



MARIA IZABEL FURST GONÇALVES

**SECAGEM, ARMAZENAMENTO E
VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
TESTE DE GERMINAÇÃO
DE SEMENTES DE PORTA-ENXERTOS
DE CITROS**

LAVRAS-MG

2017

MARIA IZABEL FURST GONÇALVES

**SECAGEM, ARMAZENAMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
PARA TESTE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE PORTA-
ENXERTOS DE CITROS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Ciências Florestais, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. José Marcio Rocha Faria

Orientador

Prof. Dr. Anderson Cleiton José

Dra. Denise Garcia de Santana

Dra. Olívia Alvina Oliveira Tonetti

Coorientadores

LAVRAS-MG

2017

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

Gonçalves, Maria Izabel Furst.

Secagem, armazenamento e validação de metodologia para teste de germinação de sementes de porta-enxertos de citros / Maria Izabel Furst Gonçalves. - 2017.

201 p. : il.

Orientador: José Marcio Rocha Faria.

Coorientadores: Anderson Cleiton José; Denise Garcia de Santana; Olívia Alvina Oliveira Tonetti.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. *Citrus*. 2. Tolerância à dessecação. 3. Longevidade. I. Faria, José Marcio Rocha. II. José, Anderson Cleiton. III. Santana, Denise Garcia de. IV. Tonetti, Olívia Alvina Oliveira. V. Título.

MARIA IZABEL FURST GONÇALVES

**SECAGEM, ARMAZENAMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
PARA TESTE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE PORTA-
ENXERTOS DE CITROS**

**DRYING, STORAGE AND VALIDATION OF METHODOLOGY FOR
GERMINATION TEST OF CITRUS ROOTSTOCKS SEEDS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Ciências Florestais, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 23 de agosto de 2017.

Dr. Cláudio José Barbedo	Instituto de Botânica
Prof. Dr. João Almir	UFLA
Prof. Dr. Anderson Cleiton José	UFLA
Dra. Heloisa Oliveira dos Santos	UFLA

Prof. Dr. José Marcio Rocha Faria
Orientador

LAVRAS-MG

2017

Àquela que me gerou e me ensinou a amar a vida.

Àquele que, mesmo já tendo ido, continua me incentivando ao crescer e ao saber das coisas da terra.

Àquele cujo amor e admiração foram essenciais, para que me transformasse em agrônoma, pesquisadora e pudesse mergulhar nos mistérios das sementes.

Ao meu irmão Flávio, amigo sensível e solidário.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus, por iluminar e abençoar a minha vida.

Ao Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento pela liberação parcial para o doutorado. Meu reconhecimento a todas as pessoas envolvidas no processo e, especialmente, a Ricardo Aurélio Pinto Nascimento, Nilson César Castanheira Guimarães, Ernesto do Nascimento Viegas e Lêda Aparecida Mendonça.

Ao meu orientador, José Márcio Rocha Faria, muito obrigada pelo suporte, encorajamento. Seu apoio e senso de humor foram essenciais para transcender as dificuldades e limitações durante este percurso. Também fiquei muito feliz em ser sua aluna, aprendi muito!

Aos meus coorientadores, pelos conselhos, críticas e direcionamentos. Além disso, agradeço ao Professor Anderson Cleiton José pelas aulas enriquecedoras sobre sementes florestais, à Professora Denise Santana, pelo seu incentivo para realizar o doutorado e, também, pela utilização do laboratório de sementes florestais da UFU para os experimentos iniciais e à Olívia Tonetti, pelo apoio no dia a dia do laboratório.

A todos os professores do curso de doutorado, por compartilhar seus conhecimentos e, pelo profissionalismo, ampliaram a minha alegria de buscar o saber.

À Professora Adriana Nakamura pelo grande auxílio e ensinamentos em morfologia e anatomia de plântulas.

Ao Professor Renato Mendes Guimarães que facilitou o uso dos equipamentos do Laboratório Central do Departamento de Agricultura da UFLA e aos funcionários deste laboratório Jaqueline Pereira Januário e José Geraldo Vilas Boas pelo suporte durante a realização das análises do sistema

antioxidante. Professor Renato, sou-lhe muito grata também pelas aulas inesquecíveis e motivadoras!

Ao Professor Evaristo Mauro de Castro pela disponibilização do Laboratório de Botânica e materiais para realização de estudos anatômicos de plântulas.

Ao Professor Antônio Decarlos Neto do Departamento de Agricultura da UFLA pelas informações sobre as sementes de porta-enxertos de citros e indicações de fornecedores de sementes.

Às Professoras Maria das Graças Guimarães Carvalho, minha primeira professora de sementes e Doris Groth por terem me contagiado com paixão pelas sementes.

À Sylvie Ducourmau e a todos os outros membros do Comitê de Germinação da ISTA, pela colaboração e diretrizes para o estabelecimento de critérios para avaliação de plântulas das sementes de porta-enxertos de citros.

À Myriam Alvisi por compartilhar sua experiência em análise de sementes. Também por ter autorizado a realização de parte dos experimentos desta tese no LASO-MG.

A todos os funcionários do Laboratório Oficial de Análise de Sementes de Minas Gerais – LASO-MG, pelo apoio durante doutorado e companhia no dia a dia. Agradeço, especialmente, ao colega Júlio Terra, pela disponibilidade em executar os testes de germinação dos interlaboratoriais, mesmo em momentos bastante atribulados. Além disso, suas observações e sugestões fizeram a diferença.

Aos funcionários de outros laboratórios oficiais do Ministério de Agricultura pela colaboração durante a execução dos ensaios interlaboratoriais. Meu reconhecimento especial aos responsáveis técnicos e responsáveis técnicos substitutos que se envolveram pessoalmente neste processo (Angélica Wielewicki, Ana Paula Barbieri, Zilva Lopes, José Giampani, Marcelo Sobreira,

Sayonara Assis e Eliane Basseto). Suas perguntas, sugestões e críticas foram determinantes.

Aos laboratórios participantes nos pré-testes e ensaios interlaboratoriais: APSEMG, IAC-Campinas, IAPAR, CATI, ADV – sementes, Embrapa Milho e Sorgo, FEPAGRO e Qualiteste. Sem esta cooperação, a validação de métodos não teria acontecido. Agradeço a todos os funcionários envolvidos e, especialmente, à Maria Selma Carvalho, Priscila Fratin Medina, Marizangela Rizzatti, Patrícia Cursi, Celso A. Dal Piva, Dea Alecia Martins Netto, João Rodolfo Guimarães Nunes e Michele Camargo.

Ao Sr. Vantuil Antônio de Sousa, do Viveiro Citrobom, pelo fornecimento de frutos de tangerina Cleópatra, para realização dos experimentos de secagem e armazenamento, além de fornecimento de sementes deste e de outros porta-enxertos para realização dos experimentos destinados à validação de métodos.

Aos outros fornecedores de sementes, viveiristas, pesquisadores, auditores fiscais agropecuários, extensionistas e estudantes, que forneceram as sementes dos porta-enxertos utilizadas para os experimentos e ensaios interlaboratoriais. Henrique Fiorese (Fiorese Citrus), Christiano César Craft (Citrograf Mudas); Osvino Koller e Luana Maro (EPAGRI); Marcos Antônio Machado (IAC-Cordeirópolis), Marizangela Rizzatti (IAPAR), Silvana Rizza (MAPA), Virgílio Machado de Almeida (EMATER – Dona Euzébia-MG) e a todos os demais, muito obrigada!

Aos colegas do Laboratório de Sementes Florestais pela convivência agradável e divertida. Também a Luiz, Wilson, Gislean, Fabieli, Thalita e Rodrigo pela ajuda em momentos críticos.

A todos os funcionários do Departamento de Ciências Florestais da UFLA e, particularmente, ao funcionário da secretaria de pós-graduação, Juliano, pelas orientações e respostas rápidas, e à Meire, pelo café e amizade.

A toda a minha família, sobrinhos e sobrinhos-netos, mais especialmente à minha mãe e irmãos pelo amor incondicional e estímulo durante o doutorado.

Ao meu grande amor, Romualdo, pela presença amorosa e motivadora. Também pela paciência e compreensão, durante esta jornada, que exigiu, muitas vezes, renúncias e sacrifícios da sua parte.

À Márcia Tavares, pela ajuda para seguir adiante e superar os obstáculos. Também pela empatia e preocupação com as pessoas a quem mais amo na vida.

O correr da vida embrulha tudo.

A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta.

O que ela quer da gente é coragem.

João Guimarães Rosa

RESUMO GERAL

Dada a importância como porta-enxerto, sementes de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*) precisam ser conservadas por médio e longo prazo. Assim, objetivou-se estudar o efeito da secagem e armazenamento para classificar seu comportamento pós-colheita. Também foi objetivo desenvolver e validar metodologia para testes de germinação de sementes desta espécie e dos porta-enxertos limão-cravo (*Citrus limonia*), trifoliata (*Poncirus trifoliata*) e citrumelo (*C. paradisi* x *P. trifoliata*). As sementes de *C. reshni* foram dessecadas em duas velocidades (RH = 10 ± 3% e 75 ± 3%), determinando-se a germinação e a atividade das enzimas do sistema antioxidante catalase e superóxido dismutase (ARTIGO 1). Numa segunda etapa essas sementes foram submetidas à secagem (RH = 10 ± 3%) até os conteúdos de água de 24,2; 11,3 e 5,5% e, juntamente com as sementes frescas (36,9% b.u), armazenadas em câmara fria a 6 ± 2°C por três meses. As sementes mais secas foram armazenadas também a -20 ± 2°C. Avaliou-se germinação após secagem e armazenamento e viabilidade e vigor de embriões após o armazenamento (ARTIGO 2). Sementes de qualidades diversas foram testadas quanto à luz e temperaturas (25, 30 e 35°C). Em seguida realizou-se ensaios interlaboratoriais (ARTIGO 3). Concluiu-se que independentemente da velocidade de secagem, as sementes de *C. reshni* foram tolerantes à dessecação, mantendo alta germinação mesmo após a secagem até o conteúdo de água de 3% e que as atividades das enzimas catalase e superóxido dismutase não foram boas indicadoras do efeito imediato da secagem. Na segunda etapa, confirmou-se a tolerância à dessecação e constatou-se que o armazenamento de sementes mais úmidas (36,9 e 24,2% b.u) a 6 ± 2°C por três meses foi mais adequado, destacando-se as sementes armazenadas frescas pelo vigor. Além disso, sementes de *C. reshni* mais secas (5,5% b.u.) são sensíveis ao armazenamento, especialmente em temperaturas negativas (-20 ± 2°C), revelando comportamento próximo das sementes intermediárias. Quanto à metodologia para germinação, concluiu-se que: a) as sementes de tangerina Cleópatra, limão-cravo e citrumelo germinam melhor nas temperaturas de 25 e 30°C e que esta última temperatura propiciou germinação mais rápida para sementes de limão-cravo; b) substratos muito úmidos não são adequados para testes em rolo do papel; c) apenas a metodologia para sementes de limão-cravo obteve bons coeficientes de variação de repetitividade, reprodutibilidade e ótimo coeficiente de variação de repetitividade e reprodutibilidade (R&R) e foi considerada validada para incorporação às regras para análise de sementes.

Palavras-chave: *Citrus*. Tolerância à dessecação. Longevidade. Germinação. Reprodutibilidade.

GENERAL ABSTRACT

Because of the importance as a rootstock, Cleopatra mandarin (*Citrus reshni*) seeds need to be preserved for medium and long terms. Thus, the objective was to study the drying and storage effect to classify its post-harvest behavior. This work objective was to develop and validate a methodology for seed germination tests of this species and of the rangpur lime (*Citrus limonia*), trifoliata (*Poncirus trifoliata*) and citrumelo (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) rootstocks. Seeds of *C. reshni* were desiccated at two speeds (RH = $10 \pm 3\%$ and $75 \pm 3\%$), determining the germination and activity of the antioxidant system catalase and superoxide dismutase enzymes (ARTICLE 1). In a second step, these seeds were submitted to drying (RH = $10 \pm 3\%$) until the water contents of 24.2; 11.3 and 5.5% and, together with fresh seeds (36.9% w.b), stored in a cold room at $6 \pm 2^\circ\text{C}$ for three months. The drier seeds were also stored at $-20 \pm 2^\circ\text{C}$. Germination after drying and storage and embryo viability and vigor after storage were evaluated (ARTICLE 2). Various qualities of seeds were tested for light and temperatures (25, 30 and 35 °C). Interlaboratory tests were then performed (ARTICLE 3). This study concluded that regardless of drying rate, *C. reshni* seeds were tolerant to desiccation, maintaining high germination even after drying up to 3% water content and that the catalase and superoxide dismutase enzymes activities were not good indicators of the drying immediate effect. In the second stage, the desiccation tolerance was confirmed and it was verified that the storage of wetter seeds (36.9 and 24.2% w.b) at $6 \pm 2^\circ\text{C}$ for three months was more adequate, highlighting the fresh stored seeds by vigor. In addition, drier *C. reshni* seeds (5.5% w.b.) are sensitive to storage, especially at negative temperatures ($-20 \pm 2^\circ\text{C}$), revealing a closer behavior of intermediate seeds. With regard to the germination methodology, we concluded that: a) the Cleopatra mandarin, rangpur lime and citrumelo seeds germinate better at temperatures of 25 and 30 °C and this latter temperature provided faster germination for rangpur lime seeds; b) very wet substrates are not suitable for paper roll testing; c) only the methodology for rangpur lime seeds obtained good repeatability, reproducibility variation coefficient and excellent repeatability and reproducibility (R & R) variation coefficient, and was considered valid for incorporation to the rules for seed analysis.

Keywords: Citrus. Desiccation tolerance. Longevity. Germination. Reproducibility.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figure 1. Rapid (silica gel) and slow (NaCl until the 250th hour and silica gel until the end) drying curves for *Citrus reshni* seeds at 20°C.....74
- Figure 2. Effects of drying rates on *Citrus reshni* seed germination. Data are means of water content results as there was no significant interaction between the drying rates and water content. Bars followed by the same letter in each variable are not significantly different by the Scott–Knott test ($P = 0.05$).75

ARTIGO 2

- Figura 1. Critérios para avaliação de embriões de sementes de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*), sendo embriões não viáveis (A, B, C, D), embriões viáveis não vigorosos (E, F, G) e embrião viável vigoroso (H).....132
- Figura 2. Germinação de sementes de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*) logo após secagem (tempo de armazenamento = 0). Médias seguidas da mesma letra, em cada conteúdo de água (% base úmida), não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.133
- Figura 3. Germinação de sementes de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*) antes e após armazenamento por três meses a $6 \pm 2^\circ\text{C}$. Médias seguidas da mesma letra, em cada conteúdo de água (b.u.= base úmida), não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.134

- Figura 4. Poliembrionia de sementes de sementes de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*) após armazenamento por três meses a $6 \pm 2^\circ\text{C}$ em diversos conteúdos de água e a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ com conteúdo de água de 5%. Dados referem-se à média de todos os tratamentos..... 135
- Figura 5. Sementes poliembrionicas de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*), após armazenamento por três meses com conteúdo de água inicial (A e B), mostrando embriões muito pequenos e vigorosos (A) e muito pequenos viáveis (B, o primeiro e o segundo da direita para esquerda) e inviáveis (B, o terceiro e o quarto da direita para esquerda), e com 5% a $6 \pm 2^\circ\text{C}$ (C) e a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ (D) por três meses, mostrando embriões pequenos e muito pequenos inviáveis. 136
- Figura 6. Embriões de sementes de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*) após armazenamento com conteúdo de água de 5% por três meses a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$, apresentando áreas descoloridas nos cotilédones e eixos embrionários coloridos em embriões viáveis (A e B) e inviáveis (C e D). 137

ARTIGO 3

- Figura 1. Germinação de sementes de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*) – desenvolvimento deste, a protrusão da raiz até a expansão das folhas primárias..... 194
- Figura 2. Plântula de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*) A. Epicótilo e folhas primárias verde- escuro com presença de glândulas de óleo; B. Epicótilo, folhas primárias e gema apical com pequenos tricomas e glândulas de óleo; C. Corte transversal

	do epicótilo; D. Detalhe do corte transversal do epicótilo mostrando glândula de óleo e um tricoma.....	195
Figura 3.	Cortes transversais da raiz da plântula de tangerina Cleópatra (<i>Citrus reshni</i>) A e B. Região distal, próxima ao ápice; C e D. Região mediana; E e F. Região proximal ao hipocótilo.	196
Figura 4.	Plântula de citrumelo (<i>Citrus paradisi</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>) com todas as estruturas essenciais (fundo com quadriculado 5 x 5 mm).	197
Figura 5.	Plântulas anormais de porta-enxertos de citros, mostrando defeitos na raiz, sendo A. Raiz bifurcada e infeccionada, B. Bifurcada e com calos C. Apenas raízes secundárias e D. Raiz atrofiada. Quadriculado 10 x 10mm em B e 5m x 5m em C e D.	198
Figura 6.	Plântulas anormais de porta-enxertos de citros, mostrando A. Despigmentação, B. Epicótilo em laço, C. epicótilo em laço e sem raiz e D. Parte aérea pouco desenvolvida ou ausente e raiz não desenvolvida. Quadriculado 5mm x 5mm.	199
Figura 7.	Plântulas de tangerina Cleópatra (<i>Citrus reshni</i>) com estrutura anômala A. Raiz verde, com rachaduras superficiais e ápice escurecido. B. Corte transversal da raiz anômala. C. Corte longitudinal da raiz anômala.	200
Figura 8.	Parte aérea de plântulas de porta-enxertos de citros, mostrando variações no número de folhas, sendo duas em A e D (ocorrem, geralmente, em tangerina Cleópatra e limão-cravo) e três ou mais em B, C, E e F e apresentar diferenças no formato (ocorrem, geralmente, em citrumelo e trifoliata).	201

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Table 1. Activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in *Citrus reshni* seeds with different water contents obtained by rapid and slow drying..... 76
- Table 2. *Citrus reshni* seed germination and seedling evaluation after desiccation..... 77

ARTIGO 2

- Tabela 1. Conteúdo de água (% base úmida) de sementes de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*), antes e após extração, secagem e armazenamento por três meses..... 130
- Tabela 2. Germinação, poliembrionia, viabilidade e vigor de embriões de sementes de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*) após armazenamento por três meses..... 131

ARTIGO 3

- Tabela 1. Lotes utilizados nos experimentos destinados ao desenvolvimento dos métodos para germinação de sementes de porta-enxertos Cleópatra, citrumelo, limão-cravo e trifoliata..... 181
- Tabela 2. Germinação de sementes de tangerina Cleópatra a 30°C, com luz constante, de acordo com a quantidade de água utilizada para umedecimento do papel de germinação..... 182
- Tabela 3. Germinação de quatro porta-enxertos de citros em temperatura de 30°C constante, em ausência e presença de luz..... 183

Tabela 4.	Germinação de três porta-enxertos de citros nas temperaturas constantes de 25, 30 e 35, em presença de luz constante.	184
Tabela 5.	Germinação do porta-enxerto trifoliata (<i>Poncirus trifoliata</i>) em diversas temperaturas constantes sob luz contínua e em temperatura e luz alternadas.	185
Tabela 6.	Germinação de limão-cravo nas temperaturas constantes de 25 e 30°C, sob luz contínua.	185
Tabela 7.	Germinação de quatro porta-enxertos de citros a 30°C, sob luz constante, após tratamentos pré-germinativos.	186
Tabela 8.	Protocolo para validação de metodologia de teste de germinação para o porta-enxertos de citros citrumelo (<i>Citrus paradisi</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>)	187
Tabela 9.	Protocolo para validação de metodologia para teste de germinação para o porta-enxerto tangerina Cleópatra (<i>Citrus reshni</i>)	188
Tabela 10.	Protocolo para validação de metodologia para testes de germinação para porta-enxertos de citros limão-cravo (<i>Citrus limonia</i>).	189
Tabela 11.	Média da porcentagem de germinação e coeficiente de variação obtidos de quatro repetições em ensaio interlaboratorial destinado à validação de metodologia, para teste de germinação para sementes de tangerina Cleópatra (<i>Citrus reshni</i>).	190
Tabela 12.	Estatísticas de repetitividade, variância entre laboratórios e reprodutibilidade do teste de germinação, obtidos por lote para ensaios interlaboratoriais para sementes de dois porta-enxertos de citros por método indicado pela ISTA.	191

Tabela 13. Média da porcentagem de germinação e coeficiente de variação obtidas de quatro repetições em ensaio interlaboratorial destinado à validação de método de teste de germinação limão-cravo (<i>Citrus limonia</i>).	192
Tabela 14. Estatísticas de repetitividade, reprodutibilidade e R&R obtidos pela análise de variância com dois fatores, de acordo com Brandão (2013) de um ensaio interlaboratorial de resultados de teste de germinação com sementes de limão-cravo (<i>Citrus limonia</i>).	193

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1	O gênero <i>Citrus</i> e espécies relacionadas.....	23
2.2	Aspectos gerais dos porta-enxertos em estudo.....	24
2.3	Tolerância à dessecação	25
2.4	Danos por secagem	28
2.5	Taxa de secagem	29
2.6	Espécies reativas de oxigênio e enzimas antioxidantes.....	30
2.7	Comportamento quanto à secagem e armazenamento.....	32
2.8	Sementes de citros.....	34
2.9	Ocorrência de poliembrionia e apomixia	36
2.10	Germinação de sementes de citros	37
2.11	Validação de métodos para teste de germinação	40
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	45
	REFERÊNCIAS	49
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	65
	ARTIGO 1 - DESICCATION TOLERANCE AND ANTIOXIDANT ENZYMIC ACTIVITY IN <i>Citrus reshni</i> SEEDS EXPOSED TO VARIOUS DRYING RATES.....	65
	ARTIGO 2 - TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DO PORTA- ENXERTO TANGERINA CLEÓPATRA (<i>Citrus reshni</i> Hort. ex Tanaka).....	93
	ARTIGO 3 - VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA TESTES DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE PORTA- ENXERTOS DE CITROS	139

1 INTRODUÇÃO

A citricultura tem expressiva participação na economia brasileira com geração de 230 mil empregos diretos e indiretos (CITRUSBR, 2013). Sua maior importância está na produção de suco de laranja, sendo o Brasil responsável por 75% da exportação mundial (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATION - FAO, 2017). Pelo caráter perene da cultura, a muda formada por porta-enxertos produzidos, a partir de sementes, é um dos insumos mais importantes (LIMA, 1986; TEÓFILO SOBRINHO, 1991).

Estas sementes são poliembriônicas, possuindo embriões originados da nucela, que são, portanto geneticamente idênticos à planta-mãe. Desta forma, é viável obter mudas com as vantagens da propagação por semente, ou seja, com raiz principal pivotante e, ao mesmo tempo, manter as características dos porta-enxertos. Essa conservação das características genéticas é importante, pois os porta-enxertos são selecionados por suas características de resistência a doenças, estresse ambiental e compatibilidade com a copa (ALEZA et al., 2010; BACCHI, 1944; BASTOS et al., 2014; CAMERON; FROST, 1968; CARUSO et al., 2014; MEDINA-FILHO et al., 1993). Ademais, a uniformidade do pomar facilita o manejo.

As sementes de *Citrus* spp e gêneros relacionados têm sido classificadas, em sua maioria, como intermediárias (71% das 24 espécies listadas). Mas há recalcitrantes (17%) e ortodoxas (12%) (ROYAL BOTANIC GARDENS KEW, 2015). Entretanto a despeito da importância e da demanda por sementes certificadas, raramente o comportamento pós-colheita está suficientemente claro. Especificamente para as sementes de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni* hort ex Tanaka), há indicações de tolerância à dessecação e comportamento ortodoxo (VILLEGAS-MONTER; ANDRADE-RODRÍGUEZ, 2005) e de recalcitrância (MARTINS; SILVA, 2006; MARTINS; SILVA; LAGO, 2007).

Embora os comportamentos controversos das sementes cítricas possam ser explicados por diversos fatores, como a qualidade inicial das sementes, detalhes do processamento do fruto, método de secagem, dentre outros, dois fatores parecem contribuir significativamente para essas diferenças: as dificuldades de avaliação da germinação em laboratório e as condições de secagem diversas, em especial, a velocidade de secagem. Na literatura sobre este assunto, há vários indícios de que têm acontecido problemas na avaliação das sementes cítricas em laboratório, citam-se, especialmente, a alta ocorrência de fungos e resultados de germinação em rolo de papel muito mais baixos que os de emergência em areia. Por vezes, como observado por Carvalho et al. (2002b), a germinação chega a ser até 21% menor que a emergência.

Além disso, conquanto se saiba que há variação interespecífica quanto à tolerância à dessecação entre espécies do gênero *Citrus* e *Poncirus* (GRAVIER; CALIFANO; ZARITZKY, 2010; HONG; ELLIS, 1995; LAMBARDI et al., 2004; MUMFORD; PANGGABEAN, 1982; SAIPARI; GOSWAMI; DADLANI, 1997), os mecanismos envolvidos nestas diferenças de comportamento não são conhecidos.

A tolerância à dessecação tem sido associada a múltiplos processos que vão desde a proteção contra a perda de água até mecanismos de reparo durante a hidratação (PAMMENTER; BERJAK, 1999). Relaciona-se com a existência, acionamento e funcionamento de mecanismos como presença de moléculas protetoras, redução de volumes de vacúolos e desdiferenciação celular (DEHAHAIE et al., 2013; LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993; OLIVER; TUBA; MISHLER, 2000; PAMMENTER; BERJAK, 1999; TWEEDLE et al., 2003).

Sistemas antioxidantes eficientes também têm sido considerados fundamentais para manutenção da viabilidade de células que sofrem a ação deletéria de radicais livres durante a secagem, os quais são indispensáveis

também durante a reidratação (BERJAK; PAMMENTER, 2013; PAMMENTER; BERJAK, 1999). O balanço entre a geração e remoção de radicais livres está associado com a sobrevivência e longevidade das sementes (BRANDÃO JÚNIOR et al., 2002).

Torna-se decisivo, portanto conhecer e entender o comportamento das sementes, quanto à capacidade de tolerar a dessecação, para definir protocolos eficientes, tanto para conservação com objetivos comerciais, como para conservação em banco de germoplasma. Mesmo o armazenamento das sementes por períodos curtos, destinado ao uso próprio, também é influenciado pela tolerância à dessecação e, na ausência deste conhecimento, o processamento pode ser inadequado e acarretar perdas.

Desta forma, este trabalho pretende contribuir para esclarecer o comportamento das sementes de *Citrus reshni*, quando submetidas a diversas velocidades de secagem e ao armazenamento, avaliando-se, inclusive, a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase durante a dessecação. Em razão da significância da poliembrionia para estas sementes, esta característica também foi avaliada durante os experimentos.

Além disso, como uma das limitações para o desenvolvimento de protocolos seguros para secagem e armazenamento das sementes dos porta-enxertos de citros é a inexistência de método, para teste de germinação confiável (SOESTINA; KING; ROBERTS, 1985) e há indicações de que problemas na avaliação da germinação podem estar envolvidos nas informações controversas, foram estudados também os fatores que interferem na germinação de tangerina Cleópatra (*C. reshni*) e mais três porta-enxertos: limão-cravo (*C. limonia*), trifoliata (*Poncirus trifoliata*) e citrumelo (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) visando à determinação das condições ótimas para germinação. Baseado nestas informações, foram propostas e, quando possível, validadas metodologias para testes de germinação. Pretende-se, assim, além de resultados seguros sobre o

comportamento das sementes de *C. resinhi* durante a secagem e armazenamento, contribuir para o avanço das pesquisas com outras sementes cítricas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O gênero *Citrus* e espécies relacionadas

Todas as espécies de citros com uso comercial são arbóreas perenes da família Rutaceae e pertencentes aos gêneros *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella*. A taxonomia destas espécies é complexa e, muitas vezes, controversa, pois podem se cruzar, gerando descendência fértil, não havendo, portanto separação clara entre elas. A maioria é diploide, podendo-se encontrar, também, alguns indivíduos triploides, tetraploides e hexaploides em baixas porcentagens nas populações (CHEN et al., 2008; DAVIES; ALBRIGO, 1994).

Originaram-se do sudeste da Ásia, de onde foram levadas para o norte da África, de lá, para o sul da Europa e depois para as Américas. Durante a domesticação, ocorreram hibridações, mutações e seleções até surgirem os tipos de citros cultivados atualmente (DAVIES; ALBRIGO, 1994).

As plantas cítricas foram introduzidas, no Brasil, pelos portugueses, onde encontraram condições favoráveis ao seu desenvolvimento. Em alguns séculos, o país se tornou importante produtor de frutas cítricas (CITRUSBR, 2013). Atualmente, é um dos maiores produtores de laranjas, com produção anual de, aproximadamente, 17,55 milhões de toneladas de frutos e valor bruto da produção de, aproximadamente, 3,4 bilhões de dólares. A maior parte da produção brasileira provém do Estado de São Paulo, sendo, também, expressiva em Minas Gerais, Sergipe, Bahia, Rio Grande do Sul e Paraná (FAO, 2017).

Em cultivos comerciais, os citros são propagados, vegetativamente, por meio de gemas (borbulhas) enxertadas em porta-enxertos, que, por sua vez, são propagados por sementes. A muda é um dos insumos mais importantes. Seus atributos genéticos, agronômicos e sanitários influenciam no desempenho produtivo, qualidade dos frutos e longevidade do pomar (LIMA, 1986; PETRY

et al., 2015; SCHÄFER; BASTIANEL; DORNELLES, 2001; TEÓFILO SOBRINHO, 1991). Entre as características mais importantes de uma muda cítrica estão a origem genética, a qualidade do sistema radicular e sua sanidade (SCHÄFER; BASTIANEL; DORNELLES, 2001).

2.2 Aspectos gerais dos porta-enxertos em estudo

A tangerina Cleópatra (*Citrus reshni* Hort ex. Tanaka) originou-se, provavelmente, na Indochina e Sul da China, de lá foi levada para a Índia e sofreu diversas seleções. Sua utilização como porta-enxerto tem crescido, principalmente, por suas características de resistência moderada à seca e a muitas doenças de importância na citricultura, como o vírus da tristeza dos citros. Ademais, possui capacidade de adaptação a solos diversos, inclusive, solos argilosos e salinos. No Brasil e em outros países, tem sido utilizada, principalmente, como porta-enxerto da tangerina Ponkan e outras tangerinas. A maior parte das sementes desta espécie apresenta poliembrionia (80 a 100%) (DAVIES; ALBRIGO, 1994).

No Brasil, cerca de 80% dos pomares utilizam o porta-enxerto limoeiro cravo (*Citrus. limonia* Osbeck). Originado da Índia, é compatível com praticamente todas as variedades copa. Apresenta boa tolerância ao estresse hídrico e menor exigência em fertilidade dos solos. Além disso, seu grande vigor no viveiro, bom pegamento de mudas e produção alta e precoce têm mantido sua importância no Brasil (POMPEU JUNIOR, 2005). Suas sementes apresentam menor taxa de poliembrionia (entre 48 e 58%) que outros porta-enxertos, possuindo, em média, 1,5 embrião por sementes (DUARTE et al., 2013).

O porta-enxerto trifoliata (*Poncirus trifoliata* [L] Raf.) originou-se da região central e norte da China. É largamente utilizado no Japão, China, Argentina, Austrália e Sul do Brasil. É muito resistente ao frio e à geada, sendo

também indicado para locais com problemas de drenagem. Confere alta qualidade às frutas, mas não tolera seca (DAVIES; ALBRIGO, 1994; OLIVEIRA; SCIVITTARO; RADMANN, 2003). Suas sementes são altamente poliembriônicas, com até 10 embriões (MOREIRA; GURGEL; ARRUDA, 1947). Importante em programas de melhoramento genético, tem gerado muitos porta-enxertos híbridos de alto valor, como o citrumelo (DAVIES; ALBRIGO, 1994; OLIVEIRA; SCIVITTARO; RADMANN, 2003). Além disso, é o principal porta-enxerto utilizado no Rio Grande do Sul (SCHÄFER; BASTIANEL; DORNELLES, 2001).

Citrumelo é um híbrido (*C. paradisi* x *P.trifoliata*), testado como porta-enxerto desde os anos de 1940, existindo diversas variedades comerciais em alguns países. Foi introduzido no Brasil por ser resistente à tristeza, à gomose, ao nematoide. É também produtivo e tolerante ao frio, porém suas plantas são mais exigentes em adubação, principalmente, em potássio (BASTOS et al., 2014). Na formação de mudas, o citrumelo apresenta maiores dificuldades do que os outros porta-enxertos como o limão-cravo e a Cleópatra, mas bem menores do que as apresentadas pelo trifoliata. Sua importância no Brasil tem crescido, especialmente, em pomares irrigados. Possui sementes altamente poliembriônicas (94 % das sementes) e apresenta, em média, 2,0 embriões por sementes (GUERRA et al., 2012).

2.3 Tolerância à dessecação

A tolerância à dessecação pode ser definida como a habilidade do organismo de restabelecer as funções metabólicas normais ao ser reidratado, depois de ter passado por secagem em equilíbrio higroscópico com o ar. Esta característica é raramente observada em plantas adultas, sendo mais comum em grãos de pólen, esporos e sementes (ALPERT, 2000). Assim, sementes com esta

habilidade, em geral, são dispersas com baixo nível de atividade metabólica e preservam a viabilidade por longo período de tempo, até que as condições ambientais sejam favoráveis à germinação. Tal tolerância tem sido associada a múltiplos processos que vão desde a proteção contra a perda de água em diferentes níveis, durante a formação das sementes e durante a secagem, até mecanismos de reparo durante a reidratação (BERJAK; PAMMENTER, 2008; PAMMENTER; BERJAK, 1999). Cabe destacar a existência de um gradiente de tolerância à dessecação que varia entre sementes extremamente sensíveis a altamente tolerantes (BERJAK; PAMMENTER, 2008; FARRANT et al., 1996; SUN; LIANG, 2001; WALTERS, 2000).

Durante a formação das sementes, os embriões apresentam alto grau de umidade até a fase de acumulação de matéria seca. O decréscimo de umidade ocorre, lentamente, enquanto as sementes acumulam reservas, torna-se acelerado, quando as sementes perdem a conexão vascular com a planta mãe e prossegue até que as sementes atinjam o equilíbrio com a umidade relativa do ar (BEWLEY et al., 2013; MARCOS FILHO, 2005; WALTERS, 2000). A partir daí, sofrem variações acompanhando as alterações de umidade do ambiente (BEWLEY et al., 2013; WALTERS, 2000). Esta secagem drástica, ao final da maturação, acontece na maioria das sementes tolerantes à dessecação. Entretanto sementes produzidas em frutos carnosos não passam por esta fase final e, geralmente, atingem a maturidade com grau de umidade em torno de 40% com tendência à estabilidade (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Sementes produzidas, nestes tipos de frutos, podem ter tolerância à dessecação, como as sementes de melão (WELBAUM; BRADFORD, 1988), ou níveis diversos de sensibilidade, como as Rutaceae dos gêneros *Citrus* e *Poncirus* e seus híbridos (GRAVIER; CALIFANO; ZARITZKY, 2010; HOR et al., 2005; KHAN et al., 2003; KING; ROBERT, 1980; LAMBARDI et al., 2004; MAKEEN et al., 2007; MUMFORD; PANGGABEAN, 1982).

Durante a formação das sementes, o acúmulo de reservas insolúveis, bem como a síntese e acúmulo de moléculas protetoras, incluindo proteínas LEAs, proteínas de choque térmico e carboidratos específicos têm sido relacionados à aquisição de tolerância à dessecação. Eventos celulares como a redução de volume dos vacúolos, reações do citoesqueleto, conformação do DNA, da cromatina e arquitetura do núcleo desempenham um papel importante. Esta tolerância relaciona-se, também, à desdiferenciação intracelular e ao desligamento metabólico. Adicionalmente, pode-se citar o envolvimento de certas moléculas anfipáticas, formação de uma camada de oleosina em torno de corpos lipídicos e a síntese de ABA (DEHAHAIE et al., 2013; LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993; OLIVER; TUBA; MISHLER, 2000; PAMMENTER; BERJAK, 1999; TWEEDLE et al., 2003). Muitas sementes recalcitrantes, como as de *Inga vera*, não apresentam essas adaptações nas estruturas celulares, o que pode indicar que estas sementes não estão realmente maduras no momento da dispersão (BARBEDO; CENTENO; RIBEIRO, 2013; CACCERE et al., 2013). Se esta hipótese for verdadeira, conseguir manter as sementes recalcitrantes fisiologicamente ligadas à planta-mãe por mais tempo poderia aumentar a tolerância à dessecação dessas sementes (BARBEDO; CENTENO; RIBEIRO, 2013).

Sistemas antioxidantes eficientes têm sido considerados fundamentais para manutenção da viabilidade de células e de organismos que sofrem a ação deletéria de radicais livres durante a secagem. Tais sistemas de proteção também são essenciais durante a reidratação (BERJAK; PAMMENTER, 2013; PAMMENTER; BERJAK, 1999). O balanço entre a geração e remoção de radicais livres durante a secagem e o armazenamento relacionam-se à longevidade das sementes (BRANDÃO JÚNIOR et al., 2002).

A ausência ou a baixa proporção de oleosinas tem sido mais relacionada com os efeitos deletérios, em sementes ricas em óleo, durante a reidratação

(PAMMENTER; BERJAK, 1999), sendo mais importante em sementes com corpos lipídicos muito grandes, como as de nim indiano, *Azardichta indica* (BERJAK et al., 1995).

A tolerância à dessecação envolve a interação de inúmeros fatores que são controlados geneticamente. Os mecanismos são complementares e agem em sinergia (LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993). A ausência de qualquer um destes mecanismos pode determinar diferentes níveis de sensibilidade à dessecação. Por outro lado, a presença de apenas um destes mecanismos não tem sido suficiente para que as sementes apresentem tolerância (BERJAK; PAMMENTER, 2008; PAMMENTER; BERJAK, 1999).

2.4 Danos por secagem

As funções normais das células podem ser alteradas quando as sementes são submetidas a graus de umidades intermediários entre a hidratação completa e o limite de sobrevivência (BERJAK et al., 1990; LEPRINCE et al., 2000; LEPRINCE; BUITINK; HOEKSTRA, 1999; PAMMENTER et al., 1998; PAMMENTER; VERTUCI; BERJAK, 1991; PRITCHARD, 1991; WALTERS et al., 2001).

Durante a secagem, a perda de água das células acaba concentrando os solutos internos, provocando reações destrutivas em sementes sensíveis à dessecação, como a elevação do pH intracelular, a desnaturação de proteínas, alterações nas paredes celulares e a perda da integridade e da seletividade da membrana plasmática (KOSTER, 1991; NEDEVA; NIKOLOVA, 1997).

A dessecação em níveis críticos pode exercer impactos deletérios, na estrutura das células, no crescimento mitótico, nos fenômenos bioquímicos, na integridade do DNA, na síntese de proteínas, na estrutura das membranas e das organelas, na germinação, bem como na formação e desenvolvimento do

embrião (FARNSWORTH, 2001). Células com cromatina celular muito condensada também foram associadas com lesão por dessecação (SILVA et al., 2014; WESLEY-SMITH et al., 2001). Em embriões de sementes recalcitrantes, a secagem provocou aumento do grau de vacuolização em células meristemáticas (maior número de vacúolos e maior área ocupada). O maior grau de vacuolização se relacionou, positivamente também, com perda da viabilidade dos embriões (SERSHEN et al., 2016).

Alterações nas membranas celulares são, geralmente, os principais danos estruturais associadas à secagem (SENARATNA; MCSERSIE, 1986) e podem estar relacionados ao rearranjo fosfolipídico da plasmalema (STAEHELIN; CHAPMAN, 1987). Os danos podem ser irreversíveis e, conseqüentemente, as sementes sofrem redução do vigor, da germinação ou até perda da viabilidade (BEWLEY; BLACK, 1994).

Em sementes poliembriônicas de *Citrus* spp, verificou-se que a secagem pode provocar redução do número de plântulas germinadas por semente e aumento do número de plântulas originadas de embriões zigóticos (LAMBARDI et al., 2004; MAKEEN et al., 2006).

2.5 Taxa de secagem

Em sementes sensíveis à dessecação, inúmeros fatores podem afetar o comportamento fisiológico na secagem, como temperatura e taxa de secagem (KERMODE; FICH-SAVAGE, 2002; WESLEY-SMITH et al., 2001).

A taxa de secagem é um fator que pode afetar a resposta à dessecação, em sementes de espécies recalcitrantes (VARGHESE et al., 2011; WESLEY-SMITH et al., 2001), intermediárias (JOSÉ et al., 2011; MAGISTRALI et al., 2015; ROSA et al., 2005) e ortodoxas (HONG; LININGTON; ELLIS, 1996).

De forma geral, sementes e embriões sensíveis à secagem apresentam maiores taxas de sobrevivência, quando submetidos à secagem rápida, se comparados aos secados lentamente (PAMMENTER; BERJAK, 1999), o que poderia ser explicado pelo prosseguimento em direção à germinação, o qual aumentaria a sensibilidade à perda de água ou pelo acúmulo de compostos tóxicos do metabolismo degenerativo (WALTERS, 2015). Entretanto esse efeito tem sido menos pronunciado em sementes (FARRANT; BERJAK; PAMMENTER, 1985; LIANG; SUN, 2002; PAMMENTER et al., 1998; PRITCHARD, 1991; SUN; LIANG, 2001).

Em contraste, para algumas sementes, a secagem mais lenta foi menos danosa (MAGISTRALI et al., 2015; VARGHESE et al., 2011). Para outras, a velocidade de secagem não afetou os resultados (BERJAK; VERTUCCI; PAMMENTER, 1993; FARIA; LAMMEREN; HILHORST, 2004; FINCH-SAVAGE, 1992; PRITCHARD et al., 1995). As consequências da velocidade de secagem parecem ser dependentes da espécie (FARIA; LAMMEREN; HILHORST, 2004) e podem também variar com estado fenológico do fruto (SANTOS et al., 2014). Nesta direção, foi observado por Corbineau et al. (2000) que a secagem lenta é benéfica, para sementes ortodoxas imaturas, pois proporciona o tempo necessário para indução e operação de mecanismos de proteção.

2.6 Espécies reativas de oxigênio e enzimas antioxidantes

A dessecação das sementes pode gerar acúmulo de espécies reativas de oxigênio potencialmente nocivas, como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (BAILLY, 2004; BERJAK; PAMMENTER, 2008; ROACH et al., 2008, 2010). O estresse oxidativo ocorre como consequência de um desequilíbrio entre a produção de ROS e a atividade

das defesas antioxidantes (ARRUDA et al., 2013; GRATÃO et al., 2012; KIBINZA et al., 2011) e podem modificar e inativar proteínas, lipídios, carboidratos, DNA e RNA, induzir disfunções celulares e até mesmo a morte celular (GILL; TUTEJA, 2010; MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007; SCANDALIOS, 2005). Este estresse tem sido considerado a principal causa de injúrias em sementes dessecadas lentamente (BERJAK; PAMMENTER, 2008). Os danos por secagem, em sementes e eixos embrionários de sementes de *Antiaris toxicaria*, foram correlacionados com aumento da produção de superóxido, do conteúdo de peróxido de hidrogênio e declínio da atividade de enzimas do sistema antioxidante (CHENG; SONG, 2008).

Entretanto, além desses efeitos negativos, tem sido demonstrado que espécies reativas de oxigênio têm também função regulatória na germinação e na dormência primária em sementes, podendo desencadear eventos que culminam na germinação (LEYMARIE et al., 2011). Os metabolismos de ácido abscísico (ABA) e giberelinas parecem estar relacionados a vias de sinalização induzidas pelas espécies reativas de oxigênio (BAZIN et al., 2011; VENTURA et al., 2012).

A célula vegetal, assim como seus peroxissomos, cloroplastos e mitocôndria, contém múltiplos sistemas enzimáticos para a remoção das ROS (MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). Para controlar os danos celulares induzidos pela presença de ROS, há mecanismos de detoxificação nas sementes, incluindo os compostos por enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), monodeidroascorbato redutase (MDHAR) e deidroascorbato redutase (DHAR) (RAJJOU; DEBEAUJON, 2008). Há ainda numerosos compostos não enzimáticos com ação antioxidante, como α -tocoferol e ascorbato (BAILLY, 2004).

As SOD são grupos de enzimas que catalisam a reação de dismutação de radicais superóxidos livres (O_2^-) produzidos em diferentes locais das sementes,

para peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. O peróxido de hidrogênio é eliminado pela ação da CAT, a qual é capaz de decompô-lo em oxigênio molecular e água, sem produção de radicais livres. O ciclo arcobato-glutationa também degrada o peróxido de hidrogênio, envolvendo enzimas como APX, DHAR e redutase-glutationa (GR) (BAILLY, 2004).

Assim, as enzimas SOD e a CAT atuam como detoxificadores, antes que os danos ocorram, buscando neutralizar as espécies reativas de oxigênio (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A produção destas enzimas, durante a dessecação, pode variar com a espécie e também com a taxa de secagem (HUANG; SONG-QUAN; XIAN-JIN, 2009; NTULI et al., 2011; VARGHESE et al., 2011). Em eixos embrionários de *Trichilia dregeana*, uma espécie com sementes recalcitrantes, a perda de eficiência do sistema, durante a secagem lenta, foi mais evidente que na rápida (VARGHESE et al., 2011).

2.7 Comportamento quanto à secagem e armazenamento

As sementes que podem ser secadas até baixos conteúdos de água e armazenadas em baixas temperaturas são denominadas ortodoxas e aquelas com o comportamento oposto, recalcitrantes (ROBERTS, 1973). Estas últimas, particularmente as de origem tropical, são geralmente sensíveis à refrigeração e não podem ser armazenadas em temperaturas abaixo de 15°C (DUSSERT et al., 2006; HONG; LININGTON; ELLIS, 1996; PAMMENTER; BERJAK, 1999).

Uma terceira categoria, denominada intermediária, foi proposta por Ellis, Hong e Roberts (1990), para agrupamento de sementes com comportamento pós-colheita entre as duas categorias anteriores. Ou seja, são sementes relativamente tolerantes à dessecação, mas não suportam níveis tão baixos quanto aqueles que são tolerados pelas ortodoxas ou perdem a viabilidade

quando armazenadas em temperaturas abaixo de zero. Em geral, essas sementes intermediárias podem ser armazenadas apenas por períodos curtos e são sensíveis à refrigeração, mesmo quando dessecadas.

Assim, as sementes intermediárias exibem características das sementes ortodoxas e recalcitrantes (ROYAL BOTANIC GARDENS KEW, 2015), demonstrando que há variação nas respostas à perda de água, apesar de as categorias de armazenamento de sementes serem qualitativas. Pressupondo-se que a longevidade é uma manifestação da tolerância à dessecação, os limiares de conteúdo de água e o tempo para acumular o dano letal seriam os critérios de corte para definir a categoria de armazenamento das sementes (WALTERS, 2015).

Nessa perspectiva, as categorias de sementes podem ser explicadas, quantitativamente, pelas consequências da secagem (espaciais e temporais) nas células, que, por sua vez, relacionam-se com a mobilidade estrutural e molecular (WALTERS, 2015). Considerando que a tolerância à dessecação depende do estado vítreo formado na matriz celular, antes de uma perda crítica de volume de 50% (MERYMAN, 1974), Walters (2015) propôs um modelo composto por um eixo horizontal que representa a perda de volume celular e um eixo vertical que descreve os efeitos temporais da perda de água por mudanças de viscosidade. Tais mudanças estariam relacionadas ao relaxamento da estrutura vítrea e ocorrem lenta ou rapidamente, dependendo da força das interações moleculares e do volume vazio dentro das células.

Assim, as sementes intermediárias estariam localizadas próximas à interseção dos dois eixos e, após a secagem, apresentariam uma matriz celular no limiar do estado vítreo, que relaxaria rapidamente. Similarmente, a maior ou menor longevidade das sementes ortodoxas estaria relacionada às taxas de relaxamento do estado vítreo (WALTERS, 2015).

2.8 Sementes de citros

Os *citrus* e espécies relacionadas produzem frutos carnosos, do tipo hesperídio, sendo o endocarpo membranáceo e dividido em carpelos em que se localizam as sementes (DAVIES; ALBRIGO, 1994; SCHNEIDER, 1968). O desenvolvimento das sementes é lento, sendo necessários, aproximadamente, 300 dias após a antese para sua completa formação em *Citrus limon* (WALTERS, 2000).

As sementes são exalbuminosas (FROST, 1948) e têm elevado conteúdo lipídico que varia entre 21,8 e 41,9%, com predominância dos ácidos graxos insaturados (52,1 a 58,8%) sobre os saturados (HOR et al., 2005; REAZAI et al., 2014; WAHEED et al., 2009). Possuem um ou mais embriões envoltos por dois tegumentos. O externo é rígido e lenhoso de coloração branco-creme e escorregadio quando úmido pela mucilagem. O interno constitui-se de uma fina membrana, essencialmente formada do integumento interno do óvulo e dos tecidos adjacentes da nucela (QUEIROZ; BLUMER, 2005). A cor do tegumento interno varia com a espécie, de marrom a vermelho-púrpura, sendo a extremidade chalazal mais espessa e de coloração mais escura (DAVIES; ALBRIGO, 1994).

Como em outras sementes de dicotiledôneas, a radícula está geralmente na região micropilar e os cotilédones na extremidade chalazal (SCHNEIDER, 1968). Sementes com um embrião, usualmente, têm dois cotilédones similares. No entanto, quando há mais de um embrião, a forma e o tamanho dos cotilédones variam bastante, ocorrendo cotilédones assimétricos e, também, mais de dois cotilédones por embrião (FROST, 1926; MOREIRA; GURGEL; ARRUDA, 1947; RAJA, 2017).

A germinação é hipógea, lenta e frequentemente irregular (SOESTINA; KING; ROBERTS, 1985; USBERTI, 1979). A protrusão da raiz inicia-se entre 7

e 18 dias (COELHO et al., 2001; USBERTI, 1979) e pode ocorrer até em 60 dias (ROUSE et al., 1997). Em geral, sementes secas germinam mais lentamente que as úmidas (SOESTINA; KING; ROBERTS, 1985).

A germinação ocorre em temperaturas entre 9°C e 38°C, com limite inferior variável com a origem da espécie; faixa ótima entre 25°C e 35°C (DAVIES; ALBRIGO, 1994; SOESTINA; KING; ROBERTS, 1985).

De acordo com o levantamento bibliográfico feito pelo Royal Botanic Gardens Kew (2015), as sementes de *Citrus* spp e gêneros assemelhados são, em sua maioria, classificadas como intermediárias (71% das 24 espécies listadas). Mas há recalcitrantes (17%) e ortodoxas (12%). Porém raramente o comportamento pós-colheita está suficientemente claro, pois a sensibilidade à dessecação para estas espécies é controversa e as temperaturas para armazenamento são pouco investigadas. Os artigos existentes sobre o comportamento no armazenamento, como os de Carvalho et al. (2002a), Mumford e Panggabean (1982) e Usberti e Felipe (1980), não abordam todos os aspectos necessários para a classificação do seu comportamento fisiológico. Sementes de limão-cravo (*Citrus limonia*) toleraram a secagem até o grau de umidade de 6% (base úmida) e sobreviveram em armazenamento hermético por 32 meses a 4°C (USBERTI; FELIPPE, 1980). Contudo não há informação quanto à tolerância ao armazenamento em temperaturas abaixo de zero.

De forma geral, a sensibilidade à dessecação varia com a espécie (GRAVIER; CALIFANO; ZARITZKY, 2010; HONG; ELLIS, 1995; LAMBARDI et al., 2004; MUMFORD; PANGGABEAN, 1982). A conservação de sementes (secas ou úmidas) é melhor em temperaturas em torno de 5°C, pois o armazenamento à temperatura ambiente (18 a 25°C) não evita a perda de viabilidade (BACCHI, 1958; CARVALHO et al., 2002a; CARVALHO; SILVA, 2013; KOLLER et al., 1993). O comportamento em temperaturas abaixo de zero tem sido pouco pesquisado, porém há evidências de possibilidade de

conservação de sementes de *Citrus limon* por períodos superiores a 90 dias nestas temperaturas (MUMFORD; PANGGABEAN, 1982).

2.9 Ocorrência de poliembrionia e apomixia

A reprodução dos porta-enxertos não é exclusivamente sexuada, pois as sementes, além do embrião zigótico, possuem vários embriões apomíticos, sendo o número total de embriões variável entre um e quatorze (KISHORE et al., 2012). Esta ocorrência de mais de um embrião por semente é denominada poliembrionia (BEWLEY et al., 2013).

Em *Citrus* spp e gêneros relacionados, a forma de poliembrionia mais comum é a esporofítica, originando número variável de embriões por diferenciação de células da nucela e que são, portanto idênticos à planta-mãe. Esporadicamente podem ocorrer dois outros tipos: a) poliembrionia por clivagem, originada da bipartição de um embrião zigótico e b) poliembrionia causada pela ocorrência de mais de um gametófito normal no mesmo óvulo, gerando dois embriões distintos (ALEZA et al., 2010; BACCHI, 1944; CAMERON; FROST, 1968; CARUSO et al., 2014; FROST, 1926; KEPIRO; ROOSE, 2009; MEDINA FILHO et al., 1993).

Normalmente os embriões não zigóticos originam-se de células da nucela situadas na superfície do saco embrionário, onde crescem irregularmente e penetram no interior do saco embrionário, adquirindo, posteriormente, forma esférica com um pequeno pedúnculo, típico de embriões normais (STRASSBURGER, 1878 apud MOREIRA; GURGEL; ARRUDA, 1947).

Quanto mais elevada a taxa de poliembrionia de um porta-enxerto, maior a chance de germinarem embriões nucelares, garantindo a mesma constituição genética da planta-mãe e a homogeneidade dos pomares (PASSOS et al., 2006). Há diferenças significativas no número de embriões por semente e

na taxa de poliembriõnia entre porta-enxertos, inclusive, entre seleções dentro de uma mesma espécie e variedade (ALTAF et al., 2001; KISHORE et al., 2012; PASSOS et al., 2006). O número de embriões por sementes das cultivares poliembriônicas é determinado por vários fatores como a espécie polinizadora, o estado nutricional da planta e a disponibilidade hídrica, além do fator genético (SOARES FILHO et al., 2003).

O desenvolvimento dos embriões não é sincronizado. Em sementes maduras podem estar presentes embriões grandes e pequenos (KISHORE et al., 2012; MOREIRA; GURGEL; ARRUDA, 1947; RAJA, 2017), possivelmente, pela maior ou menor precocidade do desenvolvimento (MOREIRA; GURGEL; ARRUDA, 1947).

Por ocasião da germinação, nem todos os embriões germinam, ou porque não estão bem formados, ou porque não conseguem vencer a competição com os demais, ou ainda porque estão mal localizados (MOREIRA; GURGEL; ARRUDA, 1947; RAJA, 2017). A porcentagem média de embriões que se convertem em plântulas varia com a espécie e, frequentemente, está em torno de 50% (KISHORE et al., 2012).

2.10 Germinação de sementes de citros

A acurácia do método de avaliação da germinação é essencial para o sucesso do monitoramento da qualidade das sementes, durante o a secagem e armazenamento (SOESTINA; KING; ROBERTS, 1985) e tem se mostrado crítica para sementes dos gêneros *Citrus* e relacionados.

Um dos principais problemas da germinação de sementes cítricas é o fato de ela ocorrer de forma lenta e irregular, especialmente, em sementes que passaram por dessecação, fazendo com que o período de avaliação se estenda,

por mais três ou seis semanas, dependendo da temperatura (KING; ROBERTS, 1980; SOESTINA; KING; ROBERTS, 1985).

Testes de curta duração podem provocar erros (HONG; LININGTON; ELLIS, 1996; KING; SOESTINA; ROBERTS, 1981), pois a velocidade de germinação é mais lenta em sementes secas, exigindo maior período de incubação (KING; ROBERTS, 1980). Danos por embebição também resultam em aparente sensibilidade à dessecação, podem ocorrer em testes de laboratório (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990) e tendo sido constatados em sementes de *Citrus sushiensis* (MAKEEN et al., 2006).

De acordo com Soestina, King e Roberts (1985), testes de germinação confiáveis para sementes cítricas devem ser realizados em rolo de papel a 30°C, utilizando sementes intactas e ter duração de seis semanas. Ressalta-se, entretanto, que esta recomendação se baseou em experimentos conduzidos apenas com sementes de *Citrus limon* e *Citrus aurantifolia*. A temperatura de 30°C foi escolhida, porque, nesta temperatura, as sementes secas apresentaram germinação significativamente mais rápida que a 25°C e, além disso, possibilitou a germinação máxima, mesmo para sementes menos vigorosas. Esta é também uma temperatura ótima para sementes de *Citrus limonia* (USBERTI, 1979), *Poncirus trifoliata* (DOJODE, 2001) e três espécies silvestres do gênero *Citrus* existentes em regiões com distintos climas na Austrália (HAMILTON; ASHMORE; PRICHARD, 2009).

De uma forma geral, a faixa de temperatura ótima para germinação de sementes cítricas está em torno de 30°C, incluindo-se 25°C para muitas espécies (HAMILTON; ASHMORE; PRICHARD, 2009; SOESTINA; KING; ROBERTS, 1985; USBERTI, 1979). Assim, a maioria das pesquisas com estas sementes tem utilizado uma destas duas temperaturas para determinar a germinação em laboratório (CARVALHO et al., 2002a, 2002b; CARVALHO; SILVA, 2013; GRAVIER; CALIFANO; ZARITZKY, 2010; KOLLER et al.,

1993; MAKEEN et al., 2006; MARTINS, SILVA; LAGO, 2007; SILVA et al., 2011; USBERTI; FELIPE, 1980).

Foi constatado que as sementes de *C. limonia* são indiferentes à luz para germinar (USBERTI, 1979). Enquanto Soestina, King e Roberts (1985) não fizeram recomendações sobre a necessidade de luz para a germinação, nem informaram como conduziram os testes. Em pesquisas com diversas espécies de citros realizaram-se testes utilizando luz, porém bons resultados podem ser obtidos também na sua ausência (CARVALHO et al., 2002a, 2002b; CARVALHO; SILVA, 2013; GRAVIER; CALIFANO; ZARITZKY, 2010; KOLLER et al., 1993; MAKEEN et al., 2006; MARTINS; SILVA; LASO, 2007; SILVA et al., 2011; USBERTI; FELIPE, 1980). Assim, muito possivelmente, outras espécies de citros também não são fotoblásticas.

Em todos os experimentos conduzidos por Soestina, King e Roberts (1985), para propor um método para teste de germinação, o substrato de papel foi umedecido com quantidade de água igual a três vezes o peso deste substrato seco. Entretanto estes autores não mencionam ter realizado testes, para determinar a quantidade de água necessária e não foram localizadas pesquisas a este respeito na literatura consultada. Apesar da falta desta informação, em geral, nas pesquisas têm utilizado quantidade de água de 3,0 e 2,5 vezes o peso do papel para estimar a viabilidade de sementes a temperaturas de 30°C e 25°C, respectivamente (CARVALHO et al., 2002a, 2002b; CARVALHO; SILVA, 2013; GRAVIER; CALIFANO; ZARITZKY, 2010; KOLLER et al., 1993; MAKEEN et al., 2006; MARTINS; SILVA; LAGO, 2007; SILVA et al., 2011; USBERTI; FELIPE, 1980).

Tem sido mostrado que a retirada dos tegumentos pode acelerar a germinação destas sementes, reduzindo em uma semana o período de avaliação de sementes úmidas e, em até 2,5 semanas, para sementes secas (SOESTINA; KING; ROBERTS, 1985; ZUCARELI et al., 2009). Entretanto a remoção dos

tegumentos é uma atividade demorada e que pode causar danos aos embriões e não é, portanto uma técnica conveniente para análise de rotina da germinação (SOESTINA; KING; ROBERTS, 1985).

Quanto à classificação de plântulas como normais e anormais, a literatura relata a ocorrência de diversos tipos de defeitos de plântulas, como raízes retorcidas e plântulas albinas (LARANJEIRA et al., 2005; RYAN, 1958). Entretanto, nem nas regras para análise de sementes (BRASIL, 2009), nem nas regras para análise internacionais (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA, 2014), ou mesmo no manual de avaliação de plântulas (ISTA, 2013) estão estabelecidos critérios para classificação de plântulas para espécies dos gêneros *Citrus* e *Poncirus*. Não há também critérios para outras árvores ou arbustos com germinação hipógea (ISTA, 2013). O estabelecimento destes critérios é importante para padronizar as avaliações realizadas por diferentes analistas e laboratórios (BRASIL, 2009; ISTA, 2014). Para estas espécies arbóreas, utilizadas como porta-enxertos, os defeitos do sistema radicular devem ser especialmente caracterizados, pois a principal função destes porta-enxertos é ser suporte e absorver nutrientes do solo (DAVIES, ALBRIGO, 1994).

2.11 Validação de métodos para teste de germinação

Um teste de germinação em laboratório tem o objetivo de determinar o potencial máximo de germinação de um lote de sementes e, por isso, é realizado em condições controladas e que possibilitem a germinação de forma rápida e regular das sementes de uma espécie (BRASIL, 2009; ISTA, 2013). Estas condições, consideradas ótimas, devem ser adequadas para análise de qualquer lote de sementes, inclusive, lotes de qualidades distintas (alta, média e baixa) e gerar resultados robustos (BRANDÃO, 2013). Esta robustez indica que os

métodos podem ser reproduzidos, comparáveis dentro de um mesmo laboratório (repetitividade) e entre laboratórios (reprodutibilidade) e utilizados com segurança nas tomadas de decisão relacionadas ao controle de qualidade interno, comercialização e fiscalização da produção.

A validação é um processo para medir o desempenho de um método. O objetivo é confirmar se o método em estudo pode medir a qualidade das sementes com precisão, repetitividade e reprodutibilidade adequadas (ISTA, 2007). Repetitividade e reprodutibilidade são essenciais para averiguar se os métodos poderão ser repetidos pelos operadores laboratoriais (dentro de um mesmo laboratório) e reproduzidos em outros laboratórios, com baixa variabilidade (RENNIE; TOMLIN, 1984).

O processo deve ser desenvolvido em etapas: seleção e desenvolvimento do método, validação por meio de testes comparativos, revisão dos resultados dos testes comparativos e preparação de um relatório final (ISTA, 2007).

O objetivo da primeira etapa é conhecer as condições ótimas, para germinação das sementes destas espécies, nas quais o potencial máximo de germinação de um lote de sementes possa ser determinado em laboratório. O desenvolvimento do método pode ser realizado de várias formas. Pode envolver simplesmente adaptações de um método recomendado para outra espécie, quando a estrutura das sementes e as causas das diferenças na qualidade entre elas são semelhantes. Por outro lado, quando não há método recomendado para espécies similares, a concepção do método requer mais conhecimento e experiência dos analistas/pesquisadores.

Em ambos os casos, o processo se baseará nas características das sementes e nas causas das diferenças de qualidade. Em ambas as situações, a interação entre o desenvolvimento e a avaliação é contínua, até que o método seja considerado adequado (ISTA, 2007). Em virtude da recente constatação de que a ocorrência de fungos, durante os testes de germinação, pode ser a principal

causa dos problemas de repetitividade e reprodutibilidade, durante uma validação (BRANDÃO, 2013), o desenvolvimento e escolha do método devem considerar os fatores que afetam esta ocorrência.

Em uma segunda fase, o método escolhido é avaliado por ensaios interlaboratoriais com amostras com três níveis distintos de qualidade (ISTA, 2007). As análises estatísticas desta identificam e excluem os *outliers*, antes de verificar se o método foi capaz de distinguir entre os diferentes lotes e quantificar os valores de repetitividade e reprodutibilidade (BRANDÃO, 2013; ISTA, 2007; NOMELINI, 2012).

Na validação, para testes de germinação de sementes, a ISTA (2007) segue as normas da ISO 5725-2 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO, 1994) e quantifica a repetitividade e a reprodutibilidade por lote ou por amostra, correspondendo assim a um modelo de análise de variância de fator único, sendo este fator o laboratório (BRANDÃO, 2013). Essa análise é também recomendada, para programas interlaboratoriais, com o objetivo de estudar a variabilidade de laboratórios (CHUI; BISPO; IAMASHITA, 2004).

Cabe ressaltar, entretanto que, na validação de métodos para análise de germinação de sementes, a exigência do envio de amostras a vários laboratórios e de lotes com qualidades distintas caracteriza o modelo de análise de variância com dois fatores (BRANDÃO, 2013). Neste enfoque, são pré-requisitos: efeito significativo para lotes e não ocorrência de interação significativa entre os fatores lotes e laboratórios.

O controle estatístico de processos, proposto por Hicks (1973), utiliza esta análise de variância com dois fatores. Isso permite calcular a variabilidade de um sistema e dá origem ao estudo de Repetitividade & Reprodutibilidade - R&R (PEDOTT, 2010). A avaliação de R&R detecta a influência reprodutibilidade (variação entre laboratórios) e repetitividade (variação dentro

de um laboratório) sobre uma série de medições (AUTOMOTIVE INDUSTRY ACTION GROUP - AIAG, 2002).

Estimativas de repetitividade e reprodutibilidade pela análise de variância com dois fatores são utilizadas em processo de validação de métodos bioanalíticos (LOURENÇO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2008; PEIXOTO-SOBRINHO et al., 2008; WORTMANN, 2004) e analíticos (FONSECA et al., 2004; GOUVEIA et al., 2009; PASCHOAL et al., 2008; RIBANI et al., 2004) e que seguem as orientações descritas na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2012). Foram também utilizadas por Brandão (2013) para avaliar metodologias para análise de sementes.

Em tais processos, um dos desafios é a classificação da reprodutibilidade e repetitividade obtidas nos ensaios interlaboratoriais como aceitáveis ou não, pois a ISTA (2007) não se posicionou sobre esta questão. Por esta razão, Brandão (2013), baseando-se nos resultados de validação de métodos de cinquenta espécies florestais brasileiras, propôs critérios para classificação dos coeficientes de variação de repetitividade e reprodutibilidade, calculados a partir do desvio padrão obtido, de acordo com a ISTA (2007) ou do coeficiente de variação de R&R. Nesta recomendação, esses coeficientes são classificados em ótimos, bons, regular e ruim, conforme a germinação média dos lotes utilizados e o valor do coeficiente. Metodologias consideradas validadas apresentaram coeficiente de variação de R&R ótimo ou bom.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este trabalho é composto por três artigos que tratam do comportamento das sementes de tangerina Cleópatra (*C. resnhi*) quanto à tolerância à dessecação (Artigo 1), durante (Artigo 2) a secagem e armazenamento e quanto às condições ótimas para germinação em laboratório deste e de mais três porta-enxertos de citros utilizados no Brasil (Artigo 3). Com estes artigos, pretendeu-se esclarecer as controvérsias existentes na literatura, em relação ao comportamento fisiológico das sementes dessa espécie e desenvolver e validar métodos, para testes de germinação para análise de sementes de *C. resnhi*, *C. limonia*, *Poncirus trifoliata* e (*Citrus paradisi* x *P. trifoliata*), por meio de ensaios interlaboratoriais, pois a ausência de métodos confiáveis é um dos entraves para desenvolver protocolos eficazes para armazenamento destas sementes.

No primeiro artigo, estudou-se a tolerância à dessecação e a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase de sementes de tangerina Cleópatra, utilizando-se duas velocidades de secagem. Concluiu-se que, independente da taxa de secagem, as sementes foram tolerantes à dessecação, pois mantiveram alta percentagem de plântulas normais, mesmo quando o conteúdo de água das sementes foi reduzido até 3%. Entretanto a secagem rápida foi ligeiramente mais vantajosa. As atividades das enzimas SOD e CAT em sementes secas não se mostram bons indicadores, para monitorar o efeito da secagem, embora possam ajudar a entender a natureza do estresse que ocorre durante a secagem e influenciar o comportamento dessas sementes durante o armazenamento.

O segundo artigo trata da secagem e armazenamento de *C. resnhi* em diversos conteúdos de água. Confirmou-se que essas sementes são tolerantes à dessecação, ou seja, não são recalcitrantes, pois mostraram percentagem de

plântulas normais (84%) próxima à da sementes recém-colhidas. Constatou-se, ainda, que o armazenamento a $6 \pm 2^\circ\text{C}$ por três meses é adequado, para manter a germinação de sementes com conteúdos de água entre 36,9 e 5,5% próxima ao das sementes recém-colhidas e as sementes não dessecadas (36,9%) se mostraram mais vigorosas, pois a germinação ocorreu em menor tempo médio e maior sincronia e foram observados mais embriões vigorosos do que antes do armazenamento. Entretanto sementes com conteúdo de água de 5,5% apresentaram pequeno decréscimo na germinação e, adicionalmente, houve redução da germinação inicial em 50% e menores índices de poliembrião em sementes com 5,5% de conteúdo de água armazenadas a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$, indicando que o comportamento das sementes de *C. reshni* é mais próximo das sementes intermediárias.

O objetivo do terceiro artigo foi conhecer as condições ótimas para germinação das sementes dos porta-enxertos tangerina Cleópatra (*Citrus reshni* Hort ex. Tanaka), limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck), citrumelo (*Citrus paradisi* Macfadyen x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf) e trifoliata (*Poncirus trifoliata* [L] Raf.), com o propósito de desenvolver e validar métodos para teste de germinação em laboratório. Constatou-se que estas sementes apresentam germinação do tipo criptocotiledonar hipogeal e germinam em presença ou ausência de luz. Concluiu-se, também, que as temperaturas de 25 e 30°C podem ser utilizadas, para testes de germinação de sementes de Cleópatra, citrumelo, limão-cravo com resultados equivalentes e a temperatura mais alta reduziu o tempo de duração do teste de limão-cravo de 35 dias para 28 dias. Além disso, substratos muito úmidos (quantidade de água 3,0 e 2,5 vezes o peso do papel) podem provocar mortalidade de sementes e aumentar o tempo médio de germinação. A metodologia proposta para os testes de germinação de sementes de porta-enxertos de limão-cravo apresentou bons coeficientes de variação de

repetitividade, de reprodutibilidade e ótimo coeficiente de variação de R&R, preenchendo os requisitos necessários para inclusão nas regras para análise.

Ao final destas pesquisas, conclui-se que as sementes de *Citrus reshni* não são recalcitrantes, dado que a secagem não afeta imediatamente a germinação destas sementes. Entretanto será necessário estudar o comportamento, durante o armazenamento, por período maior que os três meses recomendado por Hong e Ellis (1996), para confirmar a perda de viabilidade destas sementes, quando armazenadas em temperaturas próximas a -20°C e, por consequência, sua classificação fisiológica como intermediária. Um tempo maior de armazenamento, também, poderá esclarecer qual a melhor umidade para conservação destas sementes em câmara fria, sendo indicado testar conjuntamente o uso de fungicidas. Verificou-se, assim que, embora o protocolo proposto por Hong e Ellis (1986) seja útil e vantajoso por ser relativamente rápido (armazenamento por apenas três meses), apresenta limitações, inclusive, relacionadas a esta vantagem. Além disso, a classificação em uma das três categorias de armazenamento é importante, para gestão de bancos de germoplasma, mas não abarca necessariamente toda a diversidade de comportamentos fisiológicos existentes nas espécies e ecótipos de sementes existentes na natureza e, conforme ressaltado por Walters (2015), não considera o amplo espectro de respostas das sementes ao estresse da dessecação e a sobrevivência em condições anidras. Neste contexto, a redução da germinação de sementes mais secas (5,5% b.u.), durante o armazenamento, poderia ser interpretada como uma manifestação da tolerância ao longo do tempo ou como um fenômeno diferenciado. Sugere-se que as sementes de *C. reshni* sejam utilizadas em futuros experimentos para testar estas hipóteses.

É importante ressaltar, também, que a metodologia utilizada, para determinar a germinação das sementes de *C. reshni* nos artigos 1 e 2, especialmente, a opção de usar substrato mais seco que o normal (1,7 vez o peso

do substrato) mostrou-se apropriada, dado que os coeficientes de variação para a variável porcentagem de plântulas normais foram baixos ($< 12\%$), em todos os experimentos conduzidos, para estudar o comportamento das sementes, durante a secagem e armazenamento. Isso confirma resultados de pré-testes e é coerente com a constatação relatada no artigo 3 de que substratos muito úmidos (quantidade de água maiores que 72% da capacidade de retenção) não são adequados, visto que podem provocar mortalidade de sementes, além de aumentar o tempo médio de germinação. Recomenda-se, ainda, que seja realizado, juntamente com o teste de germinação, o monitoramento da viabilidade e vigor dos embriões, pois, como ocorreu no experimento apresentado no segundo artigo, esta técnica pode proporcionar conhecimento abrangente do efeito da secagem e armazenamento nessas sementes. Da mesma forma, foram muito úteis, também, as medidas indiretas de poliembrião, tempo e uniformidade de germinação.

Com relação às enzimas do sistema antioxidante durante a secagem, recomenda-se que, em futuros experimentos, o monitoramento da atividade destas enzimas seja realizado também em sementes nas fases 1 e 2 da germinação. A eficiência do sistema antioxidante durante a reidratação é importante e, talvez, mais determinante nestas fases. O acompanhamento da produção de espécies reativas de oxigênio e de outras enzimas com ação antioxidante também pode amparar conclusões mais acertadas. Para complementar, o uso de inibidores da ação de enzimas, a exemplo do amino-triazol, que inibi a catalase, também possibilitaria melhor entendimento do funcionamento do sistema antioxidante durante os processos de secagem e armazenamento.

REFERÊNCIAS

- ALEZA, P. et al. Polyembryony in non-apomitic citrus genotypes. **Annals of Botany**, London, v. 106, p. 533-545, July 2010.
- ALPERT, P. The discovery, scope, and puzzle of desiccation tolerance in plants. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 151, n. 1, p. 5-17, Nov. 2000.
- ALTAF, N. et al. Nucellar regeneration and polyembryony of citrus cultivars. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 33, p. 211-215, 2001.
- ARRUDA, S. et al. Comparative studies focusing on transgenic through cp4EPSPS gene and non-transgenic soybean plants: an analysis of protein species and enzymes. **Journal of Proteomics**, New York, v. 93, p. 107-116, 2013.
- AUTOMOTIVE INDUSTRY ACTION GROUP. **Measurement systems analysis reference manual**. 3rd ed. Southfield: Chrysler Corporation, 2002. 239 p.
- BACCHI, O. Estudos sobre a conservação de sementes: II., citros. **Bragantia**, Campinas, v. 17, n. 11, p. 157-166, 1958.
- BACCHI, O. Observações citológicas em Citrus: III., megasporogênese, fertilização e poliembryonia. **Bragantia**, Campinas, v. 4, n. 7, p. 405-412, 1944.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, p. 93-107, 2004.
- BARBEDO, C. J.; CENTENO, D. C.; RIBEIRO, R. C. F. R. Do recalcitrance seeds really exist? **Hoehnea**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 583-593, 2013.
- BASTOS, D. C. et al. Cultivares copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 35, n. 281, p. 36-45, jul./ago. 2014.
- BAZIN, J. et al. Targeted mRNA oxidation regulates sunflower seed dormancy alleviation during dry after-ripening. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 6, p. 2196-208, June 2011.

BERJAK, P. et al. Recalcitrant (homohydrous) seeds: the enigma of their desiccation sensitivity. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 18, n. 3, p. 297-310, Dec. 1990.

BERJAK, P. et al. Responses of seeds of *Azardichta indica* (neem) to short-term under ambient or chilled conditions. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 23, p. 779-792, 1995.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, Oxford, v. 109, p. 213-228, 2008.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, p. 1-9, Nov. 2013.

BERJAK, P.; VERTUCCI, C. W.; PAMMENTER, N. W. Effect of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation-sensitivity in recalcitrant seeds of *Camellia sinensis*. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 2, p. 155-166, 1993.

BEWLEY, J. D.; BLACY, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2nd ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.

BEWLEY, J. D. et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3rd ed. New York: Springer, 2013. 376 p.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, Oxford, v. 91, p. 179-194, 2003.

BRANDÃO, N. A. L. **Repetitividade e reprodutibilidade na validação de métodos para testes de germinação de sementes de espécies florestais**. 2013. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

BRANDÃO JUNIOR, D. S. et al. Tolerância à dessecação de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 17-23, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, DF: Ministro de Estado da Saúde, 2012. 23 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de sementes**. Brasília, DF, 2009. 399 p.

CACCERE, R. et al. Metabolic and structural changes during early maturation of *Inga vera* seeds are consistent with the lack of desiccation phase. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 170, n. 9, p. 791-800, 2013.

CAMERON, J. W.; FROST, M. B. Genetics, breeding and nuclear embryony. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry: anatomy, physiology, genetics and reproduction**. Berkeley: University of California Press, 1968. v. 2, p. 325-370.

CARUSO, M. et al. High-resolution melting analysis for early identification of citrus hybrids: a reliable tool to overcome the limitations of morphological markers and assist rootstock breeding. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 180, p. 199-206, Dec. 2014.

CARVALHO, J. A. et al. Qualidade de sementes de limão-cravo (*Citrus limonia* Oesbeck) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 286-298, 2002a.

CARVALHO, J. A. et al. Testes rápidos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de citrumelo Swingle. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 263-270, 2002b.

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

CARVALHO, S. A.; SILVA, L. F. C. Monitoring the viability of Citrus rootstocks seeds stored under refrigeration. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 1, p. 238-245, mar. 2013.

CHEN, C. et al. Origin and frequency of 2n gametes in *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata* and their reciprocal crosses. **Plant Science**, Shannon, v. 174, p. 1-8, Jan. 2008.

CHENG, H. Y.; SONG, S. Q. Possible involvement of reactive oxygen species scavenging enzymes in desiccation sensibility of *Antiaris toxicaria* seeds and axes. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 50, p. 1549-1556, 2008.

CHUI, Q. S. H.; BISPO, J. M. A.; IAMASHITA, C. O. O papel dos programas interlaboratoriais para a qualidade dos resultados analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 993-1003, 2004.

CITRUSBR. **Produção de laranja e suco**. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/exportadores-citricos/setor/producao-192415-1.asp>>. Acesso em: 1 maio 2013.

COELHO, R. I. et al. Caracterização morfológica da planta, frutos, sementes e plântulas de tangerina (*Citrus reticulata* L.) de ocorrência natural no sul do estado do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 294-301, 2001.

CORBINEAU, F. et al. Effects of dehydration conditions on desiccation tolerance of developing pea seed as related to oligosaccharide content and cell membrane properties. **Seed Science Research**, Zurich, v. 10, p. 329-339, 2000.

DAVIES, F. S.; ALBRIGO, L. G. **Citrus**. Wallingford: CAB, 1994. 254 p.

DEHAHAIE, J. et al. LEA polypeptide profiling of recalcitrant and orthodox legume seeds reveals AB13-regulated LEA protein abundance linked to desiccation tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, p. 4559-4573, 2013.

DOIJODE, S. D. Tropical and subtropical fruits: citrus fruits (*Citrus* spp.). In: _____. **Seed storage of horticultural crops**. New York: Haworth Press, 2001. p. 23-40.

DUARTE, F. E. V. de O. et al. Poliembrião e atributos morfológicos de sementes de porta-enxertos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 1, p. 246-254, mar. 2013.

DUSSERT, S. et al. Oxidative stress, phospholipid loss and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seed. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 127, p. 192-204, 2006.

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

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

FARNSWORTH, E. The ecology and physiology of viviparous and recalcitrant seeds. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 31, p. 835-848, 2001.

FARRANT, J. M.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. The effect of drying rate on viability retention of recalcitrant propagules of *Avicena marina*. **South African Journal of Botany**, Johannesburg, v. 51, p. 32-43, 1985.

FARRANT, J. M. et al. Presence of dehydrin-like proteins and levels of abscisic acid in recalcitrant (desiccation sensitive) seeds may be related to habitat. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 6, n. 4, p. 175-182, 1996.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Carlos do Pinhal, v. 43, p. 61-68, 1997.

FINCH-SAVAGE, W. E. Embryo water status and survival in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: evidence for a critical moisture content. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, p. 663-669, 1992.

FONSECA, S. G. C. et al. Validação de metodologia analítica para doseamento de soluções de Lapachol por CLAE. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 157-159, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATION. **Citrus fruit fresh and processed statistical bulletin 2016**. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i8092e.pdf>>. Acesso em: 8 ago. 2017.

FROST, H. B. Polyembryony, heterozygosis and chimeras in *Citrus*. **Hilgardia**, Berkeley, v. 1, p. 365-402, 1926.

FROST, H. B. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1948. v. 2, p. 290-324.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and Biochemistry: PPB/Société Française de Physiologie Végétale**, Paris, v. 48, n. 12, p. 909-30, Dec. 2010.

GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GRATÃO, P. L. et al. Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 56, p. 79-96, 2012.

GRAVIER, N.; CALIFANO, A.; ZARITZKY, N. Partial dehydration and cryopreservation of *Citrus* seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 91, p. 2544-2550, May 2010.

GUERRA, D. et al. Caracterização morfológica, determinação do número de embriões e taxa de poliembrião em três porta-enxertos híbridos de citros. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 2, p. 196-201, 2012.

HAMILTON, K. M.; ASHMORE, S. E.; PRICHARD, H. W. Thermal analysis and dryopreservation of seeds of Australian wild *Citrus* species (Rutaceae): *Citrus australasica*, *C. inodora* and *C. garrawayi*. **CryoLetters**, Lewes, v. 30, p. 268-279, 2009.

HICKS, C. R. **Fundamental in the design of experiment**. 2nd ed. New York: Holt, Rinehart and Winston, 1973. 349 p.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Interspecific variation in seed storage behavior within two genera: *Coffea* and *Citrus*. **Seed Science Technology**, Zurich, v. 23, p. 165-181, 1995.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behavior**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996.

HONG, T. D.; LININGTON, S.; ELLIS, R. H. **Compendium of information on seed storage behavior**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 106 p.

HOR, Y. L. et al. Optimal hydration status for cryopreservation of intermediate oily seed: citrus as a case study. **Annals of Botany**, Oxford, n. 95, p. 1153-1161, June 2005.

HUANG, H.; SONG-QUAN, S.; XIAN-JIN, W. Response of chinese wampee axes and maize embryos to dehydration at different rates. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 51, n. 1, p. 67-74, 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 5725-2**: accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results, part 2: basic method for determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. Geneva, 1994. 42 p.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Handbook of seedling evaluation**. 3rd ed. Bassersdorf, 2013. 276 p.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **International rules for seed testing**. Bassersdorf, 2014.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Method validation for seed testing**. Bassersdorf, 2007. 70 p.

JOSÉ, A. C. et al. Effects of drying rate and storage time on *Magnolia ovata* Spreng.: seed viability. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 39, n. 2, p. 425-434, July 2011.

KEPIRO, J.; ROOSE, M. AFLP markers closely linked to major gene essential for nuclear embryony (apomixes) in *Citrusmaxima* x *Poncirus trifoliata*. **Tree Genetic & Genomes**, Berlin, v. 6, n. 1, p. 1-11, Jan. 2009.

KERMODE, A. R.; FICH-SAVAGE, B. E. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrance seeds in relation to development. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Ed.). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. London: CABI, 2002. p. 149-184.

KHAN, M. M. et al. Studies on seed desiccation tolerance in four *Citrus* species. **Pakistan Journal Agricultural Science**, Faisalabad, v. 40, n. 1/2, p. 55-62, 2003.

KIBINZA, S. et al. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology**, Shannon, v. 181, n. 3, p. 309-15, Sept. 2011.

KING, M. W.; ROBERTS, E. H. The desiccation response of seeds of *Citrus limon* L. **Annals of Botany**, Oxford, v. 45, p. 489-492, 1980.

KISHORE, K. et al. Polyembryony and seedling emergence traits in apomictic citrus. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 138, p. 101-107, 2012.

KOLLER, O. L. et al. Efeito da umidade da semente, da temperatura de estocagem e da duração de estocagem sobre a germinação de *Poncirus trifoliata* e de outros porta-enxertos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 15, n. 1, p. 27-33, 1993.

KOSTER, K. L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 88, n. 1, p. 302-304, May 1991.

LAMBARDI, M. et al. Zygotic and nucellar embryo survival following dehydration/cryopreservation of *Citrus* intact seeds. **CryoLetter**, London, v. 25, p. 81-90, 2004.

LARANJEIRA, F. F. et al. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D. et al. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC/FUNDAG, 2005. cap. 18, p. 508-566.

LEPRINCE, O.; BUITINK, J.; HOEKSTRA, F. A. Axes and cotyledons of recalcitrant seeds of *Castaneasativa* Mill. exhibit contrasting responses of respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 338, p. 1515-1524, Sept. 1999.

LEPRINCE, O. et al. Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 122, n. 2, p. 597-608, Feb. 2000.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanism of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 4, p. 231-246, Dec. 1993.

LEYMARIE, J. et al. Role of reactive oxygen species in the regulation of *Arabidopsis* seed dormancy. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v. 53, p. 96-106, 2011.

LIANG, Y.; SUN, W. Q. Rate of dehydration and cumulative desiccation stress interacted to modulate desiccation tolerance of recalcitrant cocoa and ginkgo embryonic tissues. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 128, n. 4, p. 1323-1331, Apr. 2002.

LIMA, J. E. O. de. Novas técnicas de produção de mudas cítricas. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 7, n. 2 p. 463-468, 1986.

LOURENÇO, F. R. et al. Validação de método de doseamento para aciclovir e aplicação em estudo de equivalência farmacêutica de creme contendo aciclovir. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 30, n. 3, p. 273-276, 2009.

MAGISTRALI, P. R. et al. Slow drying outperforms rapid drying in augmenting the desiccation tolerance of *Genipa americana* seeds. **Seed Science Technology**, Zurich, v. 43, p. 101-110, 2015.

MAKEEN, A. M. et al. The influence of desiccation and rehydration on survival of polyembryonic seed of *Citrus suhuiensis* cv. Limau madu. **Science Horticulturae**, Amsterdam, v. 58, p. 1463-1170, 2007.

MAKEEN, A. M. et al. Seed moisture characteristics in relation to total lipid content of five *Citrus* taxa using an equilibrium dehydration protocol. **Seed Science Technology**, Zurich, v. 34, p. 453-464, 2006.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Ed. FEALQ, 2005. 459 p.

MARTINS, L.; SILVA, W. R. Comportamento fisiológico de sementes de tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) submetidas à desidratação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 8-10, abr. 2006.

MARTINS, L.; SILVA, W. R.; LAGO, A. A. Conservação de sementes de tangerina 'Cleopátra': teor de água e temperatura do ambiente. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 178-185, abr. 2007.

MEDINA-FILHO, H. P. et al. Genetic proof of the occurrence of mono and dizygotic hybrid twin in citrus rootstocks. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 3, p. 703-711, set. 1993.

MERYMAN, H. T. Freezing injury and its prevention in living cells. **Annual Review Biophysics and Bioengineering**, Palo Alto, v. 3, p. 341-363, 1974.

MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 459-481, 2007.

MOREIRA, S.; GURGEL, J. T. A.; ARRUDA, L. F. de. Poliembriõnia em *citrus*. **Bragantia**, Campinas, v. 7, 1947. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/brag/v7n3/02.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2016.

MUMFORD, P. M.; PANGGABEAN, G. A comparison of the effects of dry storage on seeds of *Citrus* species. **Seed Science and Technology**, Zurich, n. 10, p. 257-266, 1982.

NEDEVA, D.; NILOLOVA, A. Desiccation tolerance in developing seeds. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sofia, v. 23, n. 3/4, p. 100-113, 1997.

NOMELINI, Q. S. S. **Enfoque estatístico na validação de métodos para teste de germinação de sementes florestais**. 2012. 171 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

NTULI, T. M. et al. Increased drying rate lowers the critical water content for survival in embryonic axes of English oak (*Quercus robur* L.) seeds. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 53, n. 4, p. 270-280, 2011.

OLIVEIRA, L. S. et al. Validação e reprodutibilidade de plataforma de salto com laser para altura do salto em voleibolistas. **Conexões: Educação, Esporte, Lazer**, Campinas, v. 6, p. 111-121, 2008. Edição especial.

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; RADMANN, E. B. Procedimentos para o armazenamento de sementes de *Poncirus trifoliata* (L) Raf. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 461-463, dez. 2003.

OLIVER, M. J.; TUBA, Z.; MISHLER, B. D. The evolution the vegetative desiccation tolerance in land plants. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 151, n. 1, p. 85-100, Nov. 2000.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Review of recalcitrance seed physiology in relation to desiccation tolerance mechanism. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 1, p. 13-37, Jan. 1999.

PAMMENTER, N. W. et al. Effects of differential drying rates on viability retention of recalcitrant seeds of *Ekebergia capensis*. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, n. 4, p. 463-471, Dec. 1998.

PAMMENTER, N. W.; VERTUCCI, C. W.; BERJAK, P. Homeohydrous (recalcitrant) seeds: dehydration, the state of water and viability characteristics in *Landolphia kirkii*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 96, n. 4, p. 1093-1098, Aug. 1991.

PASCHOAL, J. A. R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PASSOS, O. S. et al. Caracterização de híbridos de *Poncirus trifoliata* e outros porta-enxertos de citros no Estado da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 410-413, dez. 2006.

PEDOTT, A. H. **Análise de dados funcionais aplicada ao estudo de repetitividade e reprodutibilidade**: ANOVA das distâncias. 2010. 131 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de produção)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. da S. et al. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 683-689, dez. 2008.

PETRY, B. H. et al. Porta-enxertos influenciam o desempenho produtivo de laranjeiras-de-umbigo submetidas a poda drástica. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 45, p. 449-455, out./dez. 2015.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D. et al. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; FUNDAG, 2005. p. 63-104.

PRITCHARD, H. W. Water potential and embryonic axis viability in recalcitrant seeds of *Quercus rubra*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 67, n. 1, p. 43-49, Jan. 1991.

PRITCHARD, H. W. et al. A comparative study of seed viability in *Inga* species: desiccation tolerance in relation to the physical characteristics and chemical composition of the embryo. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 23, p. 85-100, 1995.

QUEIROZ, R. B. V.; BLUMER, S. Morfologia dos *citrus*. In: MATTOS JUNIOR, D. et al. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC/FUNDAG, 2005. cap. 5, p. 105-123.

RAJA, K. Polymorphism influences seed viability and vigour in polyembryonic Kaffir lime (*Citrus hystrix*) seeds. **Seed Science Technology**, Zurich, v. 45, p. 189-197, 2017.

RAJJOU, L.; DEBEAUJON, I. Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 331, p. 796-805, 2008.

REAZAI, M. et al. Physicochemical characteristics of citrus seed oils from Kerman, Iran. **Journal of Lipids**, London, v. 2014, p. 1-3, 2014.

RENNIE, W. J.; TOMLIN, M. N. Repeatability, reproducibility and interrelationship of results of tests on wheat seed samples infected with *Septoria nodorum*. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 12, n. 3, p. 863-880, 1984.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROACH, T. et al. An oxidative burst of superoxide in embryonic axes of recalcitrant sweet chestnut seeds as induced by excision and desiccation. **Physiology Plant**, Bethesda, v. 133, p. 131-139, 2008.

ROACH, T. et al. Extracellular superoxide production, viability and redox poise in response to desiccation in recalcitrant *Castanea sativa* seeds. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 33, p. 59-75, 2010.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 4, p. 499-514, 1973.

ROSA, S. D. V. F. da et al. Effects of different drying rates on the physiological quality of *Coffea canephora* Pierre seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 2, p. 199-205, 2005.

ROUSE, R. E. et al. Optimum temperatures for germinating *citrus* seeds. **Proceedings of the Internacional of the Interamerican Society for Tropical Horticulture**, San Jose, v. 41, p. 136-139, 1997.

ROYAL BOTANIC GARDENS KEW. **Seed Information Database (SID)**. Version 7.1. Disponível em: <[http:// data.kew.org/sid](http://data.kew.org/sid)>. Acesso em: 11 abr. 2015.

RYAN, G. F. Albinism in citrus seedlings. **California Agriculture**, Oakland, v. 43, p. 293-295, Mar. 1958.

SAIPARI, E.; GOSWAMI, A. M.; DADLANI, M. Effect of seed drying on germination behaviour in *Citrus*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, n. 73, p. 185-190, 1998.

SANTOS, F. C. et al. Desiccation sensitivity from different coffee seed phenological stages. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 25-31, 2014.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defences. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A. L. D. Porta-enxertos utilizados na citricultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 723-733, 2001.

SCHNEIDER, H. The anatomy of *Citrus*. In: REUTHER, W. (Ed.). **Anatomy, physiology, genetics and reproduction**. Berkeley: University of California Press, 1968. v. 2, p. 1-23.

SENARATNA, T.; MCKERSIE, B. D. Loss of desiccation tolerance during seed germination: a free radical mechanism of injury. In: LEOPOLD, A. C. (Ed.). **Membranes, metabolism and dry organisms**. Ithaca: Cornell University Press, 1986. p. 85-101.

SERSHEN, N. et al. The use of plant stress biomarkers in assessing the effects of desiccation in zygotic embryos from recalcitrant seed: challenges and considerations. **Plant Biology**, New York, v. 18, p. 1-12, 2016.

SILVA, M. S. et al. Viability and cellcycle of *Melanoxylonbrauna* seeds submitted to drying and imbibition. **Journal of Seed Science**, Zurich, v. 36, n. 2, p. 162-167, 2014.

SILVA, T. T. de A. et al. Storage of 'Swingle' citrumelo seeds in different maturation stages subjected to fungicide treatment. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 770-778, 2011.

SOARES FILHO, W. S. et al. Maravilha: uma nova seleção de tangerina 'Sunki'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 245, n. 2, p. 268-271, 2003.

- SOESTINA, U.; KING, M. W.; ROBERTS, E. H. Germination test recommendations for estimating the viability of moist or dry seeds of lemon (*Citrus limon*) and lime (*C. aurantifolia*). **Seed Science Technology**, Zurich, n. 13, p. 87-110, 1985.
- STAEHELIN, L. A.; CHAPMAN, R. L. Secretion and membrane recycling in plant cells. **Planta**, Berlin, v. 171, p. 43-57, 1987.
- SUN, W. Q.; LIANG, Y. Discrete levels of desiccation sensitivity in various seeds as determined by equilibrium dehydration method. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 11, p. 317-323, 2001.
- TEÓFILO SOBRINHO, J. Propagação de citros. In: RODRÍGUEZ, O. et al. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1, p. 281-301.
- TWEEDLE, J. C. et al. Ecology of seed desiccation sensibility. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 91, n. 6, p. 294-324, Dec. 2003.
- USBERTI, R. **Estudo da germinação de sementes de limão-cravo (*Citrusreticulata* var. *Austera* Hib. Swingle): condições de umidade e armazenamento e relações hormonais**. 1979. 70 p. Dissertação (Mestrado em Biologia)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1979.
- USBERTI, R.; FELIPE, G. M. Viabilidade de sementes de *Citruslimonia* Osb. com baixo teor de umidade, armazenadas em diferentes temperaturas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 15, p. 393-397, 1980.
- VARGHESE, B. et al. Differential drying rates of recalcitrant *Trichiliadregæana* embryonic axes: a study of survival and oxidative stress metabolism. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 142, n. 4, p. 326-338, Apr. 2011.
- VENTURA, L. et al. Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 60, p. 196-206, 2012.
- VILLEGAS-MONTER, A.; ANDRADE-RODRÍGUEZ, M. A. Secado y almacenamiento de semillas de mandarina 'Cleopatra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 40, n. 1, p. 79-80, jan. 2005.
- WAHEED, A. et al. Fatty acid composition of neutral lipid: classes of citrus seed oil. **Journal of Saudi Chemical Society**, Riade, v. 13, n. 3, p. 269-272, 2009.

WALTERS, C. Level of recalcitrance in seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia**, Londrina, v. 12, p. 7-21, dez. 2000. Número especial.

WALTERS, C. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. **Planta**, Berlin, n. 242, p. 397-406, 2015.

WALTERS, C. et al. Desiccation damage: “accelerated aging” and metabolism in desiccation tolerant and sensitive seeds. **Seed Science and Research**, Wallingford, v. 11, n. 2, p. 135-148, June 2001.

WELBAUM, G. E.; BRAFORD, K. J. Water relations of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.) I.: water relations of seed and fruit development. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 86, p. 406-411, abr. 1988.

WESLEY-SMITH, J. et al. The effects of drying rates on the desiccation tolerance of embryonic axes of recalcitrant jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) seeds. **Annals of Botany**, Oxford, v. 88, n. 4, p. 653-664, July 2001.

WORTMANN, A. C. **Quantificação de ferro em tecido hepático através de espectroscopia por absorção atômica: validação do método com fígado bovino e avaliação comparativa entre tecido fresco e tecido conservado em parafina.** 2004. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciência em Gastreterologia)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

ZUCARELI, V. et al. Tolerância à dessecação e influência do tegumento na germinação de sementes de citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* MACF x *Poncirus trifoliata* (L) RAF.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 1, p. 291-295, mar. 2009.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

**ARTIGO 1 - DESICCATION TOLERANCE AND ANTIOXIDANT
ENZYMATIC ACTIVITY IN *CITRUS RESHNI* SEEDS EXPOSED TO
VARIOUS DRYING RATES**

Aceito para publicação na revista *Seed Science Technology* em janeiro de 2017

<https://doi.org/10.15258/sst.2017.45.2.08>

Desiccation tolerance and antioxidant enzymatic activity in *Citrus reshni* seeds exposed to various drying rates

M.I.F. GONÇALVES^{1,2}, J.M.R. FARIA², A.C. JOSÉ², O.A.O. TONETTI² AND MARQUES, E.R.³

¹Laboratório Oficial de Análise de Sementes, Lanagro-MG, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento,

Av. Raja Gabaglia, 245, Bairro Cidade Jardim, 30380-103, Belo Horizonte, MG, Brazil
(E-mail: izabelfurst@hotmail.com).

²Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brazil

(E-mail: jmfaria@dcf.ufla.br).

³Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brazil

(E-mail: bethagro@yahoo.com.br).

(Accepted January 2017)

Abstract

Despite the economic relevance of *Citrus reshni* as a rootstock for citrus, information about the consequences of seed desiccation is scarce and controversial. Thus, our objective was to evaluate the effects of drying rates and water content on the physiological quality of and activities of catalase and superoxide dismutase antioxidant enzymes in *C. reshni* seeds. Regardless of the drying rate tested, seeds were very tolerant to desiccation, maintaining a high percentage of normal seedlings even when the water content was reduced to 3%. At 15 and 10% water content, however, the percentage of seeds with multiple normal seedlings reduced. Rapid drying was more advantageous as it provided higher germinability and a lower percentage of abnormalities. Desiccation to 25% water content prior to sowing was beneficial because it increased the percentage of normal seedlings and retained the percentage of seeds with multiple normal seedlings. The best water content for storing these seeds still needs to be determined. Catalase and superoxide dismutase enzymatic activities in dried seeds are not good biomarkers to monitor the effects of drying in *C. reshni* seeds, although they may help understand the nature of stress that occurs during drying and probably influence seed behaviour during storage.

Introduction

Citriculture has a significant relevance in the world economy. Annually, approximately 115 million tonnes of citrus fruits are produced in 146 countries from five continents. In addition to fresh fruits, other derivatives, such as juices, wines, jellies, essential oils and pharmaceutical products, have been commercialised (FAO, 2012). Because citriculture is perennial, rootstock seedlings produced from seeds are one of the most important inputs (Lima, 1986). The use of these seeds for seedling production is justified by the fact that they have a sporophytic polyembryonic phase and that most embryos are formed by nucellar cell differentiation, making them genetically identical to the mother plant. Thus, seedlings can be obtained with seed propagation benefits, i.e. a root system with a main pivotal root and with the maintenance of rootstock genetic traits.

Despite the economic importance of *Citrus* rootstock seeds, information on the consequences of seed desiccation is often controversial, as for *Citrus reshni* Hort ex Tanaka (Villegas-Monter and Andrade-Rodríguez, 2005; Martins *et al.*, 2007). There is interspecific variation for desiccation tolerance in species of *Citrus* and *Poncirus* genera (Mumford and Panggabean, 1982; Hong and Ellis, 1995; Lambardi *et al.*, 2004; Gravier *et al.*, 2011); however, little is known about the specific mechanisms contributing to these behavioural differences. In desiccation-sensitive seeds, numerous factors can affect the physiological behaviour during drying, such as temperature and drying rate (Wesley-Smith *et al.*, 2001; Kermode and Finch-Savage, 2002). The drying rate can affect the desiccation response in recalcitrant (Wesley-Smith *et al.*, 2001; Varghese *et al.*, 2011), intermediate (José *et al.*, 2011; Magistrali *et al.*, 2015) and orthodox (Hong *et al.*, 1996) species seeds. Generally, desiccation-sensitive seeds and embryos have higher survival rates when subjected to rapid drying than when subjected to slow drying (Berjak *et al.* 1993; Pammenter and Berjak, 1999). This effect, however, is less pronounced in seeds than in excised embryos (Pammenter *et al.*, 1998; Sun and Liang, 2001; Liang and Sun, 2002). In contrast, slow desiccation is less harmful in seeds of *Genipa americana* L. (Magistrali *et al.*, 2015). For seeds of others species, for example, *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC) T. D. Penn, the drying rate does not affect the survival rate to a great extent (Faria *et al.*, 2004). The consequences of

drying rates appear to depend on the species (Faria *et al.*, 2004) and may also vary with the fruit phenological stage (Santos *et al.*, 2014).

During the early stages of seed formation and development, embryos have a high water content. Water content decreases slowly while seeds accumulate reserves, accelerates when seeds lose the vascular connection with the mother plant and continues till they reach equilibrium with the relative humidity of air (Walters, 2000; Bewley *et al.*, 2013). From that time, seeds undergo variations according to environmental humidity changes (Walters, 2000; Bewley *et al.*, 2013). This extreme drying at the end of maturation takes place in most desiccation-tolerant seeds. Seeds from fleshy fruits, however, do not go through this final phase and usually maintain a high water content (around 40%) after reaching maturity (Carvalho and Nakagawa, 2000). Seeds from these kinds of fruits may be tolerant to desiccation, such as melon seeds (Welbaum and Bradford, 1988), or may have various sensitivity levels, such as *Citrus* and *Poncirus* genera and their hybrids from the *Rutaceae* family (King and Robert, 1980; Mumford and Panggabean, 1982; Lambardi *et al.*, 2004; Makeen *et al.*, 2007; Gravier *et al.*, 2011).

Desiccation tolerance has been linked to multiple processes, from protection against different levels of dehydration during seed formation to protection and repair mechanisms during hydration (Pammenter and Berjak, 1999). Desiccation to critical levels may have deleterious impacts on cell structures, mitosis, biochemical reactions, DNA integrity, protein synthesis, membrane and organelle structures, germination, and seedling development (Farnsworth, 2001). Cells containing very condensed chromatin are associated with damage due to drying (Crèvecoeur *et al.*, 1976). Alterations in cell membranes are usually the main structural damage associated with drying (Senaratna and McKersie, 1986) and may be related to phospholipid rearrangement of the plasmalemma (Stahelin and Chapman, 1987). The damage can be irreversible, and consequently, seeds suffer from reduced vigour and germination or even loss of viability (Bewley and Black, 1994). Therefore, efficient antioxidant systems have been considered essential to maintain viability in cells and organisms that are negatively affected by free radicals during drying (Pammenter and Berjak, 1999; Berjak and Pammenter, 2013). The balance between the production and removal of free radicals during seed drying and storage is related to their longevity (Brandão Junior *et al.*, 2002).

Understanding drying effects in seed germination is important to determine conservation strategies for Cleopatra mandarin seeds (*Citrus reshni*) and to prevent inadequate processing and seed loss. Even the conservation of seeds for shorter periods, either to be used or for commercialisation, is influenced by desiccation tolerance. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of drying rates and water content on the physiological quality of and activities of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) antioxidant enzymes in *C. reshni* seeds.

Material and Methods

Collection, processing and initial characterisation of seeds

Ripe fruits of *C. reshni* were collected in October 2014 at the Citrobom Nursery farm, located in Bom Despacho, State of Minas Gerais, Brazil [19°44'14" S, 45°15'9" W; climate type Aw (tropical with dry season) and average altitude of 761 m a.s.l.]. Fruits were immediately transported in plastic boxes to the Universidade Federal de Lavras, where they were processed.

Seeds from 10 fruits were individually extracted with tweezers and were used to determine water content before processing. After their removal from the fruit, seeds were directly used, and no treatment to remove mucilage was performed.

The fruit epicarp was removed; carpels were manually crushed and kept under fermenting conditions for 12 hours. Next, seeds were extracted and demucilated under running water on a sieve. Small or malformed seeds were separated and discarded during extraction. Selected seeds were arranged as a single layer in a shady and air-conditioned environment at 20°C, long enough to remove the surface water. Immediately after this, seeds were homogenised, and they formed the seed lot (fresh seeds) used in the studies of desiccation tolerance.

Determination of water content

Seed water content before processing was determined on wet basis using the oven method, drying at $103 \pm 2^\circ\text{C}$ for 17 hours (ISTA, 2014), with five repetitions containing five seeds (Hong and Ellis, 1996). Weights were recorded with an accuracy of 0.0001 g. Determination of the water

content of the fresh seed lot (after processing), dried seeds and their controls was performed using the same method.

Drying procedures

The homogenised seed lot was divided into four equal parts: the first part was subjected to rapid drying and the second part to slow drying; the two remaining parts were maintained at the initial water content and same temperature of drying (rapidly dried and slowly dried controls). Desiccation was performed in hygostat boxes at 20°C, with rapid drying occurring under relative humidity (RH) controlled by activated silica gel (RH = 10 ± 3%) and slow drying occurring with RH controlled by a saturated sodium chloride solution (RH = 75 ± 3%). After 250 hours, slowly dried seeds were not losing water anymore, thus they were transferred to an environment with RH controlled by silica gel (RH = 10 ± 3%) until the end of drying.

Seeds were periodically weighed until they reached 25, 15, 10, 5 and 3% target water content (wet basis). The target weights to obtain the desired water content were estimated according to Cromarty *et al.* (1985). When target weights were reached, seeds were removed from drying and maintained for four hours at 20°C in containers that maintain water content. After this period, samples of the seeds were used for water content determination, germination testing and freezing in liquid nitrogen. Frozen samples were kept in a deep freezer until enzyme extraction. Whenever a target weight was reached, samples were collected from control seeds, which were assessed for water content and germination.

Evaluation of seed germination

Germination was conducted in paper rolls moistened with water, equivalent to 1.7-times the substrate dry weight. Paper rolls were packed in plastic bags and maintained at 25°C under constant light. Four replicates of 25 seeds were used per treatment.

Evaluations were performed every seven days, with germination being considered as the presence of a root protrusion (2 mm). Germination measurements (germinability, velocity coefficients, average time and time variation coefficient) were determined according to Ranal and Santana (2006). Calculations were performed in an Excel worksheet (Ranal *et al.*, 2009), and the percentage of seeds with more than one germinated embryo (indirect polyembryony) was calculated.

Germination was also evaluated according to technological criteria, with seedlings classified as normal, deformed or decayed and non-germinated seeds classified as dead or hard and fresh (ISTA, 2013, 2014). Fresh seed viability was confirmed using the tetrazolium test, according to Brasil (2009) except that embryos with radicle damage were considered to be unviable, regardless of the damage extension. According to technological criteria, seeds were considered germinated when a root or any other structural protrusion of the seedling was observed (such as hypocotyl or epicotyl).

Seedlings with or without a damaged primary root were considered deformed and were separately counted from those with damage in other essential structures. Evaluations ended when germination stabilised and it was possible to undoubtedly classify seedlings. Percentages of all kinds of seedlings and seeds observed, as well as of abnormal seedlings (deformed + decayed) and deformed seedlings that showed defects in the primary root, were determined.

The behaviour of desiccated seeds in relation to their controls was compared using a ratio between the percentages of normal seedlings from dried seeds (25, 15, 10, 5 and 3% water content) and from control seeds. The initial ratio (fresh seeds) was considered to be one.

Because these are polyembryonic seeds, the percentage of seeds that produced more than one normal seedling (multiple seedlings) was also calculated.

Extraction of enzymes

Four samples from each treatment, containing 50 seeds, were separately macerated in liquid nitrogen with the addition of 10 mg polyvinylpolypyrrolidone. Soluble protein extraction was performed with 0.2 g of macerated samples, to which 1.5 mL of extraction buffer containing 1.47 mL of 0.1 M phosphate buffer (pH 7), 15 μ L of 0.1 M ethylenediaminetetraacetic acid, 15 μ L of 0.1 M ascorbic acid, 6 μ L of 0.5 M dithiothreitol and 15 μ L of 0.1 M phenylmethanesulfonyl fluoride were added. Next, samples were centrifuged at 12,000 $\times g$ for 30 minutes at 4°C. Supernatants were collected and frozen in aliquots to be used for enzymatic activity and protein quantification assays (Bielmelt *et al.*, 1998).

Quantification of soluble proteins

Sample protein concentration was determined by the Bradford method (Bradford, 1976) using a standard curve determined by increasing concentrations of bovine serum albumin in a 96-well enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate that was read in a spectrophotometer at 595 nm. Each concentration was tested in three replicates.

Quantification of SOD activity

SOD (EC 1.15.1.1) antioxidant enzymatic activity was measured by its ability to inhibit p-nitro blue tetrazolium (NBT) photoreduction, as proposed by Giannopolitis and Ries (1997) with modifications. Ten microliters of enzymatic extract were added to 190 μL of an incubation medium, and measurements were performed in 96-well ELISA plates, using three repetitions for each biological sample. The reaction was performed at 25°C in a reaction chamber under fluorescent light lamp of 15 W. After seven minutes of light exposure, formazan produced by NBT photoreduction was measured at 560 nm. An illuminated control sample without proteins (blank) was used to determine the maximum absorbance. SOD activity was calculated as the absorbance of the sample divided by the absorbance of the blank; the percentage of inhibition was then obtained. One SOD unit was defined as the amount required for the photoreduction of 50% of NBT (Beauchamp and Fridovich, 1971; Cheng and Song, 2008). Enzymatic activity was expressed as U SOD $\text{minute}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein.

Quantification of CAT activity

CAT (EC 1.11.1.6) enzymatic activity was measured according to the technique by Havir and McHale (1987), using 10 μL of the enzymatic extract added to 190 μL of the incubation medium. The enzymatic activity was measured based on an absorbance decrease at 240 nm every 15 seconds for three minutes, while monitoring hydrogen peroxide consumption by spectrophotometry. Measurements were performed in 96-well ELISA plates using three repetitions for each biological sample. CAT activity was expressed in $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ minute}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein.

Statistical analysis

Initially, residue normality was checked using the Shapiro-Wilk test and homoscedasticity by Levene's test. Analysis of variance (ANOVA) was

then performed only when variable data were considered normal and homoscedastic ($P > 0.01$). When significant effects were observed, averages were compared using the Scott–Knott test ($P = 0.05$). All statistical analyses were performed using the R program: Core Team (2016), car package (Fox and Weisberg, 2011) and ExpDes.pt. package (Ferreira *et al.*, 2013).

Results

Fresh seeds had 46% water content, similar to the water content of seeds before processing (47.4%). Initial germinability (root protrusion) was 94%, normal seedling percentage was 83% and the average germination period was 17.94 days.

There was no interaction between the drying rate and the water content on the variables related to germination, so the results regarding the drying rates and the water content are presented separately.

Drying rate

Although the duration of slow drying was approximately 2-times greater than that of rapid drying (figure 1), the drying rate did not affect normal seedling percentage, polyembryonic measures or mean germination time, velocity and synchrony (figure 2).

However, the effect of drying rate could only be observed in germinability and seedling abnormalities. The percentage of germinated seeds (root protrusion) was lower after slow drying (86.5%) than after rapid drying (90.3%). The opposite result was found with both deformed seedlings and root-damaged seedlings, considering the total deformed seedlings (figure 2).

Unlike other variables, an interaction between factors was detected in antioxidant enzymatic activity results. At the same drying rate, SOD and CAT enzymatic activities varied according to the water content. Further, enzymatic activity variation was observed in seeds with identical water content but different drying rates (table 1).

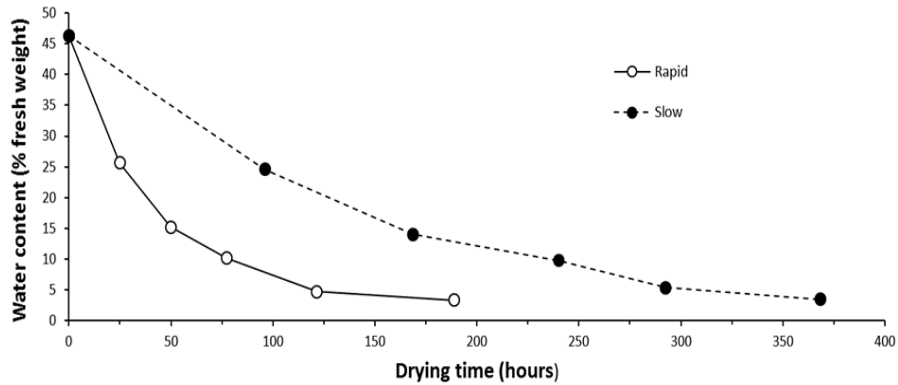


Figure 1. Rapid (silica gel) and slow (NaCl until the 250th hour and silica gel until the end) drying curves for *Citrus reshni* seeds at 20°C.

SOD activity was significantly reduced when seeds were rapidly desiccated to 25% water content. This enzymatic activity remained stable until 15% water content, and then, it reached the lowest level in seeds with 10% water content. Seeds with 5 and 3% water content had the highest SOD activities, surpassing even the enzymatic activities of fresh seeds (table 1). SOD activity in slowly desiccated seeds showed similar behaviour to the rapidly dried seeds, particularly until 10% water content. However, in seeds slowly desiccated to lower water contents (5 and 3%), the SOD activity was lower than in rapidly dried seeds and lower than the levels observed in fresh seeds.

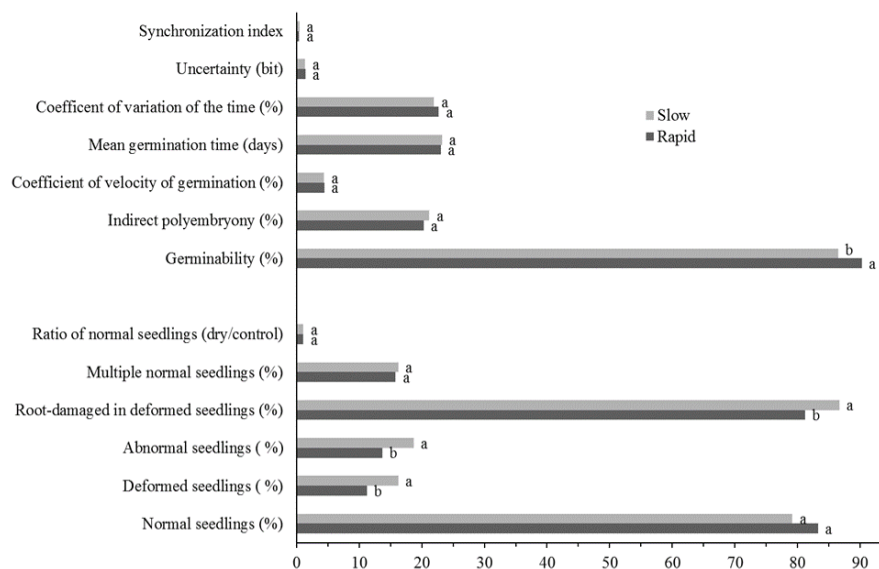


Figure 2. Effects of drying rates on *Citrus reshni* seed germination. Data are means of water content results as there was no significant interaction between the drying rates and water content. Bars followed by the same letter in each variable are not significantly different by the Scott–Knott test ($P = 0.05$).

No variation was found in CAT activity in rapidly dried seeds with 25, 15 and 10% water content. However, rapidly dried seeds with 5% water content had their enzymatic activities increased, reaching its maximum value in seeds with 3% water content (table 1). Slowly dried seeds with 25% water content also did not show a reduction in CAT activity. For seeds dried water contents lower than 25%, CAT activity was greater, with maximum activity at 15 and 10% water content, returning to the initial level in seeds with 5 and 3% water content (table 1).

Therefore, in the rapid drying the peak of CAT and SOD activity occurred in seeds dried to low water contents (5 and 3%), which was not observed in slowly dried seeds.

Table 1. Activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in *Citrus reshni* seeds with different water contents obtained by rapid and slow drying.

Water content (% fresh weight)	CAT activity ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ minute}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$)		SOD activity (U SOD $\text{minute}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$)	
	Rapid drying	Slow drying	Rapid drying	Slow drying
46 (Fresh)	13.61Ca	13.61Ba	3.42Ba	3.42Aa
25	10.62Ca	11.38Ba	3.08Ca	3.00Ba
15	15.50Cb	32.58Aa	3.20Ca	3.10Ba
10	17.66Cb	36.22Aa	2.67Da	2.24Db
5	25.29Ba	15.57Bb	3.86Aa	3.15Bb
3	40.84Aa	12.18Bb	3.72Aa	2.60Cb
CV (%)	15.95		5.94	

CV = coefficient of variation. Means followed by the same capital letter in each column and the same lower case letter in line are not significantly different by the Scott-Knott test ($P = 0.05$).

Water content

Independent of the process speed, the seed water content affected *C. reshni* germination and indirect polyembryony as well as variables in the technological evaluation (table 2).

As observed for fresh seeds, seeds with 25 and 3% water content had 93.5 and 90.0% germinability, respectively, while those with 15, 10 and 5% water content had lower germinability, ranging between 85.5 and 83.0% (table 2).

The coefficient of velocity of germination in dried seeds was low regardless of the water content, thus increasing the average time required for germination. This drying effect was offset by the greater uniformity of germination over time than fresh seeds. However, uncertainty and synchrony levels were not affected by drying.

Drying led to an increased percentage of normal seedlings in seeds with 25% water content. Seeds with a water content lower than that showed a normal seedling percentage statistically identical to that observed in fresh seeds (table 2). In contrast, the percentage of deformed and abnormal seedlings (deformed + decayed) was lower in dried seeds with up to 25% water content. This lower occurrence of seedling damage may be one of the causes, perhaps the main one, for the high technological quality of these seeds (table 2). In addition, dead or fresh seeds were not observed at the end of the tests performed with seeds containing this water content. Furthermore, the percentage of decayed seedlings was low (1%, data not shown).

Table 2. *Citrus reshni* seed germination and seedling evaluation after desiccation

Measures of germination							
Water content (% fresh weight)	Germinability (%)	Indirect polyembryony (%)	CVG (%)	MGT (days)	CVT (%)	U (bit)	Z
46 (Fresh)	94.0a	28.0a	5.58a	17.94b	31.53a	1.33a	0.43a
25	93.5a	26.6a	4.10b	24.41a	21.85b	1.43a	0.39a
15	84.5b	14.5b	4.09b	24.49a	19.36b	1.26a	0.43a
10	85.5b	12.5b	4.13b	24.32a	20.58b	1.38a	0.41a
5	83.0b	26.5a	4.26b	23.62a	22.89b	1.54a	0.36a
3	90.0a	16.5b	4.19b	23.90a	17.77b	1.18a	0.47a
CV (%)	6.61	34.63	4.64	5.03	19.18	18.86	18.97
Technological evaluation							
Water content (% fresh weight)	Normal seedlings (%)	Deformed seedlings (%)	Abnormal seedlings (%)	Root-damaged in deformed seedlings (%)	Multiple normal seedlings (%)	Ratio of normal seedlings (dry/control)	
46 (Fresh)	83.0b	13.0a	16.0a	16.0a	20.0a	1.00b	
25	93.0a	6.5b	7.0b	7.0b	21.6a	1.28a	
15	79.0b	16.0a	18.0a	18.0a	13.5b	1.08b	
10	77.0b	15.5a	19.0a	19.0a	7.5b	1.01b	
5	76.5b	16.0a	18.5a	18.5a	18.0a	0.98b	
3	79.0b	15.0a	18.5a	18.5a	15.5a	1.02b	
CV (%)	9.05	42.94	40.40	40.40	42.02	13.85	

Data are means of rapid and slow desiccation results as there was no significant interaction between the drying rates and water content. CVG = coefficient of velocity of germination; MGT = mean germination time; CVT = coefficient of variation of the time; U = uncertainty; Z = synchronisation index. CV = Coefficient of variation. Means followed by the same letter in each column are not significantly different by the Scott-Knott test ($P = 0.05$)

The percentage of root-damaged in deformed seedlings was statistically identical for seedlings that originated from fresh seeds and seeds with 25% water content. However, this percentage was intermediate for seedlings that originated from seeds with 15 and 10% water content, returning to the initial level for seeds with 5% water content. Seeds with lower water content (3%) had the lowest percentage of root-damaged in deformed seedlings (60.3%; table 2), suggesting further damage in other essential structures.

Regarding the normal seedling ratio from dried seeds and their respective controls, seeds with 25% water content presented a ratio significantly different from the initial one (fresh seeds). Therefore, seeds dried to this water content increased the percentage of normal seedlings compared to that of control seeds. When drying reached even lower water contents, the ratio was the same as to the initial one (fresh seeds), i.e. drying or a temporary humid storage had similar effects.

Measurement of indirect polyembryony

The percentage of seeds with more than one germinated embryo was unaffected by desiccation to 25% water content. This result was not maintained in seeds with 15, 10 and 3% water content. Reduction in the percentage of indirect polyembryony did not occur in seeds with 5% water content (table 2).

Only drying to intermediate water contents (15 and 10%) caused a reduction in the percentage of seeds with multiple normal seedlings (table 2). Seeds with 5 and 3% water content showed no reduction in this percentage.

Discussion

Drying rate

In contrast to other *Citrus* seeds (Cho *et al.*, 2002; Makeen *et al.*, 2005), drying rate did not affect the percentage of normal seedlings in *C. reshni* seeds. The same was true for indirect polyembryonic, multiple normal seedling percentage and germination measurements. Despite this, rapid drying seems more advantageous, since it provided higher germinability (root protrusion), a lower percentage of abnormal seedlings and a lower percentage of root-damage in deformed seedlings.

The effect of the drying rate on germination was not influenced by the water content, however a correlation between these two factors was observed for CAT and SOD enzymatic activities. The activity was lower in slowly dried seeds with 5 and 3% water content than in rapidly dried seeds. This enzymatic activity decrease suggests that under slow drying, there is a loss of efficiency in the antioxidant system, as observed in *Trichilia dregeana* Sond. (Varghese *et al.*, 2011). However, if antioxidant system disruption occurred in *C. reshni* seeds, it was probably a minor damage as there was no significant decrease in the percentage of normal seedlings.

The greatest percentage of deformed seedlings observed in slowly dried seeds does not seem to be related to the lower enzymatic activity because it occurred only in seeds with lower water contents, whereas the abnormalities occurred in seeds at all water contents. The greatest occurrence of these abnormalities may be related to the low efficiency of the antioxidant system during rehydration. However, it was not possible to verify this hypothesis, since the activity of these enzymes was not quantified during germination.

Regardless of the causes for the differences in enzymatic activities detected, the behaviour of these enzymes suggests that rapidly and slowly dried seeds are not in the same physiological state, even though have a same percentage of normal seedlings, which can influence their behaviours during storage.

Desiccation tolerance

Although they are dispersed with a high water content, *C. reshni* seeds were very tolerant to desiccation because the percentage of normal seedlings remained close to 80%, and it was statistically identical to that of fresh seeds, even after reducing the water content to 3%. This behaviour is similar to that observed by Villegas-Monter and Andrade-Rodríguez (2005) in seeds of this species and also in seeds from *Citrus limonia* Osbeck and *Citrus limon* (L.) Burm.f. (King and Roberts, 1980; Usberti and Felipe, 1980; Mumford and Panggabean, 1982). However, these data diverge from other results that reported greater sensitivity of seeds to desiccation (Martins and Silva, 2006; Martins *et al.*, 2007). The discrepancy in results could be explained by lower initial seed quality (72.5 and 64.5% germination) and also by the method used in those studies to assess germination, particularly the excessive amount of water

used in the substrate. Nonetheless, other factors such as genetic variation among *C. reshni* varieties or climatic conditions cannot be discarded. It is important to note that although the assessment time period, which is longer in desiccated seeds with an integument, has been listed as one of the main causes of errors in the physiological classification of *Citrus* seeds (King and Roberts, 1980), this factor does not seem to have contributed to the discrepancy in results because it was similar.

In most studies, SOD and CAT enzymatic activities increase during early drying stages and later decline dramatically. This strong decrease is associated, in almost all studies, to the loss or impairment of at least 50% of seed viability during desiccation (Huang *et al.*, 2009; Ntuli *et al.*, 2011; Sershen *et al.*, 2016). Therefore, this suggests that the lack of a drastic decline in SOD and CAT enzymatic activities in *C. reshni* seeds may be related to the conservation of their viability during drying. The maintenance of viability of *C. reshni* seeds after desiccation suggests that these seeds can be stored with low water content as occurs with the seeds of *C. limonia* and *C. limon* (King and Roberts, 1980; Usberti and Felipe, 1980; Mumford and Panggabean, 1982). Furthermore, it has already been observed that seeds of *C. reshni* with 5% water content can be stored for 12 months (Villegas-Monter and Andrade-Rodríguez, 2005).

In addition, the high viability and enzymes activity of the CAT and SOD in seeds of *C. reshni* dried rapidly to 3% water content suggests that this ultra-drying can be a good strategy for the conservation of these seeds as for *Ammopiptanthus mongolica* (Maxim. Ex Kom.) S. H. Cheng (Li *et al.*, 2010). Seeds of *C. limon* exhibit this behaviour and may even be stored at -18 ° C for 655 days (Mumford and Panggabean, 1982).

On the other hand, the physiological evaluations performed by Martins *et al.* (2007) suggest that the seeds of *C. reshni* are probably recalcitrant because they were better conserved with water contents between 39 and 24%, and were affected by drying down to water content below 24%. However, the seeds used by these authors presented lower initial quality (64.5% of normal seedlings) than the seeds we tested (83.0% of normal seedlings).

Although the seeds of *C. reshni* have shown themselves tolerant to desiccation, it cannot claim to be orthodox seeds because we have not studied the behaviour of these seeds during storage.

Water content

Drying *C. reshni* seeds to 25% water content prior to sowing proved to be advantageous as it increased the percentage of normal seedlings and maintained the percentage of multiple normal seedlings. When compared with fresh seeds, there was a reduction in the coefficient of velocity of germination, but this factor was offset by the lower variation in germination over time. Similar physiological behaviour was observed by Martins *et al.* 2007, studying seeds of *C. reshni* dried from 48 to 39% water content.

As for *C. reshni*, mild drying increased germination in other species seeds, which are dispersed with high water content, such as *Aesculus hippocastanum* L. (Tompsett and Pritchard, 1998), *Acer pseudoplatanus* L. (Daws *et al.*, 2006) and *Quercus robur* L. (Kraner *et al.*, 2006). This observation has been linked to the continuing seed maturation (Tompsett and Pritchard, 1998; Daws *et al.*, 2006).

A possible cause would be a germination stimulus due to a slight elevation in H₂O₂ concentration (Bailly, 2007; Roach *et al.*, 2010) as reactive oxygen species increase after mild drying was found in *Castanea sativa* Mill seeds (Roach *et al.*, 2010). Furthermore, the highest normal seedling percentage in seeds with 25% water content that we observed could still be related to the concomitant decrease in SOD activity.

There is no evidence that the lowest germination velocity observed in all drying levels is associated with CAT and SOD enzymatic activities as these variables were differently affected by drying.

Indirect polyembryony

In citrus rootstock seeds, the highest polyembryony occurrence has been considered beneficial because it increases the likelihood of the germination of nucellar-originated embryos that are genetically identical to the mother plant (Soares Filho *et al.*, 2000). Drying can result in a reduction of the number of seedlings per seed (Lambardi *et al.*, 2004) and in the percentage of seeds with more than one germinated embryo in the genus *Citrus* (Makeen *et al.*, 2007). Therefore, the choice of the seed desiccation method and final water content should take these factors into consideration.

In *C. reshni* seeds, the decrease in the percentage of multiple normal seedlings only occurred for seeds with intermediate water content (15 and 10%). Mildly desiccated seeds (25%) presented the same

percentage of multiple seedlings found in fresh seeds, and surprisingly, the same was observed for seeds dried to lower water contents (5 and 3%). This return to initial polyembryonic levels may be associated with the stimulation of the germination of zygotic embryos due to desiccation, as observed by Lambardi *et al.* (2004). If such hypothesis is true, drying to low water content (5 and 3%) would not be recommended for seeds intended for seedling production.

It is important to point out that the variation of SOD and CAT antioxidant enzymatic activities during drying does not seem to be related with polyembryony because the drying rate has an effect only on enzymatic activities. This is particularly true for CAT in seeds with low water content (5 and 3%).

Previous work has shown that the percentage of seed survival with multiple seedlings in *Citrus suhuiensis* depends on the water content of the seed and the form of rehydration (controlled or not) (Makeen *et al.*, 2007). Not all the embryos present in the polyembryonic fresh seeds of *Citrus* species germinate. The conversion rate (mean number of embryos / average number of seedlings per seed) in *Citrus reshni* was 52.1% (Kishore *et al.*, 2013), but the factors involved in the conversion of embryos to seedlings were not studied. Therefore, it could be hypothesised that the number of germinated embryos may be influenced not only by the survival of these embryos to desiccation, or enzymatic activity at the end of drying, but also by the functioning of the antioxidant system and other mechanisms of repair during rehydration. Thus, other studies need to be carried out to understand the influence of drying on embryo survival and indirect polyembryony, as well as the enzymatic activity during rehydration. It would also be interesting to determine the genetic origin of embryos and seedlings that survive (zygotic or nucellar).

Use of enzymatic activity as a biomarker

As discussed above, it can be speculated that enzymatic activities in dry seeds have some association with the behaviour of *C. reshni* seeds after drying. However, it was not possible to explain the maintenance of percentage of normal seedlings only through CAT and SOD enzyme activities in dried seeds. The same regarding the effect of the drying rate. Perhaps the activity of enzymes during rehydration is more determinant than the activity soon after drying. Besides the complexity and dynamicity of the antioxidant system, with other enzymes involved, other

tolerance and repair mechanisms may be important (Pammenter and Berjak, 1999). This is consistent with results found by Sershen *et al.* (2016) in studies on seeds from four species, in which it was found that extracellular SOD activity should not be used as a biomarker to monitor the effect of drying.

Conclusions

Regardless of the drying rate tested, *C. reshni* seeds were tolerant to desiccation and maintained a high percentage of normal seedling formation even after desiccation to 3% water content. However, seeds with 15 and 10% water content presented a reduction in the percentage of seeds with multiple normal seedlings. Rapid drying was more advantageous than slow drying, as it provided higher germinability and a lower percentage of abnormalities. Desiccation to 25% water content prior to sowing was advantageous because it increased the percentage of normal seedlings and retained the percentage of multiple normal seedlings. However, the best water content for storage of these seeds still needs to be determined. SOD and CAT enzymatic activities in dried seeds are not good biomarkers to monitor the effect of drying in this species, although they may help understand the nature of stress occurring during drying and probably influence seed behaviour during storage.

Acknowledgments

We thank the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply to consent M.I.F. Gonçalves participation in Forest Engineering Doctorate Program at UFLA. This appreciation is extended to all involved in this process, particularly Mr. Ricardo Aurélio Pinto Nascimento, Mr. Ernesto do Nascimento Viegas, Mr. Nilson César C. Guimarães and Ms. Lêda Aparecida Mendonça.

We would also like to thank the following: Mr. Vantuil Antônio de Sousa from Citrobom Nursery, Bom Despacho, state of Minas Gerais, Brazil, for the willingness, support and supply of Cleopatra mandarin fruits used in this work; Prof. Renato Mendes Guimarães, who enabled the use of facilities and equipment in the Seeds Central Laboratory in the Department of Agriculture at UFLA and the staff members Jaqueline Pereira Januário and José Geraldo Vilas Boas for the support during the

performance of the analyses; and the Foundation for Research Funding and Support from the State of Minas Gerais (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais-FAPEMIG), Process CAG/PPM-00470-14.

J.M.R. Faria is a research fellow from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq), Process 310225/2015-9.

References

- Bailly, C. (2007). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, **14**, 93-107. <http://dx.doi.org/10.1079/SSR2004159>
- Beauchamp, C. and Fridovich I. (1971). Superoxide dismutase improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, **44**, 276-287. [http://dx.doi:10.1016/0003-697\(71\)90370-8](http://dx.doi:10.1016/0003-697(71)90370-8)
- Berjak, P. and Pammenter, N.W. (2013). Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Frontiers in Plant Science*, **4**, 1-9. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2013.00478>
- Berjak, P., Vertucci, C.W. and Pammenter, N.W. (1993). Effect of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation-sensitivity in recalcitrant seeds of *Camellia sinensis*. *Seed Science Research*, **2**, 155-166. <http://dx.doi.org/10.1017/S0960258500001732>
- Bewley, J.D. and Black, M. (1994). Development-regulation and maturation. In *Seeds: Physiology of Development and Germination*, (eds. J.D. Bewley and M. Black), pp. 117-145, 2nd edition, Plenum Press, New York.
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M. and Nonogaki, H. (2013). Development and maturation. In *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*, (eds. J.D. Bewley, K.J. Bradford, H.W.M. Hilhorst and H. Nonogaki), pp. 27-83, 3rd edition, Springer-Verlag, New York.

- Biemelt, S., Keetman, U, and Albrecht, G. (1998). Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in root of wheat seedlings. *Plant Physiology*, **116**, 651-658. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.116.2.651>.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brandão Junior, D.S., Vieira, M.G.G.C., Guimarães, R.M. and Hilhorst, H.W.M. (2002). Tolerância à dessecação de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). [Desiccation tolerance in coffee seeds (*Coffea arabica* L.)]. *Revista Brasileira de Sementes*, **24**, 17-23. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222002000100004>
- Brasil (2009). Regras para Análise de Sementes, [Rules for the Analysis of Seeds], Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/ACS, Brasília.
- Carvalho, N.M. and Nakagawa, J. (2000). Maturação de sementes. [Seed maturation]. In *Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção*, [Seeds: Science, Technology and Production], (eds. N.M. Carvalho and J. Nakagawa), pp. 98-127, Funep, Jaboticabal.
- Cheng, H.Y. and Song, S.Q. (2008). Possible involvement of reactive oxygen species scavenging enzymes in desiccation sensibility of *Antiaris toxicaria* seeds and axes. *Journal of Integrative Plant Biology*, **50**, 1549-1556. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1744-7909.2008.00723.x/epdf>
- Cho, E.G., Noor, N.M., Kim, H.H., Rao Ramanath, V. and Engelmann, F. (2002). Cryopreservation of *Citrus aurantifolia* seeds and embryonic axes using a de desiccation protocol. *CryoLetters*, **23**, 309-316.
- Crèvecoeur, M., Deltour, R. and Bronchart. R. (1976). Cytological study on water stress during germination of *Zea mays*. *Planta*, **132**, 132-131. <http://doi/10.1007/BF00390328>
- Cromarty, A.S., Ellis, R.H. and Roberts, E.H. (1985). *Design of Seed Storage Facilities for Genetic Conservation*, International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Daws, M.I., Cleland, H., Chmielarz, P., Gorian, F., Leprince, O., Mullins, C.E., Thanos, C.A., Vandvik, V. and Pritchard, H.W. (2006). Variable

- desiccation tolerance in *Acer pseudoplatanus* seeds in relation to developmental conditions: a case of phenotypic recalcitrance? *Functional Plant Biology*, **33**, 59-66. <http://dx.doi.org/10.1071/FP04206>
- FAO (2012). Citrus fruit: fresh and processed. Annual Statistics 2012, Food and Agriculture Organization, Rome. Available in: http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Citrus/Documents/CITRUS_BULLETIN_2012. Access 18 August 2016.
- Faria, J.M.R., Lammeren, A.A.M. and Hilhorst, H.W.M. (2004). Desiccation sensitivity and cell cycle aspects in seeds of *Inga vera* subsp *affinis*. *Seed Science Research*, **14**, 165-178. <http://dx.doi.org/10.1079/SSR2004166>
- Farnsworth, E. (2001). The ecology and physiology of viviparous and recalcitrant seeds. *Annual Review Ecology System*, **31**, 835-848.
- Ferreira, E.B., Cavalcanti, P.P. and Nogueira, D.A. (2013). ExpDes.pt: Experimental Designs package. [In Portuguese.] R package. version 1.1.2.
- Fox, J. and Weisberg, S. (2011). An {R} Companion to Applied Regression, Second Edition, Sage, Thousand Oaks, CA.
- Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, **59**, 309-314.
- Gravier, N., Califano, A. and Zaritzky, N. (2011). Partial dehydration and cryopreservation of Citrus seeds. *Journal Science Food Agricultural*, **91**, 2544-2550. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.4427/epdf>
- Havir, E.A. and McHale, N.A. (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, **84**, 450-455. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.84.2.450>
- Hong, T.D. and Ellis, R.H. (1995). Interspecific variation in seed storage behaviour within two genera – *Coffea* and *Citrus*. *Seed Science and Technology*, **23**, 165-181.
- Hong, T.D. and Ellis, R.H. (1996). A Protocol to Determine Seed Storage Behaviour, International Plant Genetic Resources Institute, Rome.

- Hong, T.D., Linington S. and Ellis, R.H. (1996). *Compendium of Information on Seed Storage Behaviour*, International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Huang, H. Song, S.-Q. and Wu, X.-J. (2009). Response of Chinese wampee axes and maize embryos of dehydration at different rates. *Journal of Integrative Plant Biology*, **51**, 67-74. <http://dx.doi.org/1111/j.1744-7907.2008.00772.x>
- ISTA (2013). *Handbook of Seedling Evaluation*, 3rd edition, International Seed Testing Association, Bassersdorf.
- ISTA (2014) *International Rules for Seed Testing*, International Seed Testing Association, Bassersdorf.
- José, A.C., Silva, E.A.A., Davide, A.C, Melo, A.J.S. and Toorop, P.E. (2011). Effects of drying rate and storage time on *Magnolia ovata* Spreng: seed viability. *Seed Science and Technology*, **39**, 425-434. <http://dx.doi.org/10.15258/sst.2011.39.2.14>
- Kermode, A.R. and Finch-Savage, W.E. (2002). Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In *Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying*, (eds. M. Black and H.W. Pritchard), pp. 149–184, CABI, London.
- King, M.W. and Roberts, E.H. (1980). The desiccation response of seeds of *Citrus limon* L. *Annals of Botany*, **45**, 489-492.
- Kishore, K., Monika, N. Rinchen., D., Lepcha, B. and Pandey, B. (2012). Polyembryony and seedling emergence traits in apomictic citrus. *Scientia Horticulturae*, **138**, 101-107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2012.01.035>
- Kranner I., Birtić, S. and Pritchard, H.W. (2006). Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress markers and modulator of programmed cell death? *Free Radical Biology and Medicine*, **40**, 2155-2165. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.02.013>
- Lambardi, M., De Carlo, A., Biricolti, S., Puglia, A. M., Lombardo, G., Siragusa, M. and De Pasquale, F. (2004). Zygotic and nucellar embryo survival following dehydration/cryopreservation of *Citrus* intact seeds. *CryoLetters*, **25**, 81-90.

- Lima, J.E.O. (1986). Novas técnicas de produção de mudas cítricas. [New techniques for citrus seedlings]. *Laranja*, **7**, 463-468.
- Li, Y., Qu, J., Zhang, W., Na, L., Xu, P. and Li, Y. (2010). Impact of ultra-dry storage on vigor capacity and antioxidant enzyme activities in seed of *Ammopiptanthus mongolica*. *Botanical Studies*, **51**, 465-472.
- Liang, Y. and Sun, W.Q. (2002). Rate of dehydration and cumulative desiccation stress interacted to modulate desiccation tolerance of recalcitrant cocoa and ginkgo embryonic tissues. *Plant Physiology*, **128**, 1323-1331. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.010616>
- Magistrali, P.R., José, A.C., Faria, J.M.R. and Nascimento, J.F. (2015). Slow drying outperforms rapid drying in augmenting the desiccation tolerance of *Genipa americana* seeds. *Seed and Science Technology*, **43**, 101-110. <http://doi.org/10.15258/sst.2015.43.1.11>
- Makeen, M.A., Noor, M.N., Dussert, S. and Clyde, M.M. (2005). Cryopreservation of whole seeds and excised embryonic axes of *Citrus suhuiensis* cv. Limau Langkat in accordance to their desiccation sensitivity. *CryoLetters*, **26**, 259-268.
- Makeen, M.A., Normah, M.N., Dussert, S. and Clyde, M.M. (2007). The influence of desiccation and rehydration on the survival of polyembryonic seed of *Citrus suhuiensis* cv. limau madu. *Scientia Horticulturae*, **112**, 376-381. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2006.12.050>
- Martins, L. and Silva, W.R. (2006). Comportamento fisiológico de sementes de tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) submetidas à desidratação. [Physiological performance of tangerine (*Citrus reticulata* Blanco) seeds submitted to dehydration]. *Revista Brasileira de Fruticultura*, **28**, 8-10. <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v28n1/29679.pdf>
- Martins, L., Silva, W.R. and Lago, A.A. (2007). Conservação de sementes de tangerina 'Cleopátra': teor de água e temperatura do ambiente. [Preservation of 'Cleopatra' tangerine seeds: water content and storage temperature]. *Revista Brasileira de Sementes*, **29**, 178-185. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v29n1/25.pdf>

- Mumford, P.M. and Panggabean, G.A. (1982). Comparison of the effects of dry storage on seeds of Citrus species. *Seed Science and Technology*, **10**, 257-266.
- Ntuli, T.M., Finch-Savage, W.E., Berjak, P. and Pammenter, N.W. (2011). Increased drying rate lowers the critical water content for survival in embryonic axes of English oak (*Quercus robur* L.) seeds, *Journal of Integrative Plant Biology*, **53**, 270-280. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.01016.x>
- Pammenter, N.W. and Berjak, P. (1999). Review of recalcitrance seed physiology in relation to desiccation tolerance mechanism. *Seed Science Research*, **9**, 13-37. <http://dx.doi.org/10.1086/673302>
- Pammenter, N.W., Greggains, V., Kioko, J.I., Wesley-Smith, J., Berjak, P. and Finch-Savage, W.E. (1998). Effects of differential drying rates on viability retention of recalcitrant seeds of *Ekebergia capensis*. *Seed Science Research*, **8**, 463-471.
- R Core Team (2016). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ranal, M.A. and Santana, D.G. (2006). How and why to measure the germination process? *Revista Brasileira de Botânica*, **29**, 1-11.
- Ranal, M.A., Santana, D.G, Ferreira, W.R. and Mendes-Rodrigues, C. (2009). Calculating germination measurements and organizing spreadsheets. *Revista Brasileira de Botânica*, **32**, 849-855. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042009000400022>
- Roach, T., Beckett, R.P., Minibayeda, F.V., Colville, L., Whitaker, C., Chen, H., Bailly, C. and Kranner, I. (2010). Extracellular superoxide production, viability and redox poise in response to desiccation in recalcitrant *Castanea sativa* seeds, *Plant, Cell & Environment*, **33**, 59-75. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02053.x>
- Santos, F.C., Rosa, S.D.V.F., Von Pinho, E.V.R., Cirillo, M.A. and Clemente, A.C.S. (2014). Desiccation sensitivity from different coffee seed phenological stages. *Journal of Seed Science*, **36**, 025-031. <http://dx.doi.org/10.1590/S2317-15372014000100003>.
- Senaratna, T. and McKersie, B.D. (1986). Loss of desiccation tolerance during seed germination: a free radical mechanism of injury. In

- Membranes, Metabolism and Dry Organisms, (ed. A.C. Leopold), pp. 85–101, Cornell University, Ithaca.
- Sershen, Varghese, B., Naidoo, C. and Pammenter, N.W. (2016). The use of plant stress biomarkers in assessing the effects of desiccation in zygotic embryos from recalcitrant seeds: challenges and considerations. *Plant Biology*, **18**, 1-12. <http://dx.doi.org/10.1111/plb.12428>
- Soares Filho, W.S., Moreira, C.S., Cunha, M.A.P., Cunha Sobrinho, A.P. and Passos, O.S. (2000). Poliembrionia e frequência de híbridos em *Citrus* spp. [Polyembryony and hybrid frequency in *Citrus* spp.]. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **35**, 857-864.
- Staehelein, L.A. and Chapman, R.L. (1987). Secretion and membrane recycling in plant cells: novel intermediary structures visualized in ultrarapidly frozen sycamore, and carrot suspension-culture cell. *Planta*, **171**, 43-57. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00395066>
- Steponkus, P.L. (1984). Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology*, **35**, 543-584. <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pp.35.060184.002551>
- Sun, W.Q. and Liang, Y. (2001). Discrete levels of desiccation sensitivity in various seeds as determined by equilibrium dehydration method. *Seed Science Research*, **11**, 317-323. <http://dx.doi.org/10.1079/SSR200188>
- Tompsett, P.E. and Pritchard, H.W. (1998). The effect of chilling and water content status on the germination, desiccation tolerance and longevity of *Aesculus hippocastanum* L. seed. *Annals of Botany*, **82**, 249-261. <http://dx.doi.org/10.1006/anbo.1998.0676>
- Usberti, R. and Felipe, G.M. (1980). Viabilidade de sementes de *Citrus limonia* Osb. com baixo teor de umidade, armazenadas em diferentes temperaturas. [Seed viability of *Citrus limonia* Osb. under low water content and storage at different temperature]. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **15**, 393-397.
- Varghese, B., Sershen, Berjak, P., Varghese, D. and Pammenter, N.W. (2011). Differential drying rates of recalcitrant *Trichilia dregeana*

- embryonic axes: a study of survival and oxidative stress metabolism. *Physiologia Plantarum*, **142**, 326-338. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01469.x>.
- Villegas-Monter, A. and Andrade-Rodríguez, M.A. (2005). Secado y almacenamiento de semillas de mandarina 'Cleopatra'. [Drying and storage of 'Cleopatra' mandarine seeds]. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **40**, 79-80. <http://www.scielo.br/pdf/pab/v40n1/23245.pdf>
- Walters, C. (2000). Level of recalcitrance in seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia*, **12**, 7-21.
- Welbaum, G.E. and Bradford, K.J. (1988). Water relations of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.) I. Water relations of seed and fruit development. *Plant Physiology*, **86**, 406-411. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.86.2.406>
- Wesley-Smith, J., Pammenter, N.W., Berjak, P. and Walters, C. (2001). The effects of drying rates on the desiccation tolerance of embryonic axes of recalcitrant jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) seeds. *Annals of Botany*, **88**, 653-664. <http://dx.doi.org/10.1006/anbo.2001.1519>

**ARTIGO 2 - TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO E ARMAZENAMENTO
DE SEMENTES DO PORTA-ENXERTO TANGERINA CLEÓPATRA
(*Citrus reshni* Hort. ex TANAKA)**

Artigo com a formatação baseada nas normas para submissão da Revista
Brasileira de Fruticultura.

TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES
DO PORTA-ENXERTO TANGERINA CLEÓPATRA (*Citrus reshni* Hort. ex
Tanaka)

MARIA IZABEL FURST GONÇALVES¹, JOSÉ MARCIO ROCHA FARIA²,
ANDERSON CLEITON JOSÉ³, OLÍVIA ALVINA OLIVEIRA TONETTI⁴.

RESUMO

Em razão da sua importância como porta-enxerto, as sementes de tangerina Cléopatra (*Citrus reshni*) precisam ser armazenadas, para garantir a produção de mudas, ao longo do ano e para conservação em bancos de germoplasma. Objetivou-se estudar o comportamento destas sementes, após secagem e armazenamento, para determinar sua classificação quanto ao armazenamento. As sementes foram extraídas de frutos maduros, desmuciladas e submetidas à secagem em sílica gel (RH = 10 ± 3%) até os conteúdos de água de 24,2; 11,3 e 5,5% (base úmida) e, juntamente com as sementes frescas (36,9% b.u), armazenadas em câmara fria a 6 ± 2°C por três meses. As sementes mais secas foram armazenadas, também, a -20 ± 2°C. Avaliou-se a germinação após secagem e armazenamento e viabilidade e vigor de embriões somente após o armazenamento. As sementes de *C. reshni* foram tolerantes à dessecação, podendo ser dessecadas até 5,5% de conteúdo de água, sem alteração na porcentagem, velocidade e uniformidade da germinação. Quando armazenadas com conteúdo de água entre 36,9% (sementes frescas) e 5,5% a 6 ± 2°C por três meses, mantiveram-se com germinação próxima à das sementes frescas. Nestas

¹ Laboratório Oficial de Análise de Sementes, Lanagro-MG, MAPA e Departamento de Ciências Florestais, UFLA, Brasil. E-mail: izabelfurst@hotmail.com.

² Departamento de Ciências Florestais, UFLA, Brasil. E-mail: jmfaria@dcf.ufla.br.

³ Departamento de Ciências Florestais, UFLA, Brasil. E-mail: acjose@dcf.ufla.br.

⁴ Departamento de Ciências Florestais, UFLA, Brasil. E-mail: oaotonetti@gmail.com

condições, o armazenamento de sementes mais úmidas (36,9% e 24,2) foi mais vantajoso, pois, além de germinação mais elevada, apresentaram maior número de plântulas normais por sementes e mais embriões grandes, vigorosos, destacando-se as sementes armazenadas frescas pelo vigor (maior sincronia e menor tempo de germinação e mais embriões vigorosos). Entretanto, sementes secas de *C.resnyi* (5,5% b.u) apresentaram pequeno decréscimo na germinação após armazenamento a $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e, adicionalmente, houve redução de 50% da porcentagem de plântulas normais após armazenamento a $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, o que revela um comportamento mais próximo ao de sementes intermediárias.

Termos para indexação: sementes intermediárias, longevidade, poliembrionia.

DESICCATION TOLERANCE AND STORAGE OF CLEOPATRA
MANDARIN ROOTSTOCK SEEDS (*Citrus reshni* Hort. ex Tanaka)

ABSTRACT

Due to its importance as rootstock, the Cleopatra (*Citrus reshni*) mandarin seeds need to be stored to ensure the production of seedlings throughout the year and to the conservation in germplasm banks. Our objective was to study the these seeds behavior after drying and storage to determine their classification for storage. The seeds were extracted from mature fruits, demucilated and dried on silica gel (RH = $10 \pm 3\%$) until water contents of 24.2; 11.3 and 5.5% (wet basis) and, together with fresh seeds (36.9% w.b), stored in a cold room at $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for three months. The drier seeds were also stored at $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Germination after drying and storage and embryo viability and vigor were evaluated only after storage. *C. reshni* seeds were desiccation tolerant and could be desiccated up to 5.5% water content, with no change in germination percentage, velocity and uniformity. When stored with water content between 36.9% (fresh seeds) and 5.5% at $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for three months, they kept the germination close to the fresh seeds. Under these conditions, the storage of wetter seeds (36.9% and 24.2)

was more advantageous because, in addition to higher germination, they had a higher number of normal seedlings per seed and more vigorous large embryos, especially stored seeds fresh by vigor (greater synchrony and shorter germination time and more vigorous embryos). However, *C. resinhi* dry seeds (5,5% w.b) presented a small decrease in germination after storage at $6 \pm 2^\circ \text{C}$ and, additionally, there was a 50% reduction in the normal seedlings percentage after storage at $-20 \pm 2^\circ \text{C}$, which reveals a behavior closer to that of intermediate seeds.

Index terms: intermediate seeds, longevity, polyembryony.

INTRODUÇÃO

A citricultura tem expressiva participação na economia brasileira com geração de 230 mil empregos diretos e indiretos (CITRUSBR, 2013). Sua maior importância está na produção de suco de laranja, sendo o Brasil responsável por 75% da exportação mundial (FAO, 2017).

Esta relevância, aliada ao fato de que se trata de uma cultura perene, cujos pomares, se bem implantados, são capazes de se manter produtivos mais de 20 anos (MATTOS JUNIOR et al., 2014), ressalta o valor das sementes dos porta-enxertos na produção de mudas de qualidade e, por consequência, para o sucesso da atividade citrícola.

Como o tempo de amadurecimento da fruta da maioria das variedades dos porta-enxertos concentra-se em alguns meses (abril a junho, para a maioria, e julho-setembro para tangerina Cleópatra e o tangelo Orlando), enquanto os viveiristas precisam disponibilizar mudas ao longo do ano, há a necessidade de armazenar sementes para propiciar semeaduras nos períodos em que não é possível colher sementes (CARVALHO et al., 2005; CARVALHO et al., 2013).

Além disso, a certificação de sementes e mudas, instituída pela Lei 10.711 (BRASIL, 2003), tornou estas sementes muito valorizadas e procuradas,

oportunizando sua comercialização, dado que a origem genética das sementes dos porta-enxertos é de suma importância. Torna-se recomendável que o citricultor, ao adquirir mudas, tenha acesso a informações seguras sobre a espécie e cultivar do porta-enxerto (MATTOS JUNIOR et al., 2014). Atualmente, a comercialização destas sementes deve ser realizada mediante garantia da sua germinação ou da sua viabilidade (BRASIL, 2013), o que também exige conhecimento sobre as formas de conservação destas sementes por curto e médio prazo.

Por outro lado, a manutenção em bancos de germoplasma *ex situ* é essencial para o melhoramento genético, pois garante o acesso a materiais promissores e à diversidade, com vantagens sobre a conservação *in situ*. Esta última forma de conservação, em pomares ou casas de vegetação, exige grande áreas e está sujeita a perdas provocadas por pragas, doenças e estresses climáticos (DURAN-VILA, 1995; KAYA et al., 2017).

A efetividade de um determinado método de armazenamento depende da resposta das sementes à secagem e às temperaturas de armazenamento. Para a maioria das espécies, a dessecação das sementes até 10% de conteúdo de água e armazenamento a -20°C é eficaz para manter a viabilidade por muitos anos (ortodoxas). Para outras espécies, a dessecação pode reduzir fortemente a viabilidade (recalcitrantes). Existem ainda sementes relativamente tolerantes à dessecação (12-10% de conteúdo de água), mas que não resistem à dessecação até 5% ou a dessecação até esse valor seguida por armazenamento à temperatura negativa (intermediárias). Tanto as sementes recalcitrantes, como as intermediárias, são mais difíceis de conservar, exigindo condições especiais de armazenamento (HONG; ELLIS, 1996; SACANDÉ et al., 2004).

As sementes de *Citrus* spp e gêneros relacionados são, em sua maioria, classificadas como intermediárias (71% das 24 espécies listadas). As recalcitrantes correspondem a 17% e as ortodoxas a 12% (ROYAL BOTANIC

GARDENS KEW, 2015). Entretanto, raramente o comportamento pós-colheita está suficientemente claro, pois a própria sensibilidade à dessecação é controversa e as temperaturas apropriadas para armazenamento pouco pesquisadas.

Sementes de muitas espécies cítricas têm sido consideradas como tolerantes à dessecação abaixo de 10% de conteúdo de água (base úmida.). Entre essas espécies, encontram-se algumas cultivadas como *Citrus limonia* (limão-cravo), *Citrus limon* (limão-siciliano), *Citrus aurantiifolia* (limão-tahiti) e *Citrus maxima* (= *C. grandis*, toranja) e silvestres como *Citrus australasica*, *Citrus garrawayi*, *Citrus inodora* e *Citrus australis* (KING; ROBERTS, 1980; USBERTI; FELIPPE, 1980; MUMFORD; PANGGABEAN, 1982; HOR et al., 2005; WEN et al., 2010; HAMILTON et al., 2009; ASHMORE et al., 2011).

Com relação à tangerina Cleópatra (*Citrus reshni* hort. ex Tanaka), os resultados têm sido controversos: há alguns relatos de sensibilidade à dessecação (MARTINS; SILVA, 2006; MARTINS et al., 2007) e outros de tolerância até 5 e 3% de conteúdo de água (VILLEGAS-MONTER; ANDRADE-RODRÍGUEZ, 2005; GONÇALVES et al., 2017). Porém, as evidências da tolerância à dessecação são mais consistentes, dado que os trabalhos que a demonstraram utilizaram sementes com boa qualidade inicial (porcentagem de plântulas normais acima de 80%).

Tal manutenção da viabilidade de *C. reshni* após dessecação sugere que estas sementes se conservam bem com baixo conteúdo de água como ocorre com sementes de *C. limonia* e *C. limon* (KING; ROBERTS, 1980; USBERTI; FELIPPE, 1980; MUMFORD; PANGGABEAN, 1982). Nessa direção, Villegas-Monter e Andrade-Rodríguez (2005) observaram que sementes de *C. reshni* com 5% de conteúdo de água podem ser armazenadas a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ por 12 meses com pequena redução na viabilidade. Por outro lado, ocorreu queda da viabilidade em trabalho conduzido por Martins et al. (2007).

O comportamento em temperaturas subzero depende da espécie cítrica. Sementes de *C. limon* podem também ser armazenadas com 3% de conteúdo de água a -18°C por 655 dias (MUMFORD; PANGGABEAN, 1982), enquanto que as de *C. australis* mostraram significativa redução da viabilidade quando armazenadas com baixo conteúdo de água a -20°C por seis meses (ASHMORE et al., 2011).

Sementes de *C. reshni* com 25% de conteúdo de água perderam totalmente a viabilidade durante o primeiro mês de armazenamento a -20°C (FAWUSI, 1989). Não há, entretanto, informações sobre o comportamento de sementes dessa espécie quando dessecadas até 5% de conteúdo de água antes do armazenamento em temperaturas negativas.

Um aspecto importante a ser considerado é que as sementes de *C. reshni* são poliembriônicas, possuindo geralmente mais de um embrião apomítico (idênticos à planta-mãe) e também embrião zigótico, sendo que o número total de embriões varia entre um e dez (ANDRADE-RODRIGUEZ et al., 2003; KISHORE et al., 2012). Em sementes cítricas maduras podem haver embriões grandes e pequenos (MOREIRA et al., 1947; KISHORE et al., 2012), provavelmente devido a maior ou menor precocidade do desenvolvimento (MOREIRA et al., 1947).

Como o desenvolvimento dos embriões não é simultâneo, é possível que estes apresentem comportamentos diversos durante a secagem e o armazenamento. Entretanto, os reflexos da secagem e armazenamento na viabilidade e vigor de cada um dos embriões de uma semente não foram ainda pesquisados.

Em resumo, embora haja fortes evidências de que as sementes de *C. reshni* sejam tolerantes à dessecação, pouco se conhece sobre seu comportamento durante o armazenamento, uma vez que os trabalhos existentes não abordam todos os aspectos necessários para a classificação do seu comportamento

fisiológico e nem fornecem indicações seguras sobre as melhores condições para seu armazenamento.

Assim, objetivou-se estudar o comportamento dessas sementes após secagem e armazenamento e, por consequência, determinar sua classificação fisiológica. Pretendeu-se também caracterizar a viabilidade e vigor dos embriões de cada semente após armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta, processamento e caracterização inicial das sementes

Frutos maduros de *Citrus reshni* Hort ex. Tanaka (tangerina Cleópatra) foram coletados em setembro de 2016, na Fazenda Citrobom, em Bom Despacho, MG. Após a colheita, os frutos foram transportados em caixas plásticas vazadas para o Viveiro Florestal da Universidade Federal de Lavras, onde foram processados. Sementes de dez desses frutos foram extraídas com auxílio de uma pinça (sem passar por qualquer tipo de tratamento para a retirada da mucilagem) e utilizadas imediatamente para determinação da umidade antes do processamento.

À semelhança da extração realizada pelos produtores de sementes, os epicarpós dos frutos foram retirados, os carpelos esmagados manualmente e mantidos em fermentação por 12 horas. Em seguida, as sementes foram extraídas e desmuciladas em água corrente sobre peneira, descartando-se sementes pequenas ou malformadas. A remoção da umidade superficial das sementes selecionadas foi realizada em camada única, num ambiente sombreado e climatizado ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) por três horas. Imediatamente após, as sementes foram homogeneizadas, constituindo-se o lote (sementes frescas) que foi utilizado nos dois experimentos descritos a seguir.

Secagem e armazenamento

As sementes foram submetidas à secagem com umidade relativa controlada com sílica gel ativada ($\text{UR}=10 \pm 3\%$) em caixas de secagem tipo *higrostat*. Foram

realizadas pesagens periódicas até as sementes atingirem o peso-alvo (correspondente à umidade-alvo), segundo expressão proposta por Cromarty et al. (1985).

Quando atingiram a umidade-alvo, as sementes foram retiradas e armazenadas temporariamente em recipientes que mantinham a umidade (caixas plásticas com tampas bem vedadas) por quatro horas (temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$). Após esse período, foram divididas em duas porções, sendo uma porção destinada à avaliação no tempo zero de armazenamento (efeito da secagem) e outra para avaliação após três meses de armazenamento (efeito da secagem seguida de armazenamento).

As sementes destinadas ao armazenamento foram colocadas em embalagens impermeáveis (tubo Falcon fechado e envolto em filme plástico e saco de polietileno) e armazenadas em câmara fria a $6 \pm 2^\circ\text{C}$. Adicionalmente, sementes com conteúdo de água de 5% foram armazenadas também em freezer ($-20 \pm 2^\circ\text{C}$). O tempo de armazenamento foi de três meses.

Transcorrido este tempo, as sementes foram transferidas (mantendo-as na mesma embalagem) para um ambiente com temperatura de 20°C por 24 horas, para evitar condensação nas sementes (SACANDÉ et al., 2004), sendo então avaliado o conteúdo de água, germinação e poliembrionia direta, viabilidade e vigor de embriões, conforme descrito a seguir.

Conteúdo de água

O conteúdo de água das sementes foi determinado em quatro pontos: antes e após o processamento; após atingirem as umidades-alvo durante a secagem; e após o armazenamento. Utilizou-se o método da estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ por 17 horas, com cinco repetições de cinco sementes (HONG; ELLIS, 1996), calculando-se o conteúdo de água em base úmida (ISTA, 2016). Os pesos foram registrados com quatro casas decimais.

Germinação

A germinação foi realizada em rolos de papel umedecidos com água em peso equivalente a 1,7 vez o peso do substrato seco (quantidade determinada em pré-testes), utilizando-se quatro repetições de 25 sementes por tratamento. Os rolos foram acondicionados em sacos plásticos e mantidos a 25°C sob luz constante.

As avaliações foram realizadas a cada sete dias, classificando-se as plântulas em normais, deformadas ou infeccionadas; e as sementes não germinadas como mortas, duras ou dormentes (BRASIL, 2009; ISTA, 2016). A viabilidade das sementes que absorveram água e não germinaram foi confirmada pelo teste de tetrazólio, considerando-se como dormentes aquelas que possuíam pelo menos um embrião viável (BRASIL, 2009). O método do teste de tetrazólio e os critérios para avaliação dos embriões estão descritos a seguir, no item Viabilidade e vigor de embriões. Plântulas sem raiz primária ou com raiz primária danificada foram consideradas deformadas, assim como aquelas com defeitos em outras estruturas essenciais. As avaliações foram encerradas quando ocorreu a estabilização da germinação e foi possível ter certeza na classificação das plântulas.

Além das porcentagens totais de cada tipo de plântula ou semente não germinada, foram calculadas também a porcentagem de plântulas anormais (deformadas + infeccionadas) e a porcentagem de plântulas normais na primeira contagem (21 dias).

Como as sementes de *C. reshni* são poliembriônicas, quando uma semente gerou mais de uma plântula normal, apenas uma foi considerada para o cálculo da porcentagem de plântulas normais. Entretanto, a porcentagem de sementes com mais de uma plântula normal (plântulas múltiplas) e o número médio de plântulas normais por semente também foram determinados.

As medidas de germinação (coeficiente de velocidade, tempo médio, coeficiente de variação do tempo, incerteza e sincronia) foram determinadas de acordo com

Ranal e Santana (2006), considerando as sementes germinadas quando apresentaram a primeira plântula normal. Os cálculos foram realizados com auxílio de uma planilha-modelo proposta por Ranal et al. (2009).

Poliembrionia direta e contagem de embriões

Concluído o tempo de armazenamento e após a aclimação por 24 horas em ambiente a 20 °C, quatro repetições de 25 sementes de cada tratamento (sementes não-dessecadas, e com conteúdo de água de 25, 12 e 5%, armazenadas a 6 ± 2 °C e com 5% a -20 ± 2 °C), foram retiradas aleatoriamente do recipiente de armazenamento e umedecidas entre papel a 25 °C por 24 horas (AOSA; SCST, 2010).

Logo após, retirou-se a dupla camada de tegumentos e os embriões foram dissecados com auxílio de um bisturi sob lupa com aumento de oito vezes. Os embriões presentes em cada semente foram contados, medidos e classificadas pelo comprimento em grandes ($\geq 7,0$ mm), médios (entre 6,9 e 4,0 mm), pequenos (entre 3,9 e 2,0 mm) e muito pequenos ($< 2,0$ mm). Os comprimentos dos embriões foram medidos desde a ponta da radícula até a extremidade do cotilédone maior.

Foram determinados o número médio de embriões por semente, o número médio de embriões por tamanho (grande, médio, pequeno e muito pequeno) e a frequência de sementes para cada morfotipo (ou seja, de acordo com o número de embriões presente nas sementes). O número médio e a porcentagem de embriões de cada tamanho por morfotipo também foram calculados.

Viabilidade e vigor de embriões

Os embriões de cada dessas sementes dissecadas, como descrito no item 2.4.3, foram mantidos juntos, sendo embebidos com solução de 0,5% de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio a 30°C e no escuro por quatro horas (BRASIL, 2009). Em seguida, os embriões foram removidos da solução e lavados cuidadosamente para avaliação da coloração. Foram considerados inviáveis quando totalmente

descoloridos ou quando apresentaram eixo hipocótilo-radícula descolorido ou cotilédones com área igual ou maior que cinquenta por cento descolorida, ou ainda, descoloridos em áreas próximas ao ponto de inserção do eixo embrionário. Os outros embriões (coloridos ou com apenas cotilédones com área menor que cinquenta por cento e distante do ponto de inserção descolorida) foram considerados viáveis (AOSA; SCST, 2010). Os embriões totalmente coloridos e com tecidos firmes foram considerados viáveis-vigorosos (Figura 1). Todos os tipos de embriões (inviáveis, viáveis e viáveis-vigorosos) foram também classificados por tamanho. Determinou-se o número médio de embriões viáveis e o número médio de embriões vigorosos. Adicionalmente, o número médio de embriões viáveis e vigorosos de cada tamanho também foram calculados.

Análise estatística

Antes de se proceder as análises de variâncias ANOVA, verificou-se a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade pelo teste de Levene. A ANOVA foi realizada apenas quando os dados da variável foram considerados normais e homocedásticos ($p > 0,01$).

Quando foram constatadas diferenças significativas pelo teste F na ANOVA ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Toda a análise estatística foi realizada com o auxílio do programa R: Core Team (2016), pacotes CAR (FOX; WEISBERG, 2011) e ExpDes.pt. (FERREIRA et al., 2013). Um delineamento inteiramente casualizado em fatorial 4×2 foi utilizado para a análise estatística dos resultados da secagem e armazenamento a 6 ± 2 °C. Nesse modelo, quatro conteúdos de água (inicial, 25, 12, e 5%) foram combinados com dois tempos de armazenamento (zero e três meses). Note-se que o tempo de armazenamento igual a zero refere-se à condição das sementes imediatamente após a secagem. Como a análise de variância mostrou que houve interação significativa entre os entre os fatores, estão sendo apresentados os

desdobramentos de interesse, ou seja, fator conteúdo de água dentro do tempo de armazenamento zero (efeito da secagem) e o desdobramento do tempo de armazenamento dentro de cada conteúdo de água (efeito do armazenamento).

Para análise das condições de armazenamento, incluindo-se o congelamento, constituiu-se um modelo em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos correspondendo às condições testadas (sementes não-dessecadas e sementes com conteúdo de água de 25, 12 e 5%, armazenadas a 6 ± 2 °C e com 5% a -20 ± 2 °C).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conteúdo de água das sementes

As sementes frescas (após processamento) apresentaram conteúdo de água de 36,9%, o qual foi próximo do conteúdo de água das sementes antes do processamento (36,6%) (Tabela 1). Embora não tenha havido mudanças significativas no conteúdo final de água das sementes (diferença = 0,3 pontos percentuais, aumento de apenas 0,8%), não se pode afirmar que o processo de fermentação, retirada de mucilagem e secagem superficial não tenha alterado a condição fisiológica das sementes.

Os conteúdos de água alcançados durante a secagem foram muito próximos das umidades-alvo (Tabela 1). Durante o armazenamento as variações nos conteúdos de água foram pequenas (diferença \leq | 0,5 pontos percentuais |), exceto para as sementes frescas, que perderam água durante o armazenamento (redução de 1,4 pontos percentuais).

Características das sementes frescas

As sementes frescas mostraram germinação (plântulas normais) de 75% e tempo médio de germinação de 34,7 dias. A protrusão radicular iniciou-se no décimo dia e a formação de plântulas normais a partir dos 21 dias em algumas repetições e 28 dias em outras. A finalização do teste ocorreu entre 42 e 49 dias.

O conteúdo de água inicial das sementes observado neste trabalho diverge de outros lotes de sementes de *C. reshni* utilizados por outros autores que possuíam conteúdo de água entre 49 e 46% (MARTINS; SILVA, 2006; MARTINS et al., 2007; GONÇALVES et al., 2017). Sementes recém-colhidas de *C. aurantium* e de outras três espécies de *Citrus* apresentaram faixa de umidade semelhante, entre 49 e 43% (KHAN et al., 2003). Por outro lado, Lambardi et al. (2004) relatam conteúdos de água de 33,0% para sementes de *C. aurantium*.

Não seria esperado que sementes extraídas de frutos maduros, colhidos na mesma localidade e período do ano (setembro-outubro) apresentassem conteúdos de água diversos, como ocorreu com sementes de *C. reshni* colhidas em 2014 (GONÇALVES et al., 2017) e as colhidas em 2016, ora estudadas.

A observação da ocorrência de conteúdos de água diversos no momento da colheita indica que os produtores dessas sementes não devem realizar a secagem após o processamento baseada em recomendações genéricas (por exemplo, secagem por um dia à sombra). Uma vez que mudanças no conteúdo de água inicial podem interferir no conteúdo final e, conseqüentemente, na qualidade fisiológica (VILLEGAS-MONTER; ANDRADE-RODRÍGUEZ, 2005; MARTINS; SILVA, 2006; MARTINS et al., 2007; GONÇALVES et al., 2017), é essencial determinar o conteúdo de água específico do lote de sementes antes de realizar a secagem.

Tolerância à dessecação

Mesmo após a secagem até conteúdo de água de 5,5%, a germinação não foi afetada, mantendo-se próxima a das sementes frescas (recém-colhidas), exceto para as sementes dessecadas até o conteúdo de água de 11,3%. Para estas, o resultado foi estatisticamente menor (57% de germinação) devido à maior ocorrência de anormalidades (41%) (Figuras 2A e 2B).

Tal redução da germinação em conteúdo de água intermediário foi relatada por Martins e Silva (2006) em sementes com conteúdo de água de 13%, porém junto

com indícios de maior sensibilidade à dessecação, dado que houve decréscimo de viabilidade também em sementes mais secas (10 e 7%). Por outro lado, não foi observada em trabalhos que constatarem tolerância à dessecação em sementes de *C. reshni* (VILLEGAS-MONTER; ANDRADE-RODRÍGUEZ, 2005; GONÇALVES et al., 2017).

Entretanto, Gonçalves et al. (2017) relataram decréscimo da porcentagem de sementes com múltiplas plântulas normais apenas em sementes secadas (lenta ou rapidamente) até conteúdos de água intermediários (15 e 10% b.u.), estando a não redução da poliembrionia indireta nos baixos conteúdos de água (5 e 3% b.u) possivelmente associada ao estímulo da dessecação à germinação de embriões zigóticos observado em sementes *Citrus sinensis* e *C. aurantium* por Lambardi et al. (2004).

Conseqüentemente, pode-se especular que a menor porcentagem de plântulas normais observada no presente trabalho apenas em sementes desseçadas até 12% talvez esteja relacionada ao fato destas sementes serem poliembriônicas, existindo em uma mesma semente embriões em diversos estágios de desenvolvimento, tamanhos e posições dentro das sementes (MOREIRA et al., 1947; KISHORE et al., 2012; RAJA et al., 2017) e diferentes origens genéticas (LAMBARDI et al., 2004; ALEZA et al., 2010; KEPIRO; ROOSE, 2009; CARUSO et al., 2014), que poderiam, assim, ser afetados de forma diferenciada pela secagem.

Ressalte-se que a manutenção da germinação inicial, mesmo após a secagem até 5,5%, observada neste experimento, demonstrou que sementes de *C. reshni* não são recalcitrantes, confirmando resultados anteriores (VILLEGAS-MONTER; ANDRADE-RODRÍGUEZ, 2005; GONÇALVES et al., 2017). Do mesmo modo, nenhuma das medidas de germinação, nem mesmo a primeira contagem de plântulas normais, foi afetada pela dessecação (Figuras 2C a 2H).

Efeito do armazenamento

Os reflexos do armazenamento em temperatura de $6 \pm 2^\circ\text{C}$ por três meses variaram de acordo com o conteúdo de água das sementes antes do armazenamento. Assim, a germinação (plântulas normais) de sementes com os maiores conteúdos de água (sementes frescas e com 24,2%) se manteve após três meses (Figura 3A). Houve, contudo, elevação da germinação de sementes armazenadas com 11,3% e um pequeno decréscimo em sementes com 5,5% de conteúdo de água. O maior percentual de germinação de sementes com conteúdo de água de 11,3% está relacionado à redução de anormalidades (Figuras 3A e 3B). O que talvez possa ser explicado pela perda de viabilidade de embriões que foram danificados durante secagem, concomitante com superação de dormência de outros embriões durante o armazenamento, pois Carvalho et al. (2002b) observaram perda de dormência de embriões de sementes cítricas após armazenamento. Em sementes com os outros conteúdos de água avaliados, a porcentagem de plântulas anormais não foi afetada pelo armazenamento (Figura 3B).

O armazenamento elevou a porcentagem de plântulas normais da primeira contagem em sementes não dessecadas e diminuiu esta porcentagem em sementes com 24,2% de conteúdo de água. Não houve alteração em sementes mais secas (11,3 e 5,5% de conteúdo de água) (Figura 3C).

Em sementes frescas, o armazenamento aumentou o coeficiente de velocidade e reduziu o tempo médio de germinação, enquanto que, em sementes com 11,3%, ocorreu o oposto com relação ao tempo médio de germinação. Entretanto, essas duas medidas de germinação não foram afetadas em sementes armazenadas com 24,2 e 5,5% de conteúdo de água (Figuras 3D e 3E). Por outro lado, não houve redução do coeficiente de variação do tempo de germinação de sementes armazenadas úmidas (não dessecadas), maior variação após o armazenamento em sementes com conteúdo de água intermediário (24,2 e 11,3%) e manutenção

desse coeficiente em sementes dessecadas até 5,5% antes do armazenamento (Figura 3F).

Como esse coeficiente possibilita avaliar variabilidade da germinação em relação ao tempo médio de germinação (RANAL; SANTANA, 2006), pode-se afirmar que o armazenamento reduziu essa uniformidade em sementes com conteúdo de água intermediário (11,3% b.u). Por outro lado, a uniformidade do tempo de germinação em sementes não dessecadas ou muito secas não foi afetada. Em contraste, houve diminuição da incerteza e aumento da sincronia da germinação apenas em sementes não dessecadas (Figuras 3G e 3H).

Esses resultados evidenciam que a germinação (plântulas normais) de sementes de *C. reshni* dessecadas até 5,5% de conteúdo de água foi reduzida (de 84% para 70%) após três meses de armazenamento. Já as sementes mais úmidas (não dessecadas e 24,2% de conteúdo de água), mantiveram a porcentagem de plântulas normais estatisticamente igual à inicial (entre 85 e 84%). Além disso, as sementes armazenadas com a umidade inicial (conteúdo de água de 36,9%) se mostraram mais propícias à germinação após o armazenamento, dado que apresentaram maior porcentagem de plântulas normais na primeira contagem, maior coeficiente de velocidade, menor tempo médio e maior sincronia na germinação. Esta maior velocidade e uniformidade de germinação das sementes armazenadas com umidade inicial talvez possa ser explicada pela ocorrência de eventos relacionados ao início da germinação (VERTUCCI; LEOPOLD, 1989; BARBEDO et al., 2013; WALTERS, 2015), já que as sementes estavam úmidas e o efeito observado é semelhante ao esperado após condicionamento fisiológico (*priming*) (MARCOS FILHO, 2015). Contudo, outras causas, além do efeito do armazenamento não podem ser descartadas, pois a leve redução do conteúdo de água ocorrida durante o armazenamento (o conteúdo de água diminuiu de 36,9 para 35,5% após três meses) talvez possa ter contribuído para esse comportamento. Para sementes de outras espécies, uma leve diminuição do

conteúdo de água elevou a germinação (TOMPSETT; PRITCHARD, 1998; KRANNER et al., 2006; DAWS et al., 2006), podendo esse efeito estar relacionado à continuação da maturação de sementes (TOMPSETT; PRITCHARD, 1998), ou, no caso de sementes poliembriônicas, à maturação de embriões.

É importante ressaltar que a melhor conservação de sementes úmidas de *C. reshni* (conteúdo de água de 36,9 e 24,2%) já foi relatada em trabalhos anteriores (FAWUSI et al., 1979; MARTINS et al., 2007), incluindo outras espécies desse gênero (CARVALHO et al., 2002a; KAYA et al., 2017). Períodos de armazenamento maiores que três meses tornam esta efeito mais evidente (CARVALHO et al., 2002a; MARTINS et al., 2007).

Adicionalmente, foi observado em pré-testes que sementes úmidas de *C. reshni* (40 - 25% de conteúdo de água) apresentaram 60% de germinação (plântulas normais) após armazenamento a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por nove meses. Já sementes dessecadas até 5 ou 3% perderam totalmente a viabilidade (dados não apresentados).

Bewley et al. (2013a) comentaram que normalmente é muito difícil discernir entre a tolerância à dessecação e a longevidade no estado seco, uma vez que estas duas propriedades estão frequentemente associadas. Nesta perspectiva, como a tolerância à dessecação em *C. reshni* não resultou em melhor conservação, pode-se sugerir que sementes desta espécie podem ser utilizadas em estudos para entender e distinguir estes dois mecanismos.

Por outro lado, Walters (2015) argumenta que os efeitos específicos tanto do dano por dessecação quanto pelo envelhecimento são semelhantes, assim como os respectivos mecanismos de proteção (VERTUCCI; FARRANT, 1995; WALTERS, 1998; BLACK et al., 2006; BERJAK; PAMMENTER, 2008; KRANNER et al., 2010), e propõe que a longevidade das sementes é, na verdade, uma manifestação da tolerância à dessecação no decorrer do tempo.

Neste modelo conceitual, a redução da germinação de sementes de *C. reshni* após o armazenamento com conteúdo de água de 5,5% poderia ser uma consequência das respostas celulares à dessecação ocorridas ao longo do armazenamento. Um exemplo destes eventos celulares seria o "relaxamento" durante o armazenamento da matriz vítrea protetora formada na dessecação (WALTERS, 2015).

Poliembrionia direta

O número de embriões por sementes variou de um a sete, com porcentagem de sementes com mais de um embrião igual a 75%. A maioria das sementes (57%) possuía dois ou três embriões e, apenas 18% possuíam mais de três embriões (Figura 4A).

A porcentagem de poliembrionia observada é igual à relatada por Kishore et al. (2012) mas inferior ao descrito por Andrade-Rodriguez et al. (2003) (entre 90 e 79%) e Soares Filho et al. (2014) (98%). Entretanto, estes últimos autores calcularam a poliembrionia em plantas submetidas a cruzamentos controlados. Ademais, outros fatores podem influenciar a variação da porcentagem de poliembrionia como cultivares, localidade, ano, tipo de polinizador, temperatura, umidade relativa do ar e ocorrência de ventos (SOARES FILHO et al., 1995; ANDRADE-RODRIGUEZ et al., 2003).

Independente do morfotipo, a maioria das sementes possuía um ou dois embriões grandes por semente (comprimento $\geq 7,0$ mm, Figura 4B). O número de embriões médios (comprimento entre 6,9 e 4,0 mm) variou de 0 a 1, sendo que a maioria das sementes não possuía esse tipo de embrião. Foi observado também que o número de embriões por sementes se elevou à medida que o número de embriões pequenos e muito pequenos aumentou (Figura 3B). Assim, quanto maior o número de embriões, maior foi a porcentagem de embriões pequenos (comprimento entre 3,9 e 2,0 mm) e muito pequenos (comprimento $< 2,0$ mm) existentes nas sementes (Figura 4C).

Esses embriões pequenos e muito pequenos se localizavam principalmente junto à região micropilar e apresentavam coloração esverdeada, sendo esta coloração mais intensa nos embriões menores. Além disso, mostravam-se mais frágeis e tenros. Tais observações concordam com Andrade-Rodriguez et al. (2003) que constataram embriões grandes com comprimentos entre 6 e 10mm e maioria dos embriões menores que 2mm, sendo esses últimos localizados principalmente na região micropilar (70% deles).

Verificou-se também que a maioria dos embriões pequenos ou muito pequenos estavam mortos e que quase nenhum deles, quando viável, era vigoroso (Figura 4D). Do mesmo modo, Raja et al. (2017) observaram que, em sementes poliembriônicas de *Citrus hytrix*, a maioria dos embriões menores não foi corado durante o teste de tetrazólio. Os poucos embriões muito pequenos viáveis foram observados em sementes armazenadas com o conteúdo de água inicial (Figuras 5A e 5B). Em sementes armazenadas com conteúdo de água mais baixo (5,5%) não ocorreram embriões muito pequenos, ou mesmo pequenos, viáveis (Figuras 5C e 5D).

Conteúdo de água e temperaturas de armazenamento

Após o armazenamento em câmara fria ($6 \pm 2^\circ\text{C}$), sementes mais úmidas (36,9 e 24,2% de conteúdo de água) conservaram-se melhor pois além de apresentarem maior porcentagem de plântulas normais (entre 85,0 e 83,8%), mostraram maior número de embriões grandes vigorosos ($\geq 7,0\text{mm}$) por sementes. O número médio de plântulas normais por semente também evidenciou essa melhor condição (Tabela 2).

Por outro lado, observando-se as medidas de germinação, pode-se constatar que sementes não dessecadas (36,9%) se mostraram mais vigorosas que as sementes com conteúdo de água de 24,2%, dado que apresentaram menor tempo médio, além de maior uniformidade no tempo e sincronia durante a germinação.

Ademais, o número de embriões viáveis e de embriões vigorosos por semente também foi maior nas sementes frescas (Tabela 2).

As sementes armazenadas com 11,3 e 5,5% de conteúdo de água e armazenadas em câmara fria apresentam também boa germinação (entre 73,8 e 70,0% de plântulas normais), embora menor que as das sementes com maiores conteúdos de água. Já as sementes secas (5,5% de conteúdo de água) armazenadas a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ tiveram a viabilidade reduzida em 50% durante os três meses de armazenamento, alcançando 42% de germinação ao final desse período (Tabela 2).

Outrossim, o número de plântulas normais por sementes foi intermediário para sementes com 11,3 e 5,5% de conteúdo de água armazenadas a $6 \pm 2^\circ\text{C}$, enquanto que as armazenadas em temperatura subzero mostraram os menores valores. Nestas últimas, a porcentagem de sementes com múltiplas plântulas normais foi nula, indicando que pode ter ocorrido morte de embriões nesta condição de armazenamento (Tabela 2). Observa-se também que, independente da temperatura de armazenamento, o número de embriões vigorosos por sementes e o número de embriões grandes viáveis foram menores nas sementes com 5% de conteúdo de água.

Estes resultados apontam que a temperatura de $6 \pm 2^\circ\text{C}$ é adequada para conservar as sementes de *C. reshni* por até três meses. Essa faixa de temperatura tem sido utilizada com sucesso em outros trabalhos com sementes dessa espécie (VILLEGAS-MONTER; ANDRADE RODRÍGUEZ, 2005) e também para outras espécies do gênero *Citrus* (HONG; ELLIS, 1996). Essa é também a faixa de temperatura atualmente utilizada pelos produtores de sementes durante o armazenamento em câmara fria (FIORESE, 2014; GRAF, 2015), porém alguns preferem temperaturas mais baixas, $4 \pm 2^\circ\text{C}$ (LIMA, 2014).

Neste experimento são também evidentes as indicações de que as sementes mais úmidas (36,9 e 24,2% de conteúdo de água) se conservam melhor e mais

vigorosas que as mais secas. Isso sugere que terão maior longevidade no armazenamento em câmara fria. Entretanto, outros aspectos como ocorrência de fungos de armazenamento, tão comum em sementes cítricas (CARVALHO et al., 2002a; SILVA et al., 2011; CARVALHO et al., 2013), podem reduzir este potencial. Além disso, ao final do período de armazenamento foi observado que 2% das sementes com maior conteúdo de água (36,9%) apresentavam fungos na superfície do tegumento externo. Dessa forma, torna-se importante refinar a faixa de temperatura e conteúdo de água mais adequados para o armazenamento (com uso ou não de fungicidas), levando-se em conta períodos mais longos.

Por outro lado, semente secas (conteúdo de água $\leq 15\%$), podem tornar-se sensíveis a danos por embebição (SACANDÉ et al., 2004). Essa sensibilidade tem sido relacionada à coalescência de corpos lipídicos durante a hidratação (HUANG, 1992; LEPRINCE et al., 1998). Em *Citrus. suhuiensis*, o pré-umedecimento lento, a embebição em alta temperatura ou a imersão em água quente evitaram estes danos (MAKEEN et al., 2007). Em contraste, o pré-umedecimento de sementes *C. reshni* foi desfavorável pois reduziu a germinação de sementes recém-dessecadas até 5 e 3% de conteúdo de água (GONÇALVES et al., 2015). Contudo, não se pode descartar a possibilidade de neste presente trabalho terem ocorrido danos por embebição em sementes *C. reshni* testadas após o armazenamento, pois normalmente a sensibilidade a este tipo de dano eleva-se com a idade da semente, especialmente após o armazenamento a baixas temperaturas (SACANDÉ et al., 2001; SACANDÉ et al., 2004).

Efeitos negativos do armazenamento a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ ocorrem também em outras sementes ricas em lipídeos como uma espécie de *Cuphea carthagenesis* (CRANE et al., 2006), e espécies silvestres australianas do gênero *Citrus* (HAMILTON et al., 2009), sendo que esse comportamento tem sido associado com o estado conformacional dos lipídeos e particularmente à cristalização a -18°C (CRANE et al., 2006).

No presente estudo, durante a avaliação do teste de tetrazólio de sementes de *C. reshni* armazenadas a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$, constatou-se que a maior parte das áreas descoloridas não estava localizada nos eixos embrionários, mas sim nos cotilédones, sendo observados inclusive embriões com o eixo colorido e cotilédones totalmente descoloridos (Figura 6). Como corpos lipídicos são abundantes em cotilédones de sementes cítricas (HAMILTON et al., 2007), esses danos nos cotilédones podem estar relacionados a cristalização de lipídeos. De acordo com Hamilton et al. (2009), a temperatura de início de fusão dos lipídeos de sementes de *Citrus australasica*, *C. inodora* e *C. garrawayi* variou entre -14 e -20°C e, por conseguinte, o armazenamento a longo prazo das sementes dessas espécies à temperatura de -20°C não é aconselhável, recomendando-se que o armazenamento em bancos de germoplasma seja realizado em nitrogênio líquido (HAMILTON et al., 2009). Assim sendo, essa é provavelmente a melhor opção também para as sementes de *C. reshni*. Nessa direção, a criopreservação de sementes e eixos embrionários tem sido realizada com sucesso em outras sementes cítricas (LAMBARDI et al., 2004; HAMILTON et al., 2009; KAYA et al., 2017).

Classificação do comportamento no armazenamento

Os resultados da secagem de sementes de *C. reshni* mostraram que elas foram tolerantes à dessecação até 5% de conteúdo de água. Gonçalves et al. (2017) também constataram que essas sementes podem ser dessecadas até conteúdos de água mais baixos (3%) sem prejuízo imediato na germinação. Consequentemente, pode-se afirmar que as sementes de tangerina Cleópatra não são recalcitrantes.

De acordo com o protocolo de Hong e Ellis (1996), quando as sementes são tolerantes à dessecação, a distinção entre sementes ortodoxas ou intermediárias deve ser feita por meio do armazenamento a -20°C por três meses. Se a maioria ou todas as sementes morrerem, trata-se provavelmente de sementes

intermediárias. Caso a maioria sobreviva, provavelmente trata-se de sementes ortodoxas.

Dado que, após armazenamento nessas condições, as sementes de *C. reshni* tiveram a germinação reduzida em 50% (de 84% para 42% de plântulas normais), não se pode afirmar categoricamente que a maioria das sementes perdeu a viabilidade. Conseqüentemente, não podem ser classificadas utilizando-se o protocolo de Hong e Ellis (1996). Porém, como a diminuição da germinação foi alta em um curto período de tempo, há indicações de que o armazenamento a longo prazo nessas condições não é recomendado para esta espécie. Além disso, essas sementes apresentaram a mais baixa sincronia de germinação, mostrando que durante o armazenamento houve queda do vigor das mesmas. Isso indica que estas sementes são provavelmente intermediárias.

Adicionalmente, verifica-se que a porcentagem de sementes com múltiplas plântulas normais foi menor a $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ que nas outras condições de armazenamento. Aliás, esta porcentagem foi nula, ou seja, não ocorreram sementes com mais de uma plântula normal após armazenamento em temperatura negativa, o que também sugere a mesma classificação (Tabela 2).

As sementes ortodoxas além de tolerarem a dessecação na maturidade, mostram maior longevidade quando armazenadas com baixo conteúdo de água (HONG; ELLIS, 1996; BEWLEY et al., 2013b; WALTERS, 2015). Desta forma, outra indicação de que as sementes de tangerina Cleópatra provavelmente não são ortodoxas, está na constatação de que após o armazenamento a $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por três, não houve maior germinação em sementes com conteúdo de água de 5,5% do que em sementes com 11,3% de conteúdo de água (Tabela 2). Além do mais, as sementes com 5,5% de conteúdo de água apresentaram menor número de embriões grandes viáveis e menor número de embriões grandes vigorosos.

Por outro lado, ressalta-se que o conceito original de sementes ortodoxas utiliza um modelo matemático que mostra uma relação logarítmica negativa entre a

longevidade e o conteúdo de água, ou seja, observa-se aumento da longevidade com a redução do conteúdo de água em uma dada temperatura (HONG; ELLIS, 1996; WALTERS, 2015). Entretanto, aplicação dessa relação matemática está limitada a determinada faixa de conteúdo de água (ROBERTS; ELLIS, 1989; HONG; ELLIS, 1996; WALTERS, 2015). Acima desta faixa, cujo limite superior situa-se, dependendo da espécie, entre 15 e 28% de conteúdo de água, a longevidade das sementes no armazenamento hermético não é mais reduzida com a elevação do conteúdo de água (ELLIS; ROBERTS, 1977; ROBERTS; ELLIS, 1982; IBRAHIM; ROBERTS, 1983; TOMPSETT, 1986; ZEWDIE; ELLIS, 1991; WALTERS, 2015). Por consequência, a maior viabilidade observada nas sementes de *C. reshni* com alto conteúdo de água ($\geq 24,2\%$ b.u.) (Tabela 2), não possibilita inferências sobre o comportamento pós-colheita de sementes desta espécie.

Assim, o comportamento das sementes de *C. reshni* durante o armazenamento é mais próximo das sementes classificadas como intermediárias, porém apenas experimentos com armazenamento maior tempo de duração, especialmente em temperaturas em torno de -20°C , poderão confirmar esta classificação. Desta forma, embora o protocolo proposto por Hong e Ellis (1986) seja útil e vantajoso por ser relativamente rápido (armazenamento por apenas três meses), apresenta limitações, inclusive as relacionadas a esta vantagem. Além disso, embora a classificação em uma das três categorias de armazenamento seja importante para gestão de bancos de germoplasma, esta é uma classificação funcional, que não abarca necessariamente toda a diversidade de comportamentos fisiológicos existentes nas espécies e ecótipos de sementes existentes na natureza, dado que, conforme ressaltado por Walters (2015), não considera o amplo espectro de respostas das sementes ao estresse da dessecação e a sobrevivência em condições anidras.

CONCLUSÕES

As sementes de *C. reshni* foram tolerantes à dessecação, podendo ser dessecadas até 5,5% de conteúdo de água, sem alteração na porcentagem, velocidade e uniformidade da germinação. Quando armazenadas com conteúdo de água entre 36,9% (sementes frescas) e 5,5% a $6 \pm 2^\circ\text{C}$ por três meses, mantiveram-se com germinação próxima à das sementes frescas. Nestas condições, o armazenamento de sementes mais úmidas (36,9% e 24,2) foi mais vantajoso, pois, além germinação mais elevada, apresentaram maior número de plântulas normais por sementes e mais embriões grandes vigorosos, destacando-se as sementes armazenadas frescas pelo vigor (maior sincronia e menor tempo de germinação e mais embriões vigorosos). Entretanto, sementes mais secas de *C.resnhi* apresentaram pequena redução na germinação após armazenamento a $6 \pm 2^\circ\text{C}$ e, adicionalmente, houve redução de 50% da porcentagem de plântulas normais após armazenamento a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$, o que revela um comportamento mais próximo ao de sementes intermediárias.

REFERÊNCIAS

ALEZA, P.; JUÁREZ, J.; OLLITRAULT, P.; NAVARRO, L. Polyembryony in non-apomitic citrus genotypes. **Annals of Botany**, Oxford, v.106, n.4, p.533-545, 2010.

ANDRADE-RODRÍGUEZ. M.; VILLEGAS-MONTER Á.; GARCÍA-VELÁZQUEZ; A. Características morfológicas del fruto y poliembriónía de tres porta injertos de cítricos. **Revista Chapingo**, Serie Horticultura, Chapingo, v.9, n.2, p.255-263, 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS (AOSA); SOCIETY OF COMMERCIAL SEED TECHNOLOGISTS (SCST). **Tetrazolium Testing Handbook**, 2010. Disponível em:
<<http://www.aosaseed.com/publications.htm#Tetrazolium%20Testing%20Handbook>>. Acesso em: 3 dez. 2016.

ASHMORE, S.E.; HAMILTON, K.N.; OFFORD, C.A. Conservation technologies flora: Case studies from eastern Australia. **In vitro Cellular & Development Biology Plant**, Sydney, v.47, p.99-109, 2011.

BARBEDO, C.J.; CENTENO, D.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Do recalcitrant seeds really exist? **Hoehnea**, São Paulo, v.40, n.4, p.583-593, 2013.

BERJARK, P.; PAMMENTER, N.W. From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, Oxford, v.101, n.2, p.213-228, 2008.

BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.N.M.; NONGAKI, H. Development and Maturation IN: BEWLEY, J.D. **Seeds: physiology of**

development, germination and dormancy. 3rd ed. New York: Springer, 2013a. p.27-83.

BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.N.M.; NONGAKI, H. Longevity, Storage, and Deterioration. IN: BEWLEY, J.D. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3rd ed. New York: Springer, 2013b. p.341-376.

BLACK, P.; BEWLEY, J.D.; HALMER, P. **The encyclopedia of seeds**. Science, technology and uses. Wallingford: CAB International, 2008. 900p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lei 10.711 - Lei de Sementes e Mudanças, de 5 agosto de 2003**. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF. 2003. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/L10.711.htm>. Acesso em: 5 jan. 2017.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº48 de 24 de setembro de 2013**. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF. 2013. Disponível em: <http://www.lex.com.br/legis_24871657_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_48_DE_24_DE_SETEMBRO_DE_2013.aspx>. Acesso em 04 jan. 2017.

CARUSO, M.; DISTEFANO, G.; PIETRO, D.; LA MALF, P.F.; RUSSO, G.; GIUSEPPE, A.G.G.; RECUPERO, R. High-resolution melting analysis for early identification of citrus hybrids: A reliable tool to overcome the limitations of

morphological markers and assist rootstock breeding. **Scientia Horticulturae**, v.180, p.199-206, 2014.

CARVALHO, J.A.; VON PINHO, E.V.R.; OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M.; BONOME, L.T. Qualidade de sementes de limão-cravo (*Citrus limonia* Oesbeck) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.24, n.1, p.286-298, 2002a

CARVALHO, J.A.; VON PINHO, E.V.R.; OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M.; BONOME, L.T. Testes rápidos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de citrumelo Swingle. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.24, n.1, p.263-270, 2002b.

CARVALHO, S.A.; GRAF, C.C.D.; VIOLANTE, A.R. Produção de material básico e propagação. In: MATTOS JR., D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JR., J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. p. 279-316.

CARVALHO, S.A.; SILVA, L.F.C. Monitoring the viability of *Citrus* rootstocks seeds stored under refrigeration. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.35, n.1, p.238-245, 2013.

CITRUSBR. **Produção de laranja e suco**. Disponível em:

<<http://www.citrusbr.com/exportadores-citricos/setor/producao-192415-1.asp>>.

Acesso em: 01 de mai. 2013.

CRANE, J.; KOVACH, D; GARDNER, C.; WALTERS, C. Triacylglycerol phase and 'intermediate' seed physiology: a study of *Cuphea carthagenesis*. **Planta**, v.223, n.5, p.1081-1089, 2006.

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

DAWS, M.I.; CLELAND, H.; CHMIELARZ, P.; GORIAN, F.; LEPRINCE, O.; MULLINS, C.E.; THANOS, C.A.; VANDVIK, V.; PRITCHARD, H.W.

Variable desiccation tolerance in *Acer pseudoplatanus* seeds in relation to developmental conditions: a case of phenotypic recalcitrance? **Functional Plant Biology**, v.33, p.59–66, 2006.

DURAN-VILA, N. Cryoconservation of germplasm of Citrus. In: BAJAJ, Y.P.S. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 32. Cryopreservation of Plant Germplasm*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1995. pp. 70-85.

ELLIS, R.H.; ROBERTS, E.H. A revised viability monograph for onion. **Seed Research**, v.5, p.93-103, 1977.

FAWUSI, M.O.A. Viability of citrus seeds as influenced by the methods of drying and storage temperatures. **Nigerian Journal Science**, Ibadan, v.13, n.2, p.313-322, 1979.

FAWUSI, M.O.A. Seed germination, emergence, biochemical changes and early seedling performance in Cleopatra mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) following controlled environment storage. **Biotronics**, v.18, p.29-35, 1989.

FERREIRA, E.B.; CAVALCANTI, P.P.; NOGUEIRA, D.A. **Expdes.PT: Experimental designs package** (portuguese). R Package Version 1.1.2. 2013. Alfenas: UNIFAL. 237p.

FIGOIRESE, H. **Extração e conservação de sementes cítricas** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por e-mail <henrique@figoiresecitrus.com.br> em 16 set. 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATION.

Citrus fruit fresh and processed statistical bulletin 2016. Disponível em:
<<http://www.fao.org/3/a-i8092e.pdf>>. Acesso em: 8 de ago. 2017.

FOX, J.; WEISBERG, S. **An {R} Companion to Applied Regression.** 2 ed.

Thousand Oaks CA: Sage, 2011. Disponível em:

<<http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>>. Acesso em 12 fev. 2017.

GONÇALVES, M.I.F.G.; FARIA, J.M.R.; SANTANA, D.G.; TONETTI, O.A.O.; JOSÉ, A.C.; PELISSARI, F.; CARVALHO, G.P. Dessecação e pré-umedecimento na sobrevivência de sementes de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 19º, 2015, Foz de Iguaçu, Informativo Abrates, v.25, n.2, 2015. **CD-ROM.**

GONÇALVES, M.I.F.G.; FARIA, J.M.R.; JOSÉ, A.C.; TONETTI, O.A.O.; MARQUES, E.R. Desiccation tolerance and antioxidant enzymatic activity in *Citrus reshni* seeds exposed to various drying rates. **Seed Science and Technology**, v.45, n.2, p.1-17, 2017.

GRAF, C.C.D. **Sementes porta-enxertos** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por e-mail <cesargraf@citrograf.com.br> em 03 mar. 2015.

HAMILTON, K.N.; ASHMORE, S.E.; DREW, R.A.; PRITCHARD, H.W. Seed morphology and ultrastructure in *Citrus garrawayi* (Rutaceae) in relation to germinability. **Australian Journal of Botany**, Sidney, v.55, n.6, p.618-627, 2007.

HAMILTON, K.M.; ASHMORE, S.E.; PRICHARD, H.W. Thermal analysis and dryopreservation of seeds of Australian wild *Citrus* species (Rutaceae): *Citrus australasica*, *C. inodora* and *C. garrawayi*. **CryoLetters**, v.30, p.268-279, 2009.

HONG, T.D.; ELLIS, R.H. **A Protocol to determine seed storage behavior**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 78p.

HOR, Y.L.; KIM, Y.J.; UGAP, A.; CHABRILLANGE, N.; SINNIHAH, U.R.; ENGELMANN, F.; DUSSERT, S. Optimal hydration status for cryopreservation of intermediate oily seed: *Citrus* as a case study. **Annals of Botany**, Oxford, n. 95, n.7, p.1153-1161, 2005.

HUANG, A.H.C. Oil bodies and oleosins in seeds. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.177–200, 1992.

IBRAHIM, A.E.; ROBERTS, E.H.; MURDOCH, A.J. Viability of lettuce seeds. II. Survival and oxygen uptake in osmotically controlled storage. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.34, p.631-640, 1983.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). **International rules for seed testing**. Switzerland: International Seed Testing Association. 2016. 126p.

KAYA, E.; SOUZA, F.V.D.; GÖKDOĞAN, E.Y.; CEYLAN, M.; JENDEREK, M.M. Cryopreservation of *citrus* seed via dehydration followed by immersion in liquid nitrogen. **Turkish Journal of Biology**, Baloğlu, v.41, n.1, p.1603-1692, 2017.

KEPIRO, J.; ROOSE, M. AFLP markers closely linked to major gene essential for nuclear embryony (apomixes) in *Citrus maxima* x *Poncirus trifoliata*. **Tree Genetic & Genomes**, v.6, n.1, p.1-11, 2009.

KHAN, M.M.; ALM, M.A.; ABBAS, M.; IQBAL, M.J. Studies on seed desiccation tolerance in four *Citrus* species. **Pakistan Journal Agricultural Science**, Faisalabad, v.40, n.1-2, p.55-62, 2003.

KING, M. W.; ROBERTS, E. H. The desiccation response of seeds of *Citrus limon* L. **Annals of Botany**, Oxford, v.45, n.4, p.489-492, 1980.

KISHORE, K.; MONIKA, N.; RINCHEN, D.; LEPCHA, B., PANDEY, B. Polyembryony and seedling emergence traits in apomictic *citrus*. **Scientia horticulturae**, v. 138, p.101-107, 2012.

KRANNER, I.; BIRTIĆ, S.; PRITCHARD, H.W. Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress markers and modulator of programmed cell death? **Free Radical Biology and Medicine**, v.40, n.12, p.2155-2165, 2006.

KRANNER, I.; MINIBAYEVA, F.V.; BECKETT, R.P.; SEAL, C.E. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, v.188, n.3, p.655-673, 2010.

LAMBARDI, M.; DE CARLO, A.; BIRICOLTI, S.; PUGLIA, A.M.; LOMBARDO, G.; SIRAGUSA, M.; DE PASQUALE, F. Zygotic and nucelar embryo survival following dehydration/ciopreservation of *Citrus* intacts seeds. **CryoLetter**, v.25, n.2, p.81-90, 2004.

LEPRINCE O.; VAN AELST A.C.; PRITCHARD H.W.; MURPHY D.J. Oleosins prevent oil-body coalescence during seed imbibition as suggested by a low-temperature scanning electron microscope study of desiccation-tolerant and -sensitive oilseeds. **Planta**, v.204, n.1, p.109–119, 1998

LIMA, J.E. **Conservação sementes porta-enxertos**. [mensagem pessoal] Mensagem recebida por <joseeduardo@citrolima.com.br>17 mai. 2014.

MAKEEN, M.A.; NORMAH, M.N.; DUSSERT, S.; CLYDE, M.M. The influence of desiccation and rehydration on survival of polyembryonic seed of *Citrus suhuiensis* cv. *Limau madu*. **Science Horticulturae**, v.58, n.4, p.1463-1170, 2007.

MARCOS FILHO, J. Condicionamento fisiológico de sementes. In: MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Londrina: ABRATES, 2015. p.495-561.

MARTINS, L.; SILVA, W.R. Comportamento fisiológico de sementes de tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) submetidas à desidratação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.1, p.8-10, 2006.

MARTINS, L.; SILVA, W.R.; LAGO, A.A. Conservação de sementes de tangerina 'Cleopátra': teor de água e temperatura do ambiente. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.29, n.1, p.178-185, 2007.

MATTOS JUNIOR, DE NEGRI, J.D.; FIGUEIREDO, J.O.; POMPEU JUNIOR, J.; GHILARDI, A.A.; AZEVEDO, F.A.; BASTIANEL, M. CITROS: principais informações e recomendações de cultivo. In: AGUIAR, A.T.E.; GONÇALVES, C.; PATERNIANI, M.E.A.G; TUCCI, M.L.S.; CASTRO, C.E.F. **Instruções Agrícolas para as Principais Culturas Econômicas**, Boletim Técnico, 200, 7. Ed. CAMPINAS: IAC, 2014. p.140-149.

MOREIRA, S.; GURGEL, J.T.A.; ARRUDA, L.F. de. Poliembrionia em *citrus*. **Bragantia**, Campinas, v.7, n.3, p.1-37, 1947.

MUMFORD, P.M.; PANGGABEAN, G. A comparison of the effects of dry storage on seeds of *Citrus* species. **Seed Science and Technology**, v.10, p.257-26, 1982.

R Development Core Team. **R A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2016. 578p.

RAJA, K. Polymorphism influences seed viability and vigour in polyembryonic Kaffir lime (*Citrus hystrix*) seeds. **Seed Science and Technology**, v.45, n.1, p.189-197, 2017.

RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.29, n.1, p.1-11, 2006.

RANAL, M.A., SANTANA, D.G.; FERREIRA, W.R.; MENDES-RODRIGUES, C. Calculating germination measurements and organizing spreadsheets. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.32, n.4, p. 849-855, 2009.

ROBERTS, E.H.; ELLIS, R.H. Physiological, ultrastructural and metabolic aspects of seed viability. In: KHAN, A.A. **The Physiology and Biochemistry of Seed Development Dormancy and Germination**. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1982. p.465-485.

ROBERTS, E.H.; ELLIS, R.H. Water and seed survival. **Annals of Botany**, Oxford, v.63, n.2, p.39-52, 1989.

ROYAL BOTANIC GARDENS KEW. **Seed Information Database (SID)**. Version 7.1, 2015. Disponível em: < <http://data.kew.org/sid/>>. Acesso em: 11 abr. 2017.

SACANDÉ, M.; JØKER, D.; DULLOO, M.E.; THOMSEN, K.A. **Comparative storage biology of tropical tree seeds**. Rome: IPGRI, 2004. 363p.

SILVA, T.T. DE A.; GUIMARÃES, R.M.; VON PINHO, E.V.R.; ABREU, L.A.S. Storage of 'Swingle' citrumelo seeds in different maturation stages subjected to fungicide treatment. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.33, n.4, p.770-778, 2011.

SOARES FILHO, W.S.; LEE, L.M.; CUNHA SOBRINHO, A.P. Influence of pollinators on polyembryony in *Citrus*. **Acta Horticultural**, Korbeek-Lo, v.403, n.2, p.256-265, 1995.

SOARES FILHO, W.S.; SOUZA, U.; LEDO, C.A.S.; SANTANA, L.G.; PASSOS, O.S. Poliembryonia e potencial de obtenção de híbridos em citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.36, n.4, p.950-956, 2014.

TOMPSETT, P.B. 1986. The effect of temperature and moisture content on the longevity of seeds of *Ulmus carpinifolia* and *Terminalia brasii*. **Annals of Botany**, Oxford, v.57, n.6, p.875-883, 1986.

TOMPSETT, P.B.; PRITCHARD, H.W. The effect of chilling and moisture status on the germination, desiccation tolerance and longevity of *Aesculus hippocastanum* l. seed. **Annals of Botany**, Oxford, v.82, n.2, p.249-261, 1998.

USBERTI, R.; FELIPE, G.M. Viabilidade de sementes de *Citrus limonia* Osb. com baixo teor de umidade, armazenadas em diferentes temperaturas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.15, n.4, p.393-397, 1980.

VERTUCCI, C.W.; FARRANT, J.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL J; GALELI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p.237-271.

VERTUCCI, C.W.; LEOPOLD, A.C. Physiological activities associated with hydration level in seeds. In: LEOPOLD, A.C. **Membranes, metabolism and dry organisms**. Ithaca: Comstock Publishing Co, 1989. p.35-49.

VILLEGAS-MONTER, A.; ANDRADE-RODRÍGUEZ, M.A. Secado y almacenamiento de semillas de mandarina 'Cleopatra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.1, p.79-80, 2005.

WALTERS, C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. **Seed Science Research**, Cambridge, v.8, n.2, p.223-244, 1998.

WALTERS, C. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. **Planta**, v. 242, n.2, p.397-406, 2015.

WEN, B.; CAI, C.; WANG, R.; TAN Y.; QINYING L. Critical moisture content windows differ for the cryopreservation of pomelo (*Citrus grandis*) seeds and embryonic axes. **CryoLetters**, v.31, n.1, p.29-39, 2010.

ZEWDIE, M.; ELLIS, R.H. The upper-moisture-content limit to negative relations between seed longevity and moisture in niger and tef. **Seed Science and Technology**, v.19, p.295-302, 1991.

Tabela 1. Conteúdo de água (% base úmida) de sementes de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*), antes e após extração, secagem e armazenamento por três meses.

Conteúdo de água-alvo	Conteúdo de água (método da estufa $103 \pm 2^\circ\text{C}$)			
	Antes do processamento	Após processamento	Após armazenamento por três meses	
			$6 \pm 2^\circ\text{C}$	$-20 \pm 2^\circ\text{C}$
Sem secagem				
(Inicial)	36,6	36,9*	35,5	-
25	-	24,2	23,7	-
12	-	11,3	11,7	-
5	-	5,5	5,3	5,7

*Tratamento controle (sementes frescas), mantidas com conteúdo de água obtido após processamento.

Tabela 2. Germinação, poliembrionia, viabilidade e vigor de embriões de sementes de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*) após armazenamento por três meses.

Condição de armazenamento		Plântulas normais (%)	Múltiplas plântulas normais (%)	Plântulas normais/ semente	Tempo médio de germinação (dias)	Coeficiente de variação do tempo (%)	Sincronia (%)	Embriões /semente	Embriões viáveis/ semente	Embriões vigorosos/ semente	Embriões grandes/ semente	Embriões grandes viáveis/ semente	Embriões grandes vigorosos /semente
Conteúdo de água inicial (% b.u.)	Temperatura (°C)												
36,9 (sem secagem)	6 ±2	83,8a	21,3a	0,86a	26,25b	21,13c	0,44a	3,15a	2,25a	1,70a	1,15a	1,15a	1,10a
24,2	6 ±2	85,0a	28,8a	0,93a	37,33a	64,38b	0,25b	2,70a	1,25b	0,90b	1,15a	1,00a	0,80a
11,3	6 ±2	73,8b	13,8a	0,71b	39,25a	82,78a	0,23b	2,85a	1,35b	0,75b	1,00a	1,00a	0,60b
5,5	6 ±2	70,0b	20,0a	0,74b	38,02a	57,19b	0,26b	2,00a	1,05b	0,50c	1,00a	0,75b	0,40b
5,5	-20 ± 2	42,0c	0,0b	0,42c	38,49a	75,89a	0,14c	2,05a	0,70b	0,35c	1,00a	0,55b	0,25b
CV (%)		11,44	43,77	13,86	5,48	17,74	22,08	25,56	25,95	31,65	20,38	24,79	44,71

CV= coeficiente de variação; b.u = base úmida. Médias seguidas de mesma letra nas colunas não são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knott (P < 0,5).

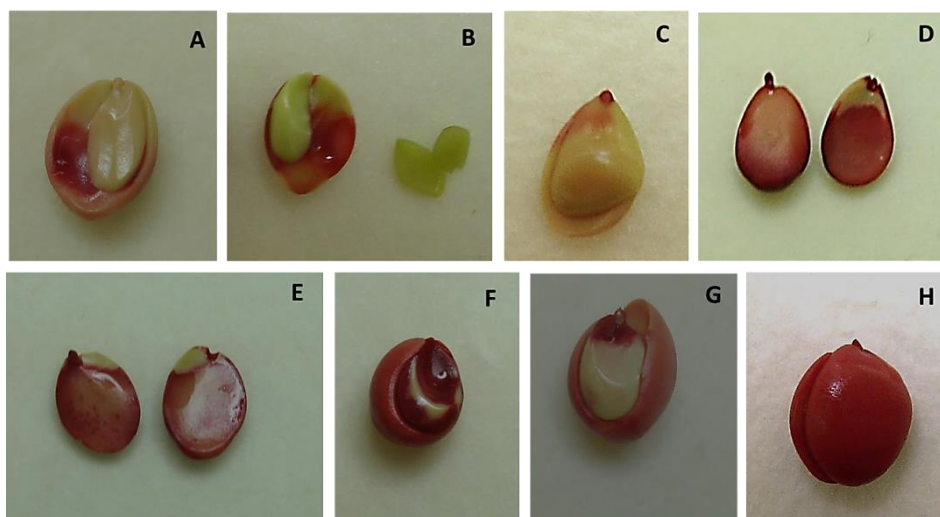


Figura 1. Critérios para avaliação de embriões de sementes de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*), sendo embriões não viáveis (A, B, C, D), embriões viáveis não vigorosos (E, F, G) e embrião viável vigoroso (H).

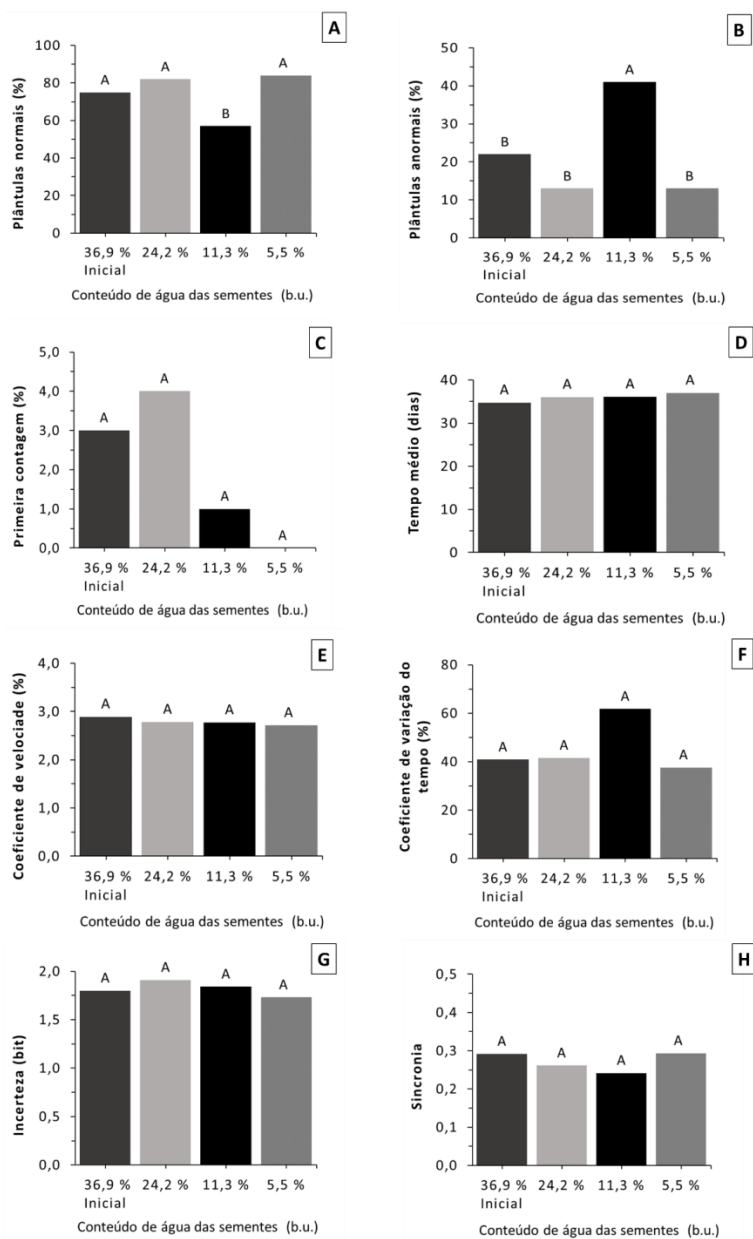


Figura 2. Germinação de sementes de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*) logo após secagem (tempo de armazenamento = 0). Médias seguidas da mesma letra, em cada conteúdo de água (% base úmida), não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

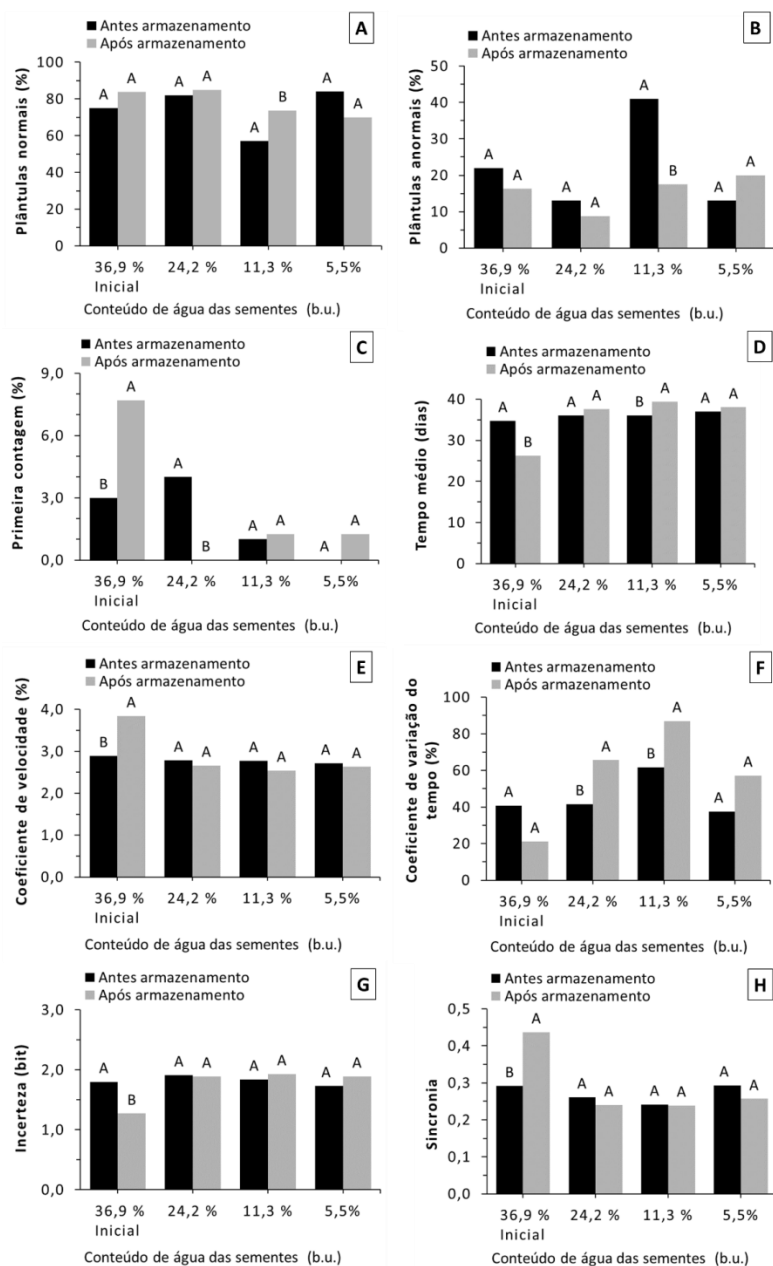


Figura 3. Germinação de sementes de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*) antes e após armazenamento por três meses a $6 \pm 2^\circ\text{C}$. Médias seguidas da mesma letra, em cada conteúdo de água (b.u.= base úmida), não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

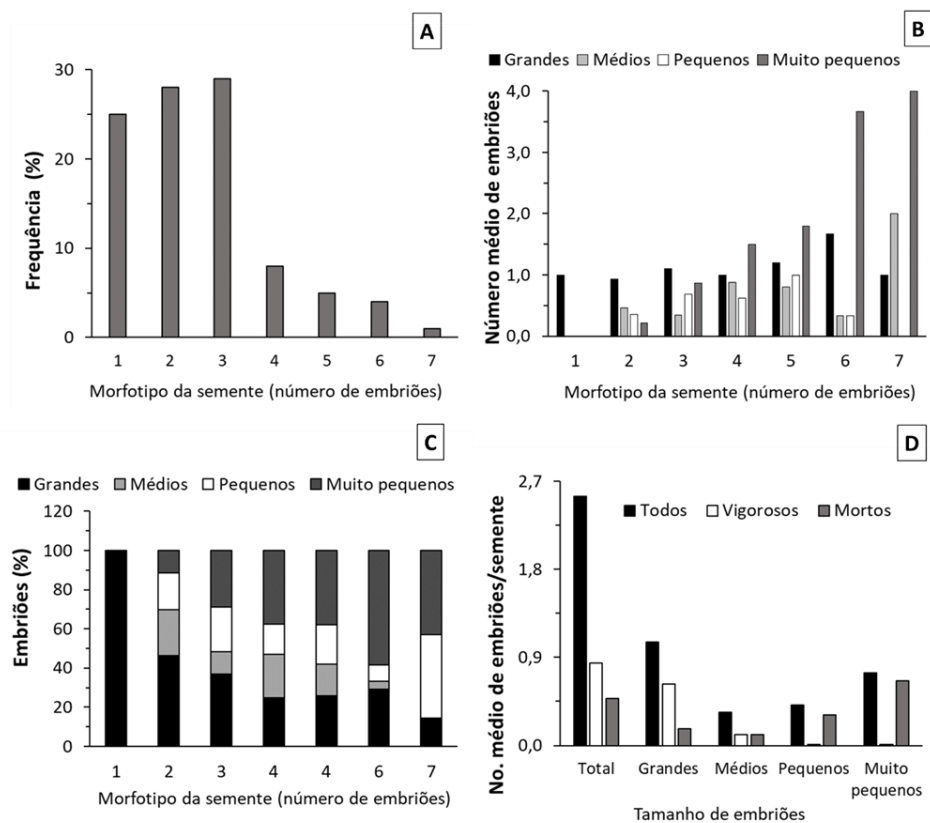


Figura 4. Poliembria de sementes de sementes de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*) após armazenamento por três meses a $6 \pm 2^\circ\text{C}$ em diversos conteúdos de água e a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ com conteúdo de água de 5%. Dados referem-se à média de todos os tratamentos.



Figura 5. Sementes poliembriônicas de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*), após armazenamento por três meses com conteúdo de água inicial (A e B), mostrando embriões muito pequenos e vigorosos (A) e muito pequenos viáveis (B, o primeiro e o segundo da direita para esquerda) e inviáveis (B, o terceiro e o quarto da direita para esquerda), e com 5% a $6 \pm 2^\circ\text{C}$ (C) e a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ (D) por três meses, mostrando embriões pequenos e muito pequenos inviáveis.



Figura 6. Embriões de sementes de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*) após armazenamento com conteúdo de água de 5% por três meses a $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, apresentando áreas descoloridas nos cotilédones e eixos embrionários coloridos em embriões viáveis (A e B) e inviáveis (C e D).

**ARTIGO 3 - VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA TESTES DE
GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE PORTA-ENXERTOS DE CITROS**

Artigo com a formatação baseada nas normas para submissão do
periódico *Journal of Seed Science*

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA TESTES DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE PORTA-ENXERTOS DE CITROS

MARIA IZABEL FURST GONÇALVES^{1*}, JOSÉ MARCIO ROCHA FARIA², DENISE GARCIA DE SANTANA, ANDERSON CLEITON JOSÉ³, OLÍVIA ALVINA OLIVEIRA TONETTI⁴.

RESUMO - A germinação de sementes dos porta-enxertos tangerina Cleópatra limão-cravo, citrumelo e trifoliata é dificultada pela lentidão, contaminação e poliembrionia. Não há metodologia descrita para teste de germinação destas sementes nas regras para análise brasileiras e ou em regras internacionais. Assim, objetivou-se determinar as condições ótimas para germinação das sementes destes porta-enxertos, para desenvolver e validar métodos para teste de germinação, além de descrever a germinação, estruturas essenciais e as principais anormalidades das plântulas. Lotes com procedências e qualidades diversas foram utilizados em experimentos que estudaram o efeito da luz, temperatura e tratamentos pré-germinativos, também, para descrever a germinação. Quando os resultados foram conclusivos, foram propostas metodologia para testes de germinação. Realizaram-se ensaios interlaboratoriais com sementes de tangerina Cleópatra e limão-cravo, utilizando amostras de sementes com qualidade alta, média e baixa para validar os métodos propostos. Concluiu-se que: a) as sementes dos porta-enxertos tangerina Cleópatra, limão-cravo e citrumelo germinam melhor nas temperaturas de 25 e 30°C, com a temperatura mais alta proporcionando germinação mais rápida de sementes de limão-cravo; b) as sementes destes três porta-enxertos, assim como as de trifoliata são fotoblásticas neutras; c) substratos muito úmidos (quantidade de água > que 73% da capacidade de retenção do substrato) não são adequados,

¹ Doutora em Ciências Florestais. E-mail: izabelfurst@hotmail.com.

² Doutor em Biologia de Sementes. E-mail: jmfaria@dcf.ufla.br.

³ Doutor em Ciências Florestais. E-mail: acjose@dcf.ufla.br.

⁴ Doutora em Ciências Florestais. E-mail: oaotonetti@gmail.com

para testes de germinação, em rolo do papel destas espécies, podendo provocar mortalidade e aumentar o tempo de germinação de sementes de tangerina Cleópatra; d) não é vantajoso realizar tratamento pré-germinativo das sementes de tangerina Cleópatra, limão-cravo, citrumelo e trifoliata, com hipoclorito 1% por 15 minutos; e) a imersão de sementes de citrumelo em água com umidade inicial de 40°C foi favorável, pois proporcionou maior porcentagem de plântulas normais na primeira contagem e não provocou anormalidades; f) a germinação das sementes destes quatro porta-enxertos foi do tipo criptocotiledonar hipogea e as estruturas essenciais das plântulas são a raiz primária, hipocótilo, cotilédones, epicótilo, folhas primárias e gema apical; as anormalidades mais frequentes são na raiz primária. g) apenas a metodologia proposta, para os testes de germinação de sementes do porta-enxerto limão-cravo, obteve bons coeficientes de variação de repetitividade, reprodutibilidade e ótimo coeficiente de variação de R&R e foi considerada válida para incorporação às regras para análise.

Termos para indexação: *Citrus. reshni*; *Citrus.limonia*; *Poncirus trifoliata*, *Citrus paradisi x Poncirus.trifoliata*.

VALIDATION OF METHODOLOGY FOR GERMINATION TESTS OF CITRUS ROOTSTOCKS SEEDS

ABSTRACT - The germination of the seeds rootstocks of Cleopatra mandarin, rangpur lime, citrumelo and trifoliata are hampered by slowness, contamination and polyembryony. There is no methodology described for the germination test of these seeds in the rules for Brazilian analysis or in international ones. The objective was to determine the optimal conditions for these rootstocks seed germination, to develop and validate methods for germination testing, as well as

to describe the germination, essential structures and main seedling abnormalities. Provenances and diverse qualities lots were used in experiments that studied the light effect, temperature and pre-germination treatments, also to describe the germination. When the results were conclusive, a methodology for germination tests was proposed. Interlaboratory tests were performed with seeds of Cleopatra mandarin and rangpur lime using high, medium and low quality seed samples to validate the proposed methods. We concluded that: a) these seeds of the rootstocks Cleopatra mandarin, rangpur lime and citrumelo germinate better at temperatures of 25 and 30 ° C, with the highest temperature providing faster germination of rangpur lime seeds; b) the seeds of these three rootstocks, as well as those of trifoliata, are neutral photoblasts; c) very wet substrates (amount of water > 73% of the retention capacity of the substrate) are not suitable for roll germination tests, which can cause mortality and increase the germination time of Cleopatra mandarin seeds; d) it is not advantageous to perform pre-germinative treatment of Cleopatra mandarin seeds, rangpur lime, citrumelo and trifoliata, with hypochlorite 1% for 15 minutes; e) immersion of citrumelo seeds in water with initial moisture of 40 ° C was favorable, as it provided a higher percentage of normal seedlings in the first count and did not cause abnormalities; f) these four rootstocks germination seeds were hypogeal cryptocotyledonar type and the seedlings essential structures are the primary root, hypocotyl, cotyledons, epicotyl, primary leaves and apical bud, with the most frequent abnormalities are in the primary root. g) only the methodology proposed for the seed germination tests of the rangpur lime rootstock had a good repeatability, reproducibility variation coefficient and a good R & R variation coefficient, and it was considered valid for incorporation to the rules for analysis.

Index terms: *Citrus. reshni*; *Citrus.limonia*; *Poncirus trifoliata*, *Citrus paradisi* x *Poncirus.trifoliata*.

INTRODUÇÃO

A lei 10.7111 que estabelece o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças (Brasil, 2003), por meio da operacionalização pelo Renasem (Registro Nacional de Sementes e Mudanças) e do RNC (Registro Nacional de Cultivares), representa um marco no sistema de produção de mudas no Brasil e provocou mudanças no setor (Machado, 2012), especialmente no que diz respeito à exigência de plantas matrizes certificadas.

Progressivamente, o setor citrícola tem acolhido inovações, criando um novo dinamismo, com produção especializada e de alto rendimento (Baptistella, 2005). Muitos viveiristas têm se especializado na produção de porta-enxertos, investido na implantação de plantas matrizes destinadas à produção de sementes, e também na comercialização. Tais sementes, originadas de matrizes selecionadas e com certificação genética, têm sido muito valorizadas (R\$150,00 a R\$ 700,00 por quilo de semente), gerando a necessidade de regulamentação do setor.

Os trabalhos de um grupo técnico, coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e composto por pesquisadores, citricultores, viveiristas e produtores de sementes, resultaram na publicação da Instrução Normativa 48 de 24 de setembro de 2013 que estabeleceu um padrão mínimo de 50% de germinação ou viabilidade para comercialização destas sementes (Brasil, 2013).

Por outro lado, apesar da importância da citricultura brasileira, pouco se conhece sobre a germinação destas sementes e não existem métodos padronizados para testes de germinação de sementes de porta-enxertos de citros (gêneros *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella* e seus híbridos) nas regras para análise de sementes brasileiras e sequer nas regras internacionais (ISTA, 2014).

Adicionalmente, a maioria das pesquisas sobre temperatura ótimas para a germinação de sementes de porta-enxertos utilizados no Brasil tem se restringido aos aspectos fisiológicos da germinação (Usberti, 1979; Rouse e Sherrod, 1996). Entretanto, as temperaturas ótimas para germinação e o desenvolvimento de plântulas de espécies cítricas podem divergir (Soetisna et al., 1985).

Um teste de germinação tem o objetivo de determinar o potencial máximo de um lote de sementes com vistas à comercialização. Deve ser realizado em condições controladas e que possibilitem a germinação de forma rápida e regular (Brasil, 2009; ISTA, 2014). Estas condições, consideradas ótimas, devem ser adequadas para análise de qualquer lote de sementes da espécie, inclusive lotes de qualidades distintas (alta, média e baixa) e gerar resultados robustos (Kataoka et al., 2011). Tal robustez indica que os métodos podem ser reproduzíveis, comparáveis dentro de um mesmo laboratório (repetitividade) e entre laboratórios (reprodutibilidade) e utilizados com segurança nas tomadas de decisão relacionadas ao controle de qualidade interno, comercialização e fiscalização da produção.

Assim, a acurácia do método de avaliação da germinação é essencial para o sucesso do monitoramento da qualidade das sementes (Soetisna et al., 1985) e tem sido determinante para sementes do gênero *Citrus* e relacionados. Tais sementes apresentam germinação lenta, com duração de 30-60 dias (Usberti, 1979; Chilembwe et al., 1992; Koller et al., 1993; Carvalho et al., 2002a; 2002b; Martins et al., 2007; Dantas et al., 2010; Silva et al., 2011; Dias et al., 2012) e frequentemente irregular (Soetisna et al., 1985).

Verificou-se também que testes de curta duração podem provocar erros (King et al., 1981; Hong et al., 1996), pois a velocidade de germinação foi mais lenta em sementes cítricas com conteúdo de água inferior a 22% (King e Roberts, 1980). Danos por embebição também resultam em aparente sensibilidade à dessecação,

podem ocorrer em testes de laboratório (Ellis et al., 1990), e foram constatados em sementes de *Citrus sushiensis* (Makeen et al., 2006).

Além destes desafios, na literatura sobre este assunto existem indícios de que têm acontecido problemas na avaliação da germinação das sementes cítricas em laboratório, como alta ocorrência de fungos e resultados de germinação em rolo de papel muito mais baixos do que os de emergência em areia. Por vezes, como observado por Carvalho et al. (2002b), a germinação chega a ser até 21 pontos percentuais menor que a emergência.

Para se garantir que os resultados dos testes de germinação se repitam dentro de um mesmo laboratório e em outros laboratórios é essencial que sejam estabelecidos critérios para classificação das plântulas como normais ou anormais, tornando a avaliação menos subjetiva (Lobo et al., 2014). Entretanto, não foram ainda estabelecidos critérios para espécies dos gêneros *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella* (Brasil, 2009; AOSA, 2012; ISTA, 2013; 2014).

A morfologia e anatomia das plântulas de espécies utilizadas como porta-enxertos no Brasil não foram ainda descritas. Pouco se conhece também sobre as anormalidades da parte aérea. Nem mesmo os danos no sistema radicular, tão importantes nos porta-enxertos, foram caracterizados. Contudo, há relatos de ocorrência de diversos tipos de defeitos, como raízes retorcidas e albinismo (Ryan, 1958; Laranjeira et al., 2005).

A validação é um processo que deve ser desenvolvido em etapas: 1) seleção e desenvolvimento do método, 2) validação por meio de testes comparativos, 3) revisão dos resultados dos testes comparativos e 4) preparação de um relatório final (ISTA, 2007). O objetivo da primeira etapa é conhecer as condições ótimas para germinação das sementes destas espécies, nas quais o potencial máximo de um lote de sementes possa ser determinado em laboratório. A interação entre o desenvolvimento e a avaliação deve ser contínua, até que o método seja considerado adequado (ISTA, 2007). Devido à recente constatação de que a

ocorrência de fungos durante os testes de germinação pode ser a principal causa dos problemas de repetitividade e reprodutibilidade durante uma validação (Brandão, 2013), o desenvolvimento e escolha do método devem considerar os fatores que afetam esta ocorrência.

Em uma segunda fase, o objetivo é avaliar o método através de ensaio interlaboratorial com amostras com pelo menos três níveis distintos de qualidade (ISTA, 2007). Utiliza-se conceitos de metrologia para verificar se o método foi capaz de distinguir entre os diferentes lotes e se apresentou repetitividade e reprodutibilidade aceitáveis (ISTA, 2007; Kataoka et al., 2011).

De acordo com normas internacionais, a repetitividade e reprodutibilidade são expressas em desvio padrão (ISO, 1994) e, segundo a ISTA (2007), obtidos por lote. Assim, é realizada uma ANOVA com apenas um fator (laboratório) para cada lote, sendo os quadrados médios destas análises de variância utilizados para estimar as variâncias de repetitividade e reprodutibilidade específicos por lote. Entretanto, nenhuma destas referências estabelece critérios objetivos para considerar um método validado. Desta forma, Brandão (2013) estudou as variações absolutas e relativas da repetitividade e reprodutibilidade por lotes e propôs faixas de classificação dos coeficientes de variação destas variáveis na análise destes ensaios.

Existe ainda uma proposta de avaliação da precisão, acurácia e exatidão de metodologias de testes de germinação, pela análise de variância com dois fatores (lotes e laboratórios), argumentando-se que a exigência de envio aos laboratórios de lotes com qualidades distintas caracteriza este modelo fatorial (Brandão, 2013). Esta também tem sido a ferramenta estatística recomendada para estimar a repetitividade e reprodutibilidade para validação de métodos bioanalíticos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012). Neste caso, os quadrados médios são utilizados para estimar as variâncias de repetitividade e a

reprodutibilidade, sendo a variância de repetitividade e reprodutibilidade (R&R) obtida pela soma destas duas variâncias.

Assim, objetivou-se conhecer as condições ótimas para germinação das sementes dos porta-enxertos tangerina Cleópatra (*Citrus reshni* hort ex. Tanaka), limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck), citrumelo (*Citrus paradisi* Macfadyen x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf) e trifoliata (*Poncirus trifoliata* [L] Raf.) para desenvolver e validar metodologia para teste de germinação; descrever a germinação e as estruturas essenciais das plântulas destes porta-enxertos.

MATERIAL E MÉTODOS

A validação da metodologia do teste de germinação para as sementes dos porta-enxertos tangerina Cleópatra, limão-cravo, citrumelo e trifoliata foi realizada em três etapas: 1) desenvolvimento do método; 2) descrição da germinação e das plântulas com estabelecimento das estruturas essenciais e critérios específicos avaliação de plântulas e 3) realização de ensaio interlaboratorial para avaliação metrológica dos métodos.

Desenvolvimento de métodos para análise da germinação de sementes de *Citrus*

Métodos para teste de germinação em laboratório descritos na literatura para espécies de citros foram aprimorados para sementes dos porta-enxertos de citros: limão-cravo (*C. limonia*), citrumelo (*C. paradisi* x *P. trifoliata*), Irifoliata (*P.*) e tangerina Cleópatra (*C. reshni*).

Utilizou-se lotes de diferentes procedências e qualidades fisiológicas, a maioria adquirida de produtores dessas sementes. Tais lotes foram caracterizados pelo conteúdo de água, peso de mil sementes e germinação, e armazenados em câmara fria a 6 ± 2 °C, em embalagens plásticas, até sua utilização.

Determinou-se o conteúdo de água das sementes pelo método da estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ por 17 horas (ISTA, 2014), utilizando-se 5 repetições de 5 sementes (Hong e Ellis, 1996). O peso de mil sementes foi estimado pela média de oito repetições de 100 sementes ou de 16 repetições, quando o coeficiente de variação entre as oito primeiras repetições foi maior que 4,0. Nesta última situação, foram descartadas repetições que divergiam da média mais que duas vezes o desvio padrão (ISTA, 2014).

Durante os testes de germinação desta etapa, foram consideradas germinadas as sementes que produziram pelo menos uma plântula normal, com as estruturas essenciais bem desenvolvidas ou com pequenos defeitos (critério tecnológico). Ao final dos testes, classificou-se as sementes não germinadas como dormentes, duras e mortas. Sementes embebidas e firmes foram submetidas ao teste de tetrazólio (Brasil, 2009) e, quando viáveis (AOSA, 2010), consideradas dormentes (Brasil, 2009; ISTA, 2014). Foram realizados experimentos distintos para cada porta-enxerto, conforme descrito nos itens abaixo.

Umidade do substrato

A faixa de umidade ótima para cada espécie foi determinada por pré-testes. Para complementar, realizou-se um experimento com a espécie *C. reshni* em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial duplo: quantidade de água para umedecimento do substrato (3,0; 2,5; 2,0; 1,7 e 1,4 vezes o peso do papel seco) e lotes (4 lotes de procedência e qualidade diversas), com parcelas de 25 sementes e quatro repetições em rolo de papel, acondicionadas em saco plástico. Procedeu-se a germinação em BOD, à temperatura de 30°C , sob luz contínua. Os lotes selecionados para este experimento foram os lotes A, B, C e D de tangerina Cleópatra, caracterizados na Tabela 1.

Foram empregadas quatro folhas de papel por rolo, sendo duas embaixo e duas em cima das sementes. O peso das folhas de papel *germitest* utilizadas neste experimento variou de 6,07g a 6,29 g, com peso médio igual a 6,21g. A capacidade de retenção média dessas folhas, determinada de acordo com ISTA (2013), foi de 273,0% do seu peso seco.

Necessidade de luz para germinação

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial duplo: luz (luz constante, 8 horas de luz e ausência) e lotes, com quatro repetições de 25 sementes. O número de lotes variou com a espécie, pois dependeu da disponibilidade para aquisição. No experimento com sementes de tangerina Cleópatra foram utilizados quatro lotes (E, F, G e H), seis lotes no experimento com citrumelo (A, B, C, D, E e F), três no de limão-cravo (A, B e C) e três no de trifoliata (A, B e C). Estes lotes estão caracterizados na Tabela 1. A germinação foi realizada em BOD, à temperatura constante de 30°C, em rolo de papel. A ausência de luz foi obtida pelo envolvimento dos rolos com duas folhas de papel alumínio.

Determinação da temperatura ótima para germinação

Os experimentos foram conduzidos em esquema fatorial duplo: temperatura (25, 30 e 35°C), e lotes, com parcelas de 25 sementes e quatro repetições. Para os experimentos com sementes de tangerina Cleópatra foram utilizados quatro lotes (E, F, G e H), seis para citrumelo (A, B, C, D, E e F), três para limão-cravo (A, B e C) e três para trifoliata (A, B e C). Devido à ocorrência de dormência em pré-testes, a germinação de sementes de trifoliata foi testada também em temperatura alternada 20-30°C, com oito horas na temperatura mais alta em presença de luz. Para as temperaturas constantes, utilizou-se luz contínua.

Com o objetivo de refinar os resultados, foi realizado outro experimento com sementes de limão-cravo, no mesmo esquema, porém utilizando apenas as

temperaturas de 25 e 30°C. Foram utilizados quatro lotes neste último experimento (D, E, F e G), que estão caracterizados na Tabela 1. Procedeu-se os experimentos em BOD, em rolo de papel, acondicionados em sacos plásticos.

Tratamentos pré-germinativos

Conduziu-se estes experimentos em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial duplo: tratamentos pré-germinativos (controle, hipoclorito de sódio e imersão em água quente) e lotes, com parcelas de 25 sementes e quatro repetições em rolo de papel, acondicionados em sacos plásticos. Foram usados cinco lotes no experimento com sementes de tangerina Cleópatra (E, F, G, H e I), dois para o de limão-cravo (H e I), seis para citrumelo (A, B, C, D, E e F) e três para trifoliata (A, B e C). Tais lotes estão caracterizados na Tabela 1. Utilizou-se a temperatura de 30°C constante e luz contínua em BOD. O tratamento térmico foi realizado com imersão em água quente por quatro horas, com temperatura inicial da água de 60°C para sementes de limão-cravo e tangerina Cleópatra e de 40°C para sementes de citrumelo. A escolha das temperaturas baseou-se nos resultados de Pereira et al. (2015) e Gonçalves et al. (2015). Este tratamento não foi realizado em sementes de trifoliata.

Procedeu-se o tratamento com hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos (utilizado por Carvalho et al., 2013 e selecionado em pré-testes). Em seguida, as sementes foram lavadas em água corrente por cinco minutos, imersas em água por 10 minutos, colocadas em papel absorvente para secagem da água superficial e então semeadas.

Análise estatística

Antes de proceder a análise de variância dos experimentos descritos nos itens 2.1.1 a 2.1.4, verificou-se a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade pelo teste de Levene. A análise de variância (ANOVA) foi realizada apenas quando os dados da variável foram considerados normais e

homocedásticos ($P > 0,01$). Variáveis que não atenderam estas pressuposições não foram analisadas.

Quando foram constatadas diferenças significativas pelo teste F na ANOVA ($P < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Toda a análise estatística foi realizada com o auxílio do programa R (R Core Team, 2016), pacotes car (Fox e Weisberg, 2011) e ExpDes.pt (Ferreira et al., 2013).

Descrição da germinação e das plântulas

O processo de germinação e desenvolvimento de plântulas foi descrito durante os pré-testes e experimentos realizados para desenvolvimento do método, definindo-se a morfo-classificação (Garwood, 1996) e as estruturas essenciais dos porta-enxertos estudados. As plântulas anormais foram descritas, sendo analisada a necessidade de estabelecer orientações específicas, além dos critérios gerais estabelecidos (Brasil, 2009; ISTA, 2013; 2014), para padronização da avaliação de plântulas durante o teste de germinação. Quando ocorreram dúvidas quanto a alguma anormalidade, realizou-se testes em areia, pois este substrato é recomendado pelas regras para análise em caso de incerteza na classificação (Brasil, 2009; ISTA, 2014).

Para refinar a caracterização morfo-anatômica das plântulas normais, foram semeadas 100 sementes de tangerina Cleópatra (50 sementes do lote A e 50 do lote C) em rolo de papel, na temperatura de 30°C. Quando as estruturas essenciais das plântulas puderam ser observadas, 10 plântulas de cada lote foram fixadas em FAA 50 (Johansen, 1940), conservadas em álcool etílico a 70% e utilizadas para estudar sua anatomia. Amostras com cerca de 0,5 cm de comprimento da raiz e do epicótilo (ápice e estrutura primária e secundária) das plântulas normais foram desidratadas em série etílica e incluídas em resina do tipo metacrilato (Historesina Leica®) seguindo o protocolo do fabricante. Seccionou-se os materiais em micrótomo rotativo transversalmente com cerca de 4 µm de espessura. Os cortes foram posteriormente corados com azul de

toluidina (O'Brien et al., 1964) e montados em verniz vitral incolor 500 Acrilex® (Paiva et al., 2006).

Algumas plântulas com estrutura atípica, que geravam dúvida quanto à classificação, também foram fixadas, incluídas e seccionadas transversal e longitudinalmente, sendo a estrutura anatômica atípica comparada com a anatomia das plântulas normais.

Ensaio interlaboratoriais

Nesta etapa, foi realizada a escolha dos métodos para teste de germinação que seriam validados, seleção dos lotes, identificação de laboratórios participantes, preparo das amostras e envio do material. Ao final, procedeu-se a análise estatística.

Escolha dos métodos para ensaio multilaboratorial

A escolha do método para teste de germinação foi realizada para cada uma das espécies separadamente, utilizando-se os resultados dos experimentos descritos nos itens 2.1.1 a 2.1.4. Quando esses experimentos indicavam mais de uma opção viável, optou-se pelo método menos trabalhoso ou ainda o mais promissor de acordo com as anotações realizadas durante os experimentos. O número de dias para a primeira contagem foi determinado de acordo com o tempo necessário para obter-se de 40 a 50% da germinação final dos lotes de maior vigor. O tempo de contagem final foi definido pela estabilização da germinação da maioria dos lotes com qualidade mediana a baixa.

Os protocolos foram elaborados utilizando-se o formato do Quadro 5.1 da Regras para Análise de Sementes em vigor (Brasil, 2009). Em caso de experimentos não-conclusivos, os protocolos não foram elaborados.

Seleção de lotes

Foram selecionados lotes para realização de ensaios interlaboratoriais com sementes de tangerina Cleópatra e de limão-cravo.

Escolha dos lotes de tangerina Cleópatra

A germinação em rolo de papel (4 x 25 sementes) de cinco lotes de tangerina Cleópatra disponíveis foi utilizada para selecionar três lotes de qualidades diversas. O lote que apresentou maior germinação foi considerado de alta qualidade (85%), e o de menor germinação (48%), de baixa qualidade. Foi escolhido para representar qualidade intermediária, um lote com germinação de 70%, ou seja, acima do padrão da espécie (50% de germinação ou viabilidade) e ao mesmo tempo estatisticamente diferente do lote de maior qualidade.

Escolha dos lotes de limão-cravo

Dos dez lotes de limão-cravo disponíveis, seis foram escolhidos para realização dos testes de germinação em rolo de papel (4 x 25 sementes). Estes resultados foram utilizados para selecionar os três lotes de qualidades diversas. O lote que apresentou maior germinação (86%) foi considerado de alta qualidade e o de menor germinação (30%), de baixa qualidade. O lote de qualidade intermediária mostrou germinação de 64%, ou seja, acima do padrão da espécie e ao mesmo tempo estatisticamente diferente do lote de maior qualidade.

Identificação dos laboratórios participantes

Para os ensaios interlaboratoriais, foram convidados a participar 16 laboratórios (todos os laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura, alguns laboratórios credenciados no Renasem nas regiões sudeste e sul e um laboratório de pesquisa). Entre estes, nove laboratórios tiveram disponibilidade e interesse em colaborar no ensaio com sementes de tangerina Cleópatra (cinco laboratórios oficiais e quatro credenciados) e dez participaram do ensaio com sementes de limão-cravo (cinco laboratórios oficiais, quatro credenciados e o laboratório de pesquisa). O laboratório de pesquisa não era credenciado no Renasem, mas que possuía experiência em germinação de sementes desses porta-enxertos.

Preparo e envio das amostras

Os lotes selecionados foram homogeneizados e divididos com o auxílio de um divisor de solos com 18 canaletas, obtendo-se as amostras necessárias para envio aos laboratórios e realização do ensaio pela organizadora (pesquisadora responsável pelo desenvolvimento do método e preparo das amostras). Foram obtidas 15 subamostras com peso entre 33 e 34g de cada lote para o ensaio de tangerina Cleópatra e 12 subamostras com peso entre 34 e 36 g de cada lote para o ensaio interlaboratorial com semente de limão-cravo. Cada subamostra foi imediatamente acondicionada em dois sacos de papel e um saco plástico fechados com auxílio de um grampeador para evitar a dessecação das sementes.

As subamostras foram acondicionadas em caixas de isopor juntamente com os sacos plásticos e os atilhos de borracha necessários para a condução dos testes e enviadas pelo correio (Sedex) para os laboratórios participantes. No ensaio com tangerina Cleópatra, foram enviadas duas subamostras de cada lote para os três laboratórios que realizariam as análises com 400 sementes e para outros, uma subamostra de cada lote. As três subamostras restantes, destinadas ao controle da organizadora do ensaio, foram também acondicionadas em caixa de isopor, e mantidas à temperatura ambiente por sete dias (período de tempo entre o envio por Sedex e o recebimento das amostras por todos os laboratórios participantes).

No ensaio com limão-cravo, como todos os laboratórios realizaram os testes com 400 sementes, as subamostras foram preparadas para possuir no mínimo esta quantidade de sementes, sendo enviada uma subamostra para cada laboratório.

As subamostras restantes também foram acondicionadas em caixa de isopor e mantidas pelo mesmo período do ensaio com tangerina Cleópatra.

As instruções de montagem dos testes (inclusive esquema de agrupamento aleatórios dos rolos no teste de germinação), a ficha de análise e os critérios de avaliação de plântulas foram enviados aos laboratórios por e-mail, para que os laboratórios pudessem se preparar para a montagem do ensaio.

Enquanto os laboratórios realizavam os ensaios, a organizadora também conduziu os mesmos testes (400 sementes de cada lote), com o mesmo método, para obter o valor de referência. Para confirmar estes resultados, foram conduzidos testes de germinação em areia com as mesmas amostras (200 sementes de cada lote). Nestes testes foram utilizadas as subamostras mantidas em caixa de isopor em temperatura ambiente por sete dias.

Análise estatística

As fichas de análises com os resultados dos laboratórios foram analisadas, considerando-se especialmente as anotações sobre a montagem e os problemas na condução dos testes. Quando foi constatada condução diferente do método proposto, os resultados desses laboratórios não foram utilizados. Antes de proceder as análises estatísticas, as repetições de 25 sementes (rolo) de cada laboratório foram agrupadas de quatro em quatro, de forma a obter repetições de 100 sementes de cada lote, dentro de cada laboratório, como usualmente é realizado em testes de germinação (RAS, 2009).

Para detecção dos valores discrepantes (*outliers*) foram utilizados o método de Hampel (1985) e o método gráfico de Box-plot. Em seguida, verificou-se se o conjunto de dados de cada amostra separadamente e, também o conjunto com todos os dados agrupados (resultados de todas as amostras e todos os laboratórios), atendiam as pressuposições de normalidade dos resíduos (Teste de Shapiro-Wilk, $P > 0,01$) e homogeneidade de variâncias (Teste de Levene, $P > 0,01$). As análises de variância (ANOVA) com um fator (laboratório) para cada uma das amostras e ainda uma ANOVA com dois fatores (lote *versus* laboratório, utilizando-se o conjunto de todos os dados), foram realizadas apenas quando as pressuposições foram atendidas.

Para obter as estimativas de repetitividade, variância entre laboratórios e reprodutibilidade como indicado pela ISTA (2007), ou seja, de acordo com a ISO 5725-2 (ISO, 1994), foram utilizados os quadrados médios das ANOVAs

com um fator para cada lote (Brandão, 2013). Os coeficientes de variação de repetitividade e reprodutibilidade também foram determinados e classificados como ótimo, bom, regular ou ruim (Brandão, 2013).

Foi realizada também a análise estatística, utilizando a ANOVA com dois fatores. Quando não houve interação significativa entre fatores e o efeito de lotes foi significativo pelo teste F a 0,01 de significância, obteve-se as variâncias de repetitividade, reprodutibilidade e R&R como proposto por Brandão (2013). Calculou-se também a contribuição de cada um dos três tipos de variância para a variância total do experimento. Além disso, os coeficientes de variação foram obtidos e o coeficiente de variação de R&R classificado em ótimo, bom, regular ou ruim (Brandão, 2013).

Além das estimativas acima, foi realizada também uma comparação dos resultados dos laboratórios com os resultados da organizadora (Referência), utilizando-se a Tabela 18.11 das Regras para Análises de Sementes (Brasil, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente serão apresentados os resultados dos experimentos realizados para desenvolvimento da metodologia para teste de germinação, depois a descrição da germinação e plântulas e os resultados dos ensaios interlaboratoriais.

Desenvolvimento do método

Os experimentos que tiveram um mesmo objetivo foram agrupados, sendo os resultados para todas as espécies estudadas apresentados conjuntamente. Ao final de cada grupo de experimentos, as respostas são discutidas.

Quantidade de água no substrato

Pré-testes realizados com as sementes de tangerina Cleópatra, limão-cravo, citrumelo e trifoliata indicaram que quando o papel de germinação foi

umedecido com quantidade de água igual ou menor a 2,0 vezes o seu peso seco, a condição dos testes foi mais adequada, com menor ocorrência de fungos e infecção secundária e menor coeficiente de variação entre as repetições.

Além disso, a primeira contagem de germinação de vários lotes foi maior quando foi utilizada menor quantidade de água. Contudo, em germinação de citrumelo e trifoliata, quando a quantidade de água no substrato foi menor que 1,7 vez, foi observado maior porcentagem de plântulas com o epicótilo preso dentro dos cotilédones. Para as outras espécies, o limite inferior da quantidade de água situa-se na quantidade mínima que possibilite o umedecimento do papel com uniformidade.

O experimento com tangerina Cleópatra mostrou que o efeito da quantidade de água utilizada para umedecimento do papel na germinação interagiu com o fator lote, para as variáveis plântulas normais, primeira contagem de plântulas normais e sementes mortas. Já o efeito nas medidas de germinação ocorreu independente dos lotes (Tabela 2). A interação entre os fatores quantidade de água versus lote obtido para sementes de tangerina Cleópatra mostra que o efeito da umidade do substrato na porcentagem de plântulas normais depende da condição da semente. Esta constatação fornece uma possível explicação para o maior coeficiente de variação observado nos pré-testes com substratos mais úmidos realizados com outras espécies cítricas.

A porcentagem de plântulas normais foi menor com maiores quantidades de água (3 e 2,5 vezes) para o lote C, enquanto que para o lote A só houve redução da germinação com quantidade de água equivalente a 3,0 vezes o peso substrato seco, e para o lote B, apenas para quantidade de água de 2,5 vezes. Em contraste, a germinação do lote D não foi influenciada pela quantidade de água (Tabela 2). Para o lote C, a maior redução da germinação com substratos mais umedecidos parece estar relacionada à maior porcentagem de sementes mortas em germinação com maior quantidade de água (Tabela 2). As causas da redução da

germinação nos lotes A e B não estão claras, mas possivelmente estão relacionadas à maior porcentagem de sementes mortas somada à maior porcentagem de plântulas anormais (deformadas + infeccionadas), já que a porcentagem de sementes dormentes foi insignificante (menor que 1,0%) e não ocorreram sementes duras.

Observa-se também que, para os lotes A, B e C, a porcentagem de plântulas normais na primeira contagem (14 dias) foi maior no tratamento com menor quantidade de água, sendo que no lote B isso ocorreu também quando o substrato foi umedecido com quantidade de água equivalente a 1,7 vez o peso do substrato seco. Esta última condição proporcionou porcentagens intermediárias para os lotes A e B. Para o lote D, a primeira contagem foi a mesma, independentemente da quantidade de água (Tabela 2).

Com relação às medidas de germinação, foi constatado que para todos os lotes, o tempo médio de germinação foi menor quando foi utilizada menor quantidade de água (equivalente a 1,4 vez o peso do substrato) e intermediário para as quantidades de água intermediárias (1,7 e 2,0 vezes). O inverso ocorreu com o coeficiente de velocidade de germinação. Em contraste, a sincronia da germinação não foi afetada pela quantidade de água no substrato (Tabela 2).

O efeito negativo das maiores quantidades de água no substrato pode estar relacionado com a maior produção de mucilagem, pois foi observado que, de uma forma geral, as sementes colocadas para embeber em substratos mais úmidos produziam uma camada mais espessa de mucilagem após 24/48 horas de embebição. Tal produção de mucilagem foi mais evidente em sementes do lote C.

O aumento do tempo de germinação em substratos úmidos pode estar relacionado à ocorrência de impermeabilidade a gases, dado que Mumford e Panggabean (1982) observaram que sementes úmidas e intactas de citros (com as duas camadas de tegumento e mucilagem) mostraram-se permeáveis a água,

mas impermeáveis a gases durante a embebição, Além disso, a mucilagem provavelmente proporciona melhor condição para desenvolvimento de fungos, pois carboidratos são substratos preferidos por esses microrganismos (Hong e Ellis, 1996) e a mucilagem de sementes cítricas contém muitos polissacarídeos (Navqui et al., 2011). Adicionalmente a presença de mucilagem pode ser prejudicial à germinação (Freitas et al., 2011) e ao desenvolvimento de plântulas, por conter substâncias inibidoras do metabolismo germinativo (Carmona et al., 1994).

Mumford e Panggabean (1982) também constaram que a remoção total da mucilagem destas sementes não é facilmente obtida durante o processamento, mesmo utilizando-se hipoclorito de sódio ou ácido e bases fortes. Desta forma, é provável que o método utilizado pelo produtor do lote C para a degomagem foi menos efetivo.

Necessidade de luz para germinação

Independente dos lotes, as sementes dos quatro porta-enxertos estudados germinam igualmente e desenvolvem plântulas normais tanto em presença de luz como no escuro. Não houve ganhos de germinação com a alternância luz/escuro (Tabela 3), concordando com os resultados de Usberti (1979) em experimentos com limão-cravo. Entretanto, as plântulas que se desenvolvem no escuro tornaram-se amareladas, em contraste com a coloração verde escuro das plântulas sob luz.

Assim, a utilização de luz durante a germinação destes porta-enxertos é indicada para facilitar a classificação das plântulas em normais e anormais, uma vez que foi muito difícil distinguir, durante a germinação no escuro, as plântulas albinas das plântulas normais que ocorreram no lote E de tangerina Cleópatra e no lote C de citrumelo.

Aliás, mesmo para sementes fotoblásticas negativas, a luz geralmente é importante para auxiliar na avaliação de plântulas, recomendando-se fornecer luz após a protrusão radicular, para evitar que as plântulas se tornem mais sensíveis ao ataque de fungos, estioladas e despigmentadas (ISTA, 2014).

Temperatura

Pode-se constatar na Tabela 4, que as sementes de tangerina Cleópatra, citrumelo e limão-cravo apresentaram a mesma percentagem de germinação nas temperaturas de 25 e 30°C, isso ocorreu em todos os lotes testados. Por outro lado, a germinação a 35°C foi menor, o que, exceto para o lote H de tangerina Cleópatra, foi devido à maior ocorrência de plântulas deformadas e ou anormais (deformadas + infeccionadas).

O efeito da temperatura de germinação em sementes de trifoliata variou de acordo com o lote (Tabela 5). Enquanto o lote A mostrou a mesma porcentagem de plântulas normais em todas as temperaturas, a germinação dos outros dois lotes foi menor a 35°C que nas temperaturas de 25 e 30°C. Uma das causas dessa redução da germinação foi a ocorrência de maior porcentagem de plântulas anormais. Por outro lado, a germinação do lote B foi maior em temperaturas alternadas, devido à menor porcentagem de plântulas deformadas nesta condição (Tabela 5) e também não ocorrência de sementes dormentes. Para o lote C, a melhor temperatura para germinação foi 30°C. Nas outras temperaturas, a porcentagem de germinação foi significativamente menor (Tabela 5).

Em sementes de trifoliata, a germinação a 30°C ocorreu mais rapidamente para sementes dos lotes A e C, pois a primeira contagem de germinação destes lotes foi maior nesta temperatura. Esta maior rapidez não ocorreu para sementes do lote B, que apresentou mesma porcentagem de plântulas normais na primeira contagem em todas as temperaturas (Tabela 5).

Embora a germinação final de sementes de limão-cravo tenha sido igual nas temperaturas de 25 e 30°C, a primeira contagem foi maior na temperatura mais alta, e atingiu o seu máximo aos 28 dias (Tabela 6). Em temperatura de 25°C, a germinação foi concluída somente aos 35 dias.

A temperatura de 30°C também é a mais favorável para sementes de *Citrus limon* e *C. aurantifolia* (Soetisna et al., 1985), além de tangerina Cleópatra, citrumelo e outros porta-enxertos (Rouse e Sherrod, 1996). Altos níveis de germinação (> 80%) foram observados também em sementes de três espécies silvestres do gênero *Citrus* da Austrália (Hamilton et al., 2009).

A maior ocorrência de anormalidades a 35°C, também foi observada por Soetisna et al. (1985). De acordo com estes autores, a maior velocidade de germinação em sementes cítricas em temperaturas mais altas (35-40°C) está relacionada à maior velocidade de embebição. As temperaturas iguais ou maiores que 35°C não são favoráveis ao desenvolvimento das plântulas. Sementes deterioradas ou que passaram por secagem, podem apresentar maior ocorrência de anormalidades nestas temperaturas (Soetisna et al., 1985).

O comportamento distinto dos lotes de sementes de trifoliata testados não permitiu identificar uma temperatura ótima para germinação de sementes desta espécie. Tal heterogeneidade pode estar relacionada a diferenças de vigor, de dormência e também genéticas. Seria esperado que esta espécie germinasse melhor em temperaturas mais baixa, pois é originada de local de clima temperado e mais tolerante ao frio (Neson, 2014). Trabalhos anteriores constataram a temperatura ótima de 25,2°C para germinação para *Poncirus trifoliata* (Rouse e Sherrod, 1996). Contudo, no presente trabalho, os lotes B e C apresentaram menor porcentagem de germinação nesta temperatura que em outra (20-30°C para o lote B, e 30°C para o lote C).

A menor germinação do lote C a 25°C ocorreu devido a anormalidades e à ocorrência de sementes mortas por desenvolvimento de fungos. Esta maior

proliferação dos fungos nessas sementes talvez possa ser explicada pelo fato da temperatura de 25°C ser mais adequada para desenvolvimento dos fungos presentes nestas amostras. Com relação ao lote B, a melhor germinação em temperaturas alternadas parece estar relacionada à quebra de dormência pela alternância de temperatura e luz. Por outro lado, não encontramos uma explicação plausível para a menor porcentagem de plântulas deformadas nesta condição.

Tratamentos pré-germinativos

Houve interação entre os efeitos dos tratamentos pré-germinativos e lotes para sementes de tangerina Cleópatra, ou seja, o efeito dos tratamentos na porcentagem de plântulas normais e anormais variou com o lote. Enquanto a maioria dos lotes não foi afetada pelos tratamentos, o tratamento com hipoclorito de sódio reduziu a germinação do lote H, pois provocou anormalidades. Adicionalmente, a porcentagem de plântulas normais na primeira contagem foi menor em sementes tratadas com hipoclorito para todos os lotes de tangerina Cleópatra (Tabela 7).

O tratamento com hipoclorito de sódio não afetou a germinação de sementes limão-cravo, porém o tratamento térmico reduziu a porcentagem de plântulas normais em um dos lotes. Esta diminuição da germinação ocorreu devido à maior ocorrência de plântulas anormais. Nenhum dos tratamentos afetou a primeira contagem de plântulas normais (Tabela 7).

Em sementes de citrumelo, o tratamento com água quente foi favorável pois proporcionou uma maior porcentagem de plântulas normais na primeira contagem, e não provocou anormalidades. Assim, a porcentagem de germinação final não foi afetada. Nestas sementes, o tratamento com hipoclorito não provocou efeitos, pois as sementes mantiveram o mesmo comportamento das sementes não-tratadas. Tal ausência de efeitos também foi observada em sementes de trifoliata.

O tratamento com hipoclorito de sódio 1% é indicado por Hong e Ellis (1996) para evitar desenvolvimento de fungos especialmente em sementes mucilaginosas, com germinação demorada. Realmente observou-se que as sementes apresentavam menor incidência de fungos, porém, este efeito não elevou a germinação. Uma possível explicação seria que o uso de substrato mais seco que o normal já havia reduzido a ocorrência de fungos nas sementes. Portanto, para as espécies nas quais não houve aumento de germinação nem decréscimo, as sementes podem ser tratadas com hipoclorito de sódio 1%, com ganhos na facilidade de condução do teste. Contudo, a montagem do teste se torna mais trabalhosa.

Descrição da germinação e plântulas dos porta-enxertos

A germinação de sementes dos porta-enxertos de citros estudados se inicia entre o sétimo e o décimo quinto dia após sementeira, quando a raiz primária, cilíndrica e esbranquiçada (branca para creme), rompe o tegumento. Antes da emergência do epicótilo, esta raiz se alonga rapidamente, podendo haver formação de pequenos pelos absorventes próximos à extremidade da mesma. A região proximal ao hipocótilo torna-se mais espessa e, em presença de luz, como ocorre em testes em rolo de papel, torna-se esverdeada, assim como o hipocótilo, que é curto e quase imperceptível (Figura 1). A presença de clorofila nas raízes e hipocótilo foi observada também por Darosci e Paulilo (2011) em plântulas de *Raulinoa echinata*, uma espécie arbustiva, também da família Rutaceae, endêmica no Vale-do-Itajaí-Açu em Santa Catarina.

Durante a emergência, o epicótilo inicialmente fica dobrado, formando uma alça, depois a gema apical se desprende, observa-se as folhas primárias em desenvolvimento e o epicótilo vai se tornando ereto (Figura 1). Na presença de luz, a parte aérea apresenta coloração verde escura, e possui glândulas de óleo e pequenos e finos tricomas na superfície (Figura 2). A presença destas glândulas

de óleo, que ao serem observadas em lupa, podem parecer um defeito do epicótilo, foi observada também nas plântulas dos outros porta-enxertos. Em consonância, Hayward e Long (1942) também observaram essas glândulas na região periférica de epicótilos de plântulas de outra espécie de *Citrus*.

A raiz primária e o epicótilo normalmente emergem da extremidade micropilar, inclusive quando mais de um embrião germina. Entretanto, a protrusão pode ocorrer em outras regiões da semente. Além disso, a germinação e desenvolvimento das plântulas numa mesma semente não é sincronizado. Pode ocorrer ainda protrusão da raiz de um embrião e do epicótilo de outro. Muitas vezes é necessário retirar o tegumento para se ter certeza que as estruturas desenvolvidas são da mesma plântula.

As raízes secundárias geralmente não se desenvolvem durante o período máximo do teste em rolo de papel. Contudo, podem ser observadas mais frequentemente durante a germinação de alguns lotes de sementes, ou quando a raiz primária está danificada.

Durante a germinação, os cotilédones não se elevam e permanecem dentro do tegumento devido ao desenvolvimento inexpressivo do hipocótilo. Assim, a germinação de *C. reshni*, *C. limonia*, *Poncirus trifoliata* e do híbrido *C. paradisi* x *P. trifoliata* é do tipo criptocotiledonar hipogeal. Este tipo de classificação foi descrito para *R. echinata*, outra espécie da família Rutaceae (Darosci e Paulilo, 2011) que possui sementes monoembriônicas e também para uma espécie poliembriônica do gênero *Citrus* (Coelho et al., 2001).

A raiz primária de *C. reshni* apresenta estrutura típica, com polos protoxilemáticos, no centro da raiz, e, em torno, tecido endodérmico e córtex, hipoderme e epiderme. Não foram observadas glândulas de óleo. Na região proximal ao hipocótilo, esta raiz já apresenta crescimento secundário bastante evidente. (Figura 3).

Uma vez que os critérios de avaliação de plântulas estabelecem que as estruturas essenciais das plântulas devem estar intactas ou possuir apenas defeitos aceitáveis (Brasil, 2009; ISTA, 2013), foram relacionadas como estruturas essenciais: a raiz primária, o hipocótilo, cotilédones, epicótilo, gema apical e folhas primárias. Estabeleceu-se ainda que a raiz primária não pode ser substituída por raízes secundárias (Figura 4).

Semelhante ao constatado para plântulas de árvores nativas brasileiras (Lobo et al. 2014), as principais anormalidades observadas durante os pré-testes e experimentos foram danos somente na raiz primária, destacando-se atrofia, bifurcação ou ausência (Figura 5). As anormalidades apenas da parte aérea foram pouco frequentes, a exemplo de epicótilo em laço, quebrado ou não desenvolvido, e folhas ou gema apical danificadas. Plântulas despigmentadas ocorreram em alguns lotes, geralmente associadas à presença de micélio de coloração cinza escura no tegumento (Figura 6A). Ocorreram também plântulas totalmente malformadas (parte aérea e raiz atrofiadas, Figura 6B, 6C e 6D).

Foram observadas em alguns lotes de sementes plântulas com raiz primária mais esverdeadas que o normal, rachaduras superficiais e ápice da raiz escurecido. Estas, embora se desenvolvessem bem logo após a protrusão, depois paralisavam o crescimento (Figura 7A). Assim, suspeitou-se que poderiam não ser realmente raízes, mas sim, hipocótilos com desenvolvimento anômalo. Porém, o corte anatômico transversal mostrou estruturas típicas de raiz, com sete polos xilemáticos e o corte longitudinal não evidencia nenhuma anomalia (Figura 7B e 7C). Muito possivelmente, a falta de continuidade no crescimento destas raízes está relacionada com danos no tecido meristemático no ápice da estrutura, que em vez de possuir tecido tenro e esbranquiçado, apresenta-se escurecida e provavelmente necrosada. Assim, embora seja uma raiz, e não um hipocótilo, este tipo de plântula deve ser classificado como anormal.

Cabe ressaltar, entretanto, que a opção de considerar a raiz primária como essencial, não é um consenso em análise de sementes. O manual de avaliação de plântulas (ISTA, 2013) considera que a raiz primária é essencial para árvores e arbustos cuja raiz primária é distinta e não há normalmente formação de raízes secundárias durante o teste de germinação. Por outro lado, regras utilizadas nos Estados Unidos, determinam que, mesmo para árvores, o bom desenvolvimento das raízes secundárias pode substituir raízes primárias defeituosas ou inexistentes (AOSA, 2012).

Publicações fitotécnicas estrangeiras e brasileiras têm considerado a existência de raiz principal importante para o bom desenvolvimento de mudas cítricas no campo, sendo esta é uma visão tradicional em horticultura. Em contraste, resultados preliminares de pesquisas estão indicando que sistemas radiculares compostos por raízes secundárias/adventícias têm melhor performance para absorver água e nutrientes (Albrecht, 2016; Bowman, 2016).

Além da principal função de um porta-enxerto de suprir e sustentar a copa, o padrão de muda cítrica em vigor no Brasil estabelece que a raiz principal não pode estar danificada (Brasil, 2013). Assim, considerando-se que não existem ainda pesquisas conclusivas sobre o assunto, optou-se por estabelecer que a raiz primária é uma estrutura essencial nas plântulas em estudo.

Além da estrutura anômala da raiz primária, já citada, não foram observadas em plântulas dos porta-enxertos estudados outros tipos de anormalidades não descritas nas regras para análises (Brasil, 2009; ISTA, 2013; 2014). Assim, foram propostos apenas critérios para uniformizar a avaliação e evitar classificações errôneas: a) As plântulas podem ser avaliadas a partir do desprendimento da parte aérea dos cotilédones; b) Plântulas normais devem possuir raiz primária com comprimento no mínimo igual ao do epicótilo; b) Em sementes com mais de uma plântula germinada, deve-se ter certeza que existe pelo menos uma plântula com todas as estruturas essenciais presentes, se

necessário os tegumentos devem ser retirados durante a avaliação; c) A avaliação de plântulas com raízes muito finas também exige retirada dos tegumentos, pois geralmente este tipo de raiz está bifurcada dentro dos cotilédones; d) Plântulas de citrumelo e trifoliata normalmente possuem três ou mais folhas primárias, sendo que nas outras espécies isso também pode ocorrer (Figura 7); e) Para ser considerada normal, uma plântula precisa possuir pelo menos uma folha intacta; f) Se ao final do teste o epicótilo permanecer parcialmente preso dentro dos cotilédones, deve-se abrir com cuidado os cotilédones e considerar a plântula normal se o epicótilo estiver intacto ou apenas levemente torcido, pelo menos uma folha estiver normal e a gema apical estiver intacta; g) Quando ocorrem múltiplas plântulas em testes em rolo de papel, elas frequentemente apresentam pequenos defeitos, epicótilos ou raízes retorcidos, crescimento na direção diagonal em vez de na direção vertical. Estes defeitos não ocorrem em testes em areia. Assim, as plântulas com estas características devem ser consideradas normais.

Escolha dos métodos para teste de germinação

Como os resultados do experimento sobre temperatura ótima para germinação do trifoliata não foram conclusivos, não foi elaborado um protocolo para validação interlaboratorial desta espécie. Os protocolos para os porta-enxertos tangerina, Cleópatra e limão-cravo estão apresentados nas Tabelas 8, 9 e 10. Entretanto, os ensaios interlaboratoriais só foram realizados para as duas primeiras espécies, pois não havia quantidade suficiente de sementes do lote de alta qualidade de citrumelo.

A temperatura de germinação de 30°C foi escolhida para os porta-enxertos tangerina Cleópatra e citrumelo porque observou-se que nesta temperatura os rolos geralmente apresentavam menor ocorrência de fungos. Para sementes de

limão-cravo, além desta vantagem foi constatada maior rapidez na germinação, com redução de sete dias no período do teste.

Ensaio interlaboratorial - tangerina Cleópatra

Como não foram relatados problemas de método na condução dos testes, os resultados de todos os laboratórios foram utilizados para as análises estatísticas. Não foram detectados *outliers* pela estatística de Hampel ou pelo método de Box-plot. O conjunto de dados de cada amostra separadamente, e também todo o conjunto de dados, atenderam as pressuposições de normalidade dos resíduos (Teste de Shapiro-Wilk, $P > 0,01$) e homogeneidade de variâncias (Teste de Levene, $P > 0,01$).

Compatibilidade com os resultados da organizadora

A germinação média do lote 1 nos nove laboratórios não foi compatível com o resultado da organizadora em rolo de papel, ou seja, a diferença entre estes resultados está fora da faixa de tolerância de variação estabelecida pela tabela 18.11 das regras para análise de sementes (Brasil, 2009). Por outro lado, os resultados médios dos lotes 2 e 3 foram compatíveis com a germinação obtida pela organizadora (Tabela 11). Porém, a germinação obtida para o lote 2 pelo laboratório B não foi compatível e para o lote 3, dois laboratórios (E e F) não obtiveram germinação compatível com a referência.

Repetitividade e Reprodutibilidade determinadas pelo método indicado pela ISTA

Observa-se na Tabela 11 que a germinação do lote 1 variou muito entre laboratórios, mas o coeficiente de variação dentro de laboratórios não foi alto. Em consequência, o coeficiente de variação de reprodutibilidade do lote 1 foi regular, mas o coeficiente de repetitividade foi classificado como ótimo (Tabela 12).

Com relação ao lote 2, os resultados entre laboratórios não variam muito, e o coeficiente de variação dentro de cada laboratório também não foi alto (Tabela 11). Desta forma, o coeficiente de reprodutibilidade foi classificado como bom e o coeficiente de repetitividade, como ótimo (Tabela 12). Em contraste, para o lote 3, o coeficiente de reprodutibilidade foi classificado como ruim e o de repetitividade como bom (Tabela 12).

Repetitividade, Reprodutibilidade e R&R de acordo com Brandão, 2013

Como o resultado da ANOVA com dois fatores mostrou que houve interação significativa entre os fatores lotes e laboratórios, não foi indicado prosseguir com as análises e obter as estatísticas de repetitividade, reprodutibilidade e R&R deste ensaio da forma proposta por Brandão (2013).

Situação da metodologia testada

O método proposto para teste de germinação de tangerina Cleópatra não foi validado, pois os coeficientes de reprodutibilidade dos lotes 1 e 3, calculados pelo método indicado pela ISTA, foram regular e ruim. Além disso, muitos resultados obtidos pelos laboratórios para o lote 1 não foram compatíveis com a referência (organizadora). A interação significativa entre lotes e laboratórios detectada na ANOVA com dois fatores, também indica a não validação do método.

Analisando-se as fichas de análises dos laboratórios, constatou-se que a causa das diferenças entre laboratórios para os lotes 1 e 3 estava relacionada com a ocorrência de anormalidades. Como o coeficiente de variação dentro do laboratório organizador foi baixo, há indicações de que a causa da falta de reprodutibilidade do método não está relacionada à heterogeneidade da amostra, mas a problemas ocorridos durante a condução do teste (Brandão, 2013). Dificuldades de avaliar plântulas pouco conhecidas pelos analistas (Nery, 2008), ou mesmo a falta de uniformidade na avaliação de plântulas entre laboratórios são outras causas possíveis.

Ensaio interlaboratorial - limão-cravo

Foram detectados problemas na execução dos testes de dois laboratórios, e por isso os dados destes laboratórios não foram utilizados. Um destes laboratório calculou incorretamente a quantidade de água necessária para umedecer o substrato, o que resultou em utilização de quantidade de água muito acima da faixa recomendada (2,3 vezes o peso seco do substrato). O outro laboratório relatou forte suspeita de mistura de lotes durante a montagem dos testes.

Os resultados dos outros oito laboratórios foram utilizados, sendo as repetições de 25 sementes foram agrupadas de quatro em quatro, de forma a obter as repetições de 100 sementes dentro de cada laboratório (RAS, 2009). Não foram detectados *outliners* pela estatística de Hampel ou pelo método gráfico de Box-plot. O conjunto de dados de cada amostra separadamente, e também todo o conjunto de dados, atenderam as pressuposições de normalidade dos resíduos (Teste de Shapiro-Wilk, $P > 0,01$) e homogeneidade de variâncias (Teste de Levene, $P > 0,01$).

Comparação com os resultados da organizadora

Os resultados médios dos laboratórios dos três lotes de limão-cravo foram compatíveis com os resultados da organizadora (referência). Adicionalmente, os resultados de cada laboratório também foram compatíveis com a referência, exceto para o lote 2 no laboratório G (Tabela 13).

Repetitividade e Reprodutibilidade determinadas pelo método indicado pela ISTA

A variação entre repetições dentro de cada laboratório foi baixa para lotes 1 e 2, com coeficiente médio dos laboratórios $< 15\%$. Entretanto, o coeficiente médio do lote 3 foi mais alto (20,86%), sendo que um dos laboratórios este coeficiente foi maior que 30% (Tabela 13). Em consequência, o coeficiente de repetitividade dos lotes 1 e 2 foram classificados como ótimos e o do lote 3 como bom (Tabela 12).

Observa-se também que os resultados do lote 3 entre laboratórios variaram mais que os resultados dos lotes 1 e 2 (Tabela 13). Desta forma, a variância entre laboratórios foi maior para este lote. Assim, o coeficiente de reprodutibilidade do lote 3 foi classificado como bom, enquanto que este coeficiente para lotes 1 e 2 foi classificado como ótimo (Tabela 12).

Repetitividade, Reprodutibilidade e R&R de acordo com Brandão (2013)

A análise de variância com dois fatores não mostrou interação significativa entre os fatores lotes e laboratórios. Além disso, o fator lote mostrou diferença entre lotes com significância maior que 0,1%, o que indica que as pressuposições para cálculo da repetitividade, reprodutibilidade e R&R por meio deste método foram atendidas. Em ensaios interlaboratorial para validação de métodos de germinação para espécies florestais brasileiras, Brandão (2013) sugere que quando estas duas condições ocorrem, o método pode ser considerado validado. Usando-se esta metodologia, as estimativas de repetitividade, reprodutibilidade e R&R são estimadas para o ensaio (conjunto dos resultados de todos os lotes e laboratórios), não para lotes individualmente (Tabela 14). Pode-se constatar que a variância da repetitividade, que representam a variação entre repetições dentro do mesmo laboratório, foi maior que a reprodutibilidade, que neste caso representa a variação entre laboratórios. Desta forma, a variância da repetitividade contribuiu mais para a variância total do ensaio que a reprodutibilidade. O coeficiente de variação de R&R foi classificado como ótimo, indicado que o método de germinação proposto para sementes de *Citrus limonia* teve um bom desempenho no ensaio interlaboratorial.

Situação da metodologia proposta

Como, neste ensaio, os resultados dos laboratórios concordaram com o obtido pela organizadora (referência), apresentaram coeficiente de repetitividade e reprodutibilidade calculados por lote classificados ótimos ou bons, e coeficiente

de variação de R& R classificado como ótimo, este método pode ser considerado validado.

CONCLUSÕES

- As sementes dos porta-enxertos tangerina Cleópatra, limão-cravo, citrumelo germinam melhor nas temperaturas de 25 e 30°C, com a temperatura mais alta proporcionando germinação mais rápida de sementes de limão-cravo. Sementes destes três porta-enxertos, assim como as de trifoliata são fotoblásticas neutras.
- Substratos muito úmidos (quantidade de água > que 73% da capacidade de retenção do papel) não são adequados para testes de germinação em rolo do papel destas espécies, podendo provocar mortalidade de sementes e aumentar o tempo de germinação de sementes de tangerina Cleópatra.
- Não é vantajoso realizar tratamento pré-germinativo das sementes de tangerina Cleópatra, limão-cravo, citrumelo e trifoliata, com hipoclorito 1% por 15 minutos. A imersão de sementes de citrumelo em água com umidade inicial de 40°C foi favorável, pois proporcionou maior porcentagem de plântulas normais na primeira contagem e não provocou anormalidades.
- A germinação de *C. reshni*, *C. limonia*, *Poncirus trifoliata* e do híbrido *C. paradisi x Poncirus trifoliata* foi do tipo criptocotiledonar hipogeal e as estruturas essenciais das plântulas são a raiz primária, hipocótilo, cotilédones, epicótilo, folhas primárias e gema apical. As anormalidades mais frequentes ocorrem apenas na raiz, destacando-se atrofia, bifurcação ou ausência.
- Apenas a metodologia proposta para os testes de germinação de sementes de porta-enxertos de limão-cravo (rolo de papel umedecido com quantidade de água entre 1,6 a 1,4 vez o peso do substrato, temperatura de 30°C, oito ou

mais horas de luz, primeira contagem 14-21 dias e contagem final aos 28 dias e, se necessário, umedecimento adicional do substrato na primeira contagem), apresentou bons coeficiente de variação de repetitividade, reprodutibilidade e ótimo coeficiente de variação de R&R, sendo considerada validada para incorporação às regras para análise.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Brasília: Ministério de Estado da Saúde, 2012. 23p.

ALBRECHT, U. *Citrus seedlings – root requirements* [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por e-mail ualbrecht@ufl.edu. Acesso em: 2 dez. 2016.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS (AOSA); **Tetrazolium Testing Handbook**, 2010.
<http://www.aosaseed.com/publications.htm#Tetrazolium%20Testing%20Handbook> Acesso em: 3 dez. 2016.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS (AOSA). **Rules for testing seeds**. Volume 1. Principles and Procedures 2012.
<http://www.aosaseed.com/publications.htm#2010%20AOSA%20Rules%20for%20Testing%20Seeds> Acesso em: 03 dez. 2016.

BAPTISTELLA, C. da S.L. Evolução dos viveiros de citros no Brasil. *Informações econômicas*, v.38, n.4, p.75-80, 2005.

BOWMAN, K. *Citrus seedlings – root requirements* [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por e-mail Kim.bowman@ars.usda.gov Acesso em: 2 dez. 2016.

BRANDÃO, N.A.L. *Repetitividade e reprodutibilidade na validação de métodos para testes de germinação de sementes de espécies florestais*. 2013. 101p. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Lei 10.711 de 5 agosto de 2003*. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF. 2003.
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/L10.711.htm Acesso em: 5 jan. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para Análise de sementes*. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa nº48 de 24 de setembro de 2013*. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF. 2013.
http://www.lex.com.br/legis_24871657_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_48_DE_24_DE_SETEMBRO_DE_2013.aspx Acesso em 04 jan. 2017.

CARMONA, R.; REZENDE, L.P.; PARENTE, T.V. Extração química de sementes de gabioba (*Campomanesia adamantium* Camb). *Revista Brasileira de Sementes*, v.16, n.1, p.31-33, 1994.
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_serial&pid=2317-1537&lng=en&nrm=iso Acesso em: 04 jan. 2017.

CARVALHO, J.A.; VON PINHO, E.V.R.; OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M.; BONOME, L.T. Qualidade de sementes de limão-cravo (*Citrus limonia* Oesbeck) durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, v.24, n.1, p.286-298, 2002a. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222002000100040> Acesso em 12 jan. 2017.

CARVALHO, J.A.; VON PINHO, E.V.R.; OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M.; BONOME, L.T. Testes rápidos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de citrumelo swingle. *Revista Brasileira de Sementes*, v.24, n.1, p.263-270, 2002b. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222002000100037> Acesso em 12 jan. 2017.

CARVALHO, S.A.; SILVA, L.F.C. Monitoring the viability of *Citrus* rootstocks seeds stored under refrigeration. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.35, n.1, p.238-245, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452013000100027> Acesso em 12 jan. 2017.

CHILEMBWE, E.H.C.; CASTLE, W.S.; CANTLIFFE, D.J. Grading, hydrating, and osmotically priming seed of four citrus rootstock to increase germination rate and seedling uniformity. *Journal of Society Horticultural Science*, v.117, n.3, p.368-372, 1992.

COELHO, R.I.; LOPES, J.C.; GROTH, D.; SOUSA, N.A. Caracterização morfológica da planta, frutos, sementes e plântulas de tangerina (*Citrus reticulata* L.) de ocorrência natural no sul do estado do Espírito Santo. *Revista Brasileira de Sementes*, v.23, n.2, p.294-301, 2001.
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_serial&pid=2317-1537&lng=en&nrm=iso Acesso em: 12 jan. 2017.

DANTAS, B.I.; GUIMARÃES, R.M.; VON PINHO, E.V.R.; CARVALHO, M.L.M. Osmotic priming methodologies in relation to the physiological performance of rangpur lime seeds (*Citrus limonia* Osbeck). *Revista Brasileira de Sementes*, v.32, n.3, p.141-151, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222010000300016> Acesso 17 jan. 2017.

DAROSCI, A.A.; PAULILO, M.T. Ecophysiological aspects of the seed and seedling of *Raulinoa echinata* (Rutaceae), a species endemic to the riparian forests of Itajaí valley. *Rodriguésia*, v.62, n.2, p.273-281. 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201162205> Acesso em 17 jan. 2017.

DIAS, M.A.; ZUCOLOTO, M.; DIAS, D.C.F.S.; SILVA, D.F.P.; SEDIYAMA, C.A.Z.; SOUZA NETO, J.D. Resposta fisiológica de sementes de variedades porta-enxertos de citros submetidas à condicionamento osmótico. *Comunicata Scientiae*, v.3, n.4, p.238-243, 2012.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. Effect of moisture content and method of rehydration on the susceptibility of pea seeds to imbibition damage. *Seed Science Technology*, v.18, n.1, p.131-177, 1990.

FERREIRA, E.B.; CAVALCANTI, P.P.; NOGUEIRA, D.A. *ExpDes.pt: Experimental Designs package* (Portuguese). R package version 1.1.2. 2013. Alfenas: UNIFAL. 237p.

FOX, J.; WEISBERG, S. *An R Companion to Applied Regression*. Thousand Oaks: Sage, 2. Ed., 2011. 449p.

FREITAS, S.J.; BARROSO, D.G.; SILVA, R.F.; MARTINS, V.H.C.R.; FREITAS, M.D.S.; FERREIRA, P.R. Métodos de remoção da sarcotesta na germinação de sementes de Jaracatiá. *Revista Árvore*, v.35, n.1, p.91-96, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622011000100011> Acesso em: 15 fev. 2017.

GARWOOD, N.C. 1996. Functional morphology of tropical tree seedlings. In: Swaine, M.D. (ed.). *The ecology of tropical forest tree seedlings*. Paris: UNESCO/ Parthenon Publishing, 1996. p.59-129.

GONÇALVES, M.I.F.; PEREIRA, V.J.; SANTANA, D.G.; FARIA, J.M.R.; OLIVEIRA, J.V.; ARAÚJO, L.C.I. Tratamento térmico para acelerar a germinação de sementes do porta-enxerto limão-cravo (*Citrus limonia*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 19º, 2015, Foz de Iguaçu, Informativo Abrates, v.,25, n. 2, 2015. CD-ROM.

HAMILTON, K.M.; ASHMORE, S.E.; PRICHARD, H.W. Thermal analysis and dryopreservation of seeds of Australian wild Citrus species (Rutaceae): *Citrus australasica*, *C. inodora* and *C. garrawayi*. *CryoLetters*, v.30, p.268-279, 2009.

HAMPEL, F.R. The breakdown points of the mean combined with son rejection rules. *Technometrics*, n.27, p.95-107, 1985.

HAYWARD, H.E.; LONG, E.M. The anatomy of the seedling and Roots of the Valência Orange. *Technical Bulletin*, n.786, p.1-31, 1942.
<https://EconPapers.repec.org/RePEc:ags:uerstb:169045> Acesso em: 17 jan. 2017.

HONG, T.D.; ELLIS, R.H. *A Protocol to determine seed storage behavior*. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 78p.

HONG, T.D.; LININGTON, S.; ELLIS, E. *Compendium of information on seed storage behavior*. Rome: International Plant Genetic Resources Institute. 1996. 106p.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). *Handbook of seedling evaluation*. Bassersdorf: International Seed Testing Association. 3. Ed. **2013**. 276p.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). *International rules for seed testing*. Switzerland: International Seed Testing Association, 2014. 242p.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). *Method validation for seed testing*. Bassersdorf: International Seed Testing Association, **2007**. 70p.

ISO 5725/2. *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Parte 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of standard measurement method*. Genève: International Organization for Standardization, 1994. 76p.

JOHANSEN, D.A. *Plant Micro technique*. New York: Mc Graw-Hill Book Co. Inc., 1940. 523p.

KATAOKA, V.Y.; CARVALHO, M.L.M.; OLIVEIRA, M.S.; CALDEIRA, C.M. Validação de metodologia para o teste de germinação em sementes de nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L. var. *oleiferus*). *Revista Brasileira de Sementes*, v.33, n.1, p.069-079, 2011.

KING, M.W.; ROBERTS, E.H. The desiccation response of seeds of *Citrus limon* L. *Annals of Botany*, v.45, n.4, p.489-492, 1980.

KING, M.W.; SOETISNA, U.; ROBERTS, E.H. The dry storage of *Citrus* seeds. *Annals of Botany*, v.45, n.6, p.489-492, 1981.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086194> Acesso em: 15 fev. 2017.

KOLLER, O.L.; STUKER, H.; VERONA, L.A.F.; SOPRANO, E. Efeito da umidade da semente, da temperatura de estocagem e da duração de estocagem sobre a germinação de *Poncirus trifoliata* e de outros porta-enxertos de citros. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.15, n.1, p.27-33, 1993.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; FILHO, A.B.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; FILHO, H.D. C. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: JUNIOR, D.M.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; JUNIOR, J.P. *Citros*. Campinas: IAC/FUNDAG, 2005. Cap. 18. p.508-566.

LOBO, G.A.; SANTANA, D.G.; SALOMÃO, A.N.; REHBEIN, L.S.; WIELEWICKI, A.P. Abordagem tecnológica da classificação morfofuncional de plântulas de 50 espécies florestais brasileiras. *Journal of Seed Science*, v.36, n.1, 2014, p.87-93. <http://dx.doi.org/10.1590/S2317-15372014000100011>

MACHADO, M.A. *Mudas de citros no Brasil: produção, certificação e biotecnologia*.
http://www.congressofruticultura2012.com.br/anais/programacao/textos-paineis/Painel_15_Marcos_Machado.pdf Acesso em: 01 mai. 2017.

MAKEEN, A.M.; NORMAH, M.N.; DUSSERT, S.; CLYDE, M.M. Seed moisture characteristics in relation to total lipid content of five *Citrus* taxa using equilibrium dehydration protocol. *Seed Science and Technology*, v.34, n.2, p.453-464, 2006.

MARTINS, L.; SILVA, W.R.; LAGO, A.A. Conservação de sementes de tangerina 'Cleopátra': teor de água e temperatura do ambiente. *Revista Brasileira de Sementes*, v.29, n.1, p.178-185, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222007000100025> Acesso em: 14 fev. 2017.

MUMFORD, P.M.; PANGGABEAN, G. A comparison of the effects of dry storage on seeds of *Citrus* species. *Seed Science and Technology*, v.10, p.257-266, 1982.

NAQVI, S.A.; KHAN, M.M.; SHAHID, M.; JASKANI, M.J.; IGRAR, A.K., KHAN, M.Z.; ZIA, K.M. Biochemical profiling of mucilage extracted from seeds of different citrus rootstocks. *Carbohydrate Polymers*, v.83, p.623-628, 2011.

NERY, M.C. *Colheita, beneficiamento e controle de qualidade de sementes de nabo forrageiro*. 2008. 180f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

NESON, L.G. *Citrus trifoliata* (Rutaceae): review of biology and distribution in the USA. *Phytoneuron*, v.46, p.1-14, 2014.

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

PAIVA, J.G.A.; FRANK-DE-CARVALHO, S.M; MAGALHÃES, M.P.; GRACIANO-RIBEIRO, D. 2006. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Botanica Brasilica*, v.20, n.2, p.257-264, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062006000200002> Acesso em: 13 fev. 2017.

PEREIRA, V.J.; GONÇALVES, M.I.F.; SANTANA, D.G.; FARIA, J.M.R.; ARAÚJO, L.C.I.; OLIVEIRA, J.V. Aperfeiçoamento de método para teste de germinação de Citrumelo Swingle (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*), In: Congresso Brasileiro de Sementes, 19º, 2015, Foz de Iguaçu, Informativo Abrates, v.,25, n. 2, 2015. CD-ROM.

R Development Core Team. *R A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2016. 578p.

Regras para Análise de Sementes – RAS. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. Brasília: MAPA, 2009. 399p.

ROUSE, R.E.; SHERROD, J.B. Optimum temperature for Citrus seed germination. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, v.109, p.132-135, 1996.

RYAN, G.F. Albinism in *Citrus* Seedlings. *California Agriculture*, v.12, n.3. p.7-8, 1958.

SILVA, T.T. DE A.; GUIMARÃES, R.M.; VON PINHO, E.V.R.; ABREU, L.A.S. Storage of 'Swingle' citrumelo seeds in different maturation stages subjected to fungicide treatment. *Revista Brasileira de Sementes*, v.33, n.4, p.770-778, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222011000400019> Acesso em: 14 fev. 2017.

SOETISNA, U.; KING, M.W.; ROBERTS, E.H. Germination test recommendations for estimating the viability of moist or dry seeds of lemon (*Citrus limon*) and lime (*C. aurantifolia*) *Seed Science Technology*, v.13, p.87-110, 1985.

USBERTI, R. Determinação do potencial de armazenamento de sementes de soja pelo teste do envelhecimento acelerado. *Revista Brasileira de Sementes*, v.1, n.2, p.28-40, 1979.

Tabela 1. Lotes utilizados nos experimentos destinados ao desenvolvimento dos métodos para germinação de sementes de porta-enxertos Cleópatra, citrumelo, limão-cravo e trifoliata.

Porta-enxerto	Lote	Conteúdo de água (%)	Peso de mil sementes (g)	Origem		Produtor de sementes?
				Estado	Região	
Cleópatra	A	30,8	83,9	SP	Campinas	Sim
	B	28,2	102,4	SP	Piracicaba	Sim
	C	24,4	91,8	MG	Central	Sim
	D	60,1	124,4	PR	Norte-central	Sim
	E	24,8	106,0	MG	Central	Sim
	F	39,8	89,2	SP	Campinas	Sim
	G	37,9	102,2	SC	Vale do Itajaí	Não
	H	29,0	77,7	MG	Central	Não
	I	50,0	110,0	PR	Norte-central	Sim
Citrumelo	A	33,7	160,9	SO	Campinas	Sim
	B	30,4	198,8	SP	Piracicaba	Sim
	C	33,7	175,3	MG	Central	Sim
	D	32,8	123,1	SP	Piracicaba	Sim
	E	35,4	176,1	MG	Central	Sim
	F	35,7	169,4	SP	Campinas	Sim
Limão-cravo	A	13,4	45,5	SP	Piracicaba	Sim
	B	8,0	40,5	MG	Zona da Mata	Não
	C	12,0	44,4	SP	Campinas	Sim
	D	20,2	48,0	MG	Zona da Mata	Sim
	E	15,1	50,1	SP	Ribeirão Preto	Sim
	F	18,7	52,1	MG	Central	Não
	G	22,0	47,4	SP	Piracicaba	Sim
	H	27,5	55,8	SC	Vale do Itajaí	Não
	I	21,3	41,9	SP	Campinas	Sim
Trifoliata	A	35,7	184,4	SP	Campinas	Sim
	B	38,0	210,6	MG	Central	Sim
	C	30,4	150,2	SP	Piracicaba	Sim

Tabela 2. Germinação de sementes de tangerina Cleópatra a 30°C, com luz constante, de acordo com a quantidade de água utilizada para umedecimento do papel de germinação.

Lote	Plântulas normais (%)						Primeira contagem plântulas normais (%)						Sementes mortas (%)			
	3,0 x	2,5 x	2,0 x	1,7 x	1,4 x	3,0 x	2,5 x	2,0 x	1,7 x	1,4 x	3,0 x	2,5 x	2,0 x	1,7 x	1,4 x	
A	58,0Ba	85,0Aa	84,0Aa	89,5Aa	84,7Aa	8,0Da	18,0Ca	21,0Ca	33,3Ba	46,9Aa	7,0Ab	1,0Ac	1,0Ac	1,0Ac	1,0Ac	
B	59,0Aa	45,2Bb	63,0Ab	75,0Ab	67,7Aa	6,0Ca	1,0Cb	12,0Bb	25,0Ab	25,3Ab	16,0Ab	5,7Ac	9,0Ac	3,0Ac	14,0Ab	
C	14,0Bb	29,5Bc	65,0Ab	63,0Ab	65,3Aa	0,0Ca	2,0Cb	9,0Bb	10,0Bc	19,8Ab	61,0Ac	43,3Bb	19,0Cb	17,0Cb	15,8Cb	
D	16,0Ab	18,0Ac	27,0Ac	29,0Ac	12,0Ab	1,0Aa	0,0Ab	1,0Ac	2,0Ad	2,0Ac	64,0Ac	61,0Aa	53,0Aa	53,0Aa	57,0Aa	
Média	36,8	44,4	59,8	64,1	57,4	3,8	5,3	10,8	17,6	23,5	37,0	27,8	20,5	18,5	22,0	
CV (%)	24,56						44,59						32,92			
Lote	Tempo médio de germinação (dias)					Coeficiente de velocidade de germinação (%)					Sincronia					
	3,0 x	2,5 x	2,0 x	1,7 x	1,4 x	3,0 x	2,5 x	2,0 x	1,7 x	1,4 x	3,0 x	2,5 x	2,0 x	1,7 x	1,4 x	
A	26,2	24,0	21,2	20,1	17,9	3,8	4,1	4,7	5,0	5,6	0,28	0,32	0,37	0,34	0,43	
B	26,7	25,9	21,8	20,3	20,6	3,8	3,9	4,6	4,9	4,9	0,38	0,28	0,48	0,38	0,30	
C	28,0	26,5	22,3	21,2	20,9	3,6	3,8	4,5	4,7	4,8	0,33	0,23	0,44	0,49	0,33	
D	24,6	28,7	24,3	24,5	22,4	4,2	3,5	4,1	4,1	4,5	0,74	0,28	0,39	0,34	0,44	
Média	26,4A	26,3A	22,3B	21,5B	20,1C	3,8C	3,8C	4,5B	4,7B	5,0A	0,43A	0,28A	0,42A	0,39A	0,37A	
CV (%)	9,37					8,67					34,2					

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância

Tabela 3. Germinação de quatro porta-enxertos de citros em temperatura de 30°C constante, em ausência e presença de luz.

Espécie	Lote	Plântulas normais (%)		
		Luz Contínua	8 horas de luz	Escuro
Cleópatra	E	75,0	73,0	72,0
	F	71,0	74,0	70,0
	G	45,0	47,0	43,5
	H	29,0	36,0	32,0
Média		55,0A	57,5A	54,4A
CV (%)			17,6	
Citrumelo	A	86,0	81,0	84,0
	B	73,0	74,0	70,5
	C	73,0	79,3	77,0
	D	76,0	78,0	72,0
	E	68,6	76,0	69,0
	F	65,0	63,0	57,0
Média		73,6A	75,2A	71,6A
CV (%)			21,73	
Limão-cravo	A	75,0	80,0	81,0
	B	70,0	68,0	66,0
	C	57,0	50,0	47,0
Média		67,3A	66,0A	64,0A
CV (%)			16,41	
Trifoliata	A	64,6	71,0	74,0
	B	54,0	70,0	68,0
	C	52,0	63,0	54,00
Média		56,9A	68,0A	65,3A
CV (%)			18,94	

Dentro de cada porta-enxerto, médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Tabela 4. Germinação de três porta-enxertos de citros nas temperaturas constantes de 25, 30 e 35, em presença de luz constante.

Espécie	Lote	Plântulas normais (%)				Plântulas deformadas (%)				Plântulas anormais (%)			
		25°C	30°C	35°C	Média	25°C	30°C	35°C	Média	25°C	30°C	35°C	Média
Cleópatra	E	75,0Aa	76,0Aa	18,0Bb	56,0	19,0Bb	23,0Ba	66,0Aa	36,0	19,0Bb	23,0Ba	77,0Aa	39,7
	F	70,0Aa	70,0Aa	38,0Ba	59,3	23,0Bb	25,0Ba	54,0Ab	34,0	24,0Bb	27,0Ba	58,0Ab	36,3
	G	38,0Ab	47,0Ab	11,0Bb	32,0	28,0Bb	20,0Ba	53,0Ab	33,6	28,0Bb	26,0Ba	62,0Ab	38,7
	H	27,0Ab	38,0Ab	10,0Bb	25,0	42,0Aa	29,0Ba	45,0Ab	38,7	45,0Aa	40,0Aa	50,0Ab	45,0
Média		52,50	57,8	19,25		28,0	24,3	54,5		29,0	29,0	29,0	
CV (%)			19,54			26,38				24,53			
Citrumelo	A	86,0	81,0	66,0	77,7a	12,0	18,0	33,0	21,0b	13,0	19,0	34,0	22,0b
	B	73,0	74,0	64,8	70,6a	13,0	17,0	24,8	18,3b	14,0	18,0	27,9	20,0b
	C	73,0	79,3	55,0	69,1a	24,0	17,6	41,0	27,5a	24,0	17,6	44,0	28,5a
	D	76,0	78,0	51,0	68,3a	15,0	15,0	26,0	18,7b	18,0	16,0	27,0	20,3b
	E	68,6	76,0	58,0	67,5a	24,3	17,0	34,0	25,1a	25,4	19,0	38,0	27,5a
	F	45,0	63,0	32,0	46,7b	18,0	8,0	39,0	21,6b	18,0	10,0	45,0	24,3a
Média		70,3A	75,2A	54,5B		17,7B	15,4B	33,0A		18,7B	16,6B	36,0A	
CV (%)			15,63			34,11				34,46			
Limão-cravo	A	75,0	80,0	57,0	70,7a	19,0	13,0	33,0	21,7a	23,0	15,0	33,0	23,7a
	B	70,0	70,0	47,0	62,3a	21,0	14,0	28,0	21,0a	21,0	15,0	29,0	21,7a
	C	53,0	51,0	41,0	48,3b	13,0	21,0	25,0	21,7a	13,0	22,0	30,0	21,7a
Média		66,0A	67,0A	48,3B		17,7B	16,0B	28,7A		19,0B	17,3B	30,7A	
CV (%)			17,85			34,63				40,38			

Dentro de cada porta-enxerto, médias seguidas de mesma letra maiúscula na mesma linha e letra minúscula na coluna não são estatisticamente diferentes pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Tabela 5. Germinação do porta-enxerto trifoliata (*Poncirus trifoliata*) em diversas temperaturas constantes sob luz contínua e em temperatura e luz alternadas.

Lote	Plântulas normais (%)				Média
	25°C	30°C	35°C	20-30°C	
A	64,6Aa	71,0Aa	67,0Aa	74,0Aa	59,3
B	59,0Ba	60,0Ba	35,0Cb	83,0Aa	69,1
C	47,0Ba	60,0Aa	31,0Bb	43,4Bb	45,4
Média	56,9	63,7	44,3	66,8	
CV (%)	18,58				
Lote	Plântulas deformadas				Média
	25°C	30°C	35°C	20-30°C	
A	25,3Aa	26,0Aa	28,0Ab	23,0Ab	25,6
B	35,0Ba	37,0Ba	59,0Aa	16,0Cb	36,8
C	33,0Aa	27,0Aa	41,0Ab	39,3Aa	35,1
Média	31,1	30,0	42,7	26,1	
CV (%)	39,45				
Lote	Plântulas anormais (%)				Média
	25°C	30°C	35°C	20-30°C	
A	31,3Aa	28,0Aa	31,0Ab	24,0Ab	28,6
B	37,0Ba	37,0Ba	59,0Aa	17,0Cb	37,5
C	43,0Ba	35,0Ba	61,0Aa	50,5Aa	47,4
Média	37,1	33,3	50,3	30,48	
CV (%)	32,35				
Lote	Primeira contagem de plântulas normais (%)				Média
	25°C	30°C	35°C	20-30°C	
A	33,2Ba	43,0Ba	56,0Aa	43,0Ba	43,8
B	3,0Ab	4,0Ab	12,0Ac	8,0Ab	6,8
C	25,0Ba	50,0Aa	29,0Bb	35,3Ba	34,8
Média	20,4	32,3	32,3	28,8	
CV (%)	26,14				

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na mesma linha e letra minúscula na coluna não são estatisticamente diferentes pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Tabela 6. Germinação de limão-cravo nas temperaturas constantes de 25 e 30°C, sob luz contínua.

Lote	Plântulas normais (%)			Primeira contagem (%)			Pl. normais aos 28 dias (%)		
	25°C	30°C	Média	25°C	30°C	Média	25°C	30°C	Média
D	81,0	86,0	83,5a	7,0Ba	71,0Aa	39,0	81,0	86,0	83,5a
E	76,0	71,0	73,5b	0,0Bb	13,0Ac	6,5	62,0	71,0	66,0b
F	70,0	75,0	72,5b	0,0Bb	22,0Ab	11,0	61,0	75,0	68,0b
G	35,0	37,0	36,0c	0,0Ab	3,0Ad	1,5	30,0	37,0	33,5d
Média	65,5A	67,3A	7,0	27,3	58,0B	67,3A			
CV (%)	13,12			25,18			15,84		

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na mesma linha e letra minúscula na coluna não são estatisticamente diferentes pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Tabela 7. Germinação de quatro porta-enxertos de citros a 30°C, sob luz constante, após tratamentos pré-germinativos.

Porta-enxerto	Lote	Plântulas normais (%)				Primeira contagem plântulas normais (%)				Plântulas anormais (%)			
		Controle	Hipoclorito 1%	Água quente ¹	Média	Controle	Hipoclorito 1%	Água quente ¹	Média	Controle	Hipoclorito 1%	Água quente ¹	Média
Cleópatra	E	76,0Aa	75,0Aa	72,0Aa	74,3	5,0	0,0	1,0	2,0c	23,0Aa	19,0Ab	25,0Aa	22,3
	F	67,0Aa	70,0Aa	67,0Aa	68,0	23,0	4,0	23,0	16,7a	29,0Aa	24,0Ab	21,0Aa	24,7
	G	43,0Ab	38,0Ab	46,0Ab	42,3	3,0	2,0	10,0	5,0c	26,0Aa	28,0Ab	29,0Aa	27,7
	H	55,0Ab	27,0Bb	55,0Ab	45,7	11,0	2,0	15,0	9,3b	26,0Ba	45,0Aa	25,0Ba	32,0
	I	8,0Ac	9,0Ac	1,0Ac	6,0	1,0	1,0	1,0	1,0c	16,0Aa	10,0Ab	19,0Aa	15,0
Média		49,8	43,8	48,2		10,5A	2,0B	12,3A		24,0	25,2	23,8	
CV (%)			20,95				39,61				39,34		
Limão-cravo	H	83,8	83,0	72,0	79,6a	73,8	74,0	72,0	73,3a	14,3	15,0	26,0	18,4a
	I	39,8	32,0	18,0	29,9b	36,8	30,0	18,0	28,3b	15,0	15,0	22,0	17,3a
Média		61,8A	57,5A	45,0B		55,3A	52,0A	45,0A		14,6B	15,0B	24,0A	
CV (%)		11,35						17,65				33,17	
Citrumelo	A	81,0	86,0	86,0	84,3a	35,0	21,0	39,0	31,7a	13,0	13,0	14,0	13,3c
	B	79,0	76,0	86,7	80,6a	28,0	14,0	37,1	26,4a	14,0	18,0	7,3	13,1c
	C	71,0	73,0	78,8	74,3b	31,0	24,0	38,5	31,2a	23,0	24,0	21,2	22,7b
	D	68,0	73,0	75,0	72,0b	22,0	21,0	33,0	25,3a	17,0	14,0	11,0	14,0c
	E	60,0	60,8	66,0	62,52c	25,0	14,5	34,0	21,0b	28,0	30,2	33,0	31,1a
	F	40,0	45,0	56,0	47,0d	9,0	14,0	28,0	17,0b	22,0	18,0	17,0	19,0c
Média		67,8A	67,8A	74,8A		25,0B	17,6C	34,9A		17,8A	21,1A	17,2A	
CV (%)			17,46				39,44				35,8		
Trifoliata	A	71,0	71,0	-	71,0a	50,0	43,0	-	46,5a	26,0	28,0	-	27,0a
	B	74,0	60,0	-	67,0a	5,0	4,0	-	4,5b	24,0	37,0	-	30,5a
	C	63,0	60,0	-	61,5a	52,0	50,0	-	51,0a	29,0	35,0	-	32,0a
Média		69,3A	63,7A	-		35,7A	32,3A	-		26,3A	33,3A	-	
CV (%)			18,34				22,4				40,5		

¹ Imersão em água com temperatura inicial de 60°C por 4 horas para tangerina Cleópatra e limão-cravo, e com temperatura inicial de 40°C por 4 horas para citrumelo. Dentro de cada porta-enxerto, médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não são estatisticamente diferentes pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Tabela 8. Protocolo para validação de metodologia de teste de germinação para o porta-enxertos de citros citrumelo (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*)

Espécie	Substrato	Temperatura em °C*	Contagem em dias		Instruções adicionais, incluindo recomendações para supera dormência
			1º	Final	
Citrumelo (<i>Citrus paradisi</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>)	RP	30	21	49	<ul style="list-style-type: none"> - Evitar dessecação das sementes durante preparo e montagem do teste. - Fazer rolos e utilizar 4 folhas de papel por rolo. - Usar substrato bem mais seco que o normal (1,9 a 1,7 vez o peso do papel seco). - Montar rolos com 25 sementes dispostas em fileiras alternas. - Ensacar os rolos com saco plástico para evitar perda ou ganho de água durante o teste. - Primeira contagem pode ser adiada por 7 ou mais dias e o período do teste por até 15 dias. - Se necessário, umedecer o rolo na data da primeira contagem (21 dias). - Realizar contagens intermediárias, no mínimo, de 15 em 15 dias ou de 7 em 7 dias se ocorrerem muitos fungos no teste.

* De acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), em teste de germinação em temperaturas constantes, deve fornecer, no mínimo, oito horas de luz.

Anotar na ficha de análise o número de horas de luz utilizado. RP: rolo de papel.

Tabela 9. Protocolo para validação de metodologia para teste de germinação para o porta-enxerto tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*)

Espécie	Substrato	Temperatura em °C*	Contagem em dias		Instruções adicionais, incluindo recomendações para superar dormência
			1°	Final	
<i>Tangerina Cleópatra (Citrus reshni)</i>	RP	30	21	35	<ul style="list-style-type: none"> - Evitar dessecação das sementes durante preparo e montagem do teste. - Fazer rolos e utilizar 4 folhas de papel por rolo. - Montar rolos com 25 sementes dispostas em fileiras alternadas. - Usar substrato bem mais seco que o normal (1,6 a 1,4 vez o peso do papel seco). - Ensacar os rolos com saco plástico para evitar perda ou ganho de água durante o teste. - Monitorar a aparência dos rolos, se ocorrerem fungos, que podem prejudicar o teste, o substrato pode ser trocado, antes ou durante a primeira contagem. Neste caso, usar substrato com a mesma umidade inicial. - Se necessário, umedecer o rolo na data da primeira contagem (21 dias). - Primeira contagem pode ser antecipada ou adiada em até 7 dias. - Pode ser necessário realizar contagens intermediárias (7 em 7 dias) entre a primeira contagem e a final, especialmente, se ocorrerem fungos no teste.

* De acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), em teste de germinação em temperaturas constantes, deve fornecer no mínimo oito horas de luz.

Anotar na ficha de análise o número de horas de luz utilizado. RP: rolo de papel.

Tabela 10. Protocolo para validação de metodologia para testes de germinação para porta-enxertos de citros limão-cravo (*Citrus limonia*).

Espécie	Substrato	Temperatura °C*	Contagem em dias		Instruções adicionais, incluindo recomendações para superar dormência
			1°	Final	
Limão-cravo (<i>Citrus limonia</i>)	RP	30	14-21	28	<ul style="list-style-type: none"> - Evitar dessecação das sementes durante preparo e montagem do teste. - Fazer rolos e utilizar 4 folhas de papel por rolo. - Montar rolos com 25 sementes dispostas em fileiras ardenadas - Usar substrato bem mais seco que o normal (1,6 a 1,4 vez peso do papel seco). - Ensacar os rolos com saco plástico para evitar perda ou ganho de água durante o teste. - Monitorar a aparência dos rolos, se ocorrerem fungos, que podem prejudicar o teste, o substrato pode ser trocado, antes ou durante a primeira contagem. Neste caso, usar substrato com a mesma umidade inicial. - Se necessário, umedecer o rolo na data da primeira contagem (14 dias). - Dependendo do lote, a primeira contagem varia em até 7 dias. - Pode ser necessário realizar contagens intermediárias (7 em 7 dias) entre a primeira contagem e a final, especialmente, se ocorrerem muitos fungos no teste.

*De acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), em teste de germinação em temperaturas constantes, deve fornecer no mínimo oito horas de luz.

Anotar na ficha de análise o número de horas de luz utilizado. RP: rolo de papel.

Tabela 11. Média da porcentagem de germinação e coeficiente de variação obtidos de quatro repetições em ensaio interlaboratorial destinado à validação de metodologia, para teste de germinação para sementes de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*).

Laboratório	Lote 1			Lote 2			Lote 3		
	Média	CV (%)	CR	Média	CV (%)	CR	Média	CV (%)	CR
A	61,75	13,64	Não	71,50	4,78	Sim	35,75	23,33	Sim
B	73,00	13,51	Sim	54,00	25,30	Não	45,00	8,51	Sim
C	62,00	15,36	Não	77,00	6,18	Sim	33,50	36,92	Sim
D	55,00	7,57	Não	70,50	6,29	Sim	34,00	34,97	Sim
E	58,00	11,61	Não	69,00	13,49	Sim	26,50	30,42	Não
F	70,44	5,39	Sim	76,62	4,75	Sim	26,85	41,00	Não
G	87,00	1,33	Sim	74,50	14,60	Sim	49,00	20,68	Sim
H	58,00	6,53	Sim	71,00	7,45	Sim	53,00	19,85	Sim
I	83,00	4,29	Sim	73,00	10,43	Sim	47,00	12,77	Sim
Média geral	70,13	9,00	Não	70,80	9,49	Sim	38,96	25,48	Sim
Referência – Rolo papel	80,00	5,15	-	70,00	8,81	-	45,25	8,81	-
Germinação em areia	84,00	-	Sim	69,00	-	Sim	49,75	-	Sim

CV: coeficiente de variação entre repetição; CR: compatibilidade com o resultado de referência de acordo com a Tabela 18.11 da RAS (Brasil, 2009).

Tabela 12. Estatísticas de repetitividade, variância entre laboratórios e reprodutibilidade do teste de germinação, obtidos por lote para ensaios interlaboratoriais para sementes de dois porta-enxertos de citros por método indicado pela ISTA.

Espécie	Lote	Germinação média (%)	Repetitividade				Variância entre laboratórios		Reprodutibilidade		
			σ_r^2	S_r	CV _r	Classificação ¹	σ_{lab}^2	σ_R^2	S_R	CV _R	Classificação ¹
<i>Citrus reshni</i>	1	72,02	42,0	6,48	9,00	Ótimo	125,64	167,64	12,95	17,98	Regular
	2	70,52	44,78	6,69	9,49	Ótimo	7,09	51,87	12,79	10,27	Ótimo
	3	40,51	90,45	9,51	23,48	Bom	73,11	163,56	7,20	31,57	Ruim
<i>Citrus limonia</i>	1	84,11	27,29	5,22	6,21	Ótimo	13,50	40,79	6,39	7,59	Ótimo
	2	57,25	37,25	6,09	10,64	Ótimo	37,10	48,52	6,97	12,17	Ótimo
	3	26,57	30,73	5,54	20,86	Bom	60,73	35,26	5,94	22,35	Bom

¹Classificação do coeficiente de variação de acordo com sistema proposto por Brandão (2013).

Tabela 13. Média da porcentagem de germinação e coeficiente de variação obtidas de quatro repetições em ensaio interlaboratorial destinado à validação de método de teste de germinação limão-cravo (*Citrus limonia*).

Laboratório	Lote 1			Lote2			Lote 3		
	Média	CV (%)	CR	Média	CV (%)	CR	Média	CV (%)	CR
A	90,75	2,90	Sim	56,00	13,60	Sim	26,75	10,74	Sim
B	85,75	9,10	Sim	63,25	3,86	Sim	32,25	13,00	Sim
C	86,25	4,17	Sim	57,00	11,98	Sim	29,75	26,24	Sim
D	88,50	2,69	Sim	64,00	8,75	Sim	21,25	32,23	Sim
E	81,00	10,90	Sim	54,50	9,65	Sim	26,25	19,02	Sim
F	77,13	6,00	Sim	58,25	7,47	Sim	22,81	11,40	Sim
G	80,75	6,89	Sim	50,50	8,00	Não	27,25	27,36	Sim
H	82,75	1,52	Sim	54,50	16,72	Sim	26,25	19,02	Sim
Média geral	84,11	6,21	Sim	57,25	10,64	Sim	26,60	20,86	Sim
Referência – Rolo papel	83,00	5,09	-	64,53	4,61	-	27,82	4,62	-
Germinação em areia	84,00	-	Sim	63,00	-	Sim	26,00	-	Sim

CV: coeficiente de variação entre repetição; CR: compatibilidade com o resultado de referência de acordo com a Tabela 18.11 das RAS (Brasil, 2009).

Tabela 14. Estatísticas de repetitividade, reprodutibilidade e R&R obtidos pela análise de variância com dois fatores, de acordo com Brandão (2013) de um ensaio interlaboratorial de resultados de teste de germinação com sementes de limão-cravo (*Citrus limonia*).

Variável	Repetitividade	Reprodutibilidade	R&R	Classificação ¹ CV _{R&R}
Variância (σ^2)	31,70	9,82	41,52	-
Desvio padrão (<i>S</i>)	5,63	3,13	6,44	-
Contribuição (%)	5,35	1,66	7,00	-
Coefficiente de Variação (CV)	10,06	5,60	11,51	Ótimo ¹

¹Classificação do coeficiente de variação de R&R de acordo com Brandão (2013) para germinação média dos lotes utilizados no interlaboratorial (até 60%).

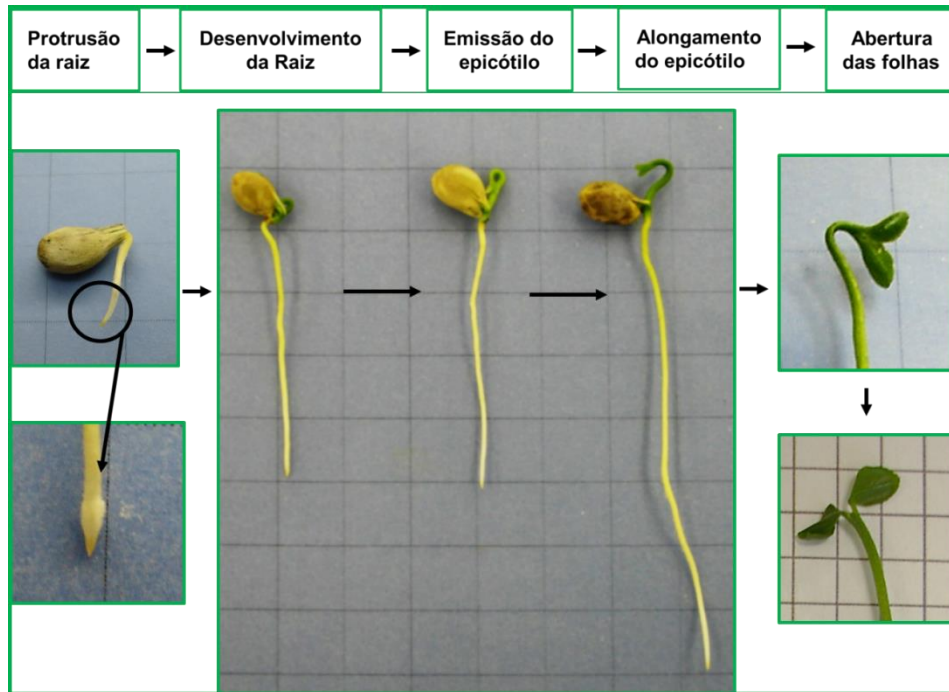


Figura 1. Germinação de sementes de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*) – desenvolvimento deste, a protrusão da raiz até a expansão das folhas primárias.



Figura 2. Plântula de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*) A. Epicótilo e folhas primárias verde-escuro com presença de glândulas de óleo; B. Epicótilo, folhas primárias e gema apical com pequenos tricomas e glândulas de óleo; C. Corte transversal do epicótilo; D. Detalhe do corte transversal do epicótilo mostrando glândula de óleo e um tricoma.

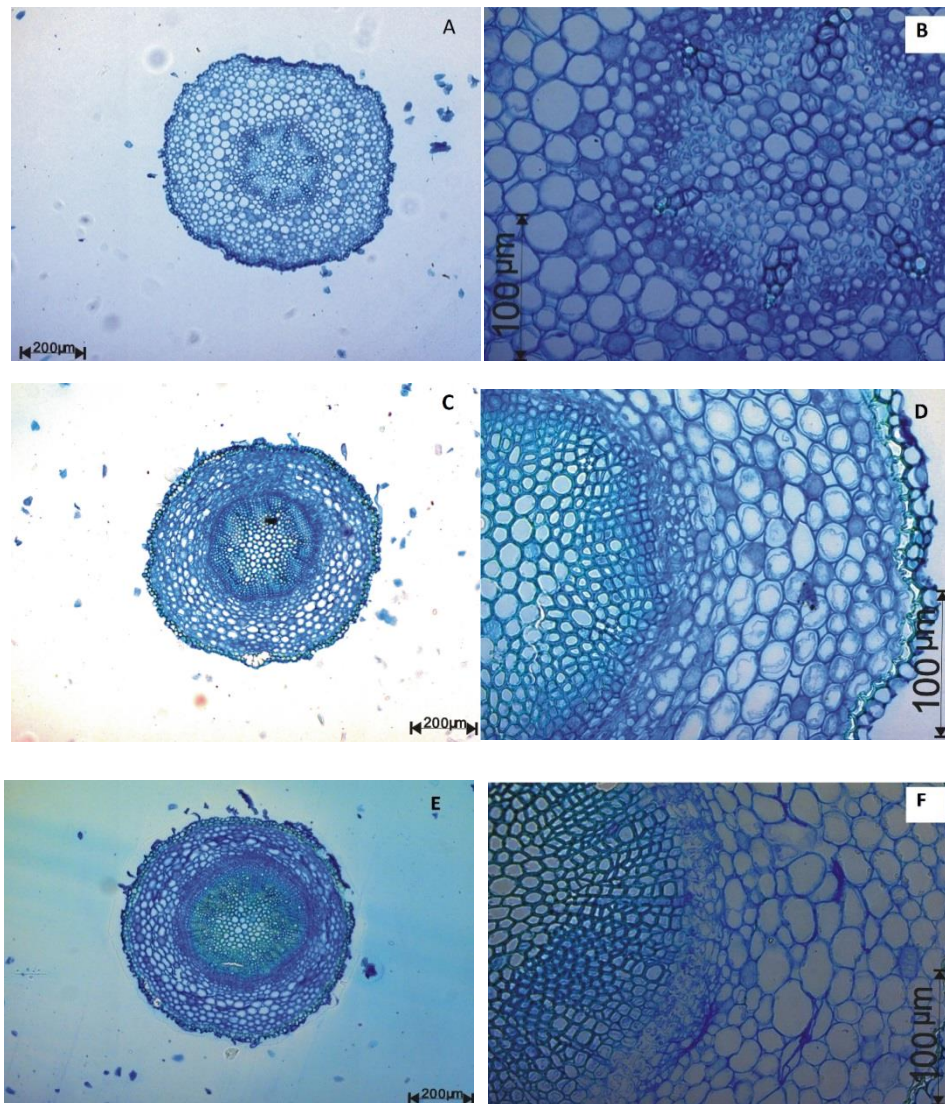


Figura 3. Cortes transversais da raiz da plântula de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*) A e B. Região distal, próxima ao ápice; C e D. Região mediana; E e F. Região proximal ao hipocótilo.

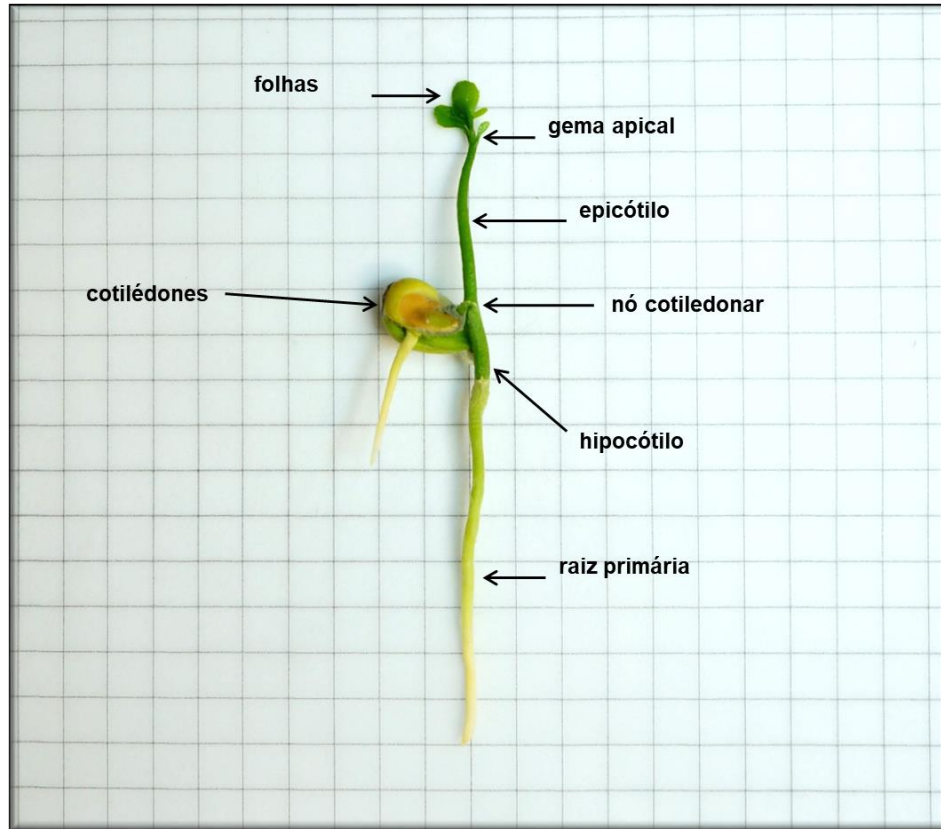


Figura 4. Plântula de citrumelo (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*) com todas as estruturas essenciais (fundo com quadriculado 5 x 5 mm).



Figura 5. Plântulas anormais de porta-enxertos de citros, mostrando defeitos na raiz, sendo A. Raiz bifurcada e infeccionada, B. Bifurcada e com calos C. Apenas raízes secundárias e D. Raiz atrofiada. Quadriculado 10 x 10mm em B e 5m x 5m em C e D.

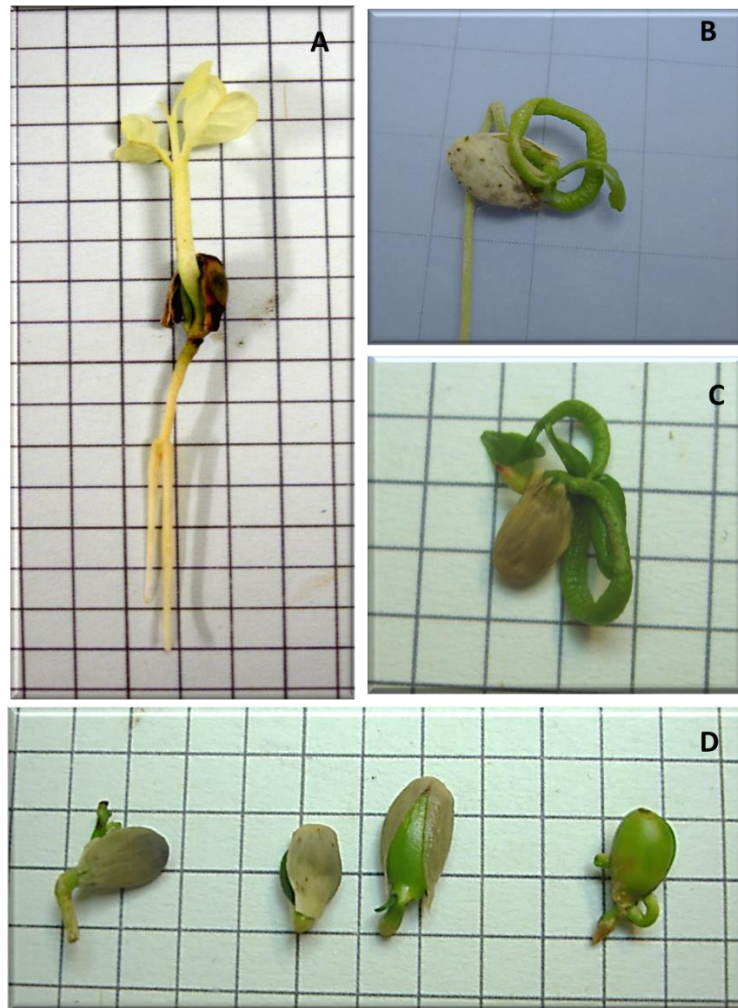


Figura 6. Plântulas anormais de porta-enxertos de citros, mostrando A. Despigmentação, B. Epicótilo em laço, C. epicótilo em laço e sem raiz e D. Parte aérea pouco desenvolvida ou ausente e raiz não desenvolvida. Quadriculado 5mm x 5mm.

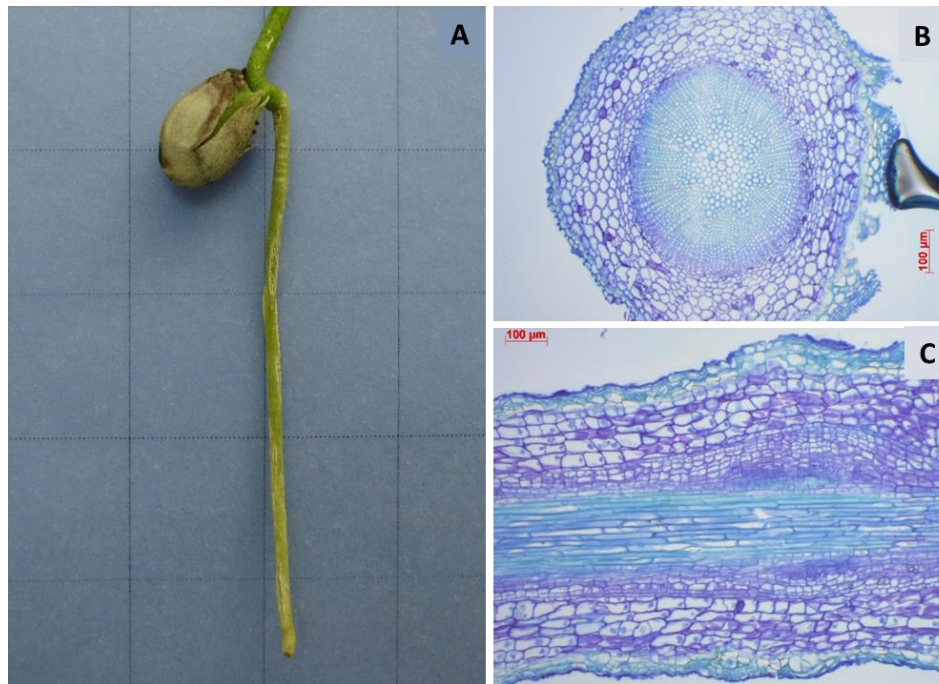


Figura 7. Plântulas de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*) com estrutura anômala. A. Raiz verde, com rachaduras superficiais e ápice escurecido. B. Corte transversal da raiz anômala. C. Corte longitudinal da raiz anômala.

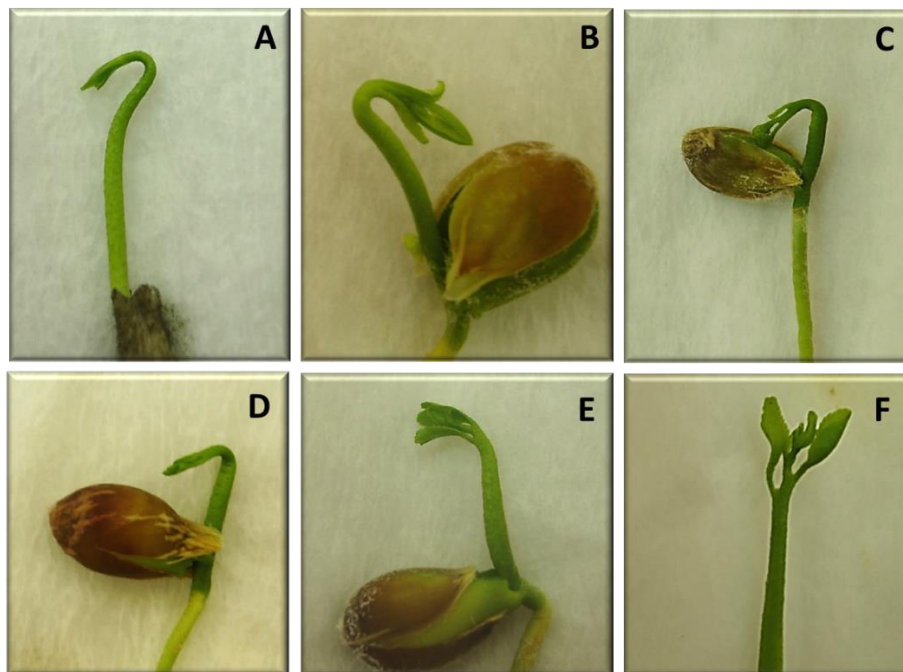


Figura 8. Parte aérea de plântulas de porta-enxertos de citros, mostrando variações no número de folhas, sendo duas em A e D (ocorrem, geralmente, em tangerina Cleópatra e limão-cravo) e três ou mais em B, C, E e F e apresentar diferenças no formato (ocorrem, geralmente, em citrumelo e trifoliata).