

**CITOGENÉTICA DE SEMENTES
ENVELHECIDAS DE *Araucaria angustifolia***

BÁRBARA PEREIRA DANTAS FONTES

1999

BÁRBARA PEREIRA DANTAS FONTES

CITOGENÉTICA DE SEMENTES ENVELHECIDAS DE
Araucaria angustifolia

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora
Prof^ª. Lisete Chamma Davide

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1999

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Fontes, Bárbara Pereira Dantas

Citogenética de sementes envelhecidas de *Araucaria angustifolia* / Bárbara
Pereira Dantas Fontes. -Lavras: UFLA, 1999.

53 p. : il.

Orientadora: Lisete Chamma Davide.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Citogenética. 2. Ciclo celular. 3. Anomalia cromossômica. 4. Quebra no
DNA. 5. Sementes. 6. Envelhecimento. 7. Armazenamento. 8. Araucaria. 9.
Germinação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.97592

-631.9562

BÁRBARA PEREIRA DANTAS FONTES

**CITOGENÉTICA DE SEMENTES ENVELHECIDAS DE *Araucaria
angustifolia***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 29 de janeiro de 1999

Prof: Antonio Claudio Davide

UFLA

Prof: Renato Mendes Guimarães

UFLA

Prof^ª: Giovana Augusta Torres

UFLA


Prof^ª. Lisete Chamma Davide
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

**Ao meus pais,
Benigno José Dantas Fontes e
Maria de Lourdes Pereira D. Fontes.**

**Aos meus irmãos,
Emerson, Eduardo e Bammera P. D. Fontes**

**Ao companheiro e amigo,
Wellington Soares**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, presente em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Federal de Lavras - UFLA, em especial ao Departamento de Biologia (Genética) e professores, pela oportunidade concedida para a realização deste curso de Pós-Graduação.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

Aos professores Lisete Chamma Davide e Antonio Claudio Davide, pela orientação, amizade, boa vontade, conselhos e apoio nos momentos difíceis.

Aos colaboradores deste trabalho, Juscélio Abreu e Eduardo, pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao professor Samuel Pereira de Carvalho (DAG/UFLA), pela amizade.

Ao prof. José Eduardo Brasil, pela utilização do Fotomicroscópio.

Ao Dr. Edilson da EMBRAPA-PR, pelo envio das sementes.

Aos amigos do Laboratórios de Citogenética: Rose, Ana Hortênsia, Juliane, Ivan, Giovana, Sandro.

Aos amigos do Laboratório de Análise de Sementes Florestais: Rosângela, Robério, Olívia, Sibeles, Leticia, José Carlos e José Márcio.

Aos funcionários da Biblioteca Central da UFLA, em especial à amiga Giz (xerox), José Maria, Marcinho e Sebastião, pela amizade e auxílio.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Biologia, pelo apoio, carinho e amizade.

Aos amigos de república: Adriana, Jair, Sônia e Leime, pela amizade, companheirismo, momentos de alegria e harmoniosa convivência.

Aos amigos Mívia e Marcelo, Luciana, Aragão, Leonardo, Dona Cida, Carlota Joaquina, Ramon e família, que me propiciaram momentos de alegria.

Aos alunos, professores e amigos da UESB.

A Wellington Soares, pelo companheirismo, amor e amizade.

Aos meus familiares, pelo amor, carinho e apoio, tornando possível vencer mais esta etapa em minha vida.

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

MUITO OBRIGADA.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Classificação fisiológica das sementes quanto ao armazenamento.....	03
2.2 Armazenamento de sementes recalcitrantes.....	05
2.2. Armazenamento de sementes de araucaria.....	06
2.3 Envelhecimento artificial de sementes.....	08
2.4 Germinação e vigor de sementes.....	11
2.5 Longevidade e deterioração de sementes.....	14
2.6 Alterações material genético.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Sementes.....	23
3.2 Grau de umidade.....	23
3.3 Tratamentos aplicados.....	23
3.3.1 Envelhecimento artificial.....	23
3.3.2 Armazenamento.....	24
3.4 Avaliação da qualidade.....	24
3.4.1 Viabilidade.....	24
3.4.2 Vigor.....	25
3.5 Análise citogenética.....	25
3.6 Análise estatística.....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 Grau de umidade.....	27
4.2 Efeito do armazenamento sobre a viabilidade e vigor de sementes de araucaria.....	27
4.3 Efeito do envelhecimento artificial sobre a viabilidade e vigor de sementes de araucaria.....	29
4.4 Efeito do armazenamento e do envelhecimento artificial sobre o ciclo celular de sementes de araucaria.....	34
5 CONCLUSÕES.....	42
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

