uma progressiva desestruturação do conteúdo citoplasmático nas células do meristema fundamental das sementes submetidas à secagem.

Begnami (1998, p. 34-43) e Panza *et al.* (2007, p. 387-388) observaram danos celulares em sementes inviáveis de *Coffea arabica* e *Euterpe edulis*: compactação crescente da cromatina, núcleos picnóticos, paredes celulares retraídas e plasmólise.

Em sementes de *Glycine max*, observou-se acentuada redução de volume celular, que pode ter ocasionado a ruptura de plasmodesmas nos três sistemas de tecidos fundamentais (dérmico, fundamental e vascular) (SILVA *et al*, 2007, p. 18).

A perda da viabilidade das sementes também está fortemente correlacionada com a perda gradativa da integridade do sistema de membranas acarretando a liberação de solutos celulares, importantes para o funcionamento da célula. A permeabilidade seletiva das membranas tem sido avaliada nos testes de condutividade elétrica e de lixiviação do potássio (MARCOS FILHO, 2005, p. 318).

A ruptura de membranas por causa do envelhecimento das sementes pode levar a diversas alterações metabólicas, o que contribui para diferentes graus de deterioração e a perda da viabilidade e vigor. A perda da integridade

da membrana em sementes deterioradas pode ocasionar a perda de açúcares, diminuindo a quantidade de substrato respirável, e também colaborando para o desenvolvimento de microorganismos (BEWLEY; BLACK, 1994, p. 408).

A desestabilização de membranas e macromoléculas em condições adversas tem sido objeto de pesquisas por várias décadas. Sabe-se que os ácidos graxos insaturados presentes nos fosfolipídios da membrana são altamente suscetíveis à degradação peroxidativa, resultando na destruição do ácido graxo e na geração de uma série de produtos potencialmente tóxicos (BEWLEY; BLACK, 1994, p. 408).

2.3.3 Acúmulo de substâncias tóxicas e atividade enzimática

Os sistemas antioxidativos estão presentes nos diferentes tecidos das plantas, com a função de impedir o acúmulo de substâncias tóxicas gerado pela oxidação. Esses sistemas protetores são compostos de constituintes enzimáticos e não enzimáticos, sendo os enzimáticos de fundamental importância, pois são os primeiros a agir, evitando o acúmulo do radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. No sistema enzimático, merecem destaque as enzimas superóxido dismutase, a catalase e a peroxidase, que são enzimas removedoras de radicais livres e de peróxidos, denominadas *scavenging* (BONOME, 2006, p. 20).

Outro fator que pode estar envolvido com a perda da viabilidade das sementes recalcitrantes é a formação de radicais livres, que são citotóxicos e podem reagir com H_2O_2 para a produção de oxigênio e radicais hidroxila (OH). Ambos altamente oxidativos podem destruir grandes polímeros, incluindo lipídios de membrana. Nas células normais existem mecanismos que impedem a formação destes radicais, como por exemplo, a enzima superóxido dismutase, que converte o radical superóxido de H_2O_2 que por sua vez é eliminado por catalases (BEWLEY; BLACK, 1985, p. 110-112).

É possível que, durante o envelhecimento das sementes o equilíbrio entre os radicais livres e a produção de sistemas enzimáticos protetores seja perturbado em favor do primeiro. Isto levaria a progressiva inativação de enzimas, desnaturação de outras proteínas, e de perturbação da integridade do

DNA e RNA, devido à atividade descontrolada de radicais livres. Além disso, a membrana se tornaria mais permeável (BEWLEY; BLACK, 1985, p. 110-112).

Há também uma boa correlação entre a viabilidade das sementes e a atividade das desidrogenases, que estão relacionadas com a atividade respiratória da semente, e nela se baseia o teste de tetrazólio (POPINIGIS, 1977, p. 151). Este teste é atualmente, o melhor teste bioquímico para avaliar a viabilidade de sementes. A respiração é um processo influenciado pela atividade de um grupo de enzimas que agem como catalisadores da decomposição de substâncias de reserva. À medida que, as sementes deterioram, a respiração se torna gradativamente menos intensa e tem como consequência final o colapso metabólico da semente (MARCOS FILHO, 2005, p. 299).

Em sementes de *Glycine max* foram verificados decréscimos na atividade das enzimas esterase e malato desidrogenase durante o armazenamento (VIEIRA, 2009, p. 53).

Acréscimos nas atividades de lipases e fosfolipases também têm sido evidenciados em várias pesquisas, ocasionando aumento dos níveis de ácidos graxos livres, um sintoma clássico de deterioração, e hidrólise de fosfolipídios, ocasionando distúrbios às membranas e a conversão de ATP em ADP (MARCOS FILHO, 2005, p. 303-304).

A atividade de amilases, catalisadoras da digestão do amido é intensa em sementes úmidas, mas, em geral, a deterioração é mais rápida quando o grau de umidade supera 20%. A elevação da atividade das proteases também é verificada durante o envelhecimento, pois ocorre a mobilização de proteínas, acompanhando o acréscimo na atividade respiratória (MARCOS FILHO, 2005, p. 304).

Begnami (1998, p. 34-42) e Bordignon (2000, p. 61) verificaram em sementes inviáveis de *Coffea arabica* e *Campomanesia xanthocarpa* uma maior deposição de compostos fenólicos.

2.4 ARMAZENAMENTO

O armazenamento de sementes consiste em guardar sementes obtidas numa determinada ocasião, procurando manter a sua máxima qualidade

fisiológica, física e sanitária, objetivando seu uso no futuro (MEDEIROS, 2001, p. 7; MEDEIROS; EIRA, 2006, p. 8).

As sementes geralmente possuem, por ocasião da maturidade fisiológica, a máxima qualidade em termos de germinação e vigor. A partir deste período tende a ocorrer uma queda progressiva da sua qualidade, pelo processo de deterioração. Depois que as sementes são colhidas e antes de serem comercializadas ou utilizadas para semeadura, elas devem ser armazenadas adequadamente, a fim de reduzir ao mínimo o processo de deterioração (CARNEIRO; AGUIAR, p. 333).

O armazenamento também visa suprir épocas de falta de sementes, pois algumas espécies só frutificam de dois em dois anos, e em outros casos as condições naturais em determinado ano não permitem a frutificação de algumas espécies, como por exemplo, excesso ou falta de chuva (SOUZA *et al*, 1980, p. 17).

A temperatura e a umidade relativa do ar, onde as sementes são armazenadas são os principais fatores que afetam a sua qualidade fisiológica. A umidade relativa do ar controla o teor de umidade da semente, enquanto a temperatura afeta os processos bioquímicos (POPINIGIS, 1977, p. 218). Regras empíricas indicam que a longevidade das sementes, que toleram secagem, é duplicada a cada 1% de diminuição no seu grau de umidade, ou a cada 5,5°C de diminuição na temperatura, até um certo limite, que pode variar com a espécie (VILLELA; PERES, 2004, p. 277).

A umidade da semente é função da umidade relativa do ar e da temperatura, pois sendo higroscópicas, as sementes absorvem ou perdem umidade até entrarem em equilíbrio com o ar ambiente (POPINIGIS, 1977, p. 224).

Sementes de diferentes espécies apresentam teor de umidade de equilíbrio diferente, à mesma temperatura e umidade relativa do ar. Essas diferenças são devidas, principalmente à composição química da semente. As proteínas são as mais higroscópicas, sendo em menor grau as celuloses e o amido, enquanto que os lipídios são essencialmente hidrofóbicos. Assim, a uma mesma umidade relativa do ar, uma semente com teor elevado de proteína ou amido e baixo teor de óleo apresentará teor de umidade muito mais

elevado que outras, com composição predominantemente oleaginosa (POPINIGIS, 1977, p. 224).

O alto teor de umidade é a maior causa de redução na qualidade fisiológica da semente armazenada. Quanto maior o teor de umidade das sementes armazenadas, maior o número de fatores adversos à conservação de sua qualidade fisiológica. Em geral, elevados teores de umidade favorecem a elevação da temperatura, devido aos processos respiratórios e maior atividade de microorganismos e insetos (POPINIGIS, 1977, p. 216).

A principal técnica para conservação de sementes durante o armazenamento é a redução do seu metabolismo, através da remoção de água por meios artificiais e da redução da temperatura. Contudo, nem todas as sementes toleram redução da temperatura e secagem (MELLO, 2008, p. 6)

A preservação da qualidade fisiológica de sementes sob determinadas condições ambientais de temperatura e umidade relativa do ar é influenciada pelo tipo de embalagem utilizada (VILLELA; PERES, 2004, p. 280).

As embalagens empregadas são divididas em três tipos, pelo grau de permeabilidade ao vapor de água: as permeáveis permitem troca de umidade entre a semente e o ambiente exterior da embalagem, é empregado quando o período de conservação é relativamente curto (sacos de pano, sacos plásticos perfurados e sacos de papel); as semipermeáveis não são totalmente herméticas, porque embora restrinjam a passagem de água, permitem a troca de vapor d'água, como os sacos plásticos de 100 a 200 μm de espessura; e as impermeáveis não permitem a troca de vapor d'água, são herméticas e nesse grupo estão os sacos trifoliados de polietileno e alumínio, latas de alumínio e recipientes de vidro com anel de borracha para a vedação da tampa (MEDEIROS, 2001, p. 17; CARNEIRO; AGUIAR, p. 340; VILLELA; PERES, 2004, p. 280, POPINIGIS, 1977, p. 225).

Em um experimento realizado com sementes de *Inga edulis*, Bacchi (1961, p. 808) verificou que os resultados menos favoráveis foram obtidos com recipientes permeáveis, pois a desidratação das sementes foi muito rápida, perdendo a viabilidade na primeira semana de armazenamento. Em recipientes hermeticamente fechados, não houve perda de água nas sementes, porém após 7 dias perderam a viabilidade, provavelmente devido ao acúmulo de CO_2 .

Em recipiente semipermeável as sementes se mantiveram viáveis por 60 dias, já que não houve acúmulo de gases e nem perda significativa de água.

Sementes de *Calophyllum brasiliense* e *Hevea brasiliensis* armazenadas em embalagem semipermeável (sacos de polietileno) se mantiveram viáveis por 9 e 7 meses, respectivamente (NERY, 2006, p. 1; BONOME, 2006, p. 39). Utilizando o mesmo tipo de embalagem, Carvalho (2006b, p. 1) armazenou as sementes de *Nectandra nitidula*, *Nectandra grandiflora*, *Nectandra lanceolata*, *Ocotea pulchella* e *Persea pyrifolia* por 12 meses.

Durante o armazenamento a presença de fungos e insetos acelera a taxa de deterioração das sementes, reduzem a porcentagem de germinação e o vigor das sementes, e aumentam a quantidade de plântulas anormais. De modo geral, quanto menor a temperatura e o teor de umidade da semente mais reduzida a atividade e desenvolvimento de fungos e insetos (POPINIGIS, 1977, p. 232). A atividade dos fungos durante o armazenamento ocorre quando o grau de umidade das sementes ultrapassa 13% e se acentua ao atingir valores superiores a 25% (MARCOS FILHO, 2005, p. 376).

A contaminação com fungos é um grande problema para o armazenamento de sementes recalcitrantes, as quais precisam ser mantidas com alto grau de umidade, que é condição favorável ao desenvolvimento desses fungos. Para evitar isso há a necessidade da realização de tratamento com fungicida, após proceder a secagem parcial das sementes, seguindo-se de armazenamento em temperatura a mais baixa que a espécie tolerar (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000, p. 505). No entanto, algumas espécies não toleram armazenamento a temperaturas muito baixas, e o fungicida pode ter efeito fitotóxico nas sementes.

A composição química das sementes também pode influenciar no potencial de armazenamento, pois sementes de diferentes espécies geralmente se comportam de maneira distinta quando mantidas em ambientes com a mesma umidade relativa do ar. Sementes ricas em lipídios têm um ponto de equilíbrio higroscópico inferior ao das ricas em amido. Isto ocorre porque os lipídios são hidrofóbicos e o amido hidrofílico, assim as sementes amiláceas podem captar maior quantidade de água do ambiente (MARCOS FILHO, 2005, p. 166).

Ao mesmo tempo, é importante ressaltar que as sementes oleaginosas apresentam menor potencial de armazenamento que as amiláceas, devido à menor estabilidade química dos lipídios. E uma elevação moderada da temperatura, como conseqüência do processo respiratório, é suficiente para a decomposição dos lipídios e elevação da taxa de deterioração. O teor elevado de proteínas também pode contribuir para a redução do potencial de armazenamento, devido à elevada afinidade dessa substância com a água (MARCOS FILHO, 2005, p. 166).

Sementes de muitas espécies florestais tolerantes à desidratação permanecerão viáveis por dois anos, mesmo quando armazenadas em temperaturas de 18 a 22°C, se elas forem desidratadas a valores abaixo de 5 a 7% de umidade e embaladas hermeticamente (MEDEIROS, 2001, p. 18), ou por períodos mais prolongados quando armazenadas a baixas temperaturas (VILLELA; PERES, 2004, p. 276). No entanto, existe pouca informação a respeito da conservação de sementes não tolerantes à desidratação, pois estas não podem ser desidratadas a valores tão baixos, necessitando ser mantidas com teores elevados de umidade (MEDEIROS, 2001, p. 18).

Há um limite mínimo do grau de umidade, abaixo do qual não há danos à germinação das sementes recalcitrantes. Desta forma, o grau de umidade das sementes recalcitrantes e a temperatura de armazenamento devem ser reduzidos até perto do valor mínimo crítico (BARBEDO; BILIA, 1998, p. 123).

Outro fator que dificulta o armazenamento de espécies recalcitrantes é que algumas não toleram temperaturas baixas, devido ao seu elevado teor de umidade. Acima de determinados níveis de hidratação, a água torna-se congelável, tanto nas sementes intolerantes à dessecação quanto nas tolerantes, podendo ocasionar danos pela formação de cristais de gelo nos tecidos e levando à perda da viabilidade (MARCOS FILHO, 2005, p. 378).

O armazenamento de sementes de *Cupania vernalis* e *Inga uruguensis* foi favorecido pela secagem parcial. Sementes com 40% e 50% de umidade armazenadas em sacos de polietileno na temperatura de 10°C se mantiveram viáveis por 240 e 60 dias, respectivamente (VIEIRA *et al.*, 2008, p. 448; BILIA *et al.*, 1998, p. 48).

Nas sementes de *Myrciaria dubia* a secagem das sementes e o armazenamento em temperaturas de 10°C não foram favoráveis ao

armazenamento, sendo que as melhores condições foram obtidas utilizando sementes com 46% de umidade sob temperatura de 20°C (FERREIRA; GENTIL, 2003, p. 440).

A criopreservação de embriões é uma alternativa promissora para a conservação de sementes recalcitrantes. A técnica consiste em colocar as sementes ou os embriões em contato com nitrogênio líquido a -196°C. No entanto, esta é uma técnica complexa, sendo necessário o monitoramento da velocidade de congelamento e da temperatura de pré-congelamento, para que não haja prejuízos à viabilidade do material. Além disso, outros fatores tornam-se limitantes à utilização desta técnica como sementes muito grandes e sementes intolerantes à secagem e ao congelamento (MARCOS FILHO, 2005, p. 378).

2.5 ESPÉCIES DE ESTUDO

2.5.1 *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg

Classificação botânica: segundo o sistema de classificação APG II *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg é assim classificada:

Grupo: Angiospermae

Núcleo: Eucotyledoneae

Clado: Eurosidae

Ordem: Myrtales

Família: Myrtaceae

Nomes populares: no Brasil *B. salicifolius* é conhecida por murta, cambuí, cambuim, maria-preta, murtinha, guruçuca, pitanga-da-várzea, vassourinha, guabiju, pitangueira-do-banhado, piúna-preta, murteira, guabiroba e guamirim (CARVALHO, 2006, p. 381-382; LANDRUM, 1986, 127-129; LORENZI, 1998, p. 244).

Distribuição geográfica: ocorre no Paraguai, Uruguai, Argentina (Misiones a Jujuy), Bolívia e Equador. No Brasil, se distribui nos estados da Bahia, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. É encontrada na Floresta Estacional Decidual na

formação Submontana, na Floresta Estacional Semidecidual nas formações Montana e Alto-Montana, na Floresta Ombrófila Densa nas formações Alto-Montana, na Floresta Ombrófila Mista nas formações Aluvial e Montana, em Vegetação com Influência Marinha (Restinga), no Cerrado e Cerradão, e em Estepes ou Campos (CARVALHO, 2006, p. 383-384).

Características morfológicas: folhas simples, opostas, membranáceas, discoloradas, escuras e brilhantes na face adaxial e mais claras na face abaxial, com glândulas laminares translúcidas, e de formas muito variadas: elípticas, lanceoladas, lineares, ovadas ou obovadas, ápice agudo, atenuado ou acuminado e base arredondada, aguda, acuminada ou acuneada, margem inteira, glabra a moderadamente pilosa e densa nervação secundária, limbo muito variável segundo a procedência do material, mede de 1,5 a 7 cm de comprimento e 0,4 a 2,5 cm de largura, nervura central saliente em ambas as faces, nervuras laterais com até 20 pares, planas ou pouco salientes em ambas as faces. O pecíolo mede de 1,5 a 10 mm de comprimento e 0,5 a 1 mm de largura, é glabro a densamente piloso, e sem estípulas (LANDRUM, 1986, p. 127; MARCHIORI; SOBRAL, 1997, p. 77; MORAIS; LOMBARDI, 2006, p. 8; SILVA JÚNIOR, 2005, p. 128).

Flores andróginas de cor creme, reunidas em dicásios de 3 a 15 flores, mais curtos do que as folhas, lobos do cálice fortemente côncavos, sub-orbiculares, com aproximadamente 1,5 a 2 mm de comprimento, pecíolo glabro ou piloso, caduco na antese com a margem pilosa, tetrâmeras, dialipétalas, com aproximadamente 2 a 3 mm de diâmetro, glabras, exceto na margem que é ciliada, ou com menos freqüência escassamente pilosas, bractéolas lineares com cerca de 0,5 mm de comprimento, geralmente caducas antes da antese, hipanto com aproximadamente 2 mm de comprimento, geralmente glabro, com menor freqüência escassamente piloso, androceu com 80 a 160 estames de 3 a 7 mm de comprimento. Anteras com 0,2 a 0,3 mm de comprimento. No gineceu o ovário possui dois lóculos e 4 a 17 óvulos por lóculo. A floração ocorre de agosto a janeiro, e a polinização é realizada por abelhas e diversos insetos pequenos (CARVALHO, 2006, p. 382; LANDRUM, 1986, p. 127; MARCHIORI; SOBRAL, 1997, p. 77; MORAIS; LOMBARDI, 2006, p. 8; SILVA JÚNIOR, 2005, p. 128).

A maturação dos frutos ocorre de janeiro a março e a dispersão dos frutos e sementes é zoocórica, realizada principalmente pela avifauna e pelo lagarto-teiú (*Theju tupinamba*) (CARVALHO, 2006, p. 382). Os frutos são glabros, de forma globosa, possuem cálice marcescente, de 1 a 3 sementes por fruto e em média 5,29 mm de comprimento e 5,49 mm de diâmetro. O epicarpo tem pouca espessura, é liso, possui as colorações verde, amarela, laranja e vermelha, e glândulas por toda a superfície, mesocarpo de cor laranja, semitransparente e carnoso (REGO *et al.*, 2010, p. 65).

As sementes possuem forma de espiral, com base e ápice arredondados e uma reentrância lateral, possui em média 3,63 mm de comprimento, 3,13 mm de largura e 2,19 mm de espessura. O tegumento é liso, membranáceo, de coloração castanha, translúcido, permitindo a visualização do embrião verde escuro. A micrópila é visível e se localiza na base do hipocótilo, sem endosperma, embrião hipocotilar, axial e invaginado. Os cotilédones rudimentares possuem a forma de duas asas membranáceas. O embrião é do tipo pimentóide de coloração verde escura e o hipocótilo e os cotilédones possuem glândulas por toda a superfície (REGO *et al.*, 2010, p.66).

Características dendrológicas: a murta é uma árvore de pequeno porte até grande (4 a 30 m), de tronco geralmente reto, podendo chegar a 40 cm de DAP (diâmetro à altura do peito). Casca espessa, marrom-escura, marcada por fissuras longitudinais, com espessura de até 20 mm. A copa é globosa ou irregular, possui ramificação cimosas e finos ramos pendentes (CARVALHO, 2006, p. 382; LORENZI, 1998, p. 244; MARCHIORI; SOBRAL, 1997, p. 77; SILVA JÚNIOR, 2005, p.128).

Aspectos ecológicos: *B. salicifolius* é considerada uma espécie secundária tardia ou clímax exigente de luz (CARVALHO, 2006, p. 383), perenifólia, seletiva higrófila, heliófila até esciófila, desenvolvendo-se nos mais variados ambientes ou estágios da vegetação, desde campos abertos até sub-bosques desenvolvidos. É frequente nos ambientes ripários e na Floresta Ombrófila Mista, situados em solos úmidos (LORENZI, 1998, p. 244). É sem dúvida uma das mirtáceas mais expressivas na Floresta Ombrófila Mista, que já se encontram em estágios mais desenvolvidos (LEGRAND; KLEIN, 1978, p. 789).

Usos: a madeira é empregada em obras internas de construção civil, para tabuado em geral e, sobretudo para lenha. Apresenta porte ornamental e pode ser aproveitada para o paisagismo (LORENZI, 1998, p. 244). É apropriada para plantios ao longo das margens de rios, por ocorrer naturalmente nestes ambientes e por atrair aves dispersoras de sementes (CARVALHO, 2006, p. 386; SILVA JÚNIOR, 2005, p. 128).

2.5.2 *Casearia decandra* Jacq.

Classificação botânica: segundo o sistema de classificação APG II *Casearia decandra* Jacq é assim classificada:

Grupo: Angiospermae

Núcleo: Eucotyledoneae

Clado: Eurosidae

Ordem Malpighiales

Família: Salicaceae

Nomes populares: guaçatunga, cambroé, pitumba ou cafezeiro do mato (LONGHI, 1995, p. 107; LORENZI, 1998, p. 101; MARCHIORI, 1997, p. 226; KLEIN; SLEUMER, 1984, p. 58).

Distribuição geográfica: ocorre na Colômbia, Venezuela, Trindade, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Equador, Peru, Paraguai, Uruguai, Argentina e Brasil. No Brasil ocorre nos estados do Amazonas, Roraima, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Pernambuco, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (LONGHI, 1995, p. 107; MARQUETE *et al.*, 2007, p. 714).

Pode ser encontrada na Floresta Ombrófila Mista e Densa, na Floresta Estacional Decidual, Savana, Formações Pioneiras com Influência Marinha (Restinga) e Floresta Aluvial, comum desde as terras baixas até 1.000 m de altitude (KLEIN; SLEUMER, 1984, p. 61; LONGHI, 1995, p. 107; LORENZI, 1998, p. 101; MARCHIORI, 1997, p. 226).

Características morfológicas: folhas decíduas, elíptico-lanceoladas até elípticas ou ovado-elípticas, ápice mais ou menos longo-acuminado, agudo, base ligeiramente inequilateral, cuneada ou arredondada, inicialmente membranáceas e tornando-se escuras em estado seco, quando maduras

cartáceas até subcoriáceas e pardas quando secas, brilhantes na face adaxial, geralmente glabras em ambas as faces, muito raramente pubescentes na face abaxial, serreadas até crenadas, nervuras laterais pares, longamente curvado-ascendentes, ligeiramente salientes em ambas as faces, estípulas linear-subuladas, subglabras e caducas (KLEIN; SLEUMER, 1984, p. 56).

Inflorescência em fascículos ou multiflorais, geralmente nós desfolhados em brotos anótimos surgindo com, ou um pouco antes das folhas novas; brácteas basais numerosas, ovadas, escariosas, foscas, subglabras; pedicelos articulados acima da base, pubérulos na antese, ligeiramente acrescentes no fruto. Sépalas 5, lanceolado-oblongas, de coloração branca, creme ou esverdeada, fragrantas, cinzento ou amarelo-pubérulas. Androceu com 10 estames, subequilongos; filamentos pubescentes ou glabros; anteras elipsóideas, aglandulares. Gineceu com ovário ovóideo, pontudo para o estilete, subdensamente piloso, estigma capitado. Floresce durante os meses de setembro, outubro e novembro, produzindo uma enorme quantidade de flores, que exalam um aroma forte e peculiar, que atrai as abelhas (KLEIN; SLEUMER, 1984, p. 58-61).

Os frutos amadurecem durante os meses de dezembro, janeiro e fevereiro, são comestíveis e muito procurados pelas aves, responsáveis pela larga dispersão da espécie (KLEIN; SLEUMER, 1984, p. 61). O fruto do tipo cápsula loculicida tardiamente deiscente (BARROSO, 1999), esférico, com pericarpo seco, pouco espesso, com superfície glabra, lisa e amarela-clara, mede de 6,8 a 11,2 cm (HALISKI *et al.*, 2012, não publicado)¹.

Sementes elipsóides, tegumento cartáceo, creme, levemente estriado e possuem em média 4,0 mm de comprimento, 3,2 mm de largura e 2,2 mm de espessura. Ao redor destas ocorre arilo carnoso, alaranjado, que preenche completamente o fruto, podendo ser confundido com mesocarpo. A semente possui endosperma carnoso e o embrião é axial, foliáceo, espatulado, dominante à total, verde-claro, com eixo curto e paracotilédones cordiformes (HALISKI *et al.*, 2012, não publicado)¹.

¹ HALISKI, S. *et al.* **Caracterização morfológica e germinação de sementes de *Casearia decandra* Jacq.** Curitiba, 2012. Não publicado.

Características dendrológicas: é uma espécie arbórea de pequeno porte até grande (4 a 18m de altura), tronco até 40 cm de diâmetro, curto e reto, casca grisalha ou castanha, áspera, finamente fendilhada descamação em pequenas placas, casca interna creme, ramificação racemosa com ramos finos horizontais, delgados, pontas pubérulas, partes mais velhas glabrescentes e cobertas com cortiça parda e lenticelas elípticas até arredondadas, formando copa alta, em geral paucifoliada (LONGHI, 1995, p. 107; LORENZI, 1998, p. 101; MARCHIORI, 1997, p. 226; KLEIN; SLEUMER, 1984, p. 56-58).

Aspectos ecológicos: espécie decídua, secundária tardia, de luz difusa até esciófila e seletiva higrófila, apresenta vasta e expressiva dispersão por praticamente todo o Sul do Brasil, em vários tipos de formações florestais, preferencialmente nos sub-bosques da Floresta Ombrófila Mista, onde se torna particularmente abundante (KLEIN; SLEUMER, 1984, p. 59; LONGHI, 1995, p. 107).

Usos: produz uma enorme quantidade de flores brancas, que exalam um aroma forte e peculiar, que atrai as abelhas, fornecendo assim uma grande quantidade de mel de excelente qualidade. Os frutos são comestíveis e muito procurados pelas aves (KLEIN; SLEUMER, 1984, p. 61). Trata-se, portanto, de uma espécie útil para recuperação de áreas degradadas, considerando sua relevância ecológica. Segundo Pio Correa (1984, p. 582) a espécie tem uso medicinal, a casca pulverizada é utilizada contra feridas e úlceras. Atualmente encontram-se estudos sobre suas propriedades farmacológicas, devido a extensivas investigações sobre as propriedades terapêuticas das espécies de *Casearia*, principalmente de *C. sylvestris* (THADEO *et al.*, 2009, p. 330).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DE FRUTOS E OBTENÇÃO DE SEMENTES

Os frutos de *B. salicifolius* foram obtidos de 12 matrizes em Março de 2009 e 2010, em um fragmento de Floresta Ombrófila Mista Aluvial localizada no município de Araucária – PR, e os de *C. decandra* de 12 matrizes em Novembro de 2009 e 2011, em um fragmento de Floresta Ombrófila Mista na região urbana de Curitiba – PR.

As matrizes não foram selecionadas a partir de características fenológicas, apenas adotou-se o critério de seleção a distância mínima entre elas de no mínimo 50 m.

Nos municípios onde foram realizadas as coletas dos frutos, o clima segundo a classificação de Koeppen é subtropical úmido mesotérmico (Cfb), com verões frescos, invernos com ocorrência de geadas severas e freqüentes e não apresenta estação seca. A temperatura média máxima anual é de 23 a 24 °C, a mínima de 15 a 16 °C e a média de 16 a 18 °C, e a precipitação média anual é de 1400 a 1600 mm/ ano (IAPAR, 2011).

Amostras do material botânico de *B. salicifolius* e *C. decandra* foram coletadas e realizadas exsiccatas que receberam a numeração 10187 e 10589, respectivamente. As exsiccatas estão depositadas no Herbário Escola de Florestas de Curitiba da Universidade Federal do Paraná (EEFC).

Os frutos foram beneficiados manualmente por meio de lavagem em água corrente, com o auxílio de um pano para macerar os frutos, pois as sementes são muito frágeis, podendo ser danificadas. As sementes foram dispostas sobre papel toalha em condições de ambiente de laboratório durante 24 horas, para retirar o excesso de água do beneficiamento, e utilizadas para a realização dos testes.

Para o beneficiamento das sementes foram separadas e eliminadas aquelas que estavam fragmentadas em mais de 50%.

As sementes de *B. salicifolius* e *C. decandra* coletadas no ano de 2009 foram utilizadas para a avaliação do comportamento das sementes durante a desidratação e as coletadas nos anos de 2010 e 2011 foram utilizadas para o armazenamento.

3.2 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DAS SEMENTES EM RELAÇÃO À TOLERÂNCIA À DESIDRATAÇÃO

Para a avaliação do comportamento das sementes de *B. salicifolius* e *C. decandra* em relação à tolerância à desidratação, as sementes recém colhidas foram acondicionadas em placas de petri sob uma placa de porcelana em dessecadores de 6 l de capacidade, contendo 200 g de acetato de potássio (CH_3COOK) e 27 ml de água destilada, obtendo assim a solução salina saturada.

Para o preparo da solução, foi colocado o sal em uma placa de Petri e a água foi adicionada aos poucos até a obtenção de uma textura plástica. A solução foi preparada de acordo com a solubilidade, seguindo procedimento descrito no manual Merck (1989) e por Medeiros (2006, p. 1-5), promovendo umidade relativa (UR) de 23,5% a uma temperatura de 15°C (SUN, 2002, p. 317-323; ROCKLAND, 1960, p. 1375-1376; WINSTON; BATES, 1960, p. 232-237; VERTUCCI; ROSS, 1993, p. 201-213). Os dessecadores foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de 15°C.

Uma amostra de 20 g sementes foi pesada diariamente, até que o peso encontrado coincidissem com o grau de umidade desejado, por meio da expressão proposta por Cromarty *et al.* (1985):

$$Pd = \frac{Pi(100 - U_i)}{100 - U_d}$$

onde: Pd= peso desejado
Pi= peso inicial
Ui= umidade inicial
Ud= umidade desejada

Quando as sementes atingiram as porcentagens de água desejadas estas foram retiradas dos dessecadores e realizados testes para obter o grau de umidade, teste de germinação e vigor, teste de tetrazólio, condutividade elétrica, análises anatômicas e bioquímicas.

3.2.1 Grau de umidade das sementes

A determinação do grau de umidade das sementes (base úmida) foi obtido pelo método de estufa sob ventilação forçada a $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, conforme as Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009, p. 308), utilizando três repetições de 200 sementes.

3.2.2 Teste de germinação e vigor

Para o teste de germinação foram utilizadas cinco repetições de 30 sementes. As sementes de *B. salicifolius* foram dispostas em caixas de plástico tipo gerbox contendo 20 g de vermiculita e 60 ml de água destilada e as de *C. decandra* distribuídas sob substrato rolo de papel umedecido com água destilada. Os rolos contendo as sementes foram envolvidos em sacos plásticos para manter a umidade do substrato.

Tanto para *B. salicifolius* como para *C. decandra* as sementes foram colocadas em germinador Biomatic regulado à temperatura de 25°C , conforme recomendação de Rego *et al.* (2009, p. 219) e Haliski *et al.* (2012, não publicado)¹.

As avaliações foram realizadas diariamente e as sementes foram consideradas germinadas quando apresentaram emissão de radícula, com no mínimo 2 mm. Foram avaliados a porcentagem, o tempo médio (TM) (LABORIAU, 1983, p. 54) e o índice de velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962, p. 176) e calculados de acordo com as fórmulas:

$$\text{IVG} = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$$

$$\text{TM} = \frac{\sum ni \cdot ti}{\sum ni}$$

onde:

G1, G2, Gn = número de sementes germinadas na primeira, na segunda, e na última contagem

N1, N2...Nn = número de dias após a primeira, a segunda e a última contagem

ni = número de sementes germinadas no dia

ti = número de dias após a semeadura

¹ HALISKI, S. *et al.* **Caracterização morfológica e germinação de sementes de *Casearia decandra* Jacq.** Curitiba, 2012. Não publicado.

3.2.3 Teste de tetrazólio

Como não há metodologia padronizada para as duas espécies, foi realizado um teste preliminar para padronização.

Foram testados tempos de permanência na solução de tetrazólio (cloreto de 2, 3, 5 trifeniltetrazólio): 1, 3 e 5 horas e concentrações: 0,075%, 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1%, utilizando quatro repetições de 50 sementes.

As sementes foram pré-condicionadas por 24 horas sob papel toalha umedecido com água destilada, e mantidas em germinador regulado à temperatura de 25°C. Após este período, extraíram-se os embriões das sementes, e os de *B. salicifolius* foram cortados ao meio e colocados na solução de tetrazólio na temperatura de 30°C, no escuro. Após os tempos de permanência dos embriões na solução de tetrazólio, estes foram lavados para retirar a solução ainda presente nos tecidos, e realizadas as avaliações com base na coloração do embrião.

Foram considerados viáveis os embriões que estavam totalmente coloridos em vermelho ou que apresentaram mais que 50% de sua área coloridas.

Os embriões foram considerados não viáveis quando apresentaram mais que 50% da sua área descoloridas, ou com áreas descoloridas ou vermelho intenso na região da radícula.

3.2.4 Teste de condutividade elétrica

Para avaliar a condutividade elétrica nas sementes de *B. salicifolius* foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes, embebidas em 75 ml de água destilada por 24 horas a 25°C, e para *C. decandra* quatro repetições de 50 sementes em 50 ml de água destilada por 6 horas na temperatura de 25 °C (REGO *et al*, 2011). Após estes períodos foi realizada a leitura da condutividade elétrica na solução de embebição, utilizando um condutímetro, e os dados foram expressos em $\mu\text{s}/\text{cm}$.

3.2.5 Análise anatômica

Para a análise anatômica foram selecionados apenas quatro graus de umidade para cada espécie de acordo com a viabilidade das sementes: foi selecionado o grau de umidade da semente recém-colhida e mais três graus de umidade onde houve queda na viabilidade das sementes. Utilizaram-se cinco sementes de cada nível de secagem: 37%, 25%, 18% e 14% de umidade para *B. salicifolius* e 54%, 21%, 14% e 8% de umidade para *C. decandra*, que foram fixadas em formol, ácido acético e álcool 70% (FAA 70%).

As sementes de *B. salicifolius* foram seccionadas transversalmente e as de *C. decandra* separadas em endosperma e embrião, sendo o endosperma seccionado transversal e longitudinalmente. Após, estas foram desidratadas com concentrações crescentes de etanol até álcool absoluto, incluídas em historresina, seccionadas em micrótomo de rotação (10 µm), distendidas em lâminas e submetidas à coloração com azul de toluidina (O` BRIEN *et al.*, 1965).

Nos testes histoquímicos, as sementes foram incluídas em polietilenoglicol 1500, seccionadas em micrótomo de rotação (20 µm) e submetidas aos testes com lugol para detecção de amido (BERLYN; MIKSCHE, 1976); sudan III para lipídios (SASS, 1951), e cloreto férrico 10% para compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940). As lâminas foram analisadas qualitativamente e os tecidos fotografados ao microscópio fotônico da marca Zeiss com câmera fotográfica Sony Cyber Shoot 2000.

Foram observadas as regiões do eixo hipocótilo-radícula, endosperma e cotilédones.

3.2.6 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Química de Carboidratos da Universidade Federal do Paraná.

3.2.6.1 Preparo das amostras

Para as análises bioquímicas foram selecionados apenas quatro graus de umidade para cada espécie de acordo com a viabilidade das sementes: foi selecionado o grau de umidade da semente recém-colhida e mais três graus de umidade onde houve queda na viabilidade das sementes. Foram separadas amostras de 3 g de sementes para os diferentes graus de umidade das sementes: 37%, 25%, 18% e 14% para *B. salicifolius*, e 54%, 21%, 14% e 8% para *C. decandra*. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e então trituradas em cadinhos de porcelana. O material foi liofilizado por 48 horas e após liofilização foi conservado em freezer (-18°C).

3.2.6.2 Extração e quantificação de lipídios

Após a liofilização, foram separadas três amostras de 3 g de sementes para cada grau de umidade, e submetidas a extração com éter etílico por 9 horas, utilizando um aparelho extrator Soxhlet. Posteriormente, foram secas e o conteúdo de lipídios determinado por diferença de peso. Para a determinação do peso das amostras foi utilizada balança de precisão com quatro casas decimais.

3.2.6.3 Extração e quantificação de açúcares solúveis totais e açúcares redutores

As sementes deslipidificadas foram separadas em três amostras de 2,4g e tratadas com 20 ml de etanol 80% sob agitação em banho-maria a 60°C por 30 minutos. Após este período o material foi centrifugado a 15000 rpm e separado o sobrenadante. Este processo foi repetido mais uma vez, e os sobrenadantes reunidos e armazenados em freezer (-18°C).

A quantificação de açúcares solúveis totais e redutores foi realizada por métodos colorimétricos. Todas as análises foram efetuadas em triplicata, e as absorbâncias medidas em espectrofotômetro SP-22 Biospectro.

OS açúcares totais foram determinados pelo do método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), e as leituras efetuadas em comprimento de

onda de 490 nm, utilizando como padrão solução de glucose nas concentrações de 20-100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

A dosagem de açúcares redutores foi realizada pelo método de Somogyi – Nelson, e as leituras efetuadas em comprimento de onda de 535 nm, utilizando como padrão solução de glucose nas concentrações de 20-100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

3.2.6.4 Extração e quantificação de amido

As sementes livres de lipídios e carboidratos de baixa massa foram utilizadas para a extração e quantificação de amido. As amostras foram extraídas com dimetilsulfóxido por 24 horas, sob agitação. Após este período, o material foi centrifugado a 15000 rpm e separado o sobrenadante. O processo foi repetido mais uma vez, e os sobrenadantes reunidos, precipitados com três volumes de etanol e mantidos sob refrigeração (4°C), por 24 horas. Posteriormente o material foi centrifugado a 15000 rpm, lavado três vezes com etanol e seco em estufa à vácuo por 4 horas. O amido extraído foi pesado em balança de precisão com quatro casas decimais e submetido ao teste do lugol.

3.2.6.5 Extração e quantificação de polissacarídeos de parede celular

O resíduo da extração de amido foi lavado com água destilada até a total remoção do dimetilsulfóxido, e em seguida submetido às extrações sequenciais. Inicialmente, o material foi extraído com água por 3 horas em banho-maria a 80°C sob agitação e refluxo. Posteriormente, o material foi centrifugado a 1500 rpm e separado o sobrenadante, sendo o processo repetido mais uma vez. Os sobrenadantes foram reunidos e precipitados com três volumes de etanol 90%. O material foi mantido sob refrigeração (4°C) por 24 horas, centrifugado, lavado três vezes com etanol 90%, seco em estufa a vácuo por 4 horas e pesado em balança de precisão com quatro casas.

O resíduo da extração aquosa foi submetido à extração alcalina com hidróxido de sódio 4M e 10 mg de boroidreto de sódio sob agitação por 4 horas. Após as extrações, o material foi centrifugado e separado o sobrenadante. Este processo foi repetido mais uma vez e os sobrenadantes

reunidos e neutralizados com ácido acético 50%. Com a neutralização, ocorreu precipitação de polissacarídeos, e estes foram separados por centrifugação e correspondem a fração de hemicelulose "A". O restante da amostra que não precipitou foi dializada por 48 horas em água corrente, concentrada, precipitada com três volumes de etanol 90% por 24 horas. O material foi mantido sob refrigeração (4 °C). Após centrifugação, o precipitado foi lavado três vezes com etanol 90%, seco em estufa a vácuo e correspondem as hemiceluloses "B".

3.2.6.6 Determinação da composição monossacarídica

As frações de amido e polissacarídeos obtidos nas extrações foram submetidas à hidrólise ácida total para a determinação da composição monossacarídica.

Inicialmente, foram solubilizados 2 mg do material com água destilada em tubos hermeticamente fechados por 24 horas. Após, foi adicionado 0,5 ml de ácido trifluoroacético (4 M) e deixados em banho-maria a 100°C durante 5 horas.

Após a hidrólise o excesso de ácido foi removido por evaporação (ADAMS, 1965; BIERMANN, 1989). Os monossacarídeos foram submetidos às reações de redução com boroidreto de sódio em temperatura ambiente por 16 horas em meio aquoso (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Em seguida adicionou-se resina Lewatit S-100 (resina trocadora de cátions na forma ácida) para decompor o excesso de agente redutor e remover os cátions Na⁺. A solução foi filtrada em algodão e o filtrado evaporado. Lavagens sucessivas com 3 ml de metanol (três vezes) foram feitas para remover o ácido bórico remanescente por co-destilação, na forma de borato de trimetila.

Os alditóis secos resultantes foram acetilados com piridina (agente catalisador) - anidrido acético (agente acetilante) (1:1 v/v), em tubo de hidrólise hermeticamente fechado, por 16 h a 25°C (WOLFROM; THOMPSON, 1963a). Este processo foi interrompido por adição de gelo moído ao sistema, e os acetatos de alditóis foram extraídos com 1 ml de clorofórmio. A piridina residual foi complexada com solução aquosa de sulfato de cobre (CuSO₄) a 5% (p/v), sendo assim separada da fase clorofórmica e eliminada por sucessivas e intercaladas lavagens com água destilada e sulfato de cobre.

A fase clorofórmica contendo os acetatos de alditóis foi coletada, e após secagem, a amostra foi ressolubilizada em acetona para ser analisada por cromatografia líquido-gasosa (GLC).

As análises por GLC foram efetuadas em cromatógrafo gasoso Hewlett Packard modelo 5890 A Série II, com detector de ionização de chama (FID) e injetor à temperatura de 250°C, coluna capilar DB-210 (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno), com espessura de filme de 0,25 µm a 220°C, e nitrogênio como gás de arraste em fluxo de 2,0 ml.min⁻¹ (SLONEKER, 1972).

3.3 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DAS SEMENTES EM RELAÇÃO AO ARMAZENAMENTO

Para o armazenamento, foram utilizadas sementes provenientes dos frutos coletados nos anos de 2010 e 2011. As sementes foram secas em dessecadores com a solução salina saturada de acetato de potássio (23,5% UR), conforme a metodologia descrita anteriormente no item 3.2, e obtidos os seguintes graus de umidade para *B. salicifolius*: 36% (semente recém colhida), 33%, e 27%, e para *C. decandra*: 57% (semente recém colhida), 43% e 35%. Após a secagem das sementes, estas foram armazenadas em câmara fria (5°C, 85% UR) em embalagens semipermeáveis de polietileno de 0,10 mm de espessura, 10 cm de largura e 20 cm de comprimento perfuradas com o auxílio de uma agulha (6 orifícios) (Pereira, 1980, p. 240). A cada 40 dias (*B. salicifolius*) e 30 dias (*C. decandra*) de armazenamento foi retirada uma amostra das sementes para as avaliações fisiológicas e para o teste de sanidade. As avaliações foram realizadas aos 0, 40, 80, 120, 160 e 200 dias, para as sementes de *B. salicifolius* e aos 0, 30 e 60 dias para as sementes de *C. decandra*.

3.3.1 Avaliações fisiológicas

As avaliações fisiológicas consistiram na determinação do grau de umidade das sementes, teste de germinação e vigor, teste de tetrazólio e no teste de condutividade elétrica. A metodologia para cada teste foi descrita anteriormente nos itens 3.2.1-3.2.4.

3.3.2. Teste de sanidade

Os testes de sanidade foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa-Florestas.

A detecção dos fungos foi realizada pelo método do papel de filtro (*Blotter test*) (NEERGAARD, 1979). Oito repetições de 25 sementes não desinfestadas foram colocadas em gerbox previamente desinfestados com álcool 70% contendo duas folhas de papel filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada esterilizada. As sementes foram mantidas em sala climatizada sob um fotoperíodo de 12 h luz negra / 12 h escuro na temperatura de 20 °C durante sete dias.

A avaliação foi realizada observando-se as estruturas fúngicas em microscópio estereoscópico. Também foram confeccionadas lâminas de cada fungo encontrado e observadas em microscópio óptico para a confirmação da classificação dos fungos a nível de gênero, com o auxílio de chave de identificação (BARNETT; HUNTER, 1982). Os dados da incidência dos fungos foram expressos em porcentagem.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram instalados segundo o delineamento inteiramente casualizado. Tanto os experimentos de secagem como os de armazenamento foram avaliados por meio da análise de regressão polinomial. Ao serem ajustadas as regressões polinomiais, foi adotada a equação de maior coeficiente de determinação.

Para as análises anatômicas não foi realizada análise estatística, pois foram efetuadas apenas avaliações qualitativas.

As análises foram realizadas pelo programa estatístico Assistat®, e os gráficos elaborados por meio do programa Excel.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DAS SEMENTES EM RELAÇÃO À TOLERÂNCIA À DESIDRATAÇÃO

4.1.1 Grau de umidade das sementes

As sementes de *B. salicifolius* no momento da coleta (2009) possuíam 37% de umidade, e quando colocadas sob umidade relativa de 23,5% e temperatura de 15°C, o grau de umidade diminuiu gradativamente, chegando a 14% após 51 dias sob a solução salina. Já as sementes de *C. decandra* possuíam 54% de umidade no momento da coleta (2009), e quando submetidas às condições descritas, o grau de umidade diminuiu gradativamente até alcançar a 8% após 39 dias sob a solução salina (Figura 1).

Para as sementes de *B. salicifolius* obteve-se os seguintes graus de umidade: 37% (semente recém colhida), 33%, 29%, 25%, 18% e 14%, e para as de *C. decandra*: 54% (semente recém colhida), 49%, 38%, 25%, 21%, 14% e 8%.

O que se pode observar é que as sementes de *C. decandra* levaram menor tempo (39 dias) para chegar a um grau de umidade menor (8%) em relação às sementes de *B. salicifolius* que levaram 51 dias para atingir o grau de umidade de 14%. Sementes de diferentes espécies geralmente se comportam de maneira distinta quando mantidas em ambientes com a mesma umidade relativa do ar. Sementes ricas em lipídios têm um ponto de equilíbrio higroscópico inferior ao das ricas em amido. Isto ocorre porque os lipídios são hidrofóbicos e o amido hidrofílico, assim as sementes amiláceas podem captar maior quantidade de água do ambiente (MARCOS FILHO, 2005, p. 179). Desta forma, como as sementes de *B. salicifolius* são ricas em amido (resultado obtido através das análises bioquímicas – item 4.1.8), e este sendo altamente hidrofílico, apresentou grau de umidade final superior ao das sementes de *C. decandra* que são ricas em lipídios.

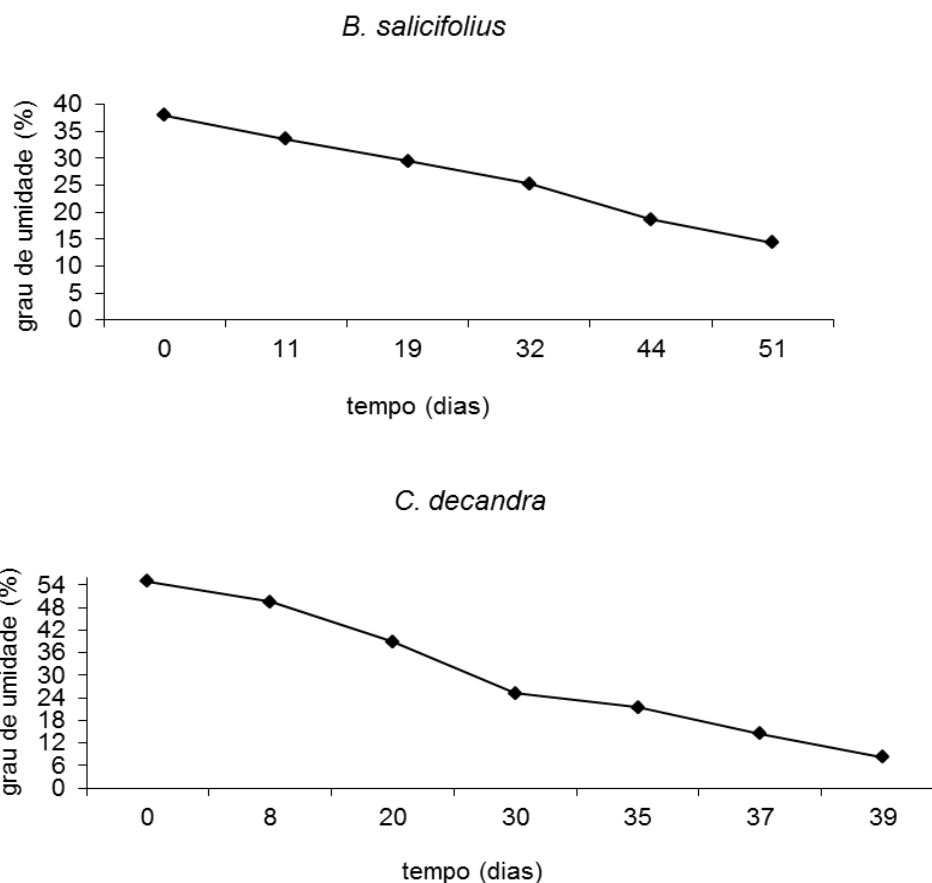


FIGURA 1- CURVA DE SECAGEM DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* EM SOLUÇÃO SALINA SATURADA DE ACETATO DE POTÁSSIO (23,5% UR).

4.1.2 Porcentagem de germinação

As sementes de *B. salicifolius* possuem 37% de umidade inicial e 93% de germinação. Com a secagem das sementes para 29% de umidade a germinação diminuiu para 85% e com 25% de umidade para 60% de germinação. Quando as sementes atingiram 14% de umidade a germinação foi nula (Figura 2).

As sementes de *C. decandra* possuem 54% de grau de umidade inicial e uma média da germinação de 91%. Com a secagem das sementes para 38% de umidade a germinação se manteve alta (90%), havendo uma diminuição para 70% de germinação com 25% de umidade. Quando as sementes atingiram 21% de umidade a germinação caiu para 56%, e com 14% de

umidade a germinação diminuiu para 12%. Ao chegar a 8% de umidade a germinação foi nula (Figura 2).

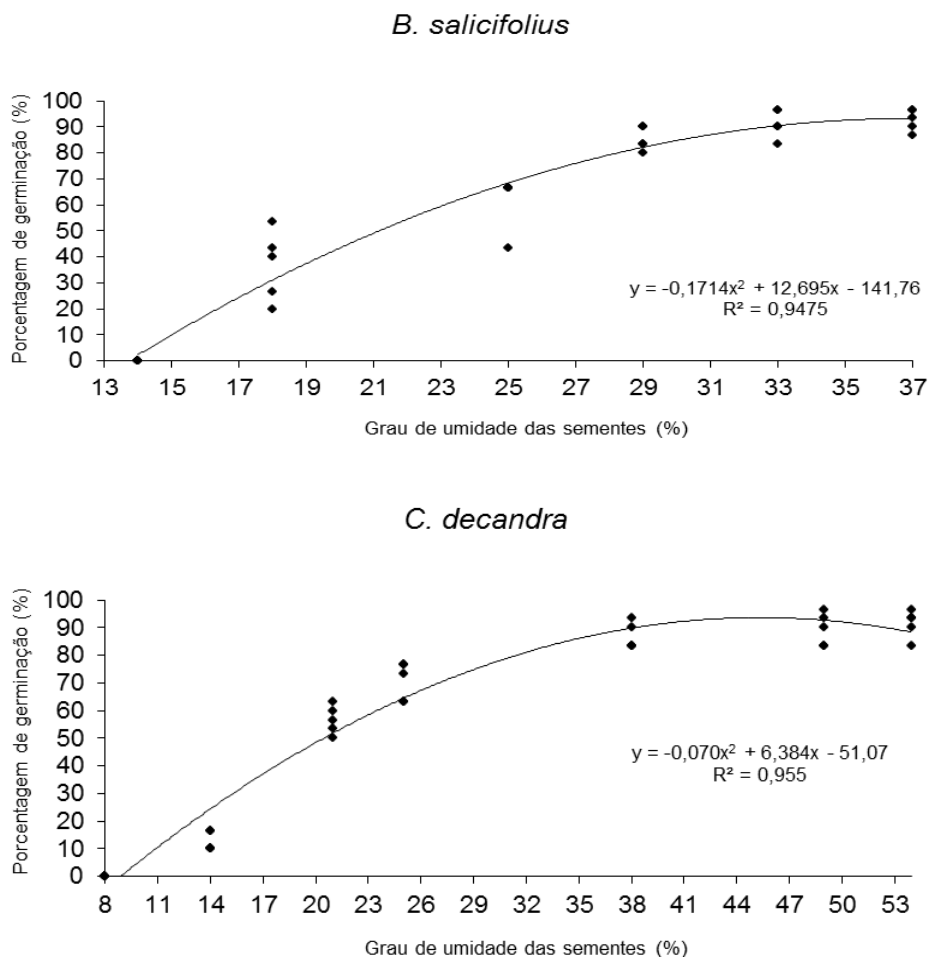


FIGURA 2- PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.

Masetto (2005, p. 52) obteve resultados semelhantes para sementes de *Eugenia handroana*, pois observou que a porcentagem de germinação foi máxima quando o grau de umidade das sementes foi superior a 30%, e ao reduzi-lo para valores abaixo de 25%, a capacidade germinativa das sementes foi reduzida gradativamente até ser completamente nula quando o nível de hidratação atinge valores inferiores a 10%.

Sementes de *Araucaria hunsteinii* perderam a viabilidade quando seu grau de umidade foi reduzido para valores abaixo de 32% (PRITCHARD *et al*, 1995, p. 84), e as de *Quercus rubra* apresentaram queda na viabilidade quando seu grau de umidade foi reduzido abaixo de 30%, e a queda completa da

viabilidade foi observado com graus de umidade entre 10% e 15% (PRITCHARD, 1991, p. 46).

Para *Inga vera*, a redução do grau de umidade a partir de 50% proporcionou uma diminuição na porcentagem de plântulas normais, e a porcentagem de germinação diminuiu gradualmente a partir de 40% de umidade, perdendo a capacidade germinativa quando o grau de umidade atingiu entre 20% e 21%. Sementes de *Eugenia uniflora* apresentaram drástica redução da capacidade germinativa entre os graus de umidade de 28 e 26%, sendo que não houve germinação quando as sementes tiveram o grau de umidade reduzido para 19% (MELLO, 2008, p. 45-47).

Diante dos resultados obtidos pode-se determinar que o conteúdo de umidade de segurança para as sementes de *B. salicifolius* e *C. decandra* foram de 37% e 38%, respectivamente, e o grau de umidade crítico e letal foram de 29% e 14% para *B. salicifolius* e de 25% e 8% para *C. decandra*.

De acordo com Hong e Ellis (1992, p. 549) e Andrade e Cunha (1996, p. 2-3) o grau de umidade de segurança corresponde ao grau de umidade que poderá ser atingido com a secagem sem prejuízos à viabilidade das sementes, o grau de umidade crítico refere-se ao grau de umidade no qual é detectado o início da perda da viabilidade, e o grau de umidade letal equivale ao valor a partir da qual todas as sementes perdem a viabilidade.

4.1.3 Índice de velocidade de germinação

Tanto para *B. salicifolius*, como para *C. decandra* houve um leve aumento do índice de velocidade de germinação (IVG) nas sementes com 33% e 49% de umidade, sendo que após 25% de umidade houve uma diminuição acentuada do vigor (Figura 3). Sendo assim, verifica-se um aumento no vigor das sementes no início da redução da umidade.

Pupim *et al.* (2009, p. 99) e Faria *et al.* (2004, p. 170) também observaram aumento no potencial fisiológico de sementes de *Magnolia ovata* e *Inga vera* com a redução de umidade, e atribuíram este aumento à continuidade do processo de maturação durante o período de secagem.

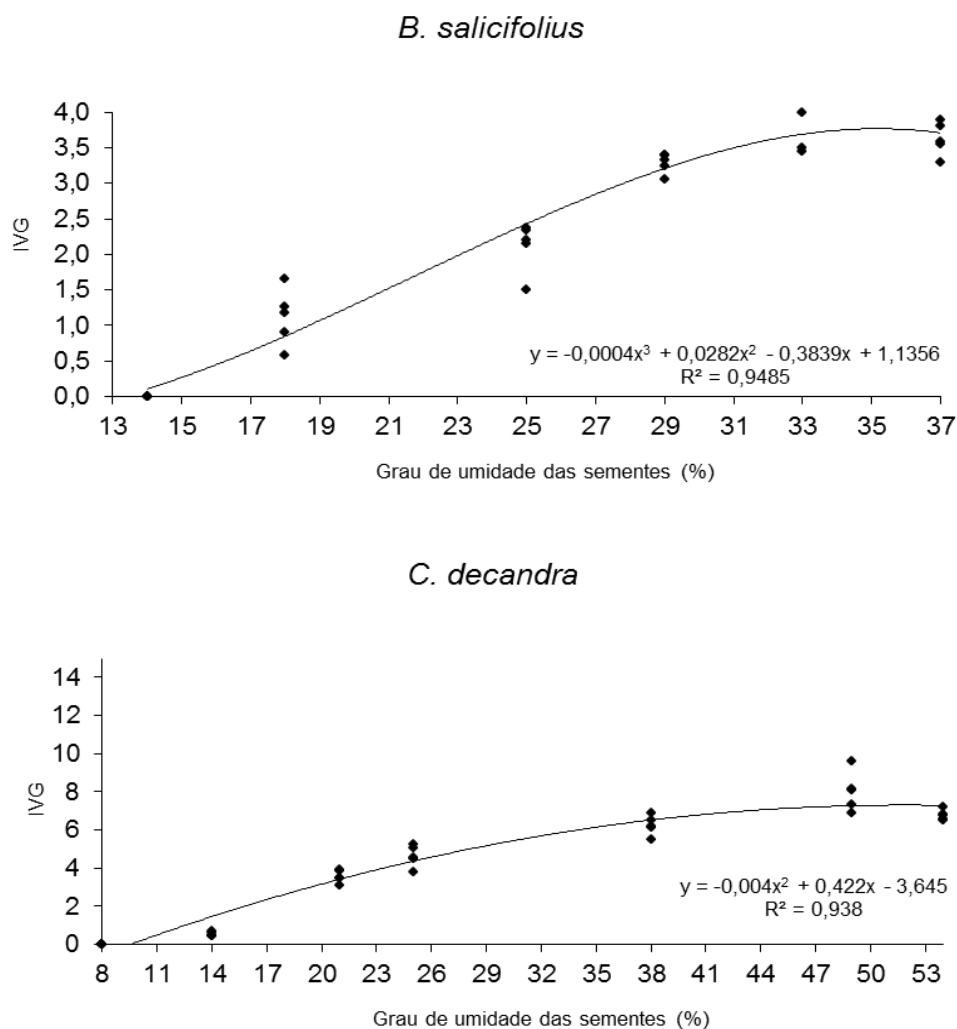


FIGURA 3- ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.

Mello (2008, p. 47-49) verificou queda no índice de velocidade de germinação em sementes de *Inga vera* e *Eugenia uniflora* com a secagem das sementes, indicando perda do vigor das sementes a partir de 50% e 45% de umidade, respectivamente. Diminuição do IVG com a redução no grau de umidade também foi observado nas sementes de *B. salicifolius* e *C. decandra* a partir de 25% de umidade.

4.1.4 Tempo médio de germinação

Para o tempo médio não foi possível ajustar as equações polinomiais, pois os valores proporcionaram uma reta (Figura 4).

O tempo médio de germinação (TM) das sementes de *B. salicifolius* e de *C. decandra* não se alterou com a secagem das sementes. Desta forma, verifica-se que este índice não foi eficiente para avaliar o vigor das sementes submetidas desidratação, pois esperava-se que houvesse um aumento no tempo médio de germinação com a secagem das sementes, indicando uma diminuição no vigor. Fato este observado tanto na porcentagem como no índice de velocidade de germinação, onde foi verificada diminuição na viabilidade e vigor das sementes a partir de 29% de umidade para *B. salicifolius* e 25% para *C. decandra*, o que não foi observado no tempo médio de germinação.

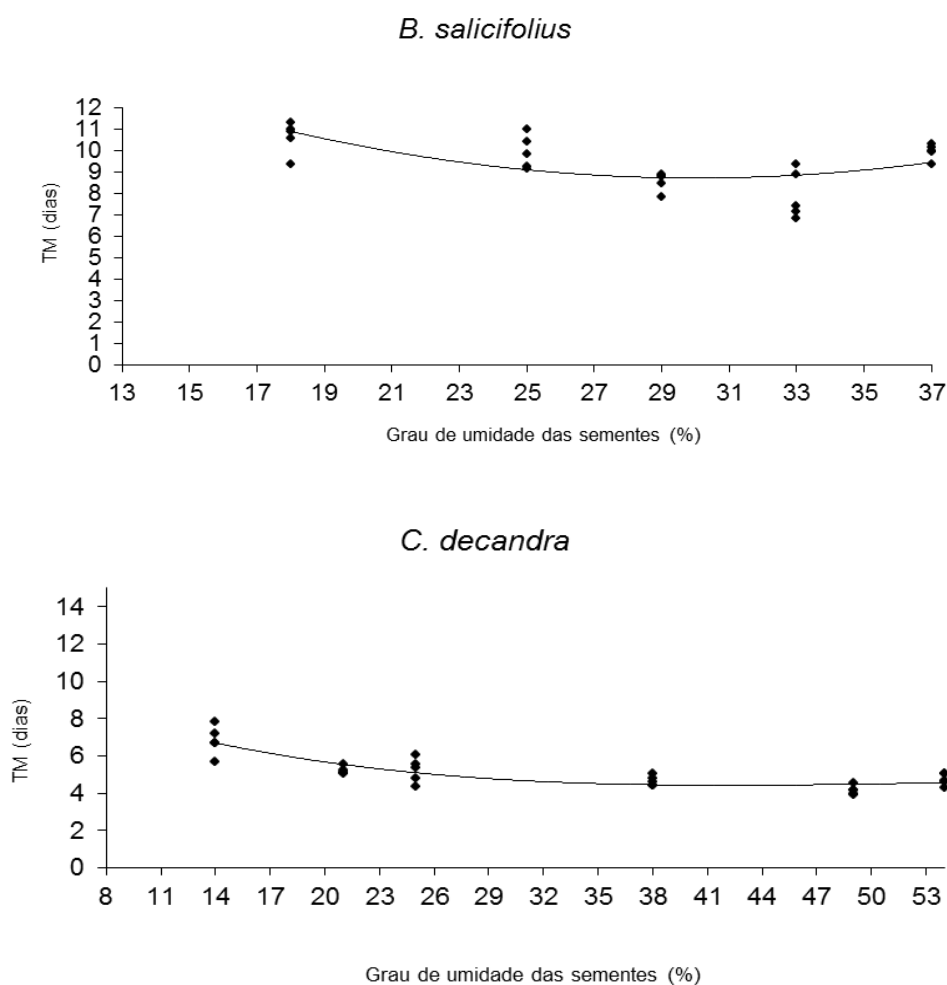


FIGURA 4- TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TM) DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.

4.1.5 Teste de tetrazólio

Para *B. salicifolius* a melhor combinação de concentração x tempo foi a 0,5% por cinco horas e para *C. decandra* foi a 0,075% por três horas, sendo esta a metodologia utilizada para o trabalho. O critério adotado para a avaliação dos embriões viáveis e não viáveis encontra-se nas Figuras 5 e 6.

Os resultados obtidos no teste de tetrazólio foram compatíveis com o teste de germinação. Houve diminuição da viabilidade a partir de 29% de umidade para *B. salicifolius* e para *C. decandra* observou-se diminuição da viabilidade a partir de 25% de umidade. Sendo que com 14% e 8% de umidade das sementes, respectivamente, a viabilidade foi nula (Figura 7).

Nas sementes de *B. salicifolius* e *C. decandra* o teste de tetrazólio se mostrou eficiente para avaliar a viabilidade das sementes submetidas à desidratação, pois de acordo com a literatura, há uma boa correlação entre a viabilidade das sementes e a atividade das desidrogenases, que estão relacionadas com a atividade respiratória da semente (POPINIGIS, 1977, p. 151).

Sendo assim, verifica-se que à medida que as sementes perderam umidade, a respiração se tornou menos intensa e conseqüentemente, houve diminuição na atividade das desidrogenases (MARCOS FILHO, 2005, p. 299).

Em sementes de *Glicine max* o teste de tetrazólio também se mostrou eficiente na determinação da viabilidade, do vigor, da deterioração por umidade e danos devido à secagem (FRANÇA-NETO, 1994, p. 87-88).



FIGURA 5 – TESTE DE TETRAZÓLIO COM OS EMBRIÕES DE *Blepharocalyx salicifolius* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE. A, B - (viável) embrião com coloração vermelha, tecido com aspecto normal e firme; C, D - (viável) embrião com menos que 50% da áreas descolorida, não afetando a região da radícula E-G - (não viável) embrião com áreas descoloridas afetando a área da radícula, H, I - (não viável) embrião com mais de 50% da área descolorida; J-L - (não viável) embrião totalmente descolorido e tecido com aspecto flácido e de deterioração.

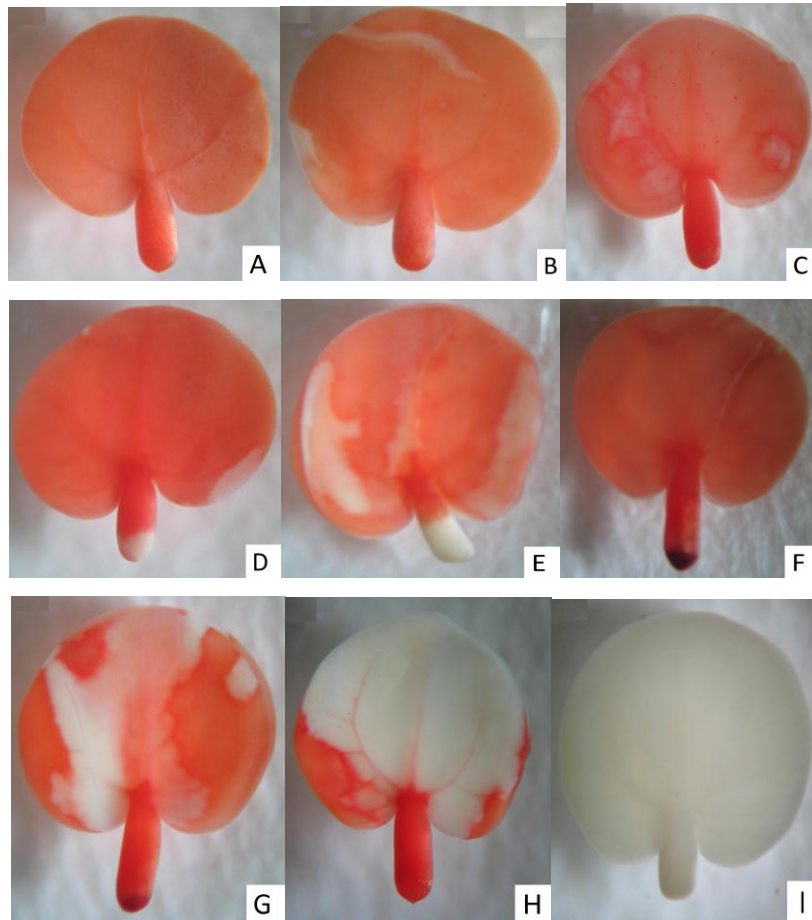


FIGURA 6 – TESTE DE TETRAZÓLIO COM OS EMBRIÕES DE *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE. A - (viável) embrião com coloração vermelha, tecido com aspecto normal e firme; B, C - (viável) embrião com menos que 50% da área descolorida, não afetando o eixo hipocótilo-radícula; D-F - (não viável) embrião com áreas descoloridas, ou vermelho-intenso afetando o eixo hipocótilo-radícula; G, H - (não viável) embrião com áreas descoloridas afetando mais que 50% dos cotilédones; I - (não viável) embrião totalmente descolorido.

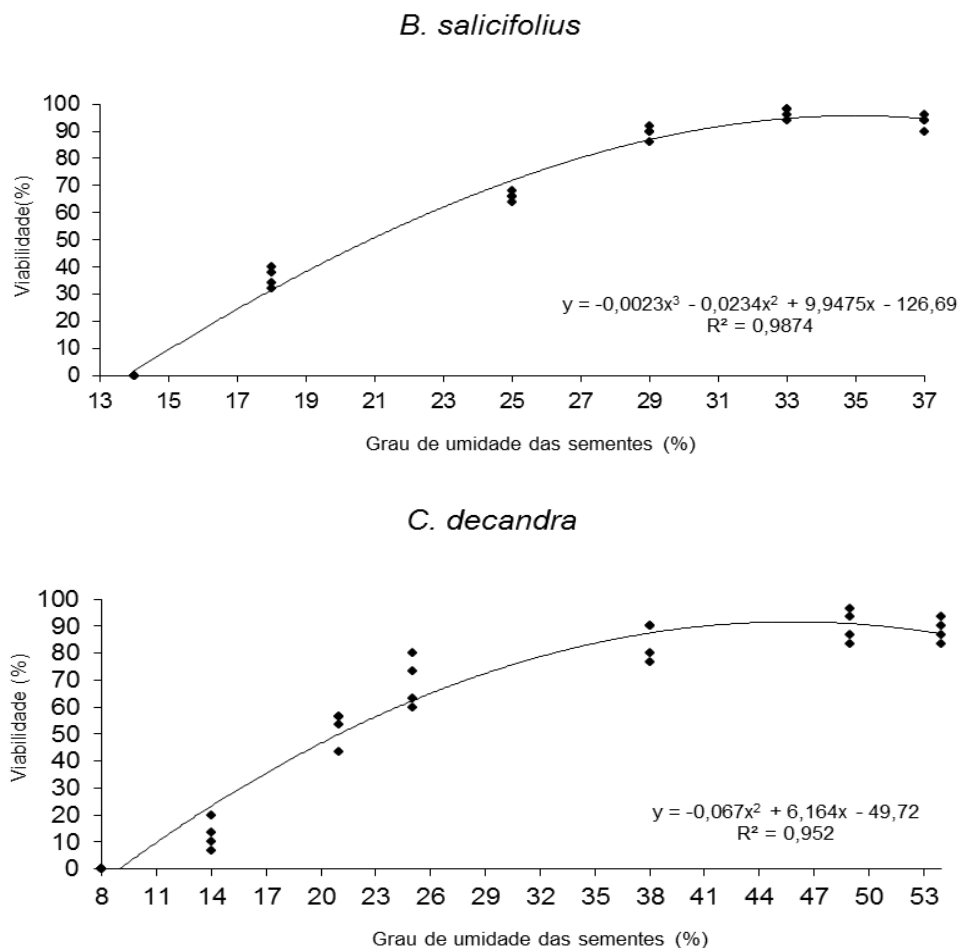


FIGURA 7- VIABILIDADE PELO TESTE DE TETRAZÓLIO DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.

Diante dos resultados obtidos nos testes de germinação e de tetrazólio verificou-se que as sementes de *B. salicifolius* e *C. decandra* não toleram secagem abaixo de 29% e 25% de umidade, respectivamente, sendo classificadas como recalcitrantes, pois de acordo Roberts (1973, p. 505), as sementes recalcitrantes são aquelas que, de forma oposta às ortodoxas são muito sensíveis à dessecação, possuem elevado grau de umidade ao se desprenderem da planta mãe, no final da maturação, e morrem quando seu grau de umidade é reduzido a valores abaixo do seu nível crítico de umidade (15 a 50%).

Berjak e Pammenter (2000, p. 45), ressaltaram que a intolerância à desidratação não é absoluta, pois se as sementes de diferentes espécies forem desidratadas com o uso do mesmo procedimento, não irão apresentar quedas idênticas dos níveis de viabilidade, devido aos diferentes graus de tolerância à perda de água. Isto também foi observado neste trabalho, pois as sementes de

B. salicifolius e *C. decandra* obtiveram graus diferentes de tolerância à perda de água.

Pammenter e Berjak (2000, p. 56-69) também observaram que as sementes recalcitrantes geralmente são produzidas por espécies clímax e não são frequentemente encontradas no banco de sementes do solo e não apresentam dormência, germinam rapidamente e persistindo no solo como um banco de plântulas. São grandes e geralmente não são dispersas pelo vento. As espécies estudadas neste trabalho são recalcitrantes, não possuem dormência e germinam rapidamente, sendo dispersas por animais, mas fogem a esta regra por serem pequenas, e *C. decandra* é uma espécie secundária (KLEIN; SLEUMER, 1984, p. 59; LONGHI, 1995, p. 107). Sendo assim, pode-se dizer que nem todas as espécies recalcitrantes atendem a estas características.

Outras características que também estão relacionadas com sementes recalcitrantes, e observadas nas espécies estudadas, são as relacionadas à sua morfologia, como a presença de tegumento fino, que não restringe a perda de água.

A região de ocorrência destas espécies também prediz a condição fisiológica das sementes. *B. salicifolius* e *C. decandra* ocorrem em Florestas Tropicais, onde a precipitação é alta, mantendo o alto grau de umidade das sementes. Neste ambiente, a temperatura, que é relativamente alta, favorece a germinação logo após a abscisão da planta mãe.

4.1.6 Teste de condutividade elétrica

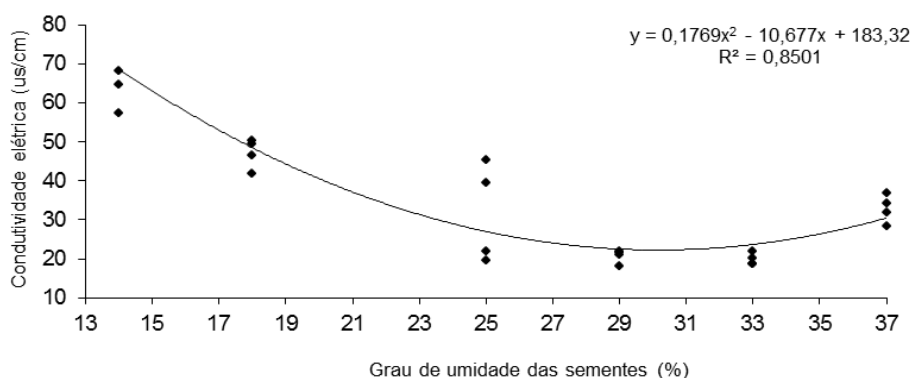
O conteúdo de lixiviados das sementes de *B. salicifolius* com 37% de umidade (sem desidratação) avaliado pelo do teste de condutividade elétrica, foi de 30 $\mu\text{s}/\text{cm}$. A partir de 33% de umidade este valor diminuiu para 23 $\mu\text{s}/\text{cm}$, e com 25% de umidade aumentou significativamente para 35 $\mu\text{s}/\text{cm}$.

Para as sementes de *C. decandra* os valores de condutividade elétrica se mantiveram com 13 $\mu\text{s}/\text{cm}$ até 38% de umidade, sendo que a partir de 25% de umidade houve um aumento significativo para 20 $\mu\text{s}/\text{cm}$ (Figura 8).

A desidratação das sementes de *B. salicifolius* e *C. decandra* a partir de 25% de umidade proporcionou grande liberação de solutos celulares, devido às

alterações na permeabilidade seletiva das membranas plasmáticas, pois de acordo com AOSA (1983, p. 53) a quantidade de lixiviados da solução está diretamente relacionada com a integridade das membranas celulares. Desta forma, pode-se dizer que, a perda da viabilidade das sementes está fortemente correlacionada com a perda gradativa da integridade do sistema de membranas acarretando a liberação de solutos celulares, importantes para o funcionamento da célula (MARCOS FILHO, 2005, p. 318).

B. salicifolius



C. decandra

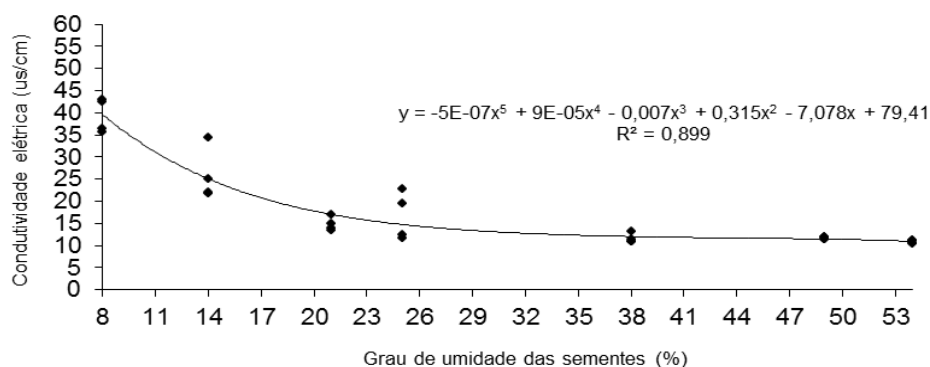


FIGURA 8- CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.

Bilia *et al.* (1998, p. 52) verificaram maior liberação de exsudatos pelas sementes de *Inga uruguensis* com 27% de umidade. Nas sementes de *B. salicifolius* e *C. decandra* foram obtidos resultados semelhantes: aumento nos valores de condutividade elétrica a partir de 25% de umidade.

Estes resultados estão de acordo com Bewley e Black (1994, p. 410), segundo as quais, as membranas se desorganizam quando as sementes

atingem graus de umidade inferiores a 25% e, também, que valores próximos a esses podem ser considerados críticos para espécies recalcitrantes.

Barros (2006, p. 58) também observou aumento nos valores de condutividade elétrica nas sementes de *Hancornia speciosa* submetidas à desidratação.

Diante dos resultados obtidos nos testes de vigor e de condutividade elétrica verificou-se que o vigor das sementes de *B. salicifolius* e *C. decandra* foi afetado com a secagem a partir de 25% de umidade.

4.1.7 Análise anatômica

A coloração pelo azul de toluidina revelou metacromasia nas paredes celulares, tanto nas sementes de *Blepharocalx salicifolius* (Figura 9-A) como nas de *Casearia decandra* (Figura 10-A), sendo que para as sementes de *B. salicifolius* com 18% e 14% de umidade e para de *C. decandra* com 8% de umidade, observou-se um aumento da coloração arroxeada, caracterizando um aumento na metacromasia (Figuras 9-D, 11-D).

Uma característica do corante azul de toluidina é o fenômeno de metacromasia. Este evento caracteriza-se por um abaixamento no pico de absorção da solução do corante (hipocromismo), em concentrações maiores de 10^{-6} M. Nas secções anatômicas, este efeito ocorre devido a um aumento na disponibilidade de grupos aniônicos e maior proximidade dos mesmos ao substrato, possibilitando a interação entre moléculas planares do azul de toluidina, sendo então necessária maior energia para a excitação de seus elétrons (VIDAL, 1977, p. 61).

Begnami (1998, p. 57) e Bordignon (2000, p. 55-56) também observaram metacromasia nas células do endosperma de sementes de *Coffea arabica* e nas células cotiledonares de *Eugenia uniflora* e *Campomanesia xanthocarpa*. Begnami (1998, p. 57) verificou que a metacromasia indica uma grande disponibilidade de grupos aniônicos presentes nas substâncias pécticas, possibilitando o empilhamento das moléculas do corante e resultando na sua coloração arroxeada.

As células do eixo embrionário das sementes de *B. salicifolius* e eixo embrionário e endosperma das sementes de *C. decandra* possuem formato hexagonal à arredondadas (Figura 9, 10, 11,12), sendo que nas sementes de *B. salicifolius* este formato não se alterou com os níveis de secagem (Figura 9, 10).

Nas sementes de *C. decandra*, observou-se que nos embriões com 21%, 14% e 8% de umidade as células se tornaram mais hexagonais do que arredondadas, verificando um achatamento das mesmas, devido a uma diminuição da turgidez da célula com a retirada de água das sementes (Figura 10-B,C,D). No eixo embrionário de *C. decandra* também foi observado uma diminuição do volume do citoplasma nas sementes a partir de 21% de umidade (Figura 11-B,C,D).

Justo *et al.* (2007, p. 539-551) estudando os efeitos da secagem em sementes de *Eugenia pyriformis* observaram uma progressiva desestruturação do conteúdo citoplasmático nas células do meristema fundamental das sementes submetidas à secagem.

Uma das indicações mais evidentes do estresse hídrico é a redução da turgidez celular, podendo ocorrer colapso na célula e a desorganização das membranas; as células devem ter um volume mínimo para manter suas atividades normais, e as mais tolerantes à dessecação possuem reduções mais discretas nesse volume (BEWLEY; BLACK, 1985, p. 110-112) reduzindo o volume dos vacúolos (MARCOS FILHO, 2005, p. 366).

As sementes de *B. salicifolius* possuem glândulas por todo o eixo embrionário, com conteúdo corado em verde pelo azul de toluidina (Figura 9-A). Por ser uma Myrtaceae pressupõe-se que seja uma glândula de óleo, que possui um aroma característico. Com os tratamentos de desidratação verificou-se que este conteúdo da glândula foi consumido a partir de 18% de umidade (Figura 9-C, D).

Núcleos das células do eixo embrionário das sementes de *B. salicifolius* foram evidenciados pelo azul de toluidina, localizado no centro das células (Figura 10-A), sendo possível também visualizar a cromatina bem distendida. Nas sementes com 18% de umidade a cromatina fica pouco evidente (Figura 10-C), e nas sementes com 14% de umidade não é possível observar os núcleos, indicio de fragmentação nuclear (Figura 10-D).

Em *C. decandra* observou-se núcleo e nucléolo corados em azul pelo azul de toluidina, não sendo possível visualizar a cromatina (Figura 11-A). Já nas sementes com 21%, 14% e 8% de umidade observam-se uma deformação dos nucléolos, devido à redução da turgidez do citoplasma (Figura 11-B,C,D).

Begnami (1998, p. 43-44) analisando sementes viáveis e inviáveis de *Coffea arabica*, verificou que nas sementes inviáveis os núcleos mostraram uma maior compactação cromatínica e alguns núcleos picnóticos. A autora salientou que devido à ausência de trabalhos estruturais com sementes recalcitrantes impossibilitou a comparação dos resultados obtidos. No entanto, em nível nuclear o que se observou das alterações estruturais se aproximam daquelas encontradas em sementes ortodoxas durante a perda da viabilidade.

Danos celulares como paredes celulares retraídas e plasmólise também foram verificados em sementes inviáveis de *Euterpe edulis* (PANZA *et al.*, 2007, p. 387-388). Em sementes de *Glycine max*, observou-se acentuada redução de volume celular, que pode ter ocasionado a ruptura de plasmodesmas (SILVA *et al.*, 2007, p. 18).

De acordo com Marcos Filho (2005, p. 366), a desidratação pode promover a desintegração do citoesqueleto, citoplasma e núcleo, com a perda da capacidade de regeneração quando a semente é novamente hidratada, fato geralmente observado nas recalcitrantes.

Tanto nas sementes de *B. salicifolius*, como nas sementes de *C. decandra* observou-se várias células em fase de divisão celular (Figura 10-A; Figura 11-B), indicando que estas sementes ainda estavam em fase de replicação celular.

De acordo com Marcos Filho (2005, p. 367) nas sementes recalcitrantes, em média 60% das células estão em fase de pré-replicação celular no momento da maturidade fisiológica, de modo que a continuidade do metabolismo em sementes mais úmidas pode ser considerada o fator determinante da sensibilidade à dessecação.

Quanto ao conteúdo de estocagem celular foram observados glóbulos não corados pelo azul de toluidina e uma massa homogênea corada em azul esverdeado no eixo embrionário das sementes de *B. salicifolius* (Figura 10-B, C). No endosperma das sementes de *C. decandra* foi observada também uma massa homogênea corada em azul (Figura 12-A) e um conteúdo granular

agrupado no centro das células nas sementes a partir de 21% de umidade corado em rosa (Figura 12-B, C).

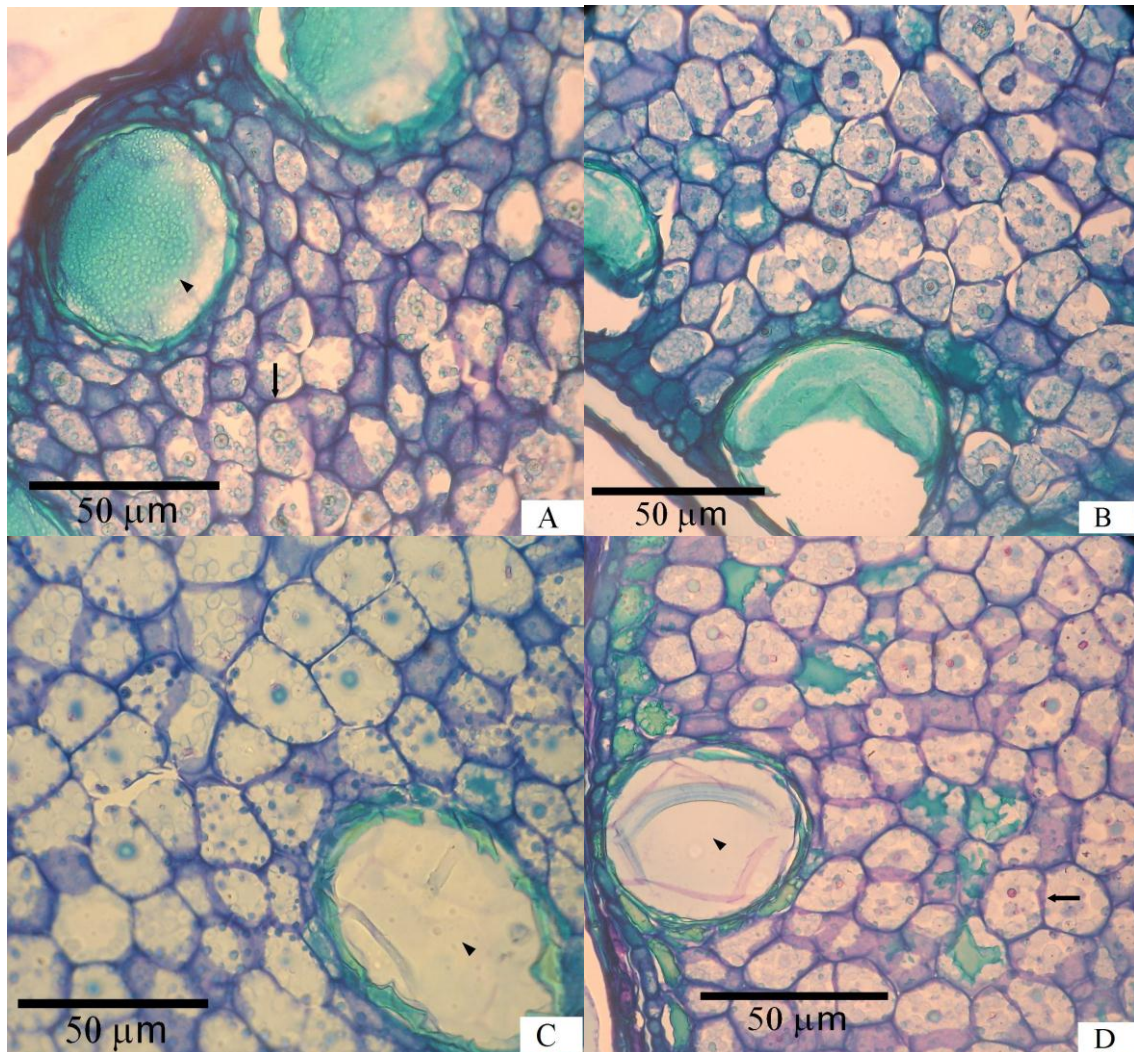


FIGURA 9- SECÇÕES LONGITUDINAIS DE EMBRIÕES DE *Blepharocalyx salicifolius* OBTIDAS DE SEMENTES COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE, CORADOS COM AZUL DE TOLUIDINA – DETALHE DA GLÂNDULA. A – semente com 37% de umidade, ► conteúdo da glândula, → parede celular metacromática, B- semente com 25% de umidade, C- semente com 18% de umidade, ► conteúdo da glândula reduzido, D- semente com 14% de umidade, ► conteúdo da glândula reduzido, → aumento da metacromasia na parede celular.

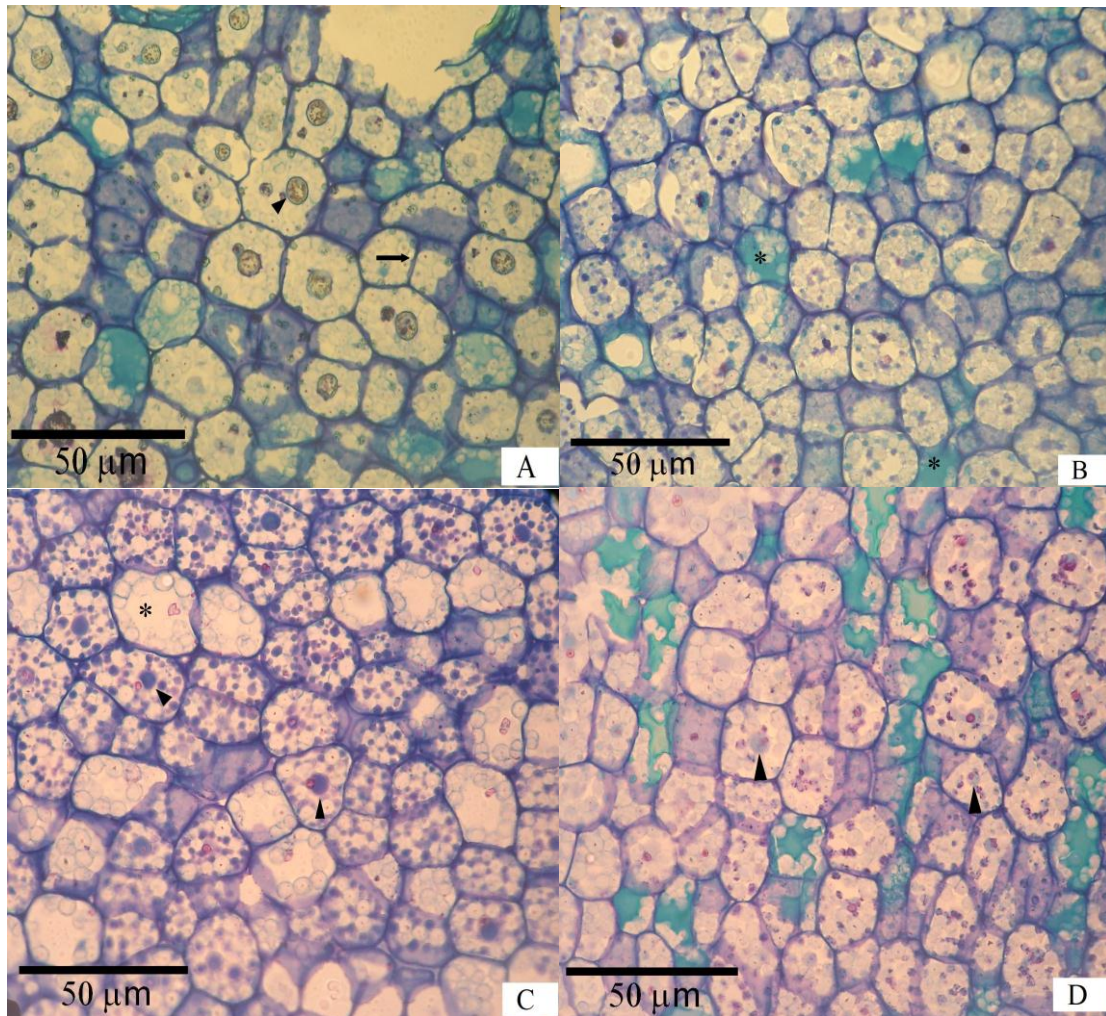


FIGURA 10- SECÇÕES LONGITUDINAIS DE EMBRIÕES DE *Blepharocalyx salicifolius* OBTIDAS DE SEMENTES COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE, CORADOS COM AZUL DE TOLUIDINA – REGIÃO DO HIPOCÓTILO. A – semente com 37% de umidade, ► núcleo, → células em divisão celular, B- semente com 25% de umidade,* conteúdo celular corado em verde, C- semente com 18% de umidade, * conteúdo celular globular não corado, ►núcleos pouco evidentes, D- semente com 14% de umidade, ► núcleos pouco evidentes.

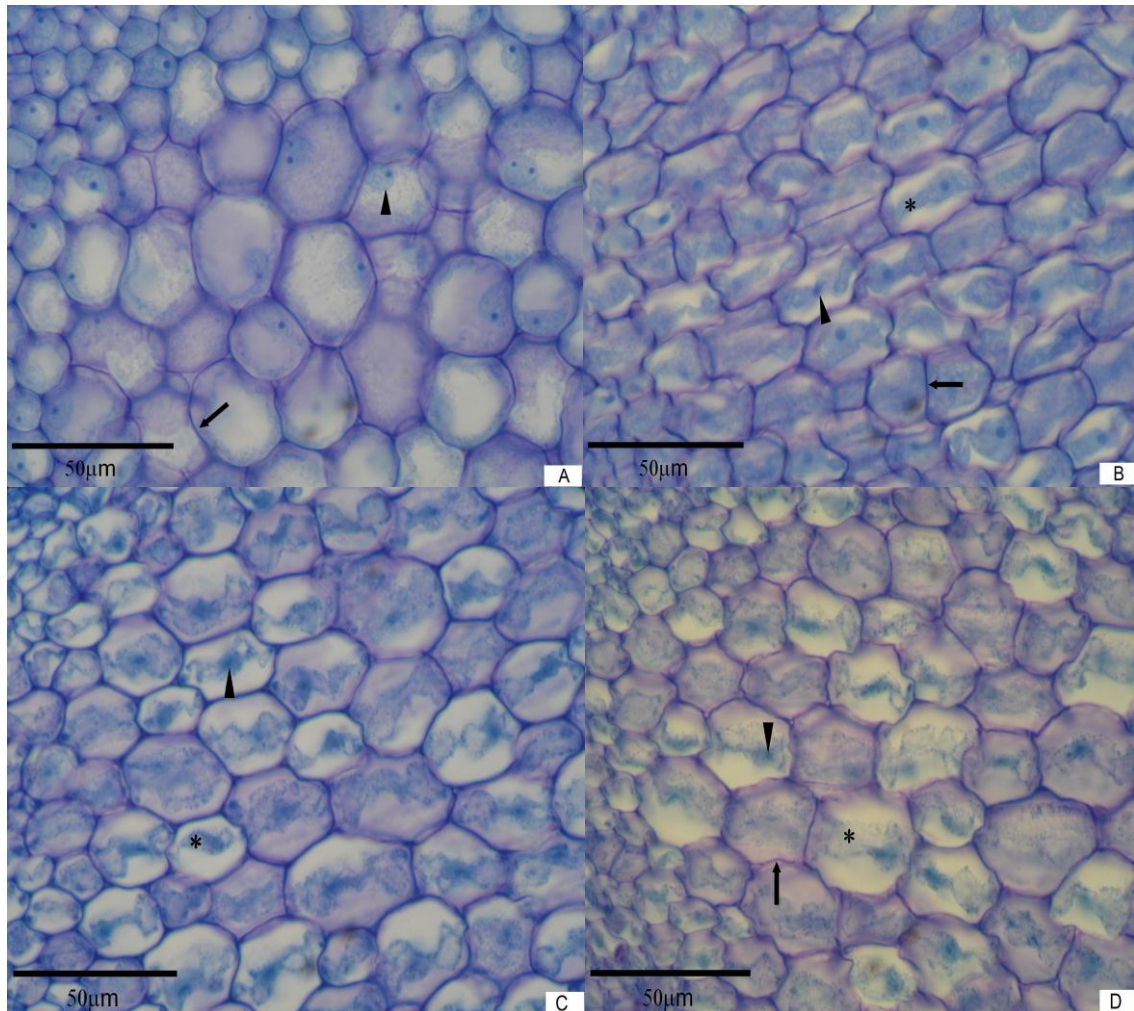


FIGURA 11- SECÇÕES LONGITUDINAIS DE EMBRIÕES DE *Casearia decandra* OBTIDAS DE SEMENTES COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE, CORADOS COM AZUL DE TOLUIDINA.

A – semente com 54% de umidade, ► núcleo e nucléolo, ➡ parede celular metacromática, B- semente com 21% de umidade, ► deformação dos nucléolos, ➡ células em divisão celular, * diminuição do volume do citoplasma, C- semente com 14% de umidade, ► deformação do nucléolo, * diminuição do volume do citoplasma, D- semente com 8% de umidade, ► deformação do nucléolo, * diminuição do volume do citoplasma, ➡ aumento da metacromasia na parede celular.

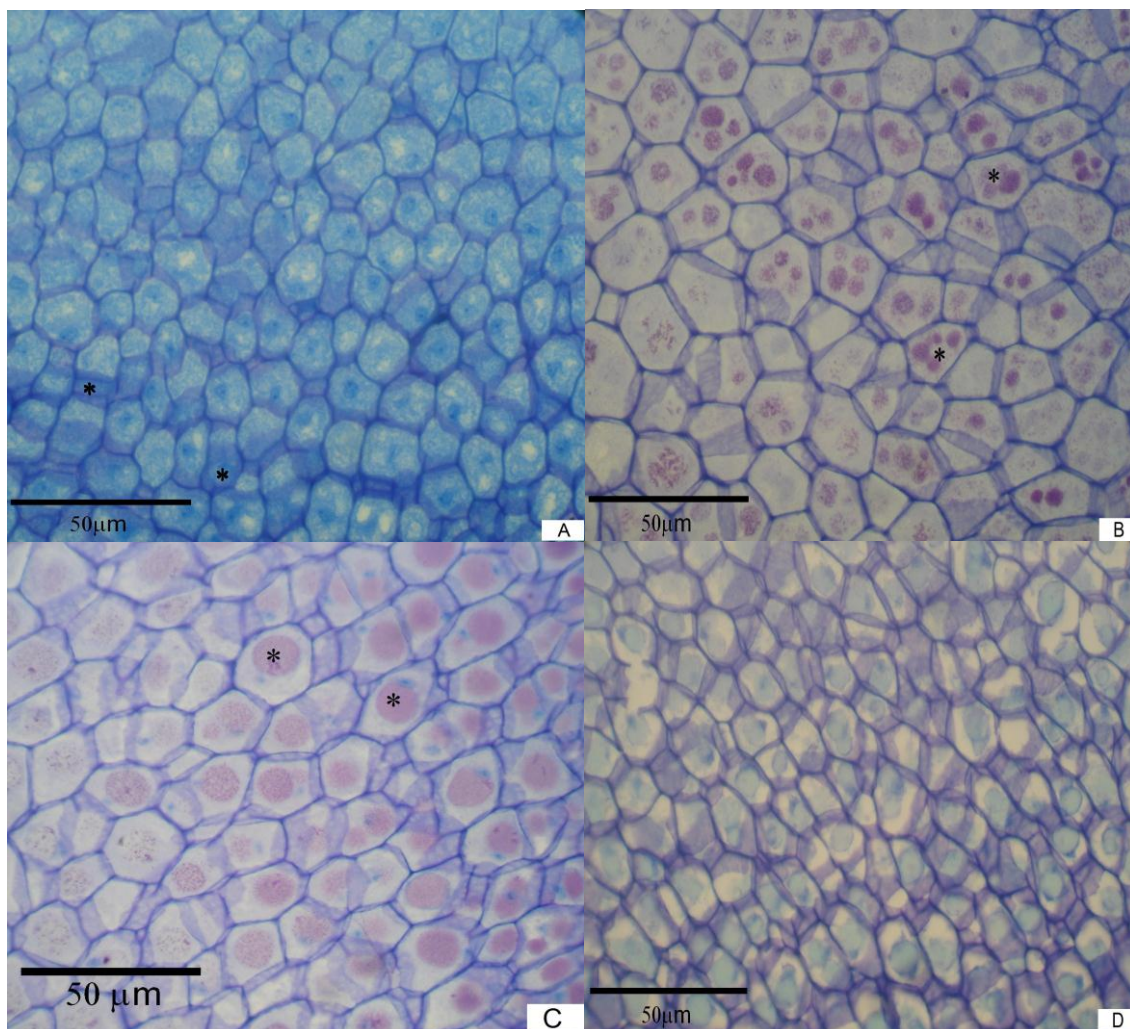


FIGURA 12- SECÇÕES LONGITUDINAIS DO ENDOSPERMA DE *Casearia decandra* OBTIDAS DE SEMENTES COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE, CORADO COM AZUL DE TOLUIDINA. A – semente com 54% de umidade, * conteúdo celular corado em azul, B- semente com 21% de umidade, * conteúdo celular corado em rosa C- semente com 14% de umidade, * conteúdo celular corado em rosa, D- semente com 8% de umidade.

Para identificar o conteúdo de reserva das células das sementes de *B. salicifolius* e de *C. decandra*, as secções das sementes foram submetidas ao teste com Sudam III, corante que reage com a presença de lipídios.

Com relação ao conteúdo da glândula do eixo embrionário de *B. salicifolius*, este reagiu positivamente com o Sudam III, indicando a presença de material lipídico (Figura 13).

Tanto no eixo embrionário das sementes de *B. salicifolius*, como no endosperma de *C. decandra* os pequenos glóbulos que formam massas homogêneas foram corados positivamente em vermelho com o Sudam III, indicando que são lipídios (Figuras 14 e 15). Verificou-se grande quantidade de

material lipídico armazenado nas células das duas espécies, porém, visualmente não foi possível detectar diferença no conteúdo de lipídios entre os tratamentos de secagem. A quantificação do conteúdo de lipídios será discutida nas análises bioquímicas (item 4.1.8).



FIGURA 13- SECÇÃO LONGITUDINAL DO HIPOCÓTILO DE *Blepharocalyx salicifolius* - DETALHE DA GLÂNDULA.

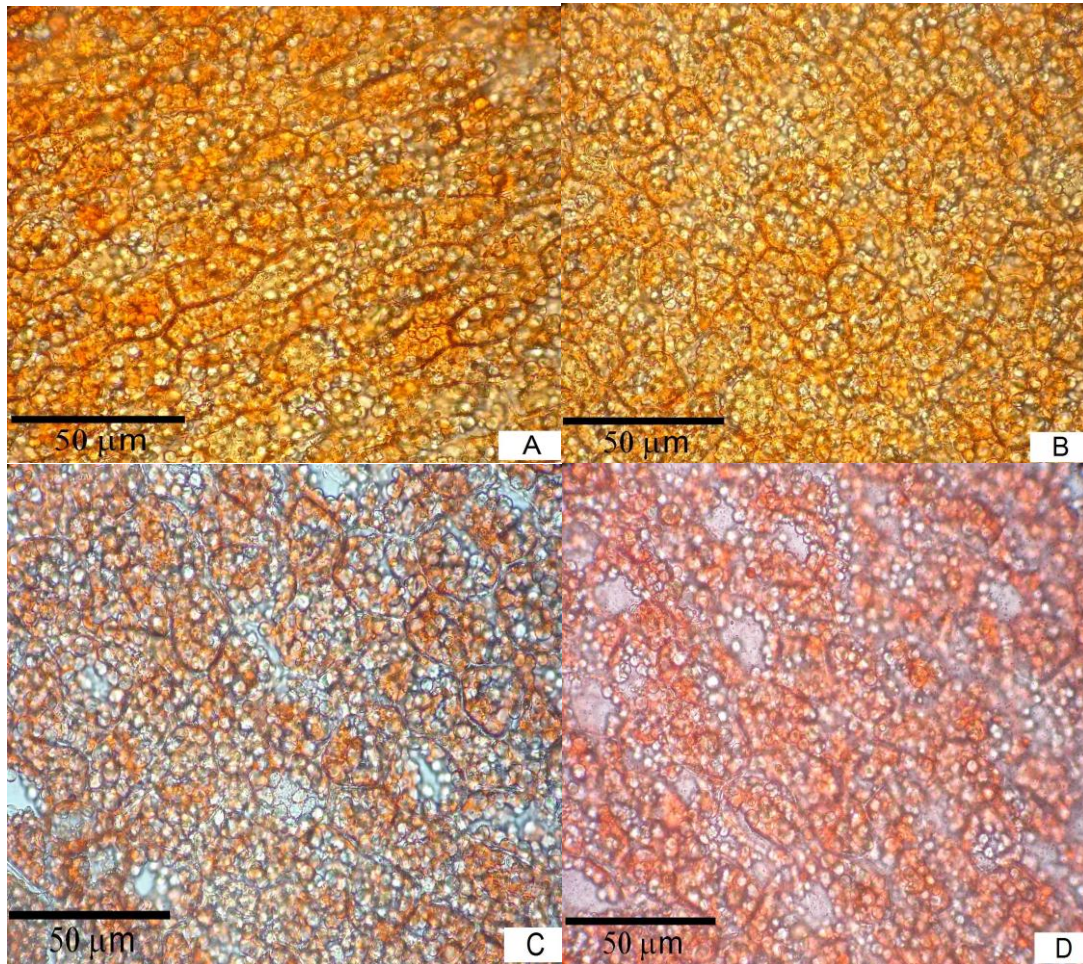


FIGURA 14- SECÇÕES LONGITUDINAIS DO HIPOCÓTILO DE *Blepharocalyx salicifolius* OBTIDAS DE SEMENTES COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE, SUBMETIDOS AO TESTE COM SUDAM III. A – semente com 37% de umidade, B- semente com 25% de umidade, C- semente com 18% de umidade, D- semente com 14% de umidade.

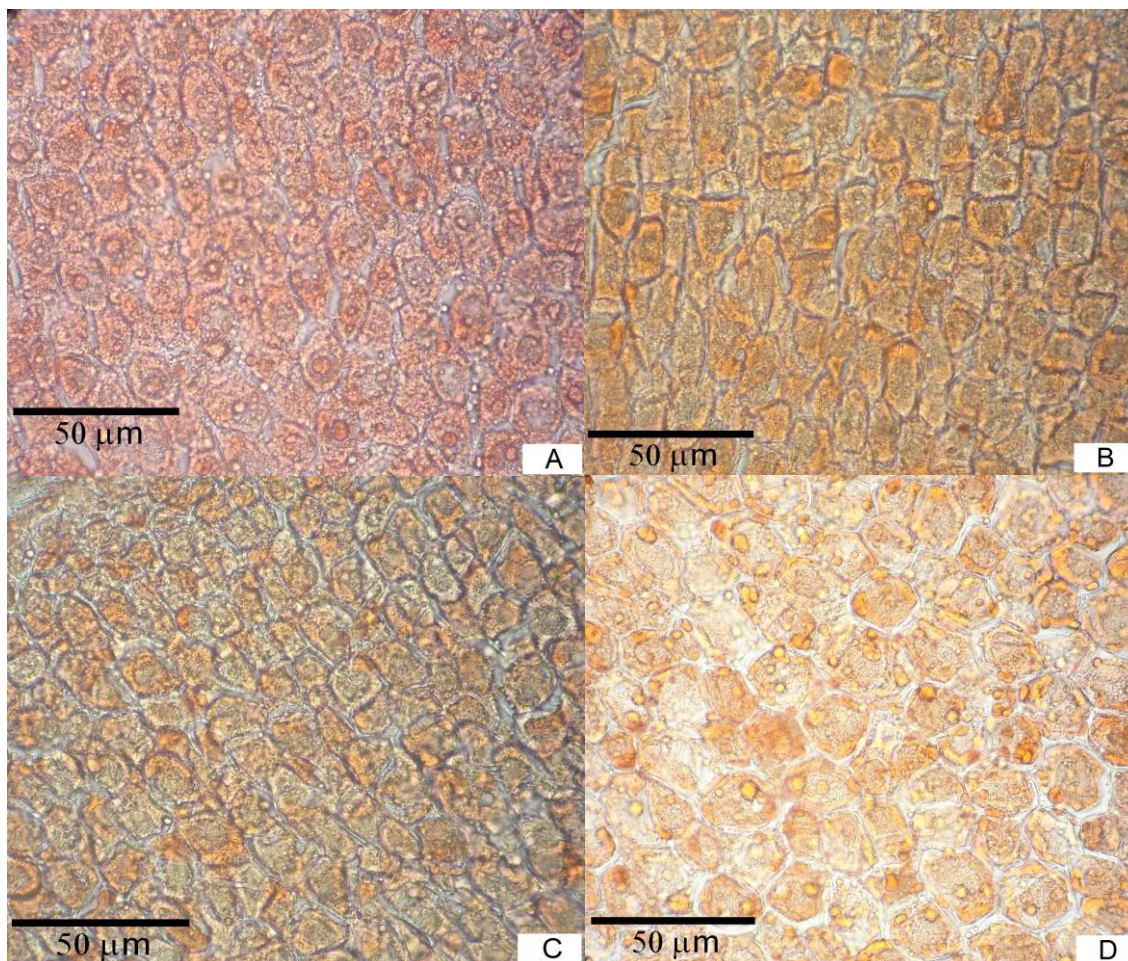


FIGURA 15- SECÇÕES LONGITUDINAIS DO ENDOSPERMA DE *Casearia decandra* OBTIDAS DE SEMENTES COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE, SUBMETIDAS AO TESTE COM SUDAM III. A – semente com 54% de umidade, B- semente com 21% de umidade, C- semente com 14% de umidade, D- semente com 8% de umidade.

As secções do eixo embrionário das sementes de *B. salicifolius* coradas com lugol evidenciaram grande quantidade de grânulos de amido no citoplasma das células. No entanto, não se observou diferença na quantidade de amido entre os tratamentos de secagem (Figura 16). A quantificação do conteúdo de amido foi realizada nas análises bioquímicas (item 4.1.8)

No endosperma das sementes de *C. decandra* não foi detectada a presença de grãos de amido pelo teste com lugol (Figura 17).

De acordo com Buckeridge *et al.* (2000, p. 140), o amido é armazenado em organelas denominadas amiloplastos e desempenha a função exclusiva de reserva, pois trata-se de uma substância metabolicamente inativa.

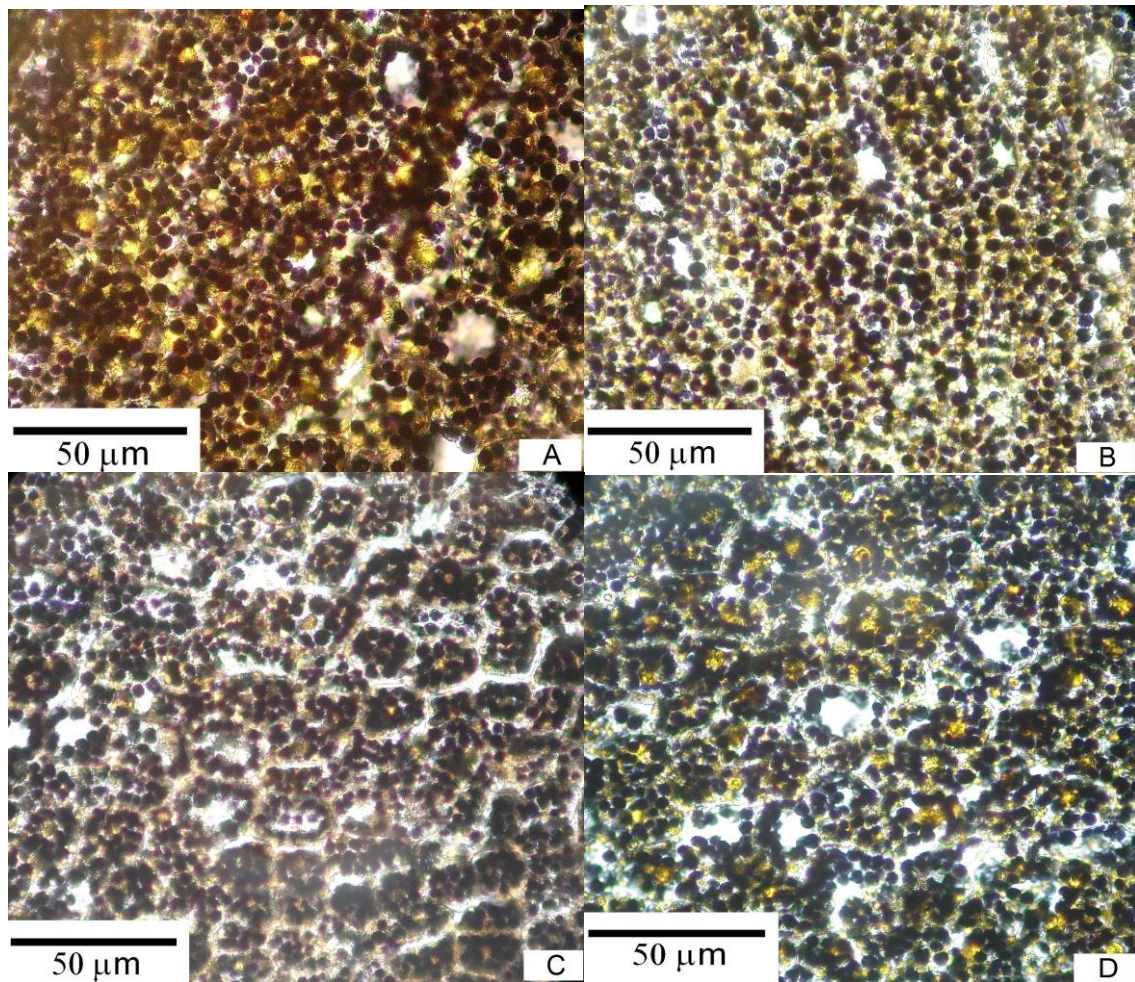


FIGURA 16- SECÇÕES LONGITUDINAIS DO HIPOCÓTILO DE *Blepharocalyx salicifolius* OBTIDAS DE SEMENTES COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE, SUBMETIDOS AO TESTE COM LUGOL. A – semente com 37% de umidade, B- semente com 25% de umidade, C- semente com 18% de umidade, D- semente com 14% de umidade.

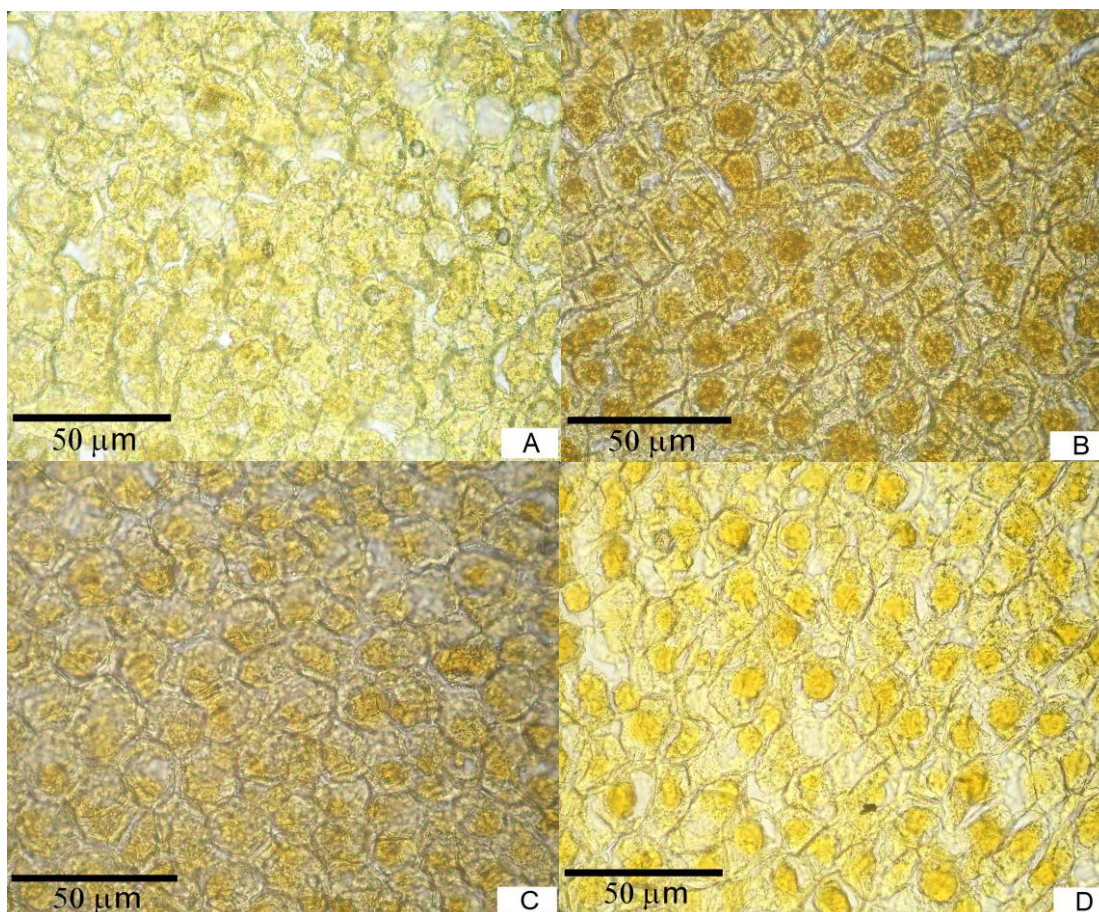


FIGURA 17- SECÇÕES LONGITUDINAIS DO ENDOSPERMA DE *Casearia decandra* OBTIDAS DE SEMENTES COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE, SUBMETIDAS AO TESTE COM LUGOL. A – semente com 54% de umidade, B- semente com 21% de umidade, C- semente com 14% de umidade, D- semente com 8% de umidade.

Quando os eixos embrionários de *B. salicifolius* foram analisados quanto ao seu conteúdo de compostos fenólicos, observou-se uma maior deposição do composto nas sementes submetidas aos tratamentos de secagem (21%, 14% e 8% de umidade) (Figura 18). No endosperma das sementes de *C. decandra* não foi observada a presença de compostos fenólicos (Figura 19).

Em *Campomanesia xanthocarpa* foi observada a presença de material redutor, sugerindo tratar-se de ácido tânico (natureza fenólica) e nas sementes não viáveis houve um aumento do seu poder redutor (BORDIGNON, 2000, p. 61). Maior deposição de compostos fenólicos também observou-se em *Coffea arabica* quando submetidas à desidratação (BEGNAMI, 1998, p. 34).

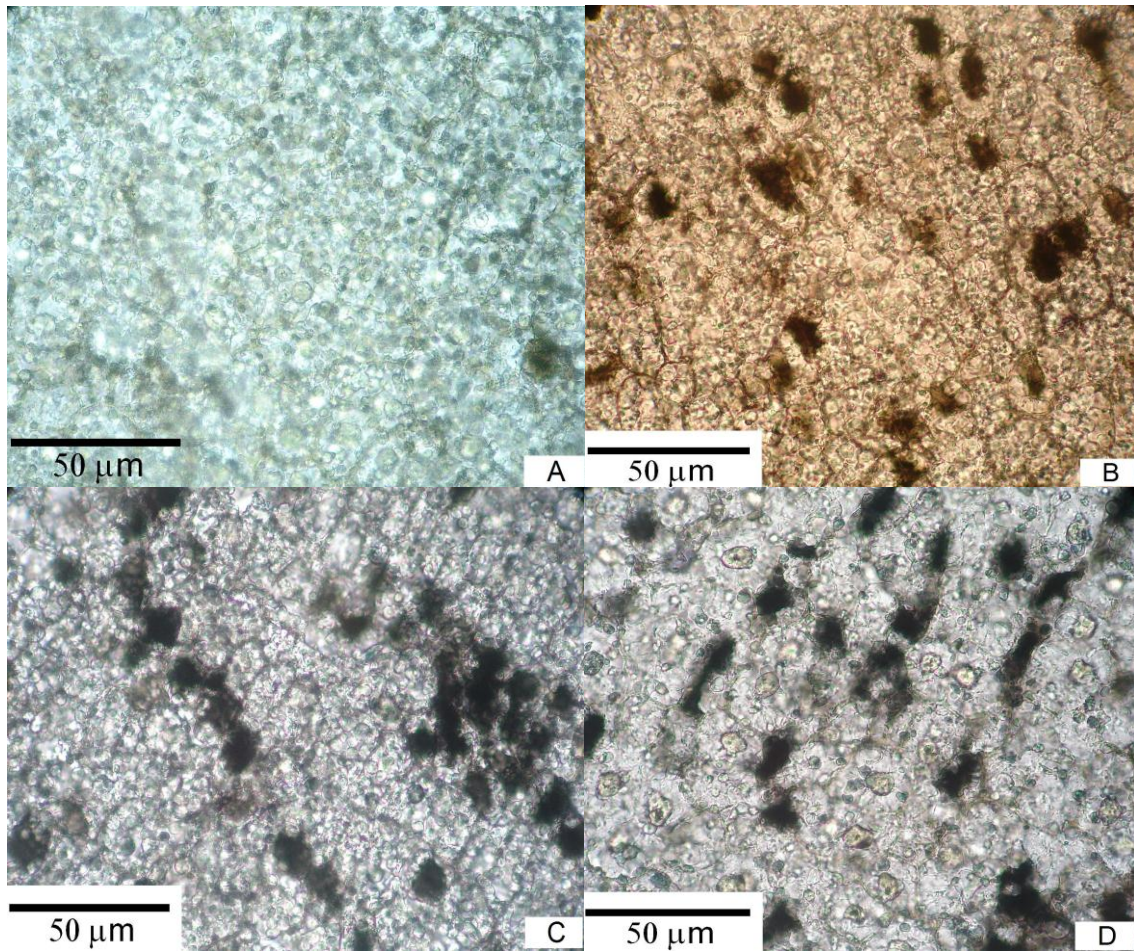


FIGURA 18- SECÇÕES LONGITUDINAIS DO HIPOCÓTILO DE *Blepharocalyx salicifolius* OBTIDAS DE SEMENTES COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE, SUBMETIDOS AO TESTE COM CLORETO FÉRRICO. A – semente com 37% de umidade, B- semente com 25% de umidade, C- semente com 18% de umidade, D- semente com 14% de umidade.

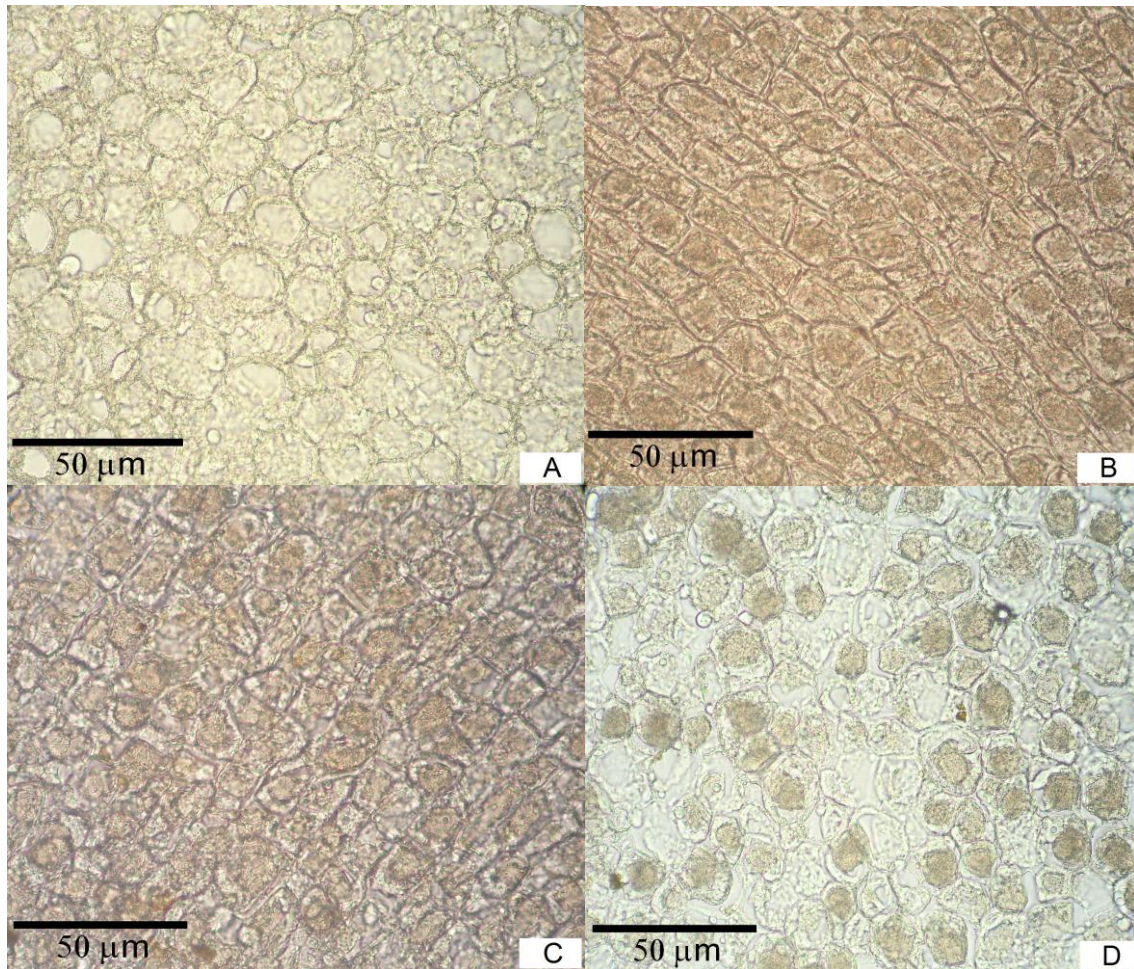


FIGURA 19- SECÇÕES LONGITUDINAIS DO ENDOSPERMA DE *Casearia decandra* OBTIDAS DE SEMENTES COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE, SUBMETIDAS AO TESTE COM CLORETO FÉRRICO. A – semente com 54% de umidade, B- semente com 21% de umidade, C- semente com 14% de umidade, D- semente com 8% de umidade.

4.1.8 Análise bioquímica

4.1.8.1 Extração e quantificação de lipídios

Para os dados da quantificação de lipídios das sementes de *C. decandra* não foi possível ajustar uma equação polinomial, pois os valores proporcionaram uma reta (Figura 20).

Na quantificação de lipídios pode-se observar que as duas espécies possuem elevadas quantidades: aproximadamente 20% para *B. salicifolius* e 30% para *C. decandra*. Este resultado corrobora com as observações feitas a partir das análises anatômicas, onde foi visualizada grande quantidade de lipídios no embrião de *B. salicifolius* e no endosperma de *C. decandra*.

Com a secagem das sementes, a porcentagem de lipídios aumentou a partir de 18% de umidade nas sementes de *B. salicifolius*, chegando a 23% de lipídios com 14% de umidade e em *C. decandra* o valor se manteve com 32% de lipídios (Figura 20).

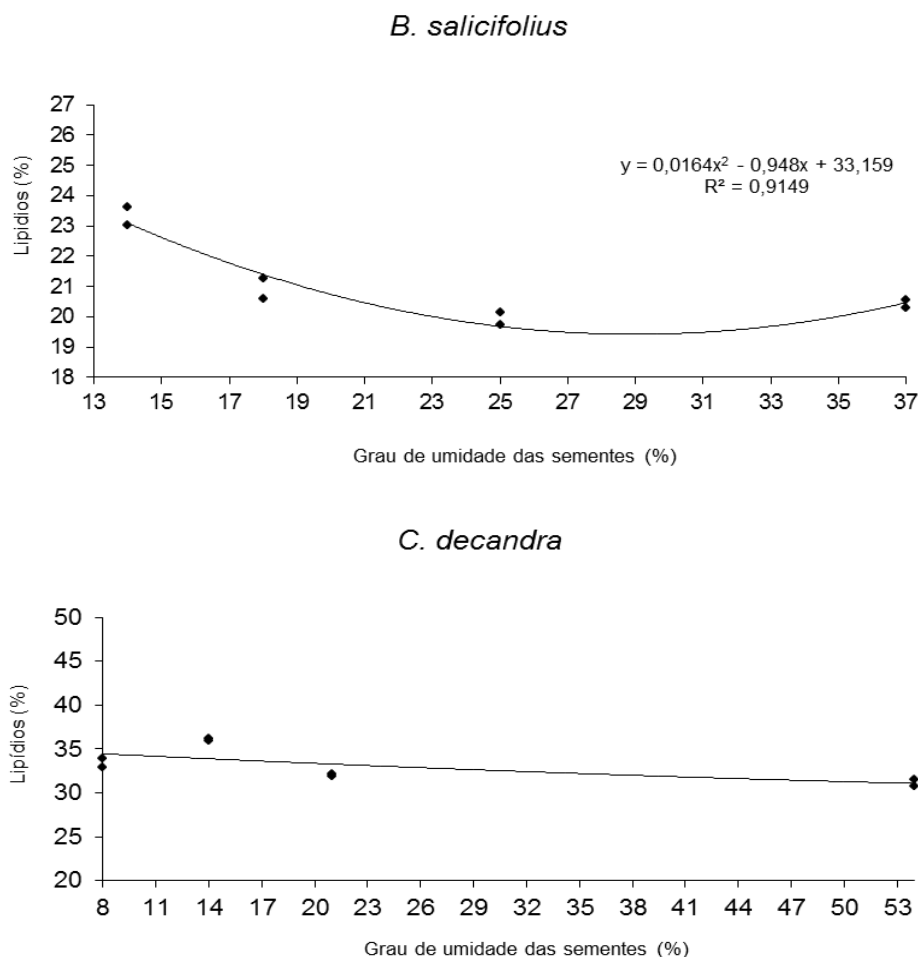


FIGURA 20- PORCENTAGEM DE LIPÍDIOS NAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.

Bonome (2006, p. 70) também verificou um aumento na porcentagem de lipídios em embriões de *Hevea brasiliensis* durante o armazenamento e atribuiu isso ao fato das sementes recalcitrantes continuarem o processo de desenvolvimento após a abscisão da planta-mãe e com isso os embriões ainda estavam em processo de diferenciação celular e deposição de reservas. Bordignon (2000, p. 64) também verificou aumento no conteúdo de lipídios em sementes de *Campomanesia xanthocarpa* com a secagem.

Os resultados concordam com Marcos Filho (2005, p. 367), que considerou que nas sementes recalcitrantes, em média 60% das células estão em fase de pré-replicação celular no momento da maturidade fisiológica. Em sementes de *B. salicifolius* foram observadas células do embrião em divisão celular, evidenciando que ainda estava em processo de desenvolvimento.

Mello (2008, p. 78-80), estudando sementes recalcitrantes e ortodoxas, agrupou-as em duas categorias quando se analisa a porcentagem de lipídios. Eixos embrionários e cotilédones de espécies ortodoxas: *E. speciosa* e *C. echinata* apresentaram rendimento de lipídios muito superior às sementes recalcitrantes: *I. vera* e *E. uniflora*, dando indícios de que a maior quantidade de lipídios poderia estar associada a mecanismos de proteção contra estresse hídrico. No entanto, tal fato não foi observado para as sementes de *B. salicifolius* e *C. decandra*, pois ambas possuem grandes quantidade de lipídios e não toleram a perda de água, verificando que para estas espécies uma maior quantidade de lipídios não está associada com a tolerância à dessecação.

Bonome (2006, p. 1) armazenou sementes de *Hevea brasiliensis* e observou biossíntese, degradação, peroxidação e coalescência de corpos lipídicos, fatores fortemente correlacionados com a deterioração de sementes. Diminuição no número de glóbulos lipídicos também foi observado em sementes envelhecidas artificialmente de *Melanoxylon brauna*, e as inviáveis de *Coffea arabica* (BEGNAMI, 1998, p. 44-45; CORTE, 2008, p. 113-115).

Para Marcos Filho (2005, p. 308), a instabilidade química dos lipídios constitui um dos fatores preponderantes para a queda da viabilidade das sementes de várias espécies. As principais alterações em lipídios, durante a deterioração são devido à hidrólise enzimática, à peroxidação e à autoxidação. Como resultado há a formação de glicerol e ácidos graxos livres, radicais livres e produtos tóxicos como aldeídos, ácidos, alcoóis e cetonas, bem como a

degradação de lipídios das membranas. Desta forma, se a oxidação de ácidos graxos e a formação de radicais livres estão ocorrendo durante o envelhecimento, o teor de ácidos graxos insaturados deve declinar como o aumento da deterioração (BEWLEY; BLACK, 1985, p. 110-112).

No entanto, em *B. salicifolius* e *C. decandra* observou-se diminuição no conteúdo de lipídios, indicando que a perda da viabilidade das sementes durante a secagem não foi devido ao seu consumo como reserva.

4.1.8.2 Extração e quantificação amido

Para os dados da quantificação de amido das sementes de *C. decandra* não foi possível ajustar uma equação polinomial, pois os valores proporcionaram uma reta (Figura 21).

Os rendimentos das extrações com dimetilsulfóxido para as sementes de *B. salicifolius* e *C. decandra* antes da secagem foram de 30% e 3%, respectivamente (Figura 21). Estes resultados sugerem a presença de grande quantidade de amido nas sementes de *B. salicifolius*. O elevado conteúdo de glucose (90%) determinado na análise da composição monossacarídica da fração (Figura 22) confirma a presença de amido. Além disto, esta fração apresentou resultado positivo com lugol. Estando de acordo com as observações realizadas nas análises anatômicas (Figuras 16 e 17), onde se verificou grande quantidade de amido presente no hipocótilo de *B. salicifolius*.

Em *C. decandra* a extração com dimetilsulfóxido não revelou a presença de amido, uma vez que a composição monossacarídica do extrato possui pequena quantidade de glucose (cerca de 5%) (Figura 23), e o teste com lugol foi negativo. O material extraído revelou grande quantidade de arabinose, galactose e manose, cerca de 50%, 20% e 15%, respectivamente (Figura 23), indicando a presença de arabinanas e galactanas, ou arabinogalactanas, que são polissacarídeos normalmente associados a pectinas e mananas que são hemiceluloses.

A porcentagem de material extraído com dimetilsulfóxido das sementes de *C. decandra* não se alterou durante a secagem (Figura 21).

Com relação à quantificação da composição monossacarídica da fração extraída com dimetilsulfóxido não foi possível ajustar as equações polinomiais,

pois em alguns casos os valores proporcionaram uma reta, e em outros, devido a grande variabilidade dos dados (Figuras 22 e 23).

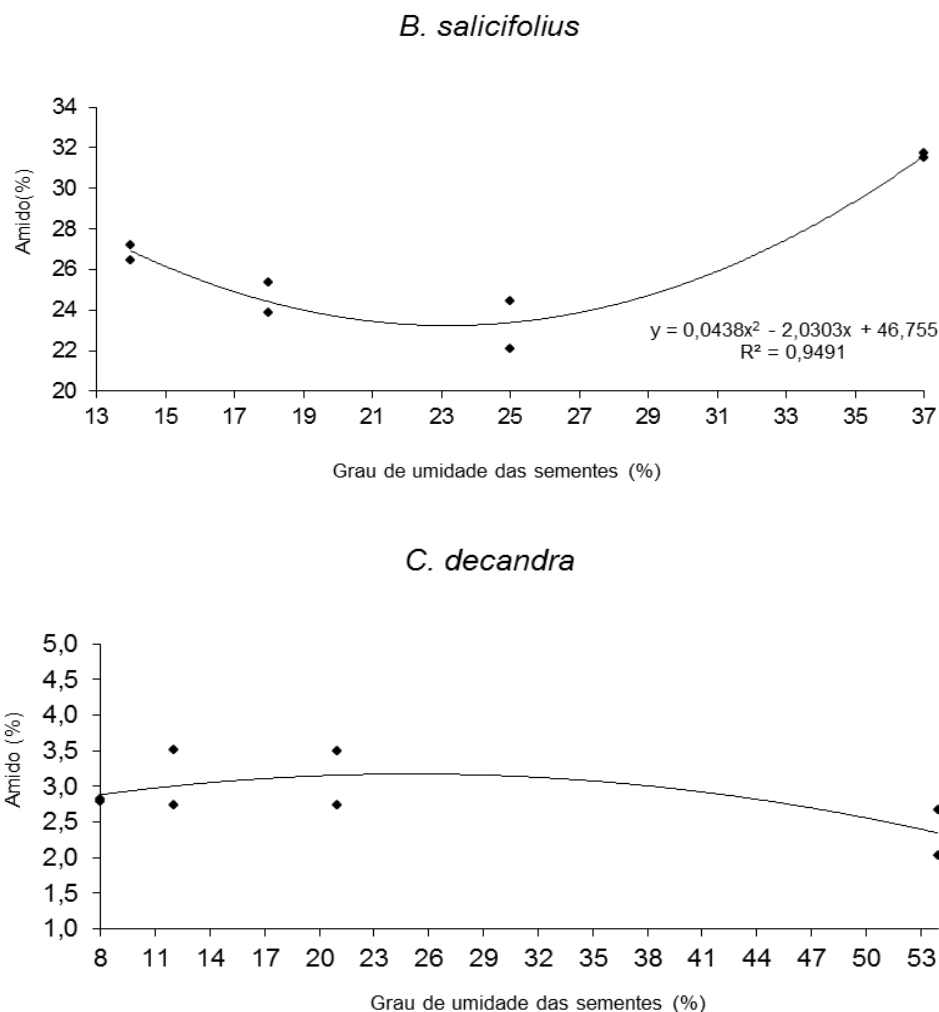


FIGURA 21- RENDIMENTO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA OBTIDA ATRAVÉS DA EXTRAÇÃO COM DIMETILSULFÓXIDO DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.

Assim, as sementes de *B. salicifolius* podem ser classificadas como amiláceas, uma vez que continha 30% de amido, e as de *C. decandra* como oleaginosas, pois apresentaram 30% de lipídios. No entanto, deve-se ressaltar que não foram realizados testes para a quantificação de proteínas.

Com a desidratação das sementes, verificou-se que a porcentagem de amido em *B. salicifolius* diminuiu. Desta forma, pode-se afirmar que a reserva de amido foi consumida durante o período de desidratação. Em *C. decandra* não houve alteração no rendimento da fração extraída (Figura 21).

Resultado semelhantes foram observados em sementes armazenadas de *Hevea brasiliensis*, *Araucaria angustifolia* e *Eugenia uniflora*, nas quais observou-se diminuição no teor de amido, devido à utilização deste composto como substrato para a respiração (RAMOS; SOUZA, 1991, p.22-23; BORDIGNON, 2000, p. 61; BONOME 2006, p. 1).

A composição monossacarídica da fração amido em *B. salicifolius* não se alterou durante a secagem (Figura 22). Nas sementes de *C. decandra* a composição se alterou a partir de 21% de umidade, sendo que a porcentagem de galactose diminuiu e a de manose aumentou.

Resultados de Bernal-Lugo e Leopold (1992, p. 1207) demonstraram que a redução de galactose, frutose e glicose em embriões de milho está associada com a perda de vigor. Para os autores, a galactose é um dos mais reativos açúcares em relação às reações de Amadori, que também estão associadas a degradação de proteínas, com conseqüente decréscimo da qualidade das sementes. Estes resultados estão de acordo com os obtidos neste trabalho, pois em *C. Decandra* observou-se redução de galactose nas sementes desidratadas a partir de 21% de umidade, onde também se verificou queda na viabilidade e vigor das sementes (itens 4.1.2 - 4.1.6).

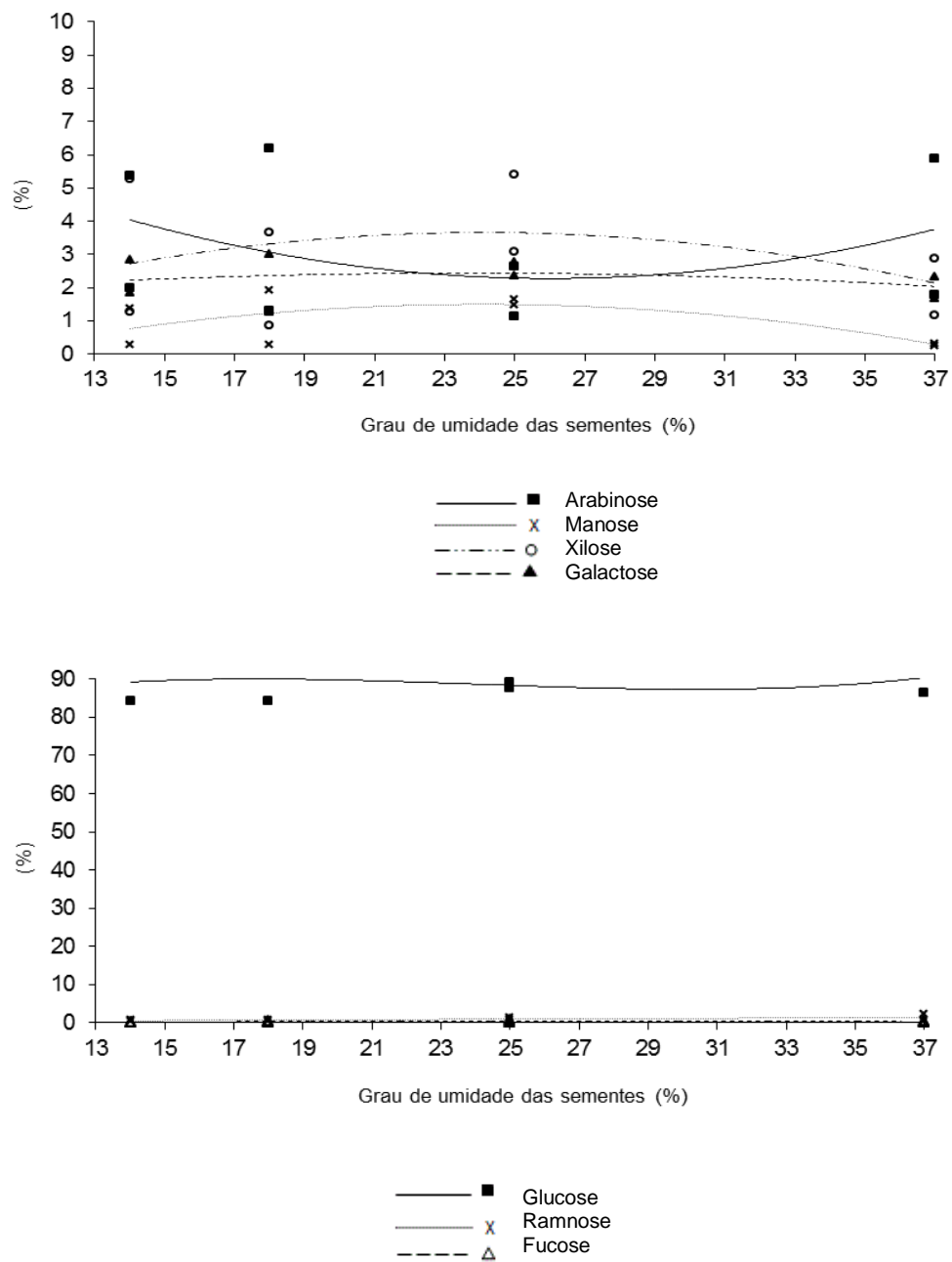


FIGURA 22- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO OBTIDA APÓS EXTRAÇÃO COM DIMETILSULFÓXIDO DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.

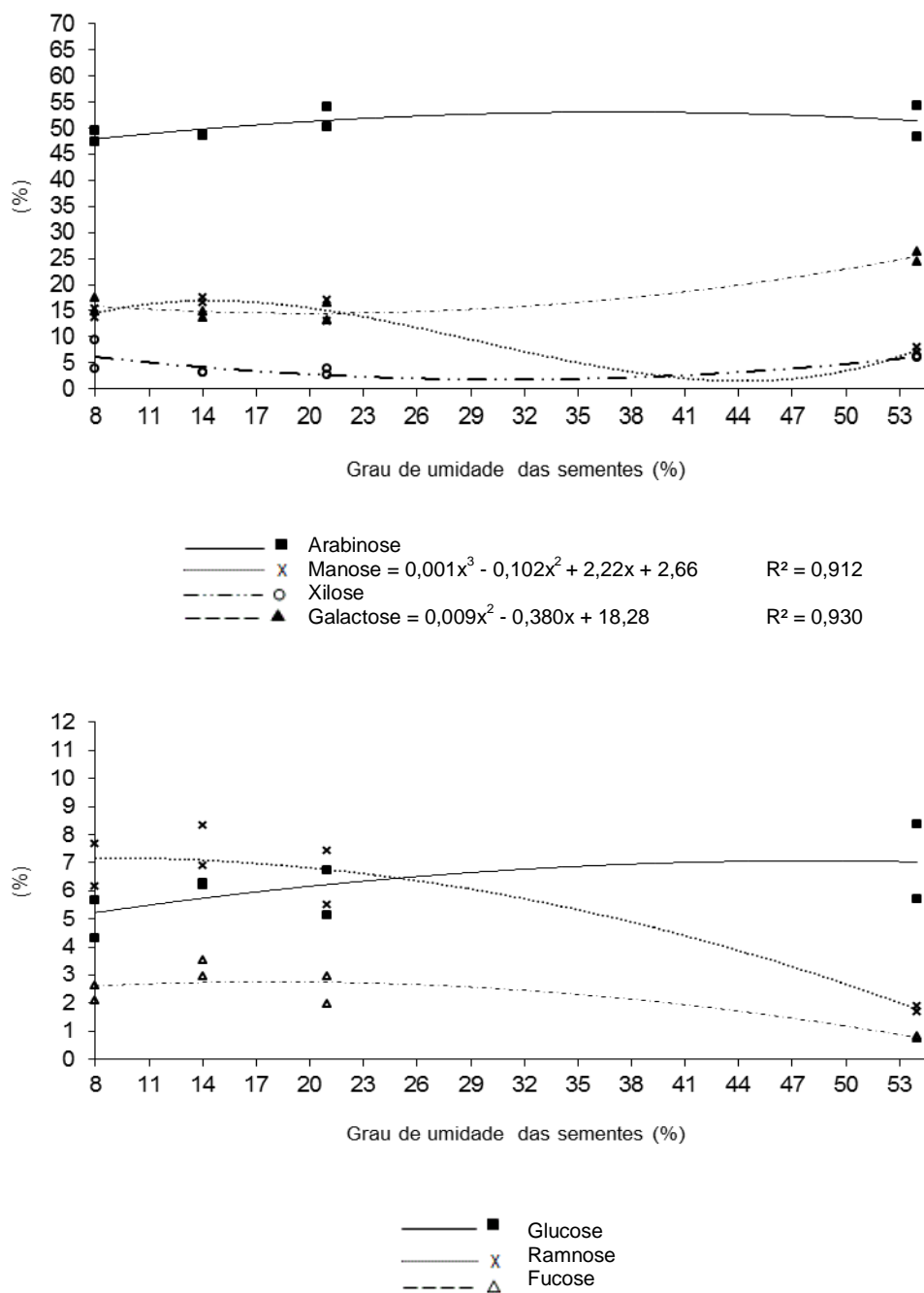


FIGURA 23- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO OBTIDA APÓS EXTRAÇÃO COM DIMETILSULFÓXIDO DAS SEMENTES DE *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.

4.1.8.3 Extração e quantificação de polissacarídeos de parede celular

Para determinados dados da quantificação de polissacarídeos de parede celular e da composição monossacarídica não foi possível ajustar as equações polinomiais, pois em alguns casos os valores proporcionaram uma reta, e em outros, houve grande variabilidade dos valores.

Para extração das pectinas da parede celular das sementes de *B. salicifolius* e *C. decandra* foram realizadas extrações aquosas, a quente, e não houve diminuição na quantidade da fração polissacarídica solúvel em água quente (Figura 24).

A composição monossacarídica da fração extraída com água revelou grande quantidade de glicose (45%) em sementes de *B. salicifolius*, evidenciando a presença de grande quantidade de amido. Foram verificadas também quantidades significativas de arabinose (20%) e galactose (20%), componentes típicos de pectinas (Figura 25).

A porcentagem de alguns monossacarídeos se alterou durante a secagem de *B. salicifolius* (Figura 25). Arabinose e manose aumentaram durante e a quantidade de glucose diminuiu, evidenciando mais uma vez o consumo de amido.

O aumento de arabinose e manose podem estar relacionados ao fato de que as sementes de espécies recalcitrantes ainda estejam em processo de diferenciação e expansão celular, onde a parede celular pode sofrer modificações (MARCOS FILHO, 2005, p. 366).

Em *C. decandra* foi verificada grandes quantidades de arabinose (58%), galactose (24%) e quantidades menores de ramnose, confirmando a extração de pectinas, pois de acordo com Buckeridge *et al.* (2000, p. 140), as cadeias laterais neutras das pectinas são formadas principalmente por arabinose e galactose. No entanto a composição monossacarídica não se alterou durante a secagem (Figura 26).

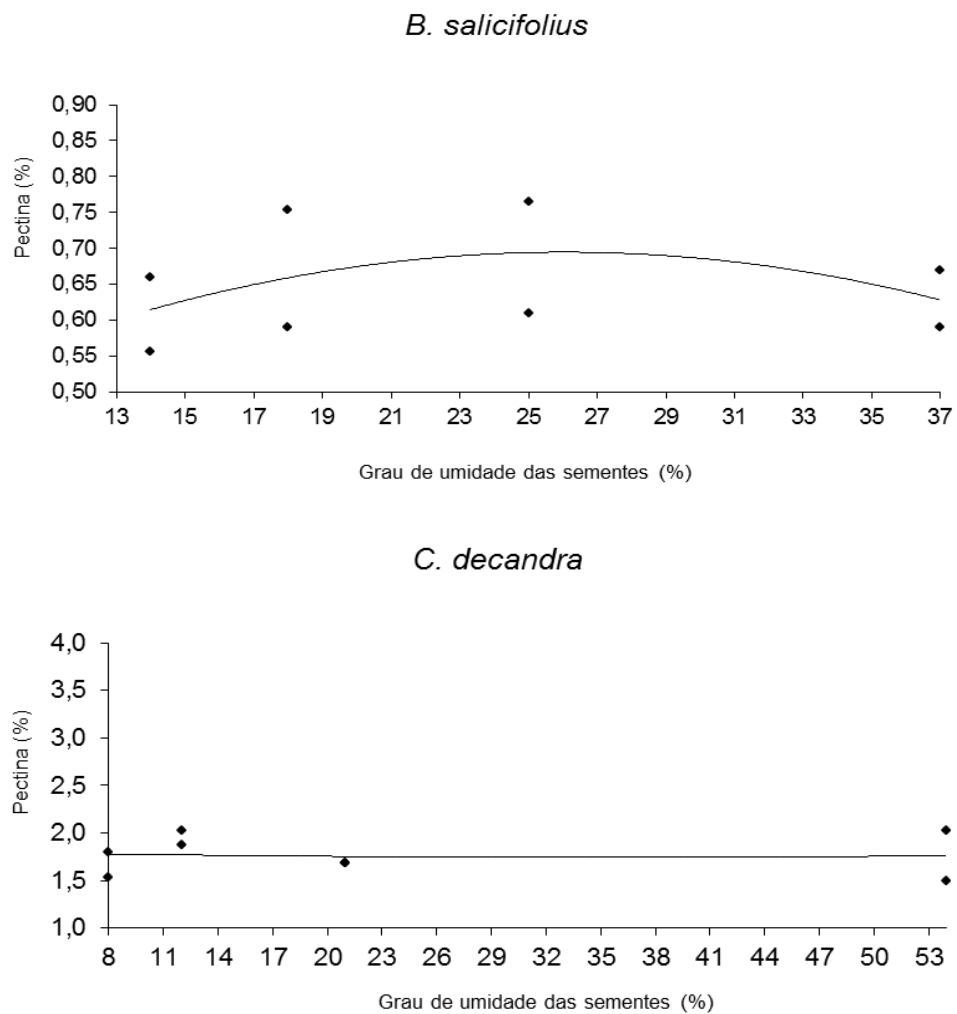


FIGURA 24- RENDIMENTO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA OBTIDA ATRAVÉS DA EXTRAÇÃO AQUOSA A QUENTE DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.

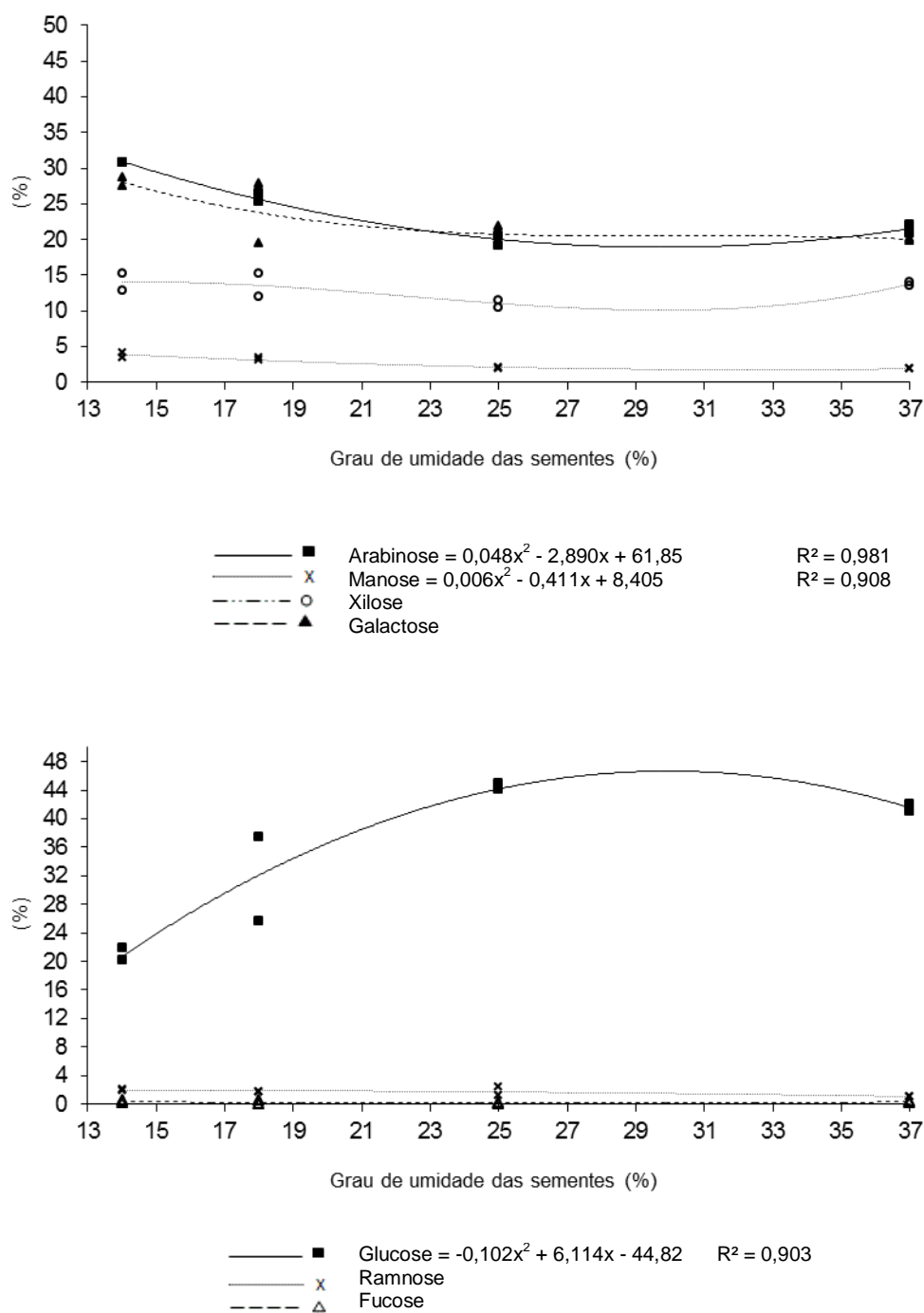


FIGURA 25- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO OBTIDA APÓS EXTRAÇÃO AQUOSA A QUENTE DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.

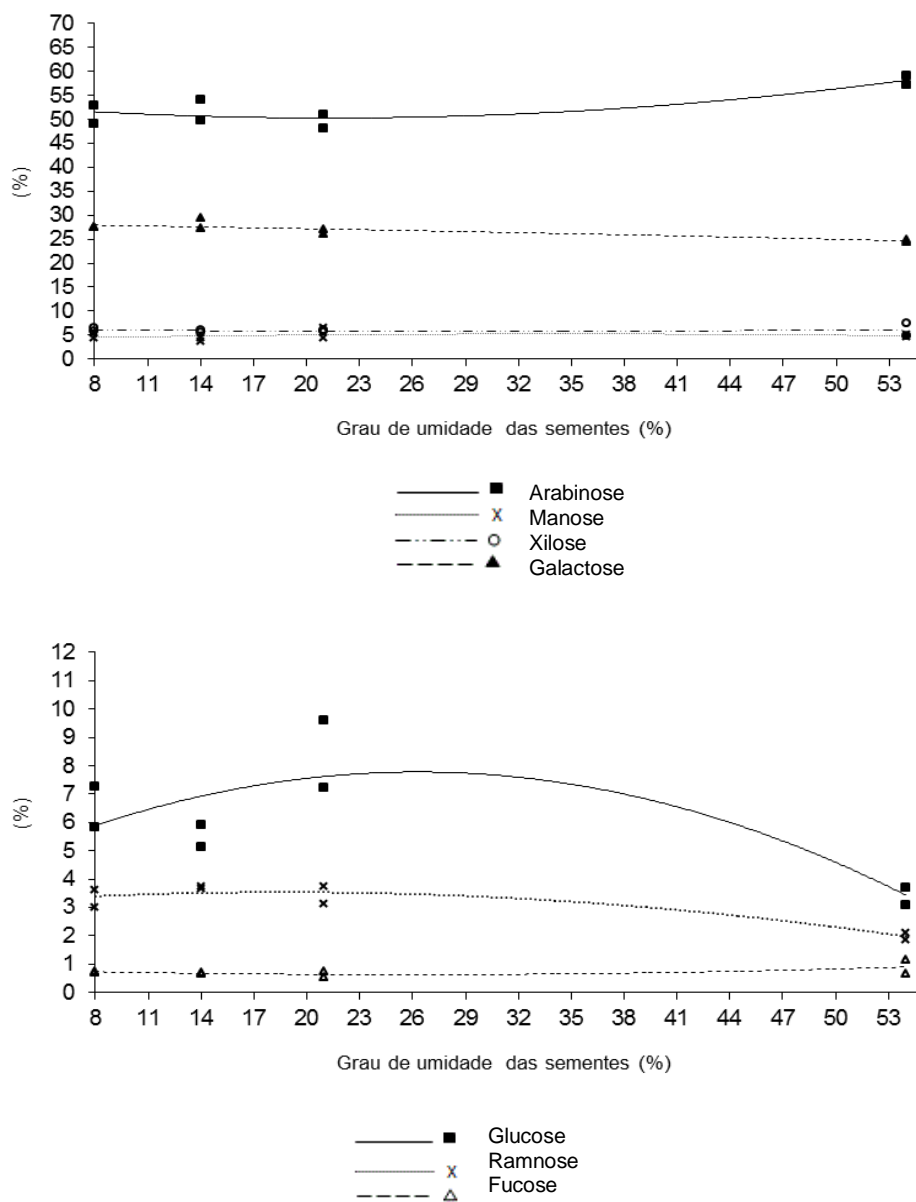


FIGURA 26- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO OBTIDA APÓS EXTRAÇÃO AQUOSA A QUENTE DAS SEMENTES DE *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.

Para extração das hemiceluloses da parede celular das sementes de *B. salicifolius* e *C. decandra* foram feitas extrações alcalinas. As hemiceluloses extraídas foram fracionadas em hemicelulose “A” e hemicelulose “B”. Não houve alteração do conteúdo de hemicelulose “A” durante a secagem das sementes de *B. salicifolius* e *C. decandra* (Figura 27).

A composição monossacarídica da fração correspondente à hemicelulose “A” nas sementes de *B. salicifolius* revelou grande quantidade de

glucose (24%), arabinose (25%), galactose (22%), xilose (20%) e menores quantidades de manose (8%), ramnose (1%) e fucose (2%) (Figura 28). Desta forma, o material extraído pode conter arabinogalactanas, arabinoxilanas e mananas.

A porcentagem de glucose em *B. salicifolius* diminuiu com a desidratação das sementes (Figura 28). Como possuem grande quantidade de amido, talvez, uma parcela desta glucose seja proveniente do amido, que foi consumido durante o período de desidratação.

Em *C. decandra*, a composição monossacarídica da hemicelulose "A" revelou a presença majoritária de xilose (47%), seguido de 29% de arabinose, 10% de galactose, 3% de glucose e 1% de manose (Figura 29). Os resultados indicam a predominância de xilanas na fração hemicelulósica da semente de *C. decandra*. A composição monossacarídica também sugere a presença de arabinogalactanas.

Com a secagem das sementes de *C. decandra* houve diminuição na porcentagem de galactose e arabinose, e aumento na quantidade de xilose (Figura 29). Sugerindo que a secagem promoveu modificações na parede celular. Resultados semelhantes foram observados em embriões de *Zea mays*, onde se verificou que a diminuição de galactose, frutose e glicose está associada com a perda de vigor (BERNAL-LUGO; LEOPOLD 1992, p. 1207). De acordo com Sakurai *et al.*, (1987a, p. 1054) a síntese de polissacarídeos contendo galactose preservaria o potencial da célula expandir, sendo assim, com a diminuição de galactose, a célula perderia a elasticidade.

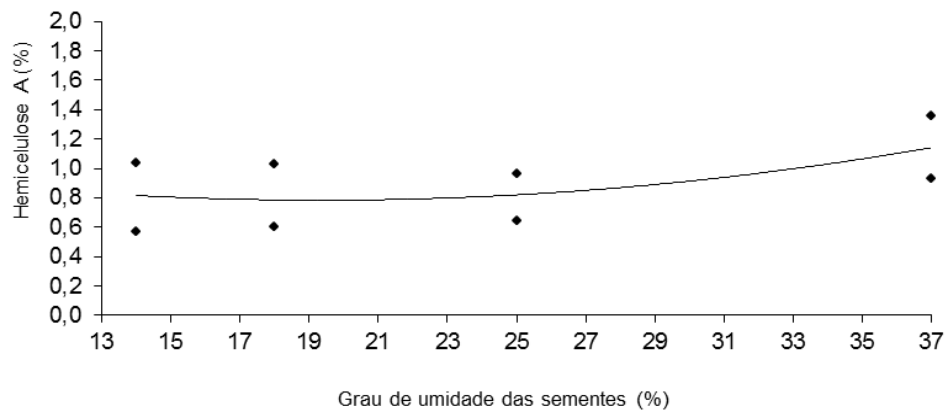
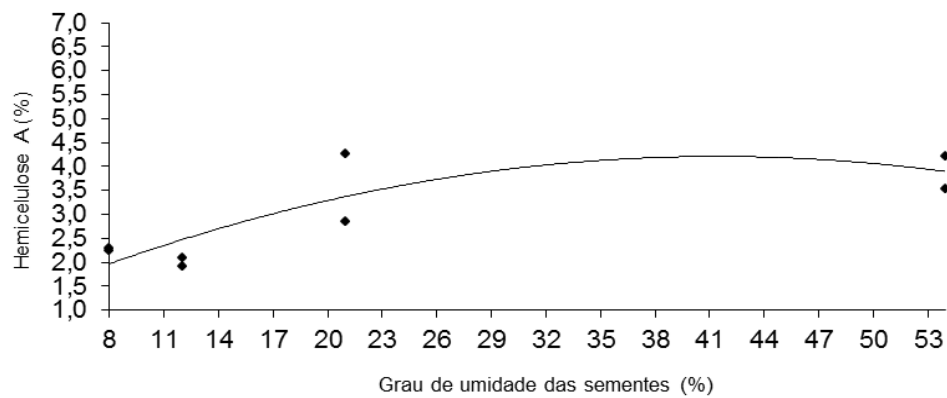
B. salicifolius*C. decandra*

FIGURA 27- RENDIMENTO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA OBTIDA ATRAVÉS DA EXTRAÇÃO ALCALINA CORRESPONDENTE A HEMICELULOSE "A" DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.

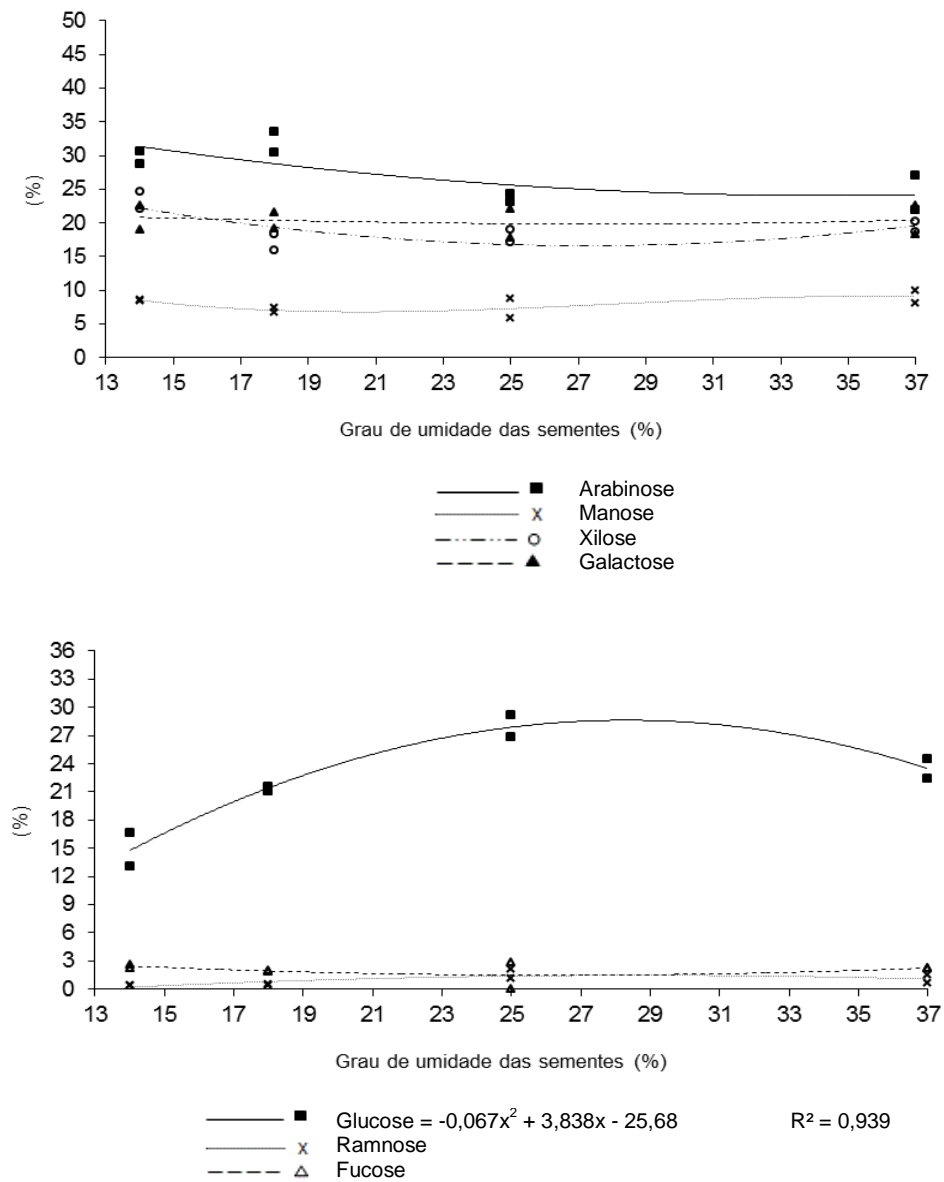


FIGURA 28- COMPOSIÇÃO MONOSSACARIDICA DA FRAÇÃO OBTIDA APOS EXTRAÇÃO ALCALINA DE HEMICELULOSE "A" DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.

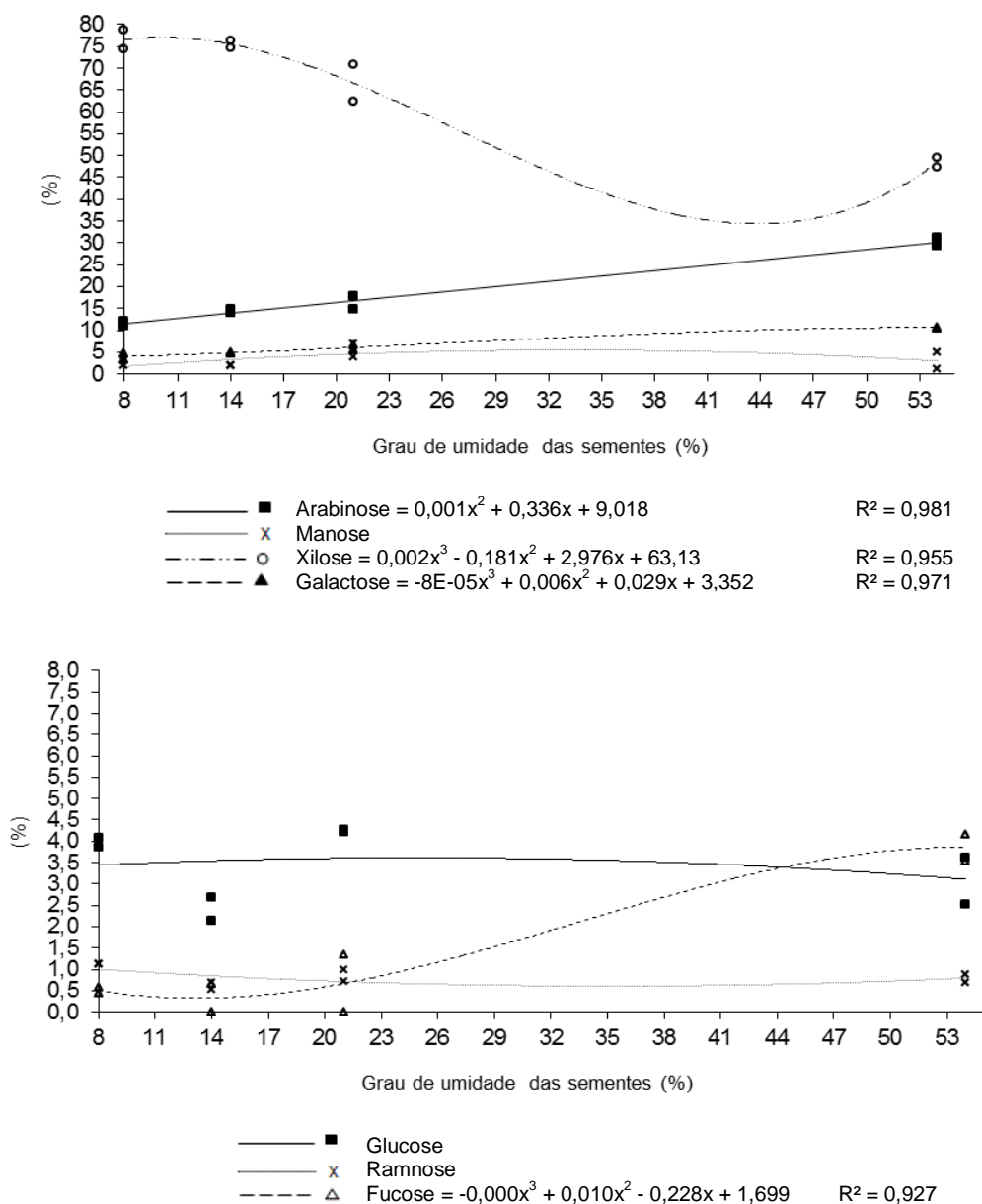


FIGURA 29- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO OBTIDA APÓS EXTRAÇÃO ALCALINA DE HEMICELULOSE "A" DAS SEMENTES DE *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.

O processo de secagem não promoveu diferenças na quantidade de material extraído na fração correspondente à hemicelulose "B" (Figura 30).

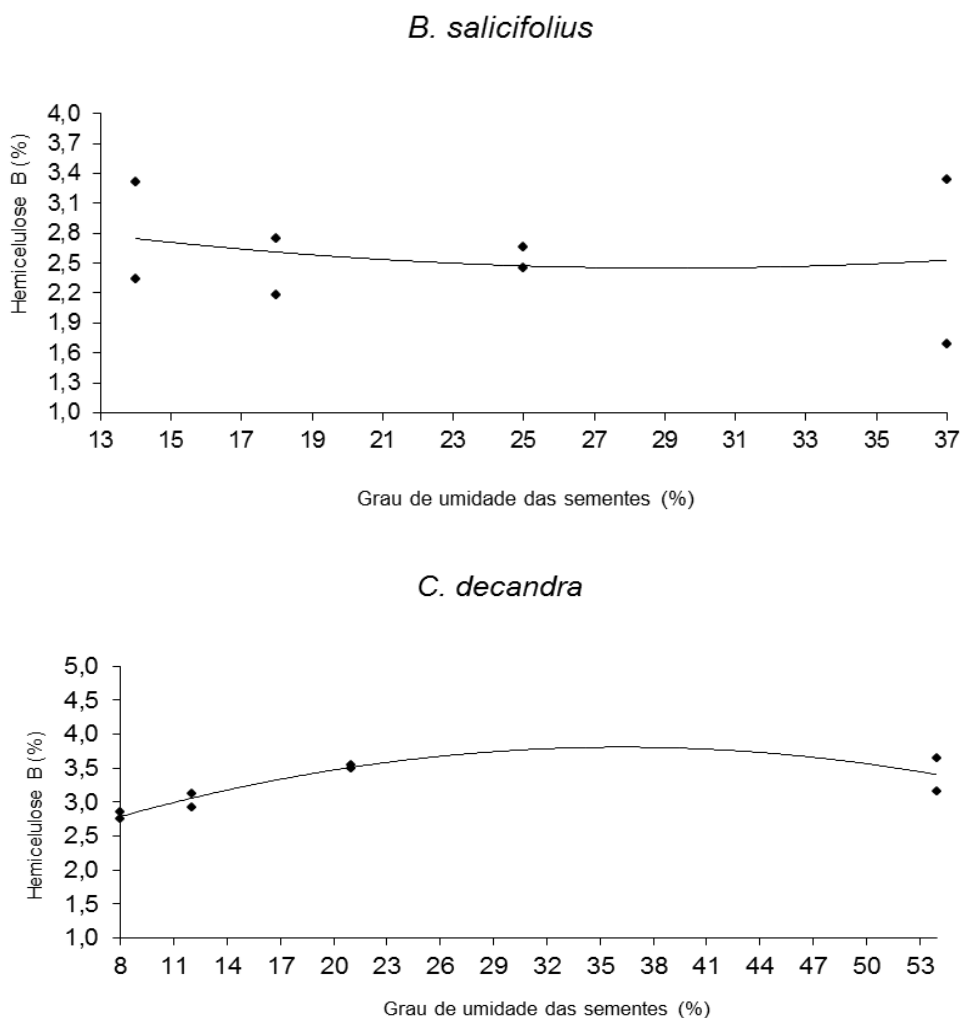


FIGURA 30- RENDIMENTO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA OBTIDA ATRAVÉS DA EXTRAÇÃO ALCALINA CORRESPONDENTE A HEMICELULOSE “B” DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.

A fração correspondente a hemicelulose “B” obtida das sementes de *B. salicifolius* revelou a presença de arabinose (40%), glucose (19%), galactose (16%) xilose (15%) manose (5%) e ramnose (0,7%) (Figura 31). Sendo assim, o material extraído pode conter arabinogalactanas, arabinoxilanas e mananas. A presença de ramnose indica que os polissacarídeos pécticos mais fortemente associados à parede celular foram liberados em condições alcalinas.

Na fração de hemicelulose “B” das sementes de *C. decandra* foram detectadas xilose (45%), arabinose (21%), galactose (14%), glucose (13%), manose (5%) e pequena quantidade de ramnose (1,8%) (Figura 32).

As arabinoxilanas foram os principais componentes da hemicelulose “B” nas sementes de *C. decandra*, assim como observado para a fração de

hemicelulose "A". Xiloglucanas e mananas provavelmente estão presentes, porém em menor quantidade.

Algumas modificações na composição das frações polissacarídicas foram observadas com a secagem sugerindo que este processo poderia promover algum tipo de modificação na parede celular

Com relação à secagem das sementes não houve diferença na porcentagem dos monossacarídeos (Figuras 31 e 32).

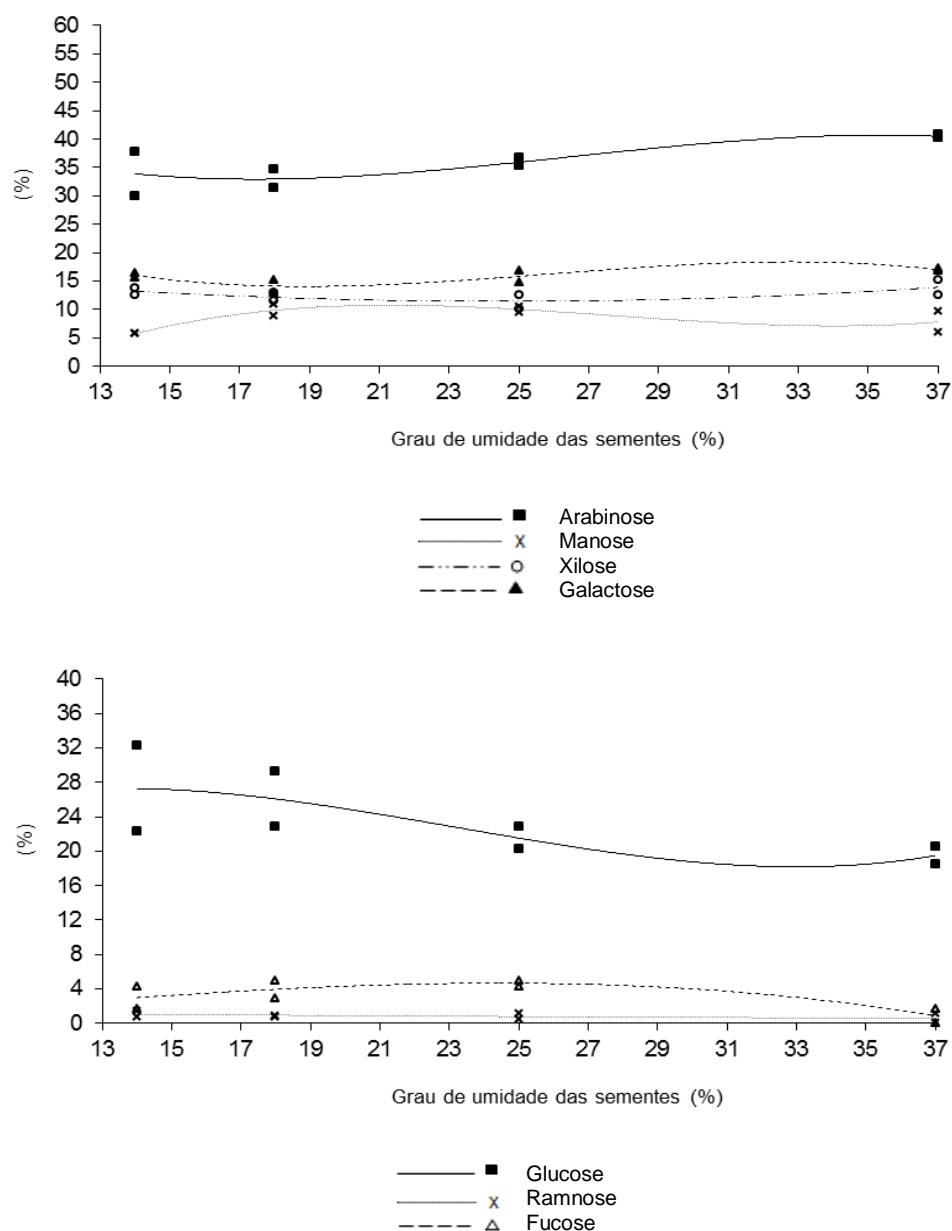


FIGURA 31- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO OBTIDA APÓS EXTRAÇÃO ALCALINA CORRESPONDENTE A HEMICELULOSE "B" DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.

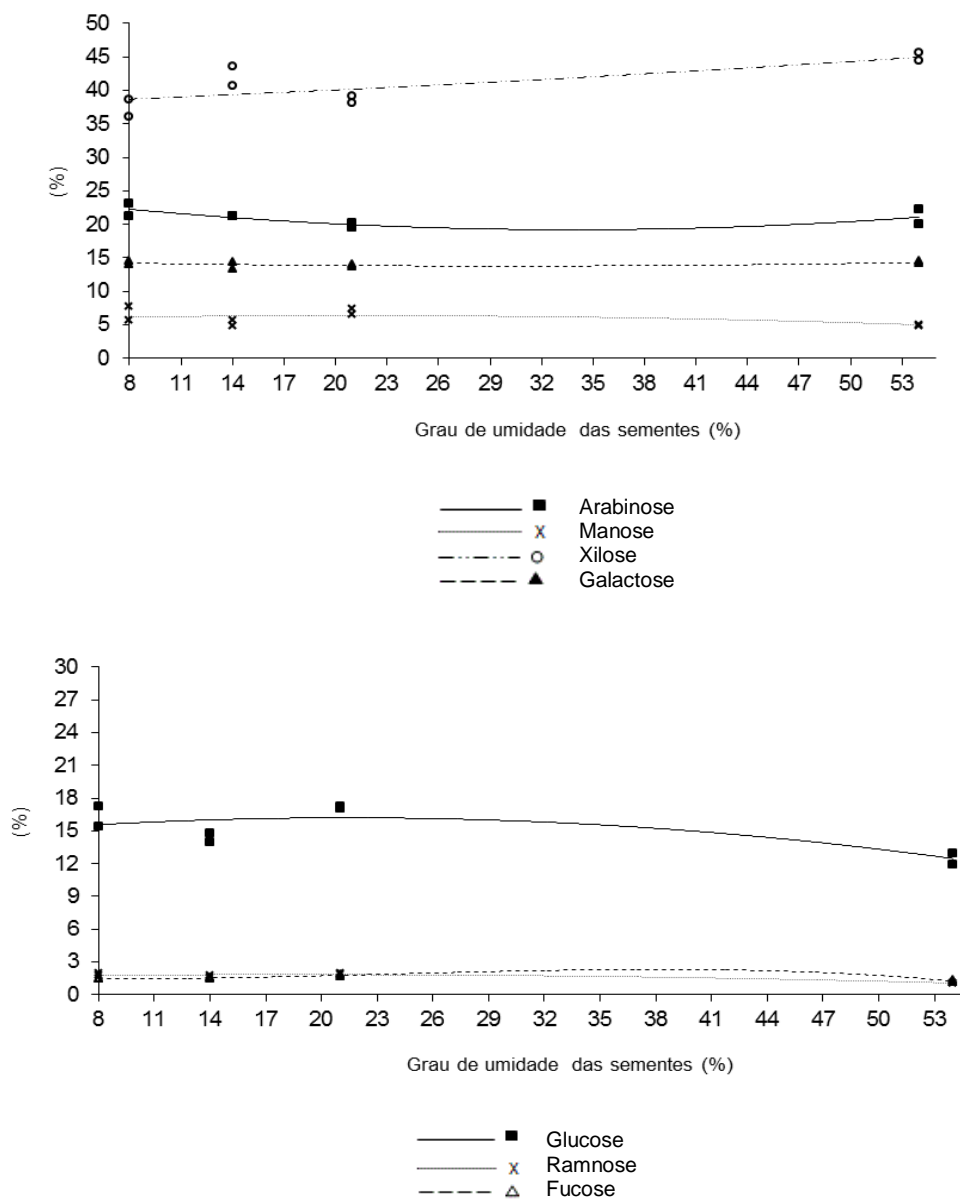


FIGURA 32- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO OBTIDA APÓS EXTRAÇÃO ALCALINA CORRESPONDENTE A HEMICELULOSE "B" DAS SEMENTES DE *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.

Os resultados das diferentes extrações de polissacarídeos permitem concluir que as sementes de *B. salicifolius* possuem o amido como principal carboidrato de reserva, enquanto em *C. decandra* não foi verificada a presença de amido.

A composição monossacarídica indica que somente polissacarídeos de parede celular foram extraídos, e que estes não exercem a função de reserva nas sementes de *B. salicifolius* e *C. decandra*.

4.1.8.4 Extração e quantificação de açúcares solúveis totais e açúcares redutores

Com relação aos açúcares solúveis, verificou-se que durante a desidratação houve aumento nas sementes de *B. salicifolius* e diminuição nas de *C. decandra* (Figura 33).

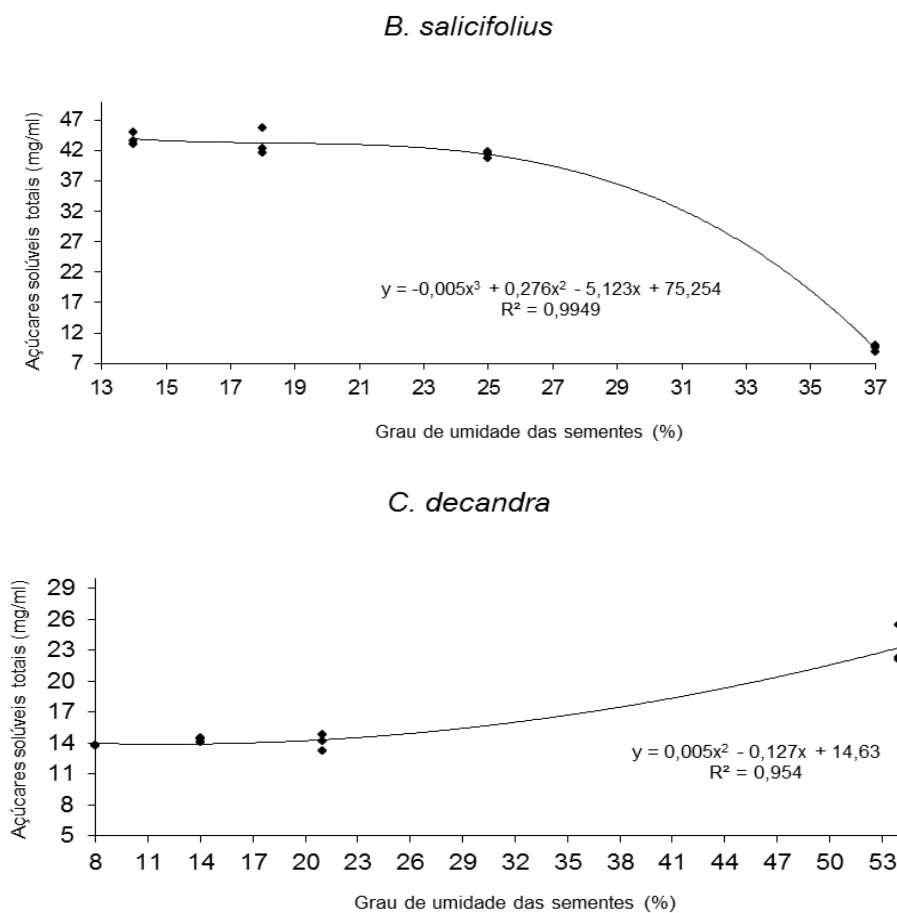


FIGURA 33- DOSAGEM DE AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS NAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.

Em *B. salicifolius*, o aumento dos açúcares solúveis provavelmente ocorreu devido à degradação do amido em moléculas menores. Em sementes de *Araucaria angustifolia* e *Eugenia uniflora* também foi verificado uma queda no teor de amido, e aumento no teor de açúcares solúveis totais, atribuídos à degradação do amido (RAMOS; SOUZA, 1991, p. 22-23; BORDIGNON, 2000, p. 61).

Mello (2008, p. 58-62) pesquisando sementes recalcitrantes e ortodoxas, verificou que à medida que as sementes de *I. vera* e *E. uniflora* foram desidratadas também ocorreu aumento no teor dos carboidratos solúveis, pois

o aumento de açúcares solúveis é geralmente associado a mecanismos de proteção contra estresses ambientais, como a seca e o frio.

Em *C. decandra* a diminuição destes compostos provavelmente se deu devido à utilização de açúcares solúveis como substrato para a respiração, uma vez que estas sementes não possuem amido e nem foi observado o consumo de lipídios.

É importante ressaltar que o conteúdo inicial de carboidratos solúveis totais nas sementes de *C. decandra* (23%) foi superior ao observado nas de *B. salicifolius* (9%).

Mello (2008, p. 58-62) observou que sementes de *I. vera*, *E. uniflora* e cotilédones de *C. echinata* possuem grande proporção de amido (42-63%), enquanto os eixos de *C. echinata* e eixos e cotilédones de *E. speciosa* possuem menos de 10% desse polissacarídeo. Essa baixa quantidade de amido poderia ser compensada pela alta proporção de açúcares solúveis, que são mais facilmente metabolizáveis, sendo, portanto mais eficientes para o desenvolvimento inicial das plântulas. Esta relação também foi observada nas espécies estudadas neste trabalho. *B. salicifolius* apresenta grande quantidade de amido, que foi degradado durante a secagem das sementes e transformado em açúcares solúveis. Enquanto que as de *C. decandra* não contêm amido e provavelmente utilizou açúcares solúveis como substrato para a respiração durante a desidratação.

No trabalho de Mello (2008, p. 58-62), a quantificação de açúcares solúveis em *C. echinata*, *E. speciosa*, *E. uniflora* e *I. vera* permitiu enquadrá-las em duas categorias, uma incluindo sementes que possuem maior quantidade de carboidratos solúveis e outra com as que possuem menor quantidade desses compostos. No primeiro grupo enquadram-se as de *C. echinata* e *E. speciosa*, ambas ortodoxas, e no outro grupo as de *I. vera* e *E. uniflora*, que são sensíveis à desidratação.

Os oligossacarídeos são comumente encontrados como reservas menores no embrião e em tecidos de reserva. Constituem importantes fontes de energia para a respiração durante a germinação e o desenvolvimento inicial da plântula (MARCOS FILHO, 2005, p. 154; BEWLEY; BLACK, 1994, p. 126).

No entanto, Farrant *et al.* (1993, p. 9) relataram alta concentração de sacarose e oligossacarídeos durante o desenvolvimento de sementes

recalcitrantes, sugerindo assim que a tolerância à dessecação não ocorreria apenas devido à presença desses açúcares. Fato também observado por Rodrigues *et al.* (2005, p. 75) para as sementes de *Syagrus coronata*, já que o aumento destes açúcares não tornou a semente isenta dos efeitos que a dessecação provocou na viabilidade.

Diante dessas exposições, pode-se concluir que grande quantidade de oligossacarídeos, ou o seu aumento durante a desidratação, não conferem tolerância às sementes, pois em *B. salicifolius* observou-se aumento destes açúcares durante a desidratação, o que não conferiu tolerância.

Com relação aos açúcares redutores, houve a mesma tendência que a dos açúcares solúveis. Para *B. salicifolius* houve um aumento na quantidade de açúcares redutores durante a secagem das sementes, e para *C. decandra* houve uma diminuição (Figura 34).

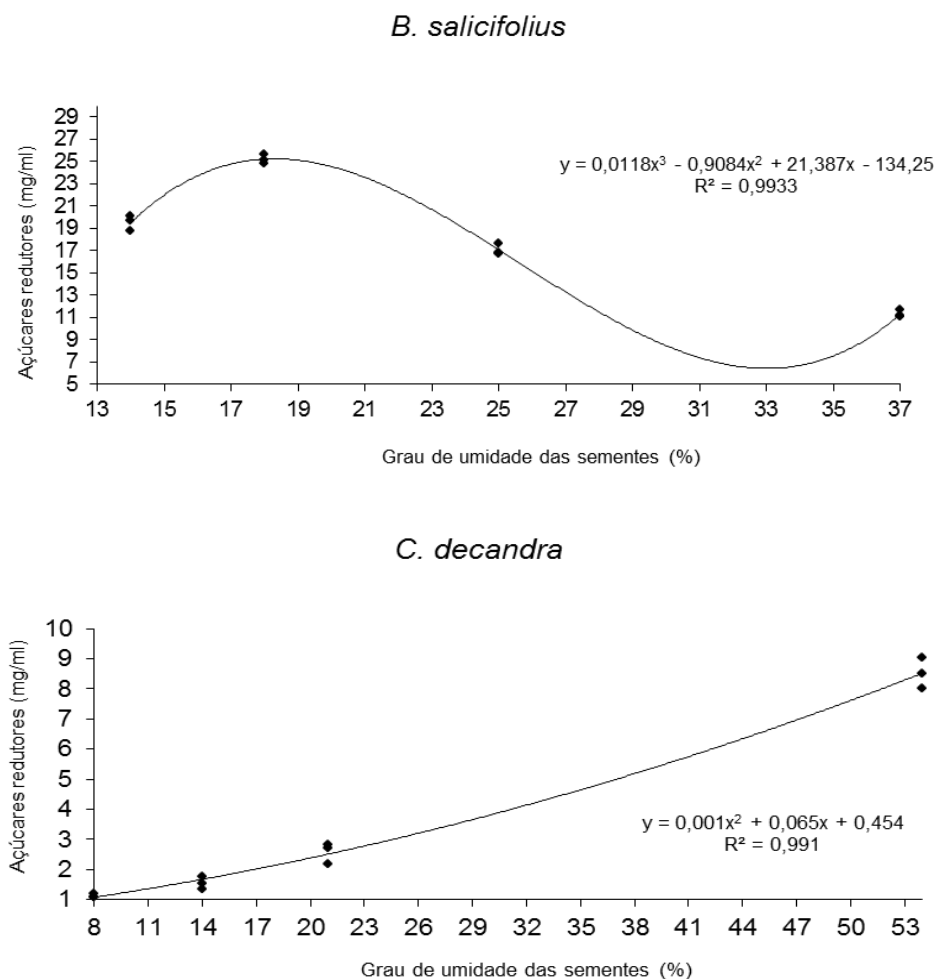


FIGURA 34- DOSAGEM DE AÇÚCARES REDUTORES NAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.

O aumento destes açúcares em sementes de *B. salicifolius*, provavelmente se deu devido à degradação do amido e posterior conversão em açúcares. Bonome (2006, p. 1) também verificou aumento de açúcares redutores no endosperma de *Hevea brasiliensis* durante o armazenamento, provavelmente devido à degradação de açúcares solúveis ou lipídios e posterior conversão em açúcares redutores. A redução dos açúcares redutores em sementes de *C. decandra* ocorreu devido à utilização destes compostos como substratos para respiração.

Em sementes de *Hevea brasiliensis*, Bonome (2006, p. 1) verificou que o teor de açúcares redutores decresceu no embrião durante o armazenamento, por utilizarem estes açúcares como substratos para a respiração.

Nas sementes de *B. salicifolius* o conteúdo inicial de açúcar redutor coincide com o conteúdo de açúcar total, indicando ausência de sacarose. Nas sementes de *C. decandra* o conteúdo de açúcar redutor é inferior ao conteúdo de açúcar total, indicando que parte dos açúcares solúveis presentes correspondem à sacarose.

4.2 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DAS SEMENTES EM RELAÇÃO AO ARMAZENAMENTO

4.2.1 Grau de umidade das sementes

Para o armazenamento das sementes foram utilizadas as sementes provenientes das coletas dos anos de 2010 e 2011. O teor de umidade inicial das sementes foi de 36% para *B. salicifolius* e de 57% para *C. decandra*, caracterizando o tratamento sem secagem (testemunha). Para obtenção dos tratamentos com secagem as sementes de *B. salicifolius* foram desidratadas até 33% e 27% de umidade, e as de *C. decandra* até 43% e 35% de umidade. Foram escolhidos estes graus de umidade devido aos melhores resultados obtidos no teste com os diferentes níveis de secagem.

Durante o armazenamento em câmara fria (5°C, 85%UR), o grau de umidade das sementes de *B. salicifolius* aumentou a partir de 80 dias de armazenamento, e continuou aumentando até os 200 dias, no entanto, este

aumento foi pequeno: de 36% (0 dias) para 38% (200 dias), de 33% (0 dias) para 36% (200 dias) e de 27% (0 dias) para 30% (200 dias).

Em *C. decandra* também houve um aumento no grau de umidade das sementes: de 57% (0 dias) para 59% (60 dias) e de 43% (0 dias) para 45% (60 dias), para o tratamento com 35% de água, este valor não se alterou durante o armazenamento (Figura 35).

Este aumento no grau de umidade se deve ao fato das sementes terem sido armazenadas em embalagem semipermeável (saco de polietileno) perfuradas, que permite a troca de vapor de água com o ambiente, este com alta umidade relativa do ar (85%).

Bilia *et al* (1998, p. 50) e Bonome (2006, p. 35), utilizando o mesmo tipo de embalagem e as mesmas condições de umidade relativa do ar também verificaram aumento no grau de umidade das sementes de *Inga uruguensis* e *Hevea brasiliensis* durante o armazenamento. Bonome (2006, p. 35) considerou que isto decorreu devido ao tipo de embalagem utilizada (semipermeável), associado ao alto grau de umidade em que as sementes foram armazenadas. Esse último fator contribui para elevação da atividade respiratória, resultando numa maior liberação de CO₂ e vapor de água no interior da embalagem, e com isso pode ser que o vapor de água liberado durante a respiração das sementes tenha condensado no interior das paredes da embalagem formando gotículas de água que acabaram sendo absorvidas pelas sementes, aumentando seu grau de umidade.

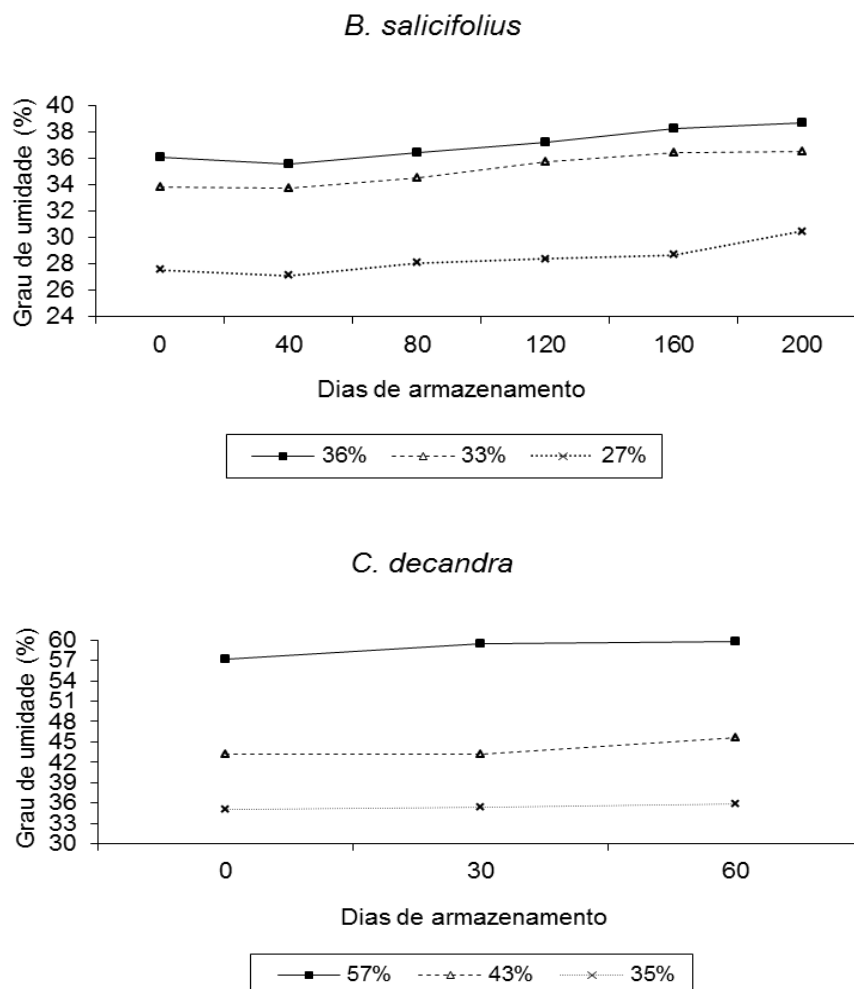


FIGURA 35- GRAU DE UMIDADE DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* DURANTE O ARMAZENAMENTO.

Para o armazenamento de sementes recalcitrantes recomenda-se a utilização de recipientes semipermeáveis, pois restringem a perda de água, mas permitem a troca de gases. Em um experimento realizado com sementes de *Inga edulis*, Bacchi (1961, p. 808) verificou que os resultados menos favoráveis foram obtidos com recipientes permeáveis, pois a desidratação das sementes foi muito rápida, perdendo a viabilidade na primeira semana de armazenamento. Em recipientes hermeticamente fechados, não houve perda no grau de umidade das sementes, porém após sete dias perderam a viabilidade, provavelmente devido ao acúmulo de CO₂. Em recipiente semipermeável as sementes se mantiveram viáveis por 60 dias, já que não houve acúmulo de gases e nem perda significativa de umidade.

A utilização de embalagens semipermeáveis para o armazenamento de sementes recalcitrantes tem gerado bons resultados, e permitido a manutenção

da viabilidade e qualidade fisiológica das sementes de muitas espécies por vários meses, pois este tipo de embalagem restringe a perda de água, mas permite a troca de gases. Sementes de *Calophyllum brasiliense* e *Hevea brasiliensis* armazenadas em embalagem semipermeável (sacos de polietileno) se mantiveram viáveis por nove e sete meses, respectivamente (NERY, 2006, p. 1; BONOME, 2006, p. 39). Utilizando o mesmo tipo de embalagem, Carvalho (2006b, p. 1), armazenou as sementes de *Nectandra nitidula*, *Nectandra grandiflora*, *Nectandra lanceolata*, *Ocotea pulchella* e *Persea pyrifolia* por 12 meses.

4.2.2 Porcentagem de germinação

Para os dados da porcentagem de germinação das sementes de *B. salicifolius* com 36% e 33% de umidade não foi possível ajustar equações polinomiais, pois os valores proporcionaram uma reta (Figura 36), indicando que não houve alteração da porcentagem de germinação durante o armazenamento.

A porcentagem de germinação das sementes de *B. salicifolius* com 36% e 33% se manteve alta (maior que 90%) até os 200 dias de armazenamento. Nas sementes com 27% de umidade a porcentagem de germinação diminuiu a partir de 80 dias de armazenamento (70%) (Figura 36).

Nas sementes de *C. decandra* a porcentagem de germinação diminuiu a partir de 30 dias de armazenamento, nos três tratamentos testados (57%, 43% e 35% de umidade), chegando a 0% com 60 dias de armazenamento (Figura 36).

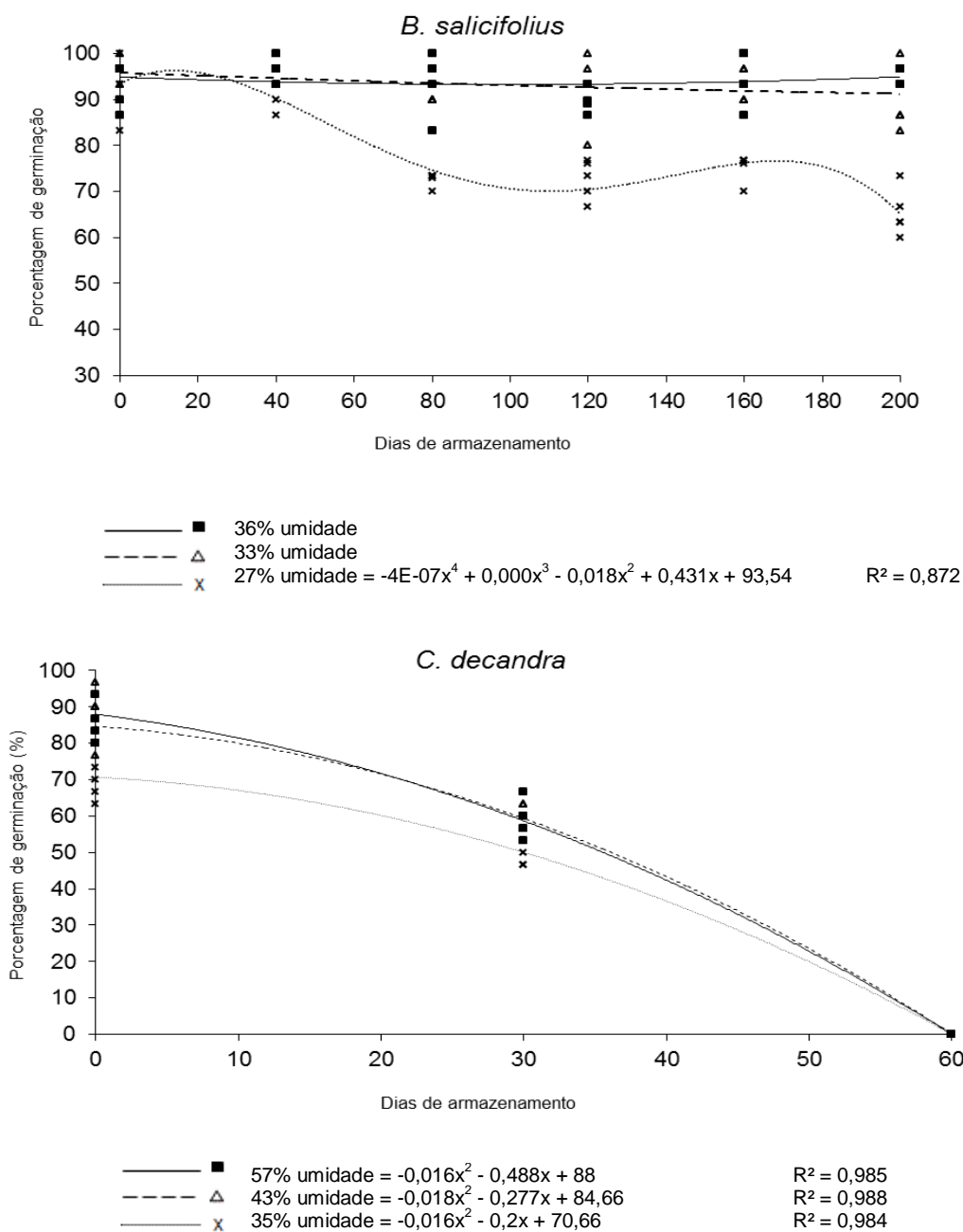


FIGURA 36- PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.

4.2.3 Índice de velocidade de germinação

Para os dados do índice de velocidade de germinação das sementes de *B. salicifolius* com 33% e 27% de umidade não foi possível ajustar equações polinomiais, pois os valores proporcionaram uma reta (Figura 37), indicando que não houve alteração deste índice durante o armazenamento.

Nas sementes de *B. salicifolius* 36% de umidade o IVG aumentou a partir de 40 dias de armazenamento, sendo que aos 160 e 200 dias de armazenamento houve um aumento acentuado (Figura 37). Desta forma verifica-se que o vigor das sementes de *B. salicifolius* com 36% de umidade aumentou durante o armazenamento. Este aumento de vigor provavelmente ocorreu, pois as sementes ainda não haviam completado seu processo de maturação.

Este resultado está de acordo com Marcos Filho (2005, p. 360) que verificou nas sementes recalcitrantes células em fase de pré-replicação celular no momento da maturidade fisiológica, de modo que há continuidade do metabolismo em sementes mais úmidas após a coleta.

Pupim *et al.* (2009, p. 99) e Faria *et al.* (2004, p. 170) também observaram aumento no potencial fisiológico de sementes de *Magnolia ovata* e *Inga vera* no início da secagem e atribuíram este aumento à continuidade do processo de maturação durante o período de secagem.

Para as sementes de *C. decandra* observou-se que o índice de velocidade de germinação diminuiu durante o armazenamento nos três tratamentos testados (57%, 43% e 35% de umidade) (Figura 37), verificando uma diminuição no vigor das sementes a partir de 30 dias de armazenamento.

Bonome (2006 p. 40) e Corte (2008, p. 65) também verificaram queda no índice de velocidade de germinação de sementes de *Hevea brasiliensis* e *Melanoxylon brauna* durante o armazenamento, concluindo que o vigor das sementes é afetado negativamente pelo armazenamento.

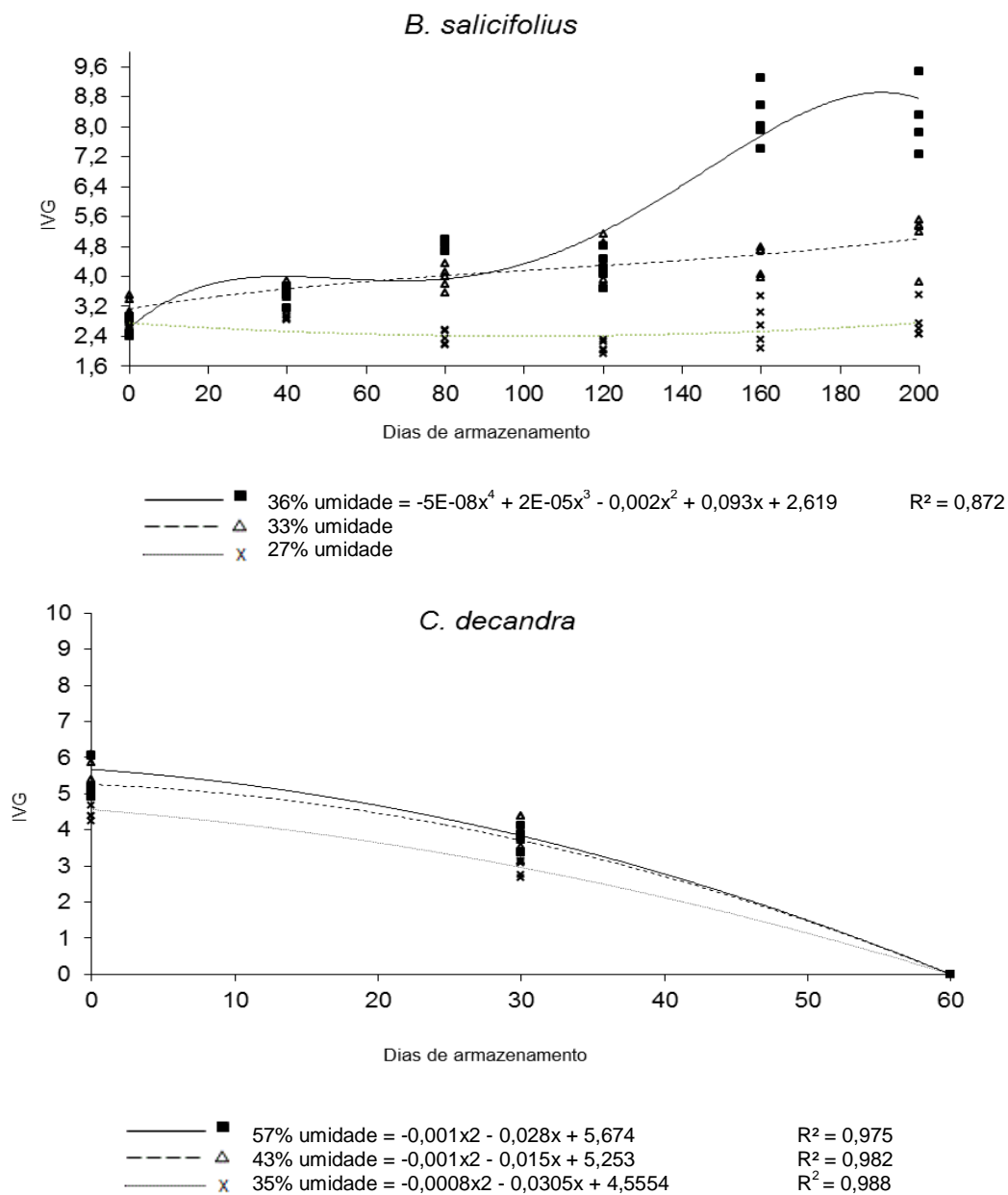


FIGURA 37- ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.

4.2.4 Tempo médio de germinação

Para os dados do tempo médio de germinação das sementes de *B. salicifolius* com 27% de umidade não foi possível ajustar uma equação polinomial, pois os valores proporcionaram uma reta (Figura 38), indicando que o tempo médio de germinação não se alterou durante o armazenamento.

Nas sementes de *B. salicifolius* com 36% e 33% de umidade o tempo médio diminuiu a partir de 40 dias de armazenamento (Figura 38), verificando, mais uma vez, um aumento do vigor destas sementes durante o armazenamento. Este fato pode ter ocorrido devido às sementes não terem completado seu desenvolvimento, e com isso houve um aumento do vigor, pois de acordo com Marcos Filho (2005, p. 360) nas sementes recalcitrantes, em média 60% das células estão em fase de pré-replicação celular no momento da maturidade fisiológica, de modo que há uma continuidade do metabolismo nas sementes mais úmidas.

Em *C. decandra* observou-se um aumento no tempo médio de germinação nos três tratamentos testados (57%, 43% e 35% de umidade) aos 30 dias de armazenamento (Figura 38), verificando mais uma vez a diminuição no vigor das sementes durante o armazenamento. Aos 60 dias de armazenamento, o tempo médio de germinação foi zero, pois não houve germinação.

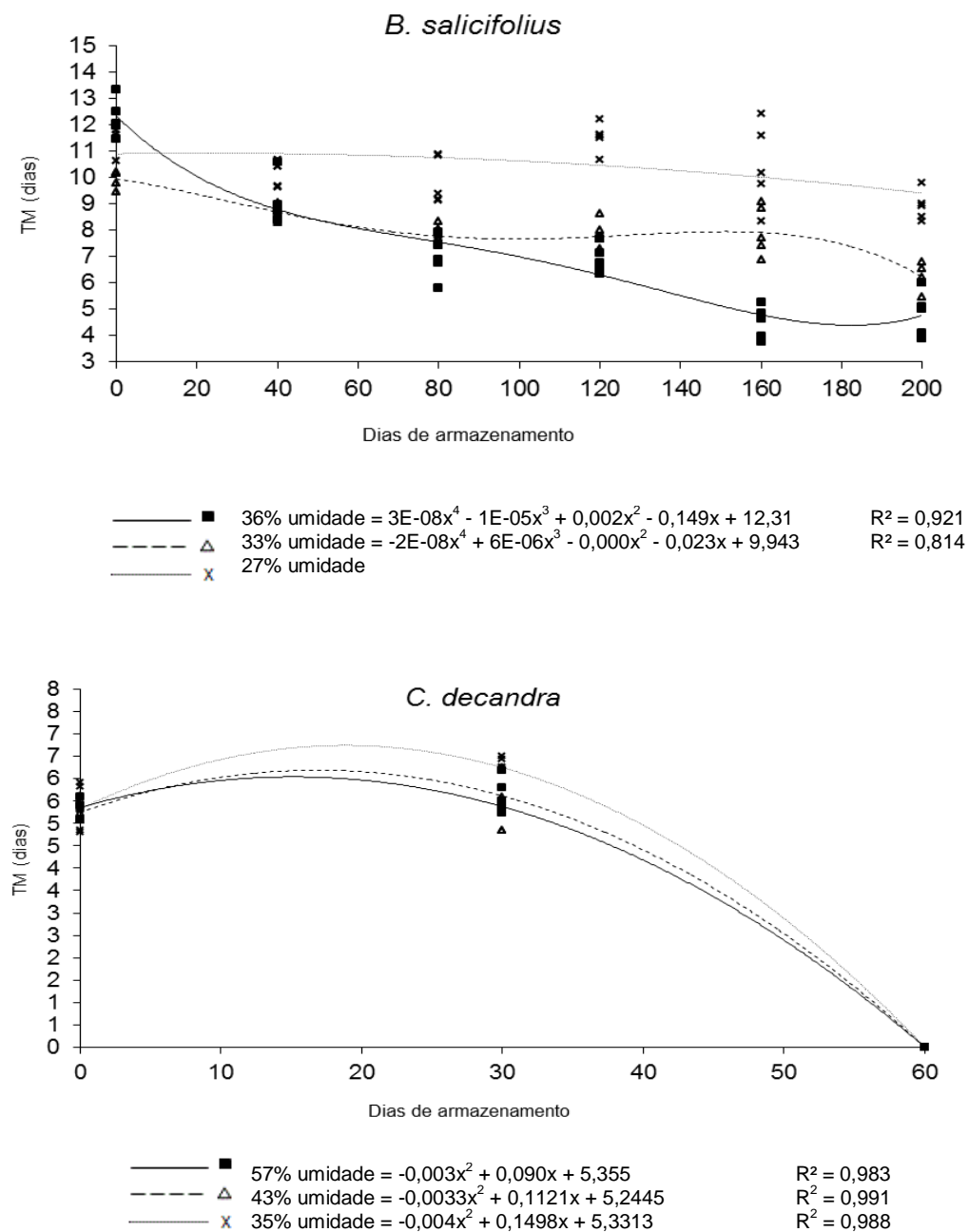


FIGURA 38- TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.

4.2.5 Teste de tetrazólio

Para os dados da viabilidade as sementes de *B. salicifolius* com 36% e 33% de umidade não foi possível ajustar equações polinomiais, pois os valores proporcionaram uma reta (Figura 39), indicando que a viabilidade das sementes não se alterou durante o armazenamento.

Os resultados obtidos pelo teste de tetrazólio foram semelhantes aos obtidos pelo teste de germinação. A viabilidade das sementes de *B. salicifolius* com 36% e 33% de umidade se manteve alta (90%) até os 200 dias de armazenamento. Nas sementes com 27% de umidade a viabilidade diminuiu a partir de 80 dias de armazenamento (Figura 39).

Com *C. decandra* também houve semelhança entre os testes de germinação e o de tetrazólio, nos quais observou-se diminuição da viabilidade das sementes para 80% a partir de 30 dias de armazenamento nos três tratamentos testados (57%, 43% e 35% de umidade). Aos 60 dias de armazenamento a viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio foi de 30% (Figura 39), diferente do resultado encontrado no teste de germinação, em que a germinação das sementes aos 60 dias de armazenamento foi zero. Isto pode ter ocorrido devido à alta presença de fungos nas sementes aos 60 dias de armazenamento, que provavelmente impediram que as sementes germinassem, pois o ataque dos fungos às sementes pode causar vários tipos de doenças ou desordens como: aborto, enrugamento e redução do tamanho das sementes, podridão de sementes, necroses, descolorações e redução da viabilidade e do poder germinativo (ARAÚJO; ROSSETTO, 1987, p. 147).

Corte (2008, p. 65) verificou queda na viabilidade em sementes de *Melanoxylon brauna* avaliada pelo teste de tetrazólio a partir de três meses de armazenamento.

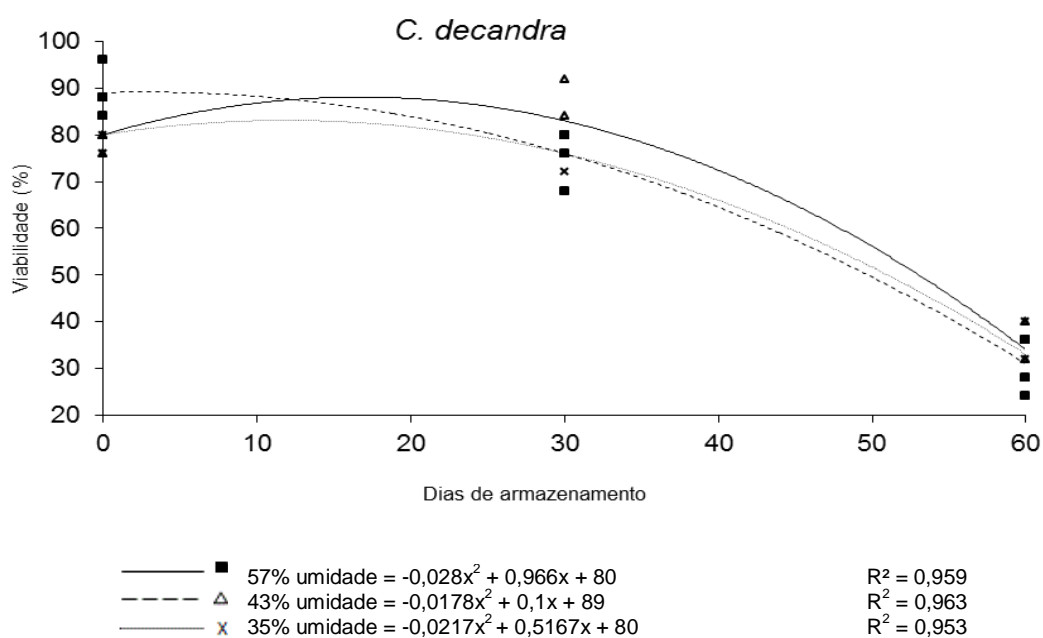
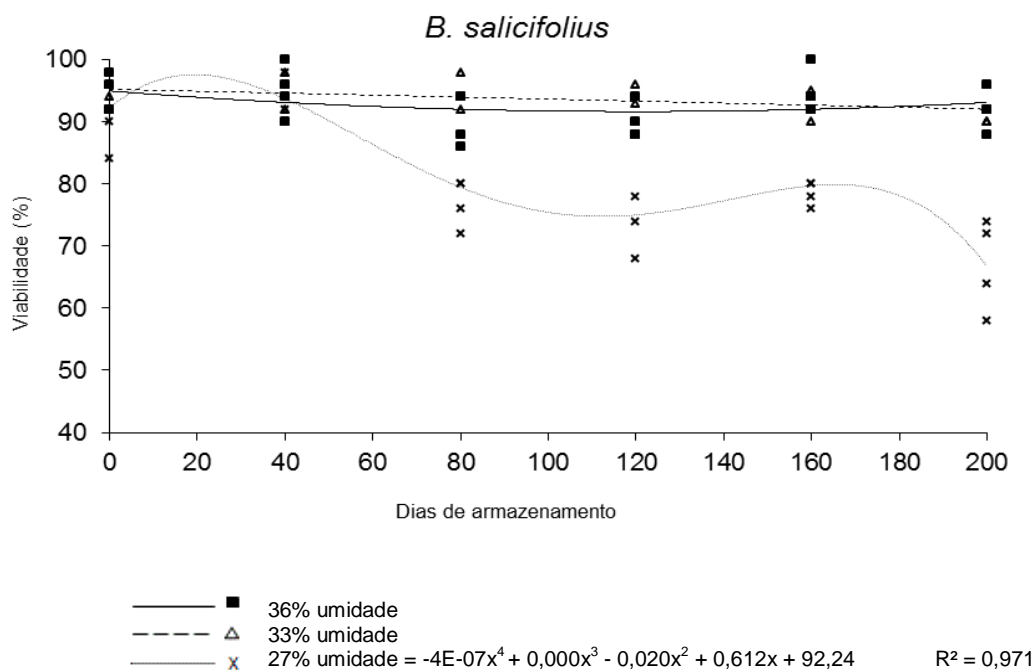


FIGURA 39- VIABILIDADE PELO TESTE DE TETRAZÓLIO DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.

4.2.6 Teste de condutividade elétrica

Para os dados da condutividade elétrica das sementes de *B. salicifolius* com 36% e 33% de umidade não foi possível ajustar equações polinomiais, pois os valores proporcionaram uma reta (Figura 40), indicando que não houve alteração na condutividade elétrica durante o armazenamento.

O conteúdo de lixiviados das sementes de *B. salicifolius* com 27% de umidade, avaliado através do teste de condutividade elétrica, aumentou a partir de 80 dias de armazenamento (Figura 40).

Nas sementes de *C. decandra* os valores de condutividade elétrica aumentaram em todos os tratamentos testados (57%, 43% e 35% de umidade) a partir de 30 dias de armazenamento, chegando a valores bem altos aos 60 (Figura 40). Este resultado confirma a diminuição do vigor das sementes de *C. decandra* durante o armazenamento.

Aumento nos valores de condutividade elétrica durante o armazenamento foi verificado por Bonome (2006, p. 44) e Corte (2008, p. 65) em sementes de *Hevea brasiliensis* e *Melanoxylon brauna*, sugerindo que os sistemas de membranas das células estão se desorganizando durante o armazenamento.

Bilia *et al.* (1998, p. 52) também evidenciaram aumento nos valores de condutividade elétrica na sementes com teor de água de 27% e tendência geral de acréscimo com o decorrer do armazenamento. Os valores médios de condutividade elétrica dos diferentes tratamentos de secagem se elevaram significativamente aos 15 dias de armazenamento. Assim, a observação de valores mais elevados de condutividade elétrica em sementes que se umedeceram durante o armazenamento, indicou um progresso real da deterioração.

Como visto anteriormente, para a desidratação das sementes, o valor da condutividade elétrica está relacionado à quantidade de lixiviados na solução, e estes com a integridade das membranas celulares (AOSA, 1983, p. 53). Desta forma, a perda da viabilidade está fortemente correlacionada com a perda gradativa da integridade do sistema de membranas acarretando a liberação de solutos celulares, importantes para o funcionamento da célula (MARCOS FILHO, 2005, p. 318).

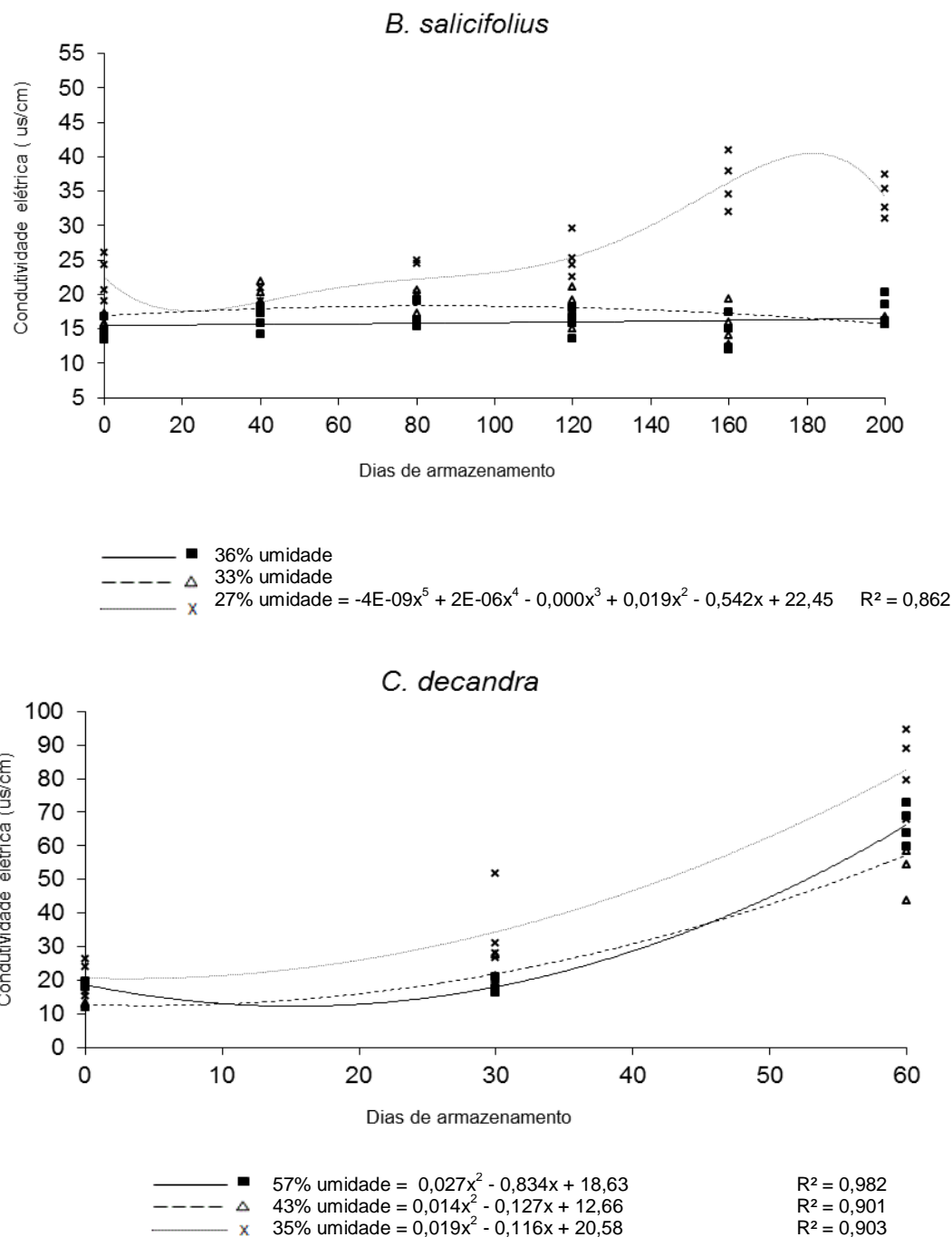


FIGURA 40- CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DAS SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.

Diante dos resultados obtidos pelos dos testes de viabilidade e vigor, pode se concluir que a secagem das sementes de *B. salicifolius* a 27% de umidade não foi favorável ao armazenamento, e que a as sementes com 36% e 33% de umidade permaneceram viáveis por 200 dias armazenadas a 5°C e 85% UR em embalagens semipermeáveis de polietileno de 0,10 mm de

espessura, 10 cm de largura e 20 cm de comprimento perfuradas com o auxílio de uma agulha (6 orifícios).

Nos experimentos realizados com as sementes de *C. decandra* não obteve-se bons resultados durante o armazenamento, tanto com as sementes recém colhidas, como nos tratamentos de secagem (43% e 35%), pois a germinação e o vigor foram reduzidos aos 30 dias de armazenamento e aos 60 dias todas as sementes estavam mortas.

Um fator que pode ter contribuído para a morte das sementes é a alta quantidade de lipídios (30%) (valor obtido por meio das análises bioquímicas – item 4.1.8), pois de acordo com Marcos Filho (2005, p. 308) a instabilidade química dos lipídios constitui um dos fatores preponderantes para a queda da viabilidade das sementes de várias espécies, devido a formação de glicerol, ácidos graxos livres, radicais livres e produtos tóxicos como aldeídos, ácidos, alcoóis e cetonas, bem como a degradação de lipídios das membranas.

Pupim *et al.* (2009, p. 103) também verificaram baixo potencial de armazenamento em sementes de *Magnolia ovata*, que podem ser armazenadas por somente 30 dias, e atribuíram à baixa longevidade das sementes à sua composição química (32,7% de óleo), pois grande quantidade de lipídios pode causar a deterioração rápida da semente por meio do processo de peroxidação de lipídios, que resulta na formação de radicais livres prejudicando o funcionamento da célula (MARCOS FILHO, 2005, p. 308).

Para outras espécies recalcitrantes como *Cupania vernalis* e *Inga uruguensis* o armazenamento foi favorecido pela secagem parcial. Sementes com 40% e 50% de umidade armazenadas em sacos de polietileno na temperatura de 10°C se mantiveram viáveis por 240 e 60 dias, respectivamente (VIEIRA *et al.*, 2008, p. 448; BILIA *et al.*, 1998, p. 48).

Para as sementes de *Myrciaria dubia* a secagem das sementes também não foi favorável ao armazenamento desta espécie, sendo que as melhores condições foram obtidas utilizando sementes com 46% de umidade sob temperatura de 20°C (FERREIRA; GENTIL, 2003, p. 440).

4.2.7 Teste de sanidade

Para discussão dos resultados referentes à ocorrência de fungos adotou-se um critério para classificar a frequência dos fungos em alta ou baixa: quando a frequência foi maior que 15% esta foi considerada alta, e quando a frequência foi abaixo de 15% esta foi considerada baixa.

Com relação à ocorrência de fungos nas sementes de *B. salicifolius* durante o armazenamento foram encontrados fungos saprófitas: *Penicillium* sp. e *Epicoccum* sp. e fungos potencialmente fitopatogênicos: *Pestalotiopsis* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Verticillium* sp. e *Macrophomina* sp. (Tabela 1).

Nas sementes de *B. salicifolius* recém-coletadas (36% de umidade) foi verificada alta frequência de *Pestalotiopsis* sp. (22%) e *Fusarium* sp. (18%).

Nas sementes com 33% de umidade o fungo *Pestalotiopsis* sp. esteve presente em mais de 40% das sementes, dos 0 aos 200 dias de armazenamento, e *Fusarium* sp. em 12% das sementes no início do armazenamento. *Penicillium* sp. ocorreu em 27% das sementes aos 80 dias de armazenamento, e em 17% aos 120 e 160 e em 12% aos 200 dias.

Nas sementes com 27% de umidade foi verificada alta frequência do fungo *Penicillium* sp. (21%) a partir de 40 dias de armazenamento até os 200 dias, e de *Pestalotiopsis* sp. desde os 0 dias (40%) até os 200 dias (29%) de armazenamento. O fungo *Cladosporium* sp. esteve presente em 12% das sementes aos 0 dias de armazenamento (Tabela 1).

De acordo com Marcos Filho (2005, p. 376) a atividade dos fungos de armazenamento ocorre quando o grau de umidade das sementes ultrapassa 13% e se acentua ao atingir valores superiores a 25%. Tal fato foi observado nas sementes de *B. salicifolius*, que foram armazenadas com teores de umidades superiores a 25%, e houve desenvolvimento acentuado dos fungos *Penicillium* sp. nas sementes com 27% de umidade e *Pestalotiopsis* sp. nas sementes com 36% de umidade.

Bilia *et al.* (1998, p. 52) também verificaram a presença de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. em sementes de *Inga uruguensis* durante o armazenamento, e salientaram que estes fungos parecem encontrar nas

condições ideais para o armazenamento de sementes recalcitrantes, condições favoráveis para o seu desenvolvimento.

TABELA 1- FREQUÊNCIA DE FUNGOS EM SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.

FUNGOS	FREQUÊNCIA (%)																	
	0 DIAS			40 DIAS			80 DIAS			120 DIAS			160 DIAS			200 DIAS		
	36%	33%	27%	36%	33%	27%	36%	33%	27%	36%	33%	27%	36%	33%	27%	36%	33%	27%
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	22	43,5	40,5	30,5	49,5	22,5	37	49,5	39	59,5	63,5	48	70	64,5	32,5	38	38	29
<i>Cladosporium</i> sp.	4	9	12,5	2,5	8	3,5	3,5	5	0,5	3	8	0,5	5	19,5	2,5	2	17,5	0
<i>Fusarium</i> sp.	18	12	14	6,5	3	1	0,5	0	0	4,5	6	2,5	16	6,5	3,5	4,5	2	0,5
<i>Penicillium</i> sp.	0	1	9	0,5	1,5	21	0,5	27,5	35	3,5	17	53,5	9,5	17,5	57	3,5	12	70
<i>Alternaria</i> sp.	0,5	2,5	0	0	0	0	0	0,5	0	2	6,5	0	0	6	0	0,5	3	0
<i>Colletotrichum</i> sp.	0	0	0	8	5,5	7,5	3	4,5	5,5	5,5	4	0	0,5	0	3,5	0,5	2,5	4,5
<i>Epicoccum</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Verticillium</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Macrophomina</i> sp.	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,5	0	0	3	3,5	4	0	8	8,5

Para os fungos que apresentaram alta frequência nas sementes de *B. salicifolius* (*Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp.) foram confeccionados gráficos e realizada análise de regressão polinomial, ajustando as regressões com maior coeficiente de determinação.

Para determinados dados não foi possível ajustar as equações polinomiais, pois em alguns casos os valores proporcionaram uma reta, e em outros, houve grande variabilidade dos dados.

Com relação à frequência de *Pestalotiopsis* sp., observou-se que durante o armazenamento houve um aumento na porcentagem de ocorrência deste fungo nas sementes com 36% de umidade a partir de 40 dias de armazenamento, aumentando progressivamente até os 200 dias de armazenamento. Nas sementes com 33% e 27% de umidade a frequência de *Pestalotiopsis* sp. não se alterou (Figura 41).

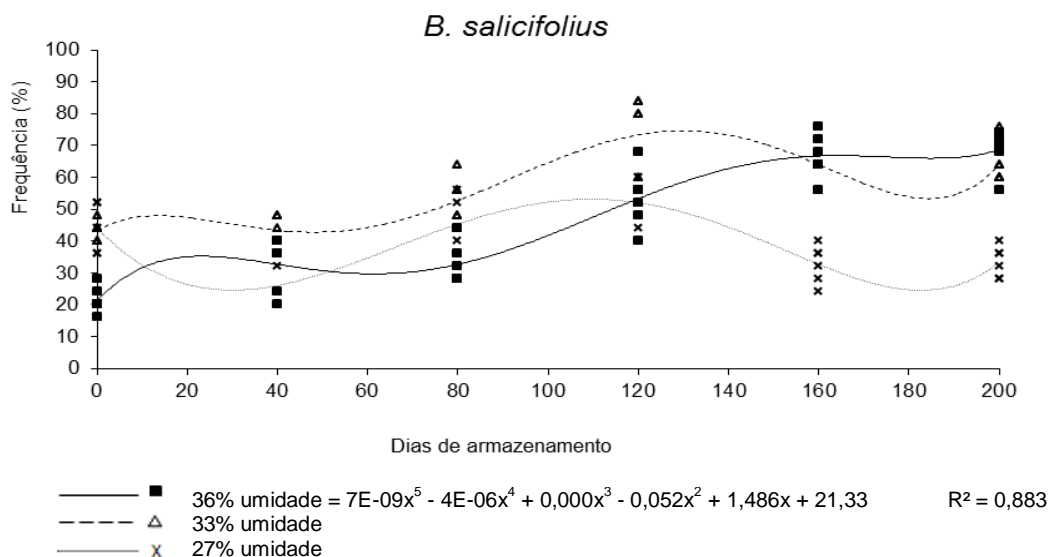


FIGURA 41- FREQUÊNCIA DE *Pestalotiopsis* sp. EM SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.

A frequência de *Cladosporium* sp. não se alterou estatisticamente em nenhum dos tratamentos de secagem nas sementes de *B. salicifolius*, sendo a frequência deste fungo muito variável entre os tratamentos de secagem e no decorrer do período de armazenamento (Figura 42).

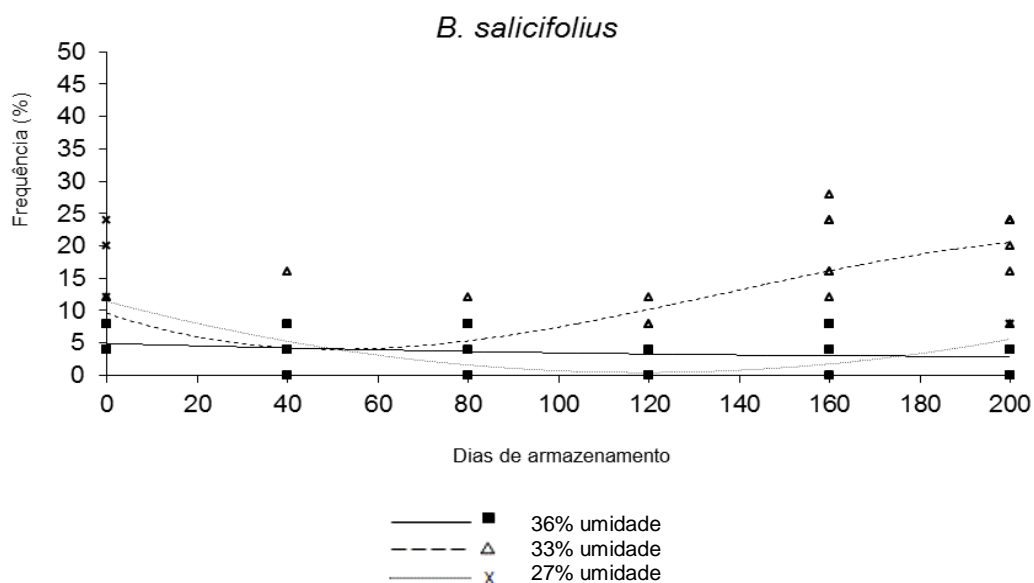


FIGURA 42- FREQUÊNCIA DE *Cladosporium* sp. EM SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.

A frequência de *Fusarium* sp. nas sementes de *B. salicifolius* pode ser considerada alta (aproximadamente 15%), no entanto, não se modificou em nenhum dos tratamentos de secagem durante o armazenamento (Figura 43).

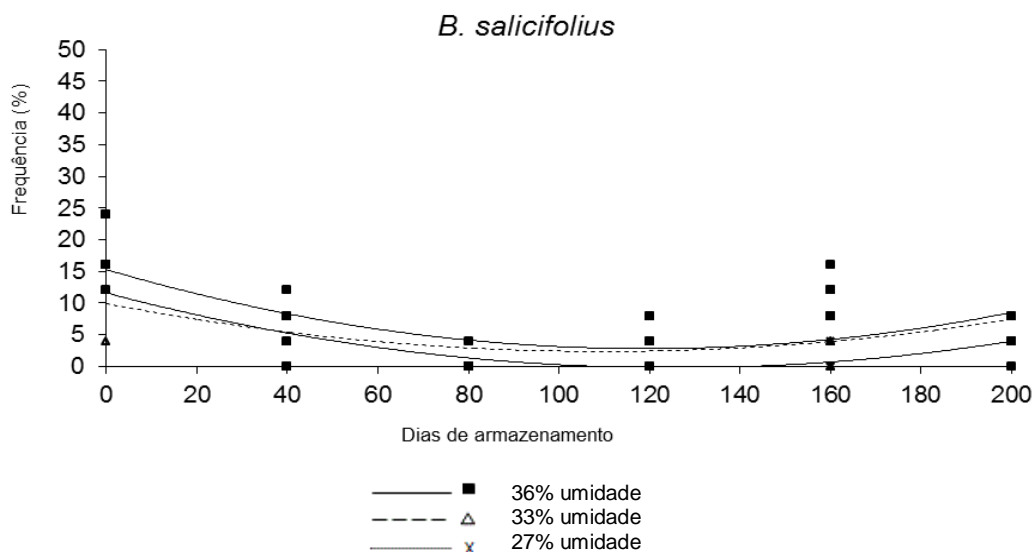


FIGURA 43- FREQUÊNCIA DE *Fusarium* sp. EM SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* E *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.

O fungo *Penicillium* sp. esteve presente nas sementes de *B. salicifolius* com 33% e 27% desde o início do armazenamento, e a sua frequência aumentou com o tempo. Já nas sementes com 36% de umidade, *Penicillium* sp. só apareceu a partir de 80 dias de armazenamento, e a frequência não se modificou durante o armazenamento (Figura 44).

Penicillium sp. apresentou maior frequência nas sementes submetidas à desidratação (33% e 27% de umidade), em relação as que não foram submetidas (36% de umidade). Este fato pode ter ocorrido porque a desidratação ocasionou danos às membranas celulares, permitindo maior liberação de solutos celulares, que serviram como substrato para o desenvolvimento deste fungo.

Mendes *et al.* (2009, p. 25) trabalhando com sementes de *Leucaena leucocephala* verificou que a maior porcentagem de *Penicillium* sp. foi detectada em sementes armazenadas por 28 meses.

Silva *et al.* (2003, p. 258) também observaram que a incidência de *Penicillium* sp. foi maior à medida que houve aumento do tempo de armazenamento em sementes de *Chorisia speciosa*.

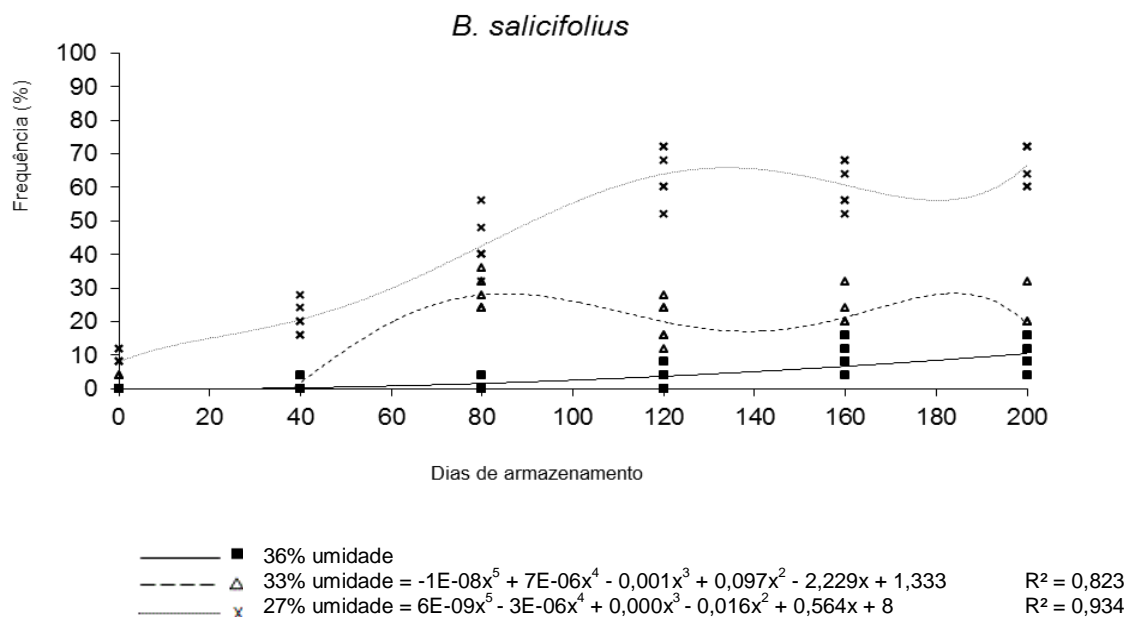


FIGURA 44- FREQUÊNCIA DE *Penicillium* sp. EM SEMENTES DE *Blepharocalyx salicifolius* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.

Diante destes resultados pode-se afirmar que a alta frequência de *Pestalotiopsis* sp. e *Penicillium* sp. aos 30 e 60 dias de armazenamento, associados à ocorrência de fungos fitopatogênicos (*Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Verticillium* sp. e *Macrophomina* sp.) contribuiu para a baixa viabilidade e vigor das sementes de *B. salicifolius* com 27% de umidade durante o armazenamento (item 4.2.2 – 4.2.6). De acordo com Machado (1998, p. 22) a presença de fungos durante o armazenamento podem ser altamente prejudiciais às sementes, causando perda do poder germinativo, apodrecimento, aumento das taxas de ácidos graxos provocando oxidação de óleos e com isso uma deterioração mais rápida das sementes.

Além do mais, nas sementes com 27% de umidade, a desidratação pode ter causado danos às membranas celulares e a consequente liberação de exsudatos celulares, contribuindo para o desenvolvimento destes fungos.

Carvalho e Nakagawa (2000, p. 505) ressaltaram que a contaminação com fungos é um grande problema para o armazenamento de sementes recalcitrantes, as quais precisam ser mantidas com alto grau de umidade, que é condição favorável ao desenvolvimento desses fungos. Para evitar isso há a necessidade da realização de tratamento com fungicida, após proceder a secagem parcial das sementes, seguindo-se de armazenamento em temperatura a mais baixa que a espécie tolerar. Sendo assim, tornam-se necessários estudos para o tratamento das sementes de *B. salicifolius* para evitar o desenvolvimento de fungos durante o armazenamento, principalmente dos gêneros *Penicillium* e *Pestalotiopsis*.

Nas sementes de *C. decandra* recém-coletadas foi verificada a presença de *Cladosporium* sp., *Epicoccum* sp., *Rhizopus* sp. e *Alternaria* sp. Nas sementes submetidas à secagem e ao armazenamento foram encontrados os fungos *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Epicoccum* sp., *Alternaria* sp. e *Rhizopus* sp. (Tabela 2).

Cladosporium sp. apresentou alta frequência (87-100%) em todos os tratamentos de secagem, do início ao fim do armazenamento (0-60 dias), e *Fusarium* sp. esteve presente em 60% das sementes com 43% de umidade aos 0 dias de armazenamento e aos 30 e 60 dias de armazenamento em 60% e 95% das sementes, respectivamente. *Epicoccum* sp. também apresentou alta frequência nas sementes de *C. decandra* em todos os tratamentos de secagem desde o início (0 dias) até os 60 dias de armazenamento (Tabela 2).

TABELA 2- FREQUÊNCIA DE FUNGOS EM SEMENTES DE *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.

FUNGOS	FREQUÊNCIA (%)								
	0 DIAS			30 DIAS			60 DIAS		
	57%	43%	35%	57%	43%	35%	57%	43%	35%
<i>Cladosporium</i> sp.	100	100	87	100	93	88	100	100	100
<i>Fusarium</i> sp.	0	60	66,5	42	71,5	71,5	91	95	95,5
<i>Alternaria</i> sp.	6	4	2	5	4	2,5	4,0	6,5	4,5
<i>Epicoccum</i> sp.	10	31,5	15,5	30	25	23	52	44,5	42
<i>Rhizopus</i> sp.	6,5	2	6	0	0	0	0	0	0

Para os fungos que apresentaram alta frequência nas sementes de *C. decandra* (*Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. e *Epicoccum* sp.) foram confeccionados gráficos e realizada análise de regressão polinomial, ajustando as regressões com maior coeficiente de determinação.

Cladosporium sp. ocorreu em 100% das sementes com 57% e 43% de umidade, e em 85% das sementes com 35% de umidade, no entanto a frequência não se alterou durante o armazenamento (Figura 45).

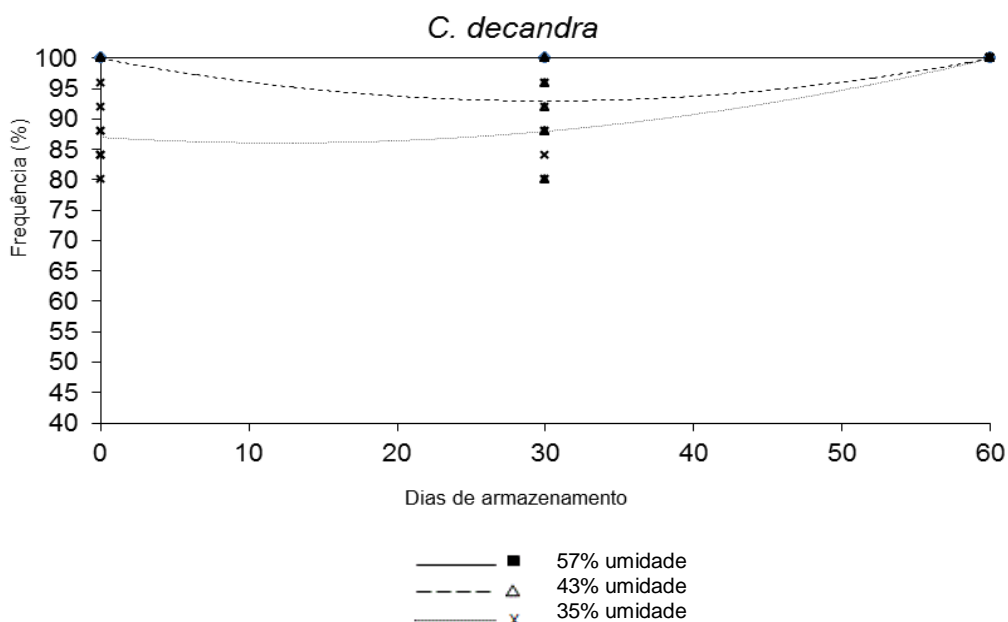


FIGURA 45- FREQUÊNCIA DE *Cladosporium* sp. EM SEMENTES DE *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.

Fusarium sp. esteve presente em 60% das sementes com 43% e 35% de umidade. Nas sementes recém colhidas (57% de umidade) não foi detectada a presença de *Fusarium* sp. Com 30 dias de armazenamento este fungo ocorreu em 70% das sementes, e com 60 dias a frequência aumentou para 95% (Figura 46).

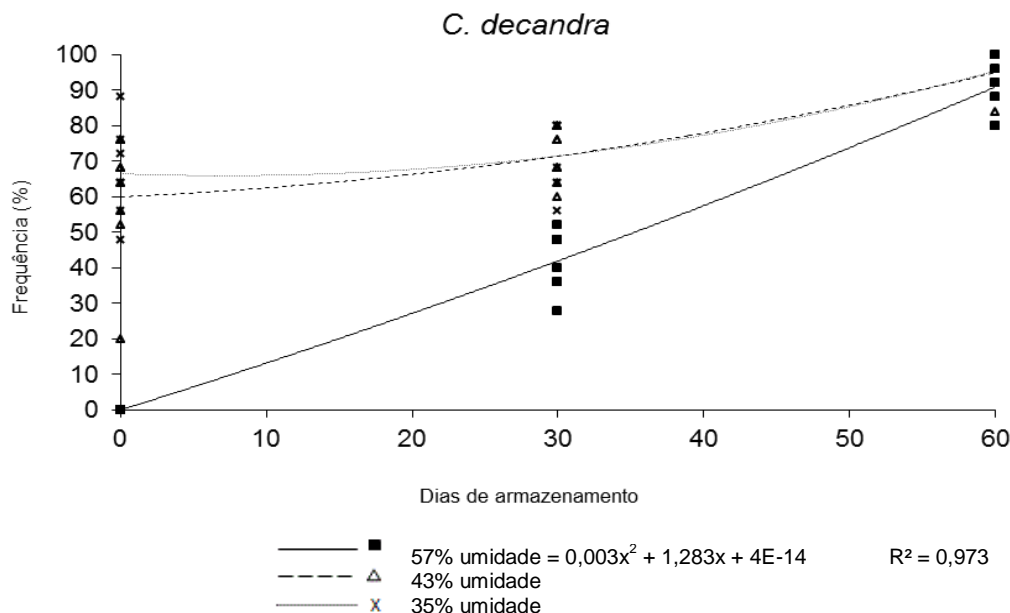


FIGURA 46- FREQUÊNCIA DE *Fusarium* sp. EM SEMENTES *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.

Diante dos resultados, observa-se que nas sementes de *C. decandra* com 57% de umidade, o armazenamento favoreceu o desenvolvimento de *Fusarium* sp. Talvez devido ao aumento no grau de umidade das sementes que propiciou ambiente favorável para o fungo, pois de acordo com Popinigis (1997, p. 232) quanto maior o grau de umidade da semente maior é a atividade de fungos.

Fusarium sp. é um fungo considerado fitopatogênico, e tem sido relatado como causa da redução da germinação das sementes de espécies florestais, como em *Anadenanthera colubrina* e *Piptadenia paniculata* (REGO; SANTOS; MEDEIROS, 2006, p. 63). Segundo Rodrigues e Menezes (2002, p. 535) foi observado em sementes de *Vigna unguiculata*, que espécies de *Fusarium* causaram inibição na germinação de algumas sementes e, mesmo as que germinaram apresentaram crescimento do fungo sobre cotilédones e folhas primárias, além de necrose na radícula.

Fusarium sp. também é responsável por causar tombamento, uma das doenças mais comuns em viveiros florestais, que afeta a germinação das sementes e as plântulas recém emergidas. Outra doença causada por este fungo é a podridão de raízes, observada em plântulas de *Peltophorum dubium* e *Pinus* sp (SANTOS; PARISI, 2011, p. 40-42).

A frequência de *Epicoccum* sp. não se alterou durante o armazenamento nas sementes com 43% e 35% de umidade. Nas sementes com 57% de umidade a frequência aumentou para 30% e 50% aos 30 e 60 dias de armazenamento, respectivamente (Figura 47).

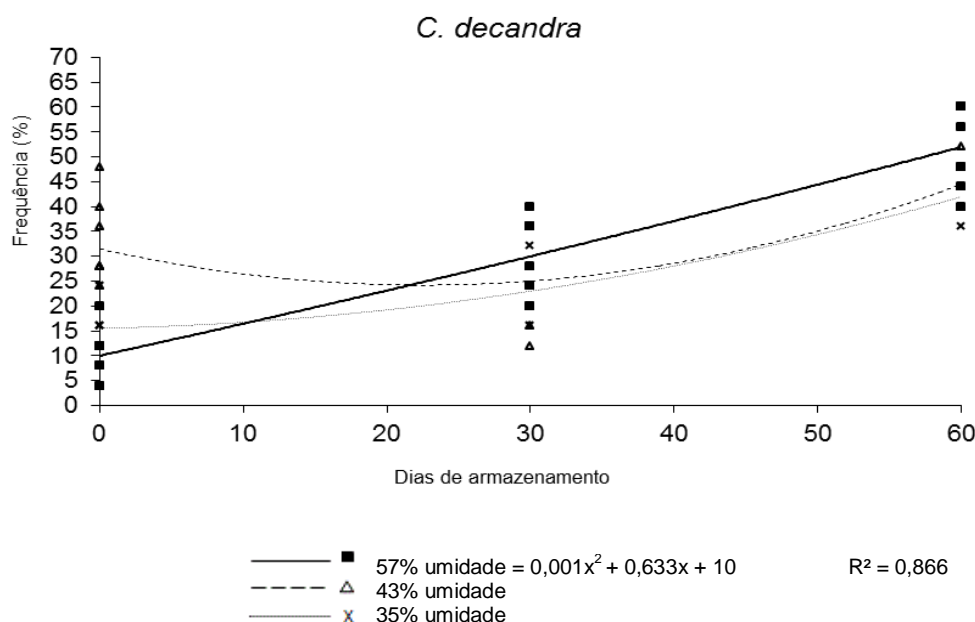


FIGURA 47- FREQUÊNCIA DE *Epicoccum* sp. EM SEMENTES DE *Casearia decandra* COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO.

A alta frequência de *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp e *Epicoccum* sp. associadas à ocorrência de *Alternaria* sp. aos 30 e 60 dias de armazenamento favoreceu a perda da viabilidade das sementes de *C. decandra* (item 4.2.2). Pois de acordo com Popinigis (1997, p. 232) a presença de fungos durante o armazenamento acelera a taxa de deterioração das sementes, reduzem a porcentagem de germinação e o vigor das sementes.

Netto e Faiad (1995, p. 80) também verificaram alta incidência de fungos patogênicos e saprófitas em sementes de *Didymopanax morototoni*, o que provavelmente foi um dos fatores responsáveis pela deterioração das sementes e baixa porcentagem de germinação, e em *Virola sebifera* constataram a deterioração das sementes e a redução da germinação causadas pelo fungo *Penicillium* sp.

Diante das exposições feitas neste trabalho, pode-se dizer que sementes recalcitrantes apresentam diferentes níveis de tolerância à secagem, e que estes níveis estão relacionados com a fisiologia, a anatomia e a composição bioquímica de cada uma. Sendo assim, salienta-se mais uma vez, que as causas da perda da viabilidade das sementes recalcitrantes envolvem múltiplos processos, sendo necessárias mais pesquisas com espécies recalcitrantes.

Recomenda-se que sejam realizadas análises de proteínas, enzimas, compostos fenólicos e radicais livres nas sementes de *B. salicifolius* e *C. decandra* para verificar o papel destes compostos na recalcitrância destas espécies.

Recomenda-se também a realização de uma análise ultra estrutural a nível celular, para verificar os danos ocorridos devido à secagem nas organelas celulares.

Quanto ao armazenamento de espécies recalcitrantes verificou-se que o comportamento das sementes durante o armazenamento pode ser muito variável devido às diferenças no grau de tolerância à secagem, a sua morfologia e a composição bioquímica.

Para futuros trabalhos com as sementes de *B. salicifolius* e *C. decandra* recomendam-se a investigação das modificações bioquímicas ocorridas durante o armazenamento, e de técnicas para aumentar o tempo de armazenamento, como tratamentos com fungicidas e talvez a criopreservação de embriões, visto a importância de conservar estas espécies, tanto do ponto de vista ambiental como silvicultural.

5 CONCLUSÕES

- O grau de umidade de segurança para as sementes de *B. salicifolius* e *C. decandra* foram de 37% e 38%, respectivamente, e o grau de umidade crítico e letal foram de 29% e 14% para *B. salicifolius* e de 25% e 8% para *C. decandra*;
- *B. salicifolius* e *C. decandra* podem ser classificadas como recalcitrantes;
- Com relação às alterações fisiológicas ocorridas durante a secagem observou-se diminuição na viabilidade e no vigor das sementes de *B. salicifolius* a partir de 29% de umidade, e nas sementes de *C. decandra* a partir de 25% de umidade;
- Quanto às alterações estruturais nas sementes de *C. decandra* verificou-se diminuição do volume do citoplasma e da turgidez da célula e deformação dos nucléolos com a retirada de água das sementes;
- Nas sementes de *B. salicifolius* submetidas à desidratação verificaram-se indícios de fragmentação nuclear e maior deposição de compostos fenólicos;
- Quanto às alterações bioquímicas nas sementes de *B. salicifolius* verificou-se degradação do amido em moléculas menores (açúcares solúveis e redutores), aumento da porcentagem de lipídios e modificação na composição monossacarídica de polissacarídeos de parede celular;
- Em *C. decandra* verificou-se a utilização de açúcares solúveis e redutores como substrato para a respiração e modificações na composição da parede celular;

- Sementes de *B. salicifolius* com 36% e 33% de umidade podem ser armazenadas em câmara fria à 5°C e 85% UR em embalagens semipermeáveis de polietileno por 200 dias;
- Para *C. decandra* recomenda-se o armazenamento das sementes sem secagem (54% de umidade) até 30 dias, em câmara fria a 5°C e 85% de UR, em embalagens semipermeáveis de polietileno.
- A alta frequência de *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp e *Epicoccum* sp. associados à ocorrência de *Alternaria* sp. aos 30 e 60 dias de armazenamento favoreceu a perda da viabilidade e vigor das sementes de *C. decandra*;
- A alta frequência de *Pestalotiopsis* sp. e *Penicillium* sp. aos 30 e 60 dias de armazenamento, associados à ocorrência de fungos fitopatogênicos contribuiu para a baixa viabilidade e vigor das sementes de *B. salicifolius* com 27% de umidade durante o armazenamento.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-BAKI, A.A.; ANDERSON, J.D. physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOSLOWSKI, T.T. **Seed biology**, New York: Academic Press, 1972, v.1, 416 p.
- ADAMS, G. A. Complete acid hydrolysis. **Methods in Carbohydrates Chemistry**, v. 5, p. 269-276, 1965.
- AGUIAR, I.B. de. Conservação de sementes. In: Manual técnico de sementes florestais. **IF. Série registros**, São Paulo, n. 14, p. 33-44, 1995.
- ANDRADE, A.C.S.; CUNHA, R. Grau crítico de umidade? **Informativo do Comitê Técnico de Sementes Recalcitrantes**, Brasília, n.1, p.2-3, 1996.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. AOSA. **Seed vigor testing handbook**. AOSA, 1983, 93 p. (Contribution, 32).
- ARAÚJO, E.; ROSSETO, E. A. Doenças e injúrias de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 146-161.
- AVIGAD, G.; DEY, P.M. Carbohydrate Metabolism: Storage Carbohydrates. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. **Plant Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1997. p.143-204.
- BACCHI, O. Estudos sobre a conservação de sementes. IX- Ingá. **Bragantia**, Campinas, v. 20, n.35, p.805-14, 1961.
- BARBEDO, C.J.; BILIA, D.A.C. Evolution of research on recalcitrant seeds. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55 (número especial), p.121-125, 1998.

BARBEDO, C.J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botanica Brasilica**, v.12, p. 145-164, 1998.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3. ed. Minnesota: Burgess, 1982. 242 p.

BARROS, D.I. **Tecnologia de sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2006. 89f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Areia.

BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: ed. da UFV, 1999, 443 p.

BEGNAMI, C. N. **Alterações estruturais, ultraestruturais e bioquímicas durante a perda da viabilidade de sementes de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho**. 1998. 93 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BERJAK, P., FARRANT, J.M., PAMMENTER, N.W. The basis of recalcitrant seed behaviour – cell biology of the homohydrous seed conditions. In: TAYLORSON, R.B. (Ed.). **Recent advances in the development and germination of seeds**. New York, Plenum Press. p. 89-108, 1989.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12 (edição especial), p. 22-55, 2000.

BERNAL-LUGO, I.; LEOPOLD, A.C. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. **Plant Physiology**, Bethesda, v.98, n.3, p.1207-1210, 1992.

BEWLEY, J.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994, 367p.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: The Iowa State Press, 1976, 326 p.

BIERMANN, C. J. Hydrolysis and the other cleavage of glycosidic linkages. In: BIERMANN, C. J.; MCGINNIS, G. D. **Analysis of Carbohydrates by GLC and MS**. Florida: CRC Press, p. 27-41, 1989.

BILIA, D. A. C.; MARCOS FILHO, J.; NOVENBRE, A. D. L. C. Conservação da qualidade fisiológica de sementes de *Inga uruguensis*. **Revista Brasileira de Sementes**, v.20, n.1, p.48- 54, 1998.

BLACK, M.; PRITCHARD, H.W. Glossary. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H.W. **Desiccation in survival in plants: drying without dying**. New York: CAB International, p. 373-382, 2002.

BLACKMAN, S.A.; WETTLAUFER, S.H.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, n. 1, p. 225-230, 1992.

BONOME, L.T. da S. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. de Juss.) Muell. Arg.) durante o armazenamento**. 124f. Tese (Doutorado em Agronomia) Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

BORDIGNON, M.V. **Análise morfo-fisiológica em sementes de *Eugenia uniflora* L. e *Campomanesia xanthocarpa* Berg. (Myrtaceae)**. 94f. Dissertação (Mestrado em Biologia celular) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS. p. 157-162, 2009.

BUCKERIDGE, M. S., TINÉ, M. A. S., SANTOS, H. P., LIMA, D. U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes: estrutura, metabolismo e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 137-162, 2000.

CARNEIRO, J.G. de A.; AGUIAR, I.B. de. Armazenamento de sementes. In: AGUIAR, I.B. de; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. **Sementes Florestais Tropicais**. Brasília: ABRATES, p. 333-350, 1993.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: Embrapa Florestas. v. 2. p. 380-386, 2006a.

CARVALHO, L. R de. **Conservação de sementes de espécies dos gêneros *Nectandra*, *Ocotea* e *Persea* (Lauraceae)**. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006b.

CARVALHO, N.M. de; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção**. Campinas, Fundação Cargill, 1983. 429p.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000, 588p.

CHO, C.; LIN, T.P.; KUO-HUANG, L.L. Ultrastructural study on the recalcitrant seeds of *Machilus thunbergii* Sieb. e Zuce. **Taiwania**, Taipei, v. 46, n. 2, p.125-134, 2001.

CORTE, V. B. **Alterações fisiológicas e bioquímicas de sementes de *Melanoxylon brauna* envelhecidas natural e artificialmente**. 129f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

CROMARTY, A.S.; ELLIS, R.H.; ROBERTS, E.H. **Desing of seed storage facilities for genetic conservation**. Rome:IPGRI, 1985, 100p.

DENARDI, L.; MARCHIORI, J.N.C. Anatomia ecológica da madeira de *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 2. p. 119-127, 2005.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Biochemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.41, n.230, p.1167-1174, 1990.

FARIA, J.M.R.; VAN LAMMEREN, A.A.M.; HILHORST, H.W. M. Desiccation sensitivity and cell cycle aspects in seeds of *Inga vera* sudsp. *affinis*. **Seed Science Research**, v.14, n.2, p.165-178, 2004.

FARRANT, J.M., PAMMENTER, N.W., BERJAK, P. Recalcitrance: a current assessment. **Seed Science and Technology**, v. 16, n.1, p. 155-166, 1988.

FARRANT, J.M., PAMMENTER, N.W. AND BERJAK, P. Seed development in relation to desiccation tolerance: A comparison between desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation-tolerant types. **Seed Science Research**, v. 3, p. 1-13, 1993.

FERREIRA, S.A.N.; GENTIL, D.F.O. Armazenamento de sementes de camu-camu (*Myrciaria dubia*) com diferentes graus de umidade e temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.3, p.440-442, 2003.

FONSECA, S. C. L.; FREIRE, H. B. Recalcitrants seeds: post-harvest problems. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 2, p. 297-303, 2003.

FRANÇA NETO, J. de B. O teste de tetrazólio em sementes de soja. In: VIEIRA, R.D., CARVALHO, N.M. de. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP-UNESP. 1994, p. 87-102.

HONG, T.D.; ELLIS, R.H. Optimum air-dry seed storage environments for *Arabica coffee*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 20, p. 547-560, 1992.

IAPAR. **Cartas climáticas do Paraná**. Disponível em <<http://www.iapar.br>>. Acesso em 21/01/2011.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940.

JUSTO, C. F.; ALVARENGA, A. A. de; ALVES, E.; GUIMARÃES, R. M.; STRASSBURG, R. C. Efeito da secagem, do armazenamento e da germinação sobre a micromorfologia de sementes de *Eugenia pyriformis* Camb. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 539-551, 2007.

KERMODE, A.R.; FINCH-SAVAGE, B.E. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H.W. **Desiccation in survival in plants: drying without dying**. New York: CAB International, p. 149-184, 2002.

KLEIN, R.M.; SLEUMER, H.O. Flacourtiaceae. In: Reitz, P.R. **Flora Ilustrada Catarinense**, Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 1-95. 1984

LABORIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, 1983. 174p.

LANDRUM, L.R. Monograph 45: *Campomanesia*, *Pimenta*, *Blepharocalyx*, *Legrandia*, *Acca*, *Myrrhinium*, and *Luma* (Myrtaceae). **Flora Neotropica**, New York, p. 116-160, 1986.

LEGRAND, D.C.; KLEIN, R. Mirtáceas. 17. *Myrciaria*, 18. *Pseudocaryophyllus*, 19. *Blepharocalyx*, 20. Espécies suplementares, 21. Espécies cultivadas, 22. Generalidades: chaves dos gêneros. In REITZ, P.R. **Flora ilustrada catarinense**, Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 731-876, 1978.

LIANG, Y.; SUN, W. Q. Desiccation tolerance of recalcitrant *Theobroma cacao* embryonic axes: the optimal drying rate and its physiological basis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 352, p. 1911-1919, 2000.

LONGHI, R.A. **Livro das árvores e arvoretas do sul**. 2 ed. Porto Alegre: L & PM Ed, 1995. 176p.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 1 ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1992. 352p.

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

MACHADO, J.C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC-ESAL-FAEPE, 1988. 106 p.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.1, p. 176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005, 495p.

MARCHIORI, J.N.C. **Dendrologia das Angiospermas: Das Magnoliáceas às Flacurtiáceas**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 1997. 271p.

MARCHIORI, J.N.C.; SOBRAL, M. **Dendrologia das Angiospermas: Myrtales**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 1997. 304p.

MARQUES, M.A. **Secagem e armazenamento de sementes de *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* (Benth.) Altschul e *A. colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul**. 124f. Tese (Doutorado em Agronomia - Produção e Tecnologia de Sementes) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

MARQUETE, R.; VAZ, A.M.S. da F. O gênero *Casearia* no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 58, n. 4, p. 705-738, 2007.

MASETTO, T.E. **Estudo da sensibilidade à dessecação em sementes de *Eugenia handroana* D. Legrand (Myrtaceae)**. 60f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal – Florestas de Produção) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

MEDEIROS, A.C. de S.; EIRA, M.T.S. de. Comportamento fisiológico, secagem e armazenamento de sementes florestais nativas. **Circular técnica, 127**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 13p.

MEDEIROS, A.C. de S. Armazenamento de sementes de espécies florestais nativas. **Documentos 66**. Brasília: Embrapa, 2001. 24p.

MEDEIROS, A.C. de S. Preparo e uso de soluções salinas saturadas para a caracterização fisiológica de sementes florestais. **Circular Técnica, 125**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006, 5p.

MELLO, J.I. de O. **Compostos de reserva de sementes e suas relações com diferentes níveis de sensibilidade à dessecação e ao congelamento**. 117f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo, 2008.

MENDES, S. S.; MESQUITA, J. B.; MARINO, R. H.. Qualidade sanitária de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit armazenadas em câmara fria. **Acta Forestalis**, Aracaju, v.1, n.1, p.19-28, 2009.

MERCK. **The Merck Index**: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 11.ed. New York: Merck, 1989, 1605p.

MORAIS, P. O.; LOMBARDI, J. A. A Família Myrtaceae na Reserva Particular do Patrimônio Natural da Serra do Caraça, Catas Altas, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, Belo Horizonte, v. 7, n. 1, p. 3-32, 2006.

NERY, F.C. **Aspectos da germinação, armazenamento de sementes, crescimento inicial e anatomia de plantas jovens de *Calophyllum brasiliense* Cambess.** 173f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

NETTO, A.M.; FAIAD, M.G.R. Viabilidade e sanidade de sementes de espécies florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 17, n.1, p. 75-80, 1995.

O' BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Aspects of recalcitrant seed physiology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12 (edição especial), p. 56-69, 2000.

PANZA, V.; LÁINEZ, V.; MALDONADO, S.; MARODER, H.L. Effects of desiccation on *Euterpe edulis* Martius seeds. **Biocell**, v.31, n.3, p.383-390, 2007.

PEREIRA, J.P. Conservação da viabilidade do poder germinativo da semente de seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 2, p. 237-244, 1980.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. v. 2. Rio de Janeiro: Instituto de Desenvolvimento Florestal, 1984, 687p.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1977. 289p.

PRITCHARD, H.W. Water potential and axis viability in recalcitrant seeds of *Quercus rubra*. **Annals of Botany**, v. 67, p. 43-49, 1991.

PRITCHARD, H.W.; TOMPSETT, P.B.; MANGER, K.; SMIDT, W.J. The effect of moisture content on the low temperature responses of *Araucaria hunsteinii* seed and embryos. **Annals of Botany**, v. 76, p. 79-88, 1995.

PUPIM, T.L, NOVEMBRE, A.D. da L., BRANCALION, P.H.S., MORAES, M.H.D. de, MONDO, V.H.V., LABONIA, V.D. de S. Conservação de sementes de *Magnolia ovata* St. Hil. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 3, p. 96-105, 2009.

RAMOS, A.; SOUZA, G.B. Utilização das reservas alimentícias de sementes de araucária durante armazenamento. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 22-23, p. 21-27, 1991.

REID, J.S.G.; BEWLEY, J.D. A dual role for the endosperm and its galactomannan reserves in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), an endospermic leguminous seed. **Planta**, v. 147, p. 145-150, 1979.

REID, J.S.G.; EDWARDS, M.E. Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds. In: STEPHEN, A.M. **Food Polysaccharides and Their Applications**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1995. p. 155-186.

REGO, S.S.; SANTOS, A.F. dos; MEDEIROS, A.C. de S. Detecção, transmissão e patogenicidade de fungos em sementes e mudas de angico e angico-branco. Botucatu: **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 32, suplemento, p. 63, 2006.

REGO, S.S. NOGUEIRA, A. C., KUNIYOSHI, Y. S., SANTOS, A. F. dos. Caracterização morfológica do fruto, da semente e do desenvolvimento da plântula de *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg. e *Myrceugenia gertii* Landrum - Myrtaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n.3, p. 52-60, 2010.

REGO, S.S.; NOGUEIRA, A.C.; MEDEIROS, A.C. de S.; SANTOS, A.F. dos. Teste de condutividade elétrica para avaliar o vigor de sementes de *Blepharocalyx salicifolius* e *Casearia decandra* com diferentes teores de água. **Anais do XVII Congresso Brasileiro de Sementes**, Natal, 2011.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v. 1, p. 499-514, 1973.

ROCKLAND, L.B. Saturated salt solutions for static control of relative humidity between 5° and 40 °C. **Analytical Chemistry**, v.32, n.10, p.1375-1376, 1960.

RODRIGUES, M. O. de S.; CREPALDI, I. C.; LUCHESE, A. M.; SANTANA, N. O.; CARVALHO, A. L. B.; PELACANI, C. R.; LEDO, C. A. da S. Influência do armazenamento nos teores de açúcares solúveis totais e redutores em

sementes de *Syagrus coronata* (Martius) Beccari (Arecaceae). **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 5, n. 2, p. 72-75, 2005.

RODRIGUES, A.A.C.; MENEZES, M. Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de Serra Talhada e de Caruaru, Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 5, p. 532-537, 2002.

ROSSETTO, C.A.V.; NAKAGAWA, J.; ROSOLEM, C.A. Efeito da adubação potássica e da época de colheita na qualidade fisiológica de sementes de canola (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzg.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.19, n.2, p.349-354, 1997.

SAKURAI, N; S. TANAKA, S. KURISHI. Changes in wall polysaccharides of squash (*Curcubita maxima* Duch.) hypocotyls under water stress condition. I. Wall sugar composition and growth as affected by water stress. **Plant Cell Physiology**, v.28, n.6, p.1051- 1058, 1987a.

SAKURAI, N. S.; TANAKA, S.; KURISHI, B. Changes in wall polysaccharides of squash (*Curcubita maxima* Duch.) hypocotyls under water stress condition. II- Composition of pectic and hemicellulosic polysaccharides. **Plant Cell Physiology**, v.28, n.6, p.1059-1070, 1987b.

SANTOS, A.F. dos, PARISI, J.J.D. Doenças em mudas e tipos de associações entre fungos e sementes florestais. In: SANTOS, A.F. dos, PARISI, J.J.D., MENTEN, J.O.M. **Patologia de Sementes Florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2011, p. 37-61.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**, 2nd ed. Ames: The Iowa State College Press, 1951, 228p.

SILVA, P. de A., DINIZ, K. A., OLIVEIRA, J. A., VON PINHO, E. V. de R. Análise fisiológica e ultra-estrutural durante o desenvolvimento e a secagem de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p.15-22, 2007.

SILVA, R. T. V. da; HOMECHIN, M.; FONSECA, E. de P.; SANTIAGO, D. C. Tratamento de sementes e armazenamento na sanidade de sementes de paineira (*Chorisia speciosa* St. Hil). **Semina**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 255-260, 2003.

SILVA JÚNIOR, M. C. da. **100 árvores do Cerrado: guia de campo**. Brasília: Rede de sementes do Cerrado. 2005. 278p.

SLONEKER, J. H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 6, p. 20-24, 1972.

SOUZA, S.M. de; PIRES, I.E.; LIMA, P.C.F. Influência da Embalagem e condições de armazenamento na longevidade de sementes florestais. In: Pesquisa Florestal no Nordeste Semi-Árido: sementes e mudas. **Boletim de Pesquisa**, v. 2, Brasília: Embrapa, p.15-24. 1980.

SUN, W. Q.; LIANG, Y. Discrete levels of desiccation sensitivity in various seeds as determined by the equilibrium dehydration method. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 11, p. 317–323, 2001.

SUN, W.Q. Methods for the study of water relations under desiccation stress. In: BLACK, M.; PITCHARD, H.W. **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. New York: CABI Publishing, p. 47-91, 2002.

THADEO, M.; MEIRA, R. M. S. A., AZEVEDO, A. A., VIEIRA, J. M. de A. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras da folha de *Casearia*

decandra Jacq. (Salicaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n.2, p.329-338, 2009.

VERTUCCI, C.W.; ROOS, E.E. Theoretical basis of protocols for seed storage II. The influence of temperature on optimal moisture levels. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, n.3, p.201-213. 1993.

VIDAL, B.C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cellular Molecular Biology**, v. 22, p. 45-64, 1977.

VIEIRA, B. G. T. L. **Alterações histológicas e bioquímicas e potencial fisiológico de sementes de soja**. 67f. Tese (Doutorado em Agronomia) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2009.

VIEIRA, C.V., ALVARENGA, A.A. de, CASTRO, E.M. de, NERY, F.C., SANTOS, M. de O. Germinação e armazenamento de sementes deamboatá (*Cupania vernalis* Cambess.) Sapindaceae. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 444-449, 2008.

VILLELA, F.A.; PERES, W.B. Coleta, beneficiamento e armazenamento. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. São Paulo: Artmed, 2004, p. 265-282.

WALTERS, C. Levels of recalcitrance in seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12 (edição especial), p. 7-21, 2000.

WINSTON, P.W.; BATES, D.H. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. **Ecology**, Tempe, v.41, n.1, p. 232-237. 1960.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 211, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydrate. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65, 1963b.