RESUMO

FONTES, B. P. D. Citogenética de sementes envelhecidas de *Araucaria angustifolia*. UFLA, 1999. 53p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)*

As perdas de vigor e viabilidade das sementes, com a evolução do seu processo deteriorativo, estão associadas ao processo do envelhecimento e podem estar relacionadas com alterações citogenéticas que conduzem a um comprometimento de sua integridade genética. Para verificar o efeito do envelhecimento acelerado sobre as características citogenéticas de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, estas foram submetidas ao envelhecimento artificial através da utilização de duas temperatura (30°C e 40°C), por quatro períodos de exposição (0, 3, 6 e 9 dias). Para o armazenamento, sementes de araucária foram acondicionadas em sacos plásticos durante 0, 30, 60 e 90 dias, a 5°C. Tanto as sementes armazenadas quanto as envelhecidas foram colocadas para germinar e as suas radículas foram fixadas em solução de álcool-etílico - ácido acético (3:1). As lâminas microscópicas foram preparadas através da técnica do esmagamento, e a coloração das raízes foi feita com reativo de Schiff. Os resultados revelaram redução na percentagem de germinação e no índice de velocidade de germinação, tanto nas sementes armazenadas quanto nas envelhecidas artificialmente. Tanto o armazenamento quanto o envelhecimento artificial não influenciaram significativamente a taxa de divisão celular, porém, aumentaram a frequência de anomalias como: ocorrência de micronúcleos, núcleos fragmentados e anáfases com pontes nas primeiras divisões mitóticas em pontas de raízes. Estas alterações indicam que a perda de viabilidade e vigor das sementes de araucária, observada nestas condições, são devidas, entre outros fatores, a quebras nas moléculas de DNA.

Comitê Orientador: Lisete Chamma Davide -DBI-UFLA (Orientadora), Antonio Claudio Davide -DCF-UFLA e Eduardo Bearzoti -DCE-UFLA

ABSTRACT

FONTES, B. P. D. Cytogenetics of aged seeds of *Araucaria angustifolia*. UFLA, 1999. 53p. (Dissertation - Master in Genetics and Plant Breeding)*

The vigour and viability losses of seeds with the evolution of their deteriorative process are associated with cytogenetical alterations which lead to a endanger of their genetical integrity. To verify the effect of aging upon the cytogenetical characteristics of seeds from *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze, these ones were submitted to artificial aging through the use of two temperatures (30°C and 40°C) for four periods of exposition (0, 3, 6 and 9 days). To storage, "araucaria" seeds were placed in plastic seeds for 0, 30, 60 and 90 days at 5°C. Both stored and aged seeds were placed to germinate and their radicles were fixed in ethilic alcohol - acetic acid solution (3:1). The microscopic slides were made through the smear technique and root staining was done with Schiff's reactive. The results showed reduced germination percentage and germination velocity index, both in stored and artificially aged seeds. Both storage and artificial aging did not significantly influence cell division rate but increased anomaly frequencies such as: occurrence of micronucleoli, fragmented nuclei and anaphases with bridges at first mitotic divisions at root tips. These alterations denote that loss of viability and vigour of "araucaria" seeds observed in these conditions are due, among other factors, to breaks in DNA molecules.

Guidance Committee: Lisete Chamma Davide - UFLA (Orientador), Antonio Claudio Davide - UFLA and Eduardo Bearzoti -DCE-UFLA

1 INTRODUÇÃO

A perpetuação das espécies florestais nos ecossistemas preservados é garantida pelas estratégias de bancos de sementes para as espécies dos estágios sucessionais iniciais (pioneiras) e pelos bancos de plântulas para aquelas pertencentes aos estágios mais tardios, como as espécies clímax exigentes de luz e as clímax tolerantes à sombra. Quando esses ecossistemas tendem a desaparecer, como as florestas de araucaria, torna-se imprescindível o domínio das técnicas de armazenamento de sementes 'ex sito' como base para manutenção de bancos de germoplasmas e programas de reposição florestal. Além disso, as sementes constituem importante fonte de material genético para o melhoramento de plantas.

O armazenamento de sementes a longo prazo é tecnicamente e economicamente viável para aquelas espécies que toleram a dessecação abaixo de 10% de umidade e o armazenamento a frio, mesmo em temperaturas abaixo de zero isto é, para aquelas espécies cujas sementes são ortodoxas (Roberts, 1973a). As sementes de araucária, no entanto, são do tipo recalcitrante (Tompsett, 1984), ou seja, suas sementes não toleram a perda de umidade abaixo de 37% e nem o armazenamento a baixa temperatura. Nesse caso, o armazenamento torna-se possível apenas a curto prazo (6-12 meses) e, mesmo assim, com perdas na viabilidade e no vigor.

As perdas de viabilidade e do vigor das sementes são causadas pelas alterações citológicas, como a desestruturação dos sistemas de membranas, podendo chegar a outras alterações, como aquelas de natureza metabólica, genética e fisiológica (Abdul-Baki e Anderson, 1972; Roberts, 1973b). Estas alterações ocorrem de maneira acelerada nas sementes recalcitrantes, como as de araucária.

Entre os eventos que compõem o processo de deterioração e que envolvem o material genético estão as quebras no DNA, causando redução na capacidade de síntese de proteínas (Ghosh *et al.* 1981), danos no metabolismo de DNA (Roberts, 1973c; Cheach e Osborne, 1978; McGee, 1983; Coello e Vázquez-Ramos, 1996), além de danos cromossômicos durante o envelhecimento (Abdalla e Roberts, 1968, 1969; Roberts, 1973c, 1978; Villiers, 1974; Murata, 1981).

Com relação à araucária, até o momento não se têm informações sobre a ocorrência de alterações citogenéticas associadas à perda de vigor e viabilidade das sementes envelhecidas. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o ciclo celular de sementes de araucária submetidas ao envelhecimento artificial e ao armazenamento a curto prazo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Classificação fisiológica das sementes quanto ao armazenamento

As sementes são, acima de tudo, um meio de sobrevivência das suas respectivas espécies, e a manutenção da diversidade genética de plantas tem se tomado de grande interesse, principalmente daquelas que correm risco de extinção.

Segundo Harrington (1972), de todas as estratégias de conservação “ex situ”, o armazenamento de sementes é o método mais fácil e mais barato de preservar os genótipos de plantas existentes no mundo, sem mudar muito sua constituição genética. Entretanto, o armazenamento de sementes de determinadas espécies é mais complexo e só é conseguido por períodos curtos. Segundo Roberts (1973a), as sementes da maioria das espermatófitas sofrem dessecação durante os estágios finais de desenvolvimento. Tais sementes, chamadas ortodoxas, geralmente, podem ser armazenadas por longos períodos, sob condições de baixa umidade e baixa temperatura. Em algumas espécies, no entanto, a desidratação das sementes logo após a abscisão leva à perda da viabilidade. Essas sementes são classificadas como recalcitrantes (Roberts, 1973a; Roberts e King, 1980). A sua viabilidade é dependente de alta umidade, e as sementes de muitas dessas espécies morrem quando sua umidade cai abaixo de um certo nível crítico (Chin, 1978). Esse nível crítico varia muito entre espécies, cultivares e mesmo entre lotes de sementes (Chin, 1978; King e Roberts, 1980).

Hanelt (1977), citado por Roberts e King (1980), demonstrou que espécies que produzem sementes ortodoxas tendem a originar-se em ambientes sujeitos a secas ocasionais ou estações secas, ao passo que aquelas que produzem sementes recalcitrantes pertencem ecologicamente a árvores e arbustos de florestas tropicais e temperadas de galeria e às plantas que crescem

em ambiente aquático. Roberts e King (1980) observaram que as sementes recalcitrantes são normalmente dispersas em ambientes úmidos ou dentro d'água e que aquelas que apresentam períodos de viabilidade mais curto são nativas dos trópicos úmidos, onde as condições são continuamente favoráveis ao estabelecimento de mudas. Berjak *et al.* (1984) assumem que não há vantagem seletiva para a desidratação dessas sementes durante a maturação, como há para as ortodoxas, pois a secagem durante a maturação, necessariamente, prolongaria o período de desenvolvimento das sementes e, em ambientes continuamente úmidos, presume-se que esse não seja um processo eficiente. Assim, continuam os autores, é provável que qualquer mecanismo genético que opere no sentido de controlar o processo de desidratação durante a maturação das sementes ortodoxas não opere em condições de recalcitrância. Tal fato poderia ocorrer em virtude da ausência da informação no genoma ou, caso contrário, da não funcionalidade da informação nessas circunstâncias.

Roberts e King (1980) observaram também que sementes recalcitrantes geralmente são produzidas por plantas perenes que adotaram uma estratégia reprodutiva, na qual são produzidas sementes a intervalos regulares. Porém, segundo os autores, a persistência das espécies no tempo depende mais do hábito perene do crescimento da planta madura do que do estágio de quiescência das suas unidades de dispersão. Considerando que muitas dessas espécies requerem mais de 20 anos para que estejam suficientemente maduras para produzir sementes viáveis e geneticamente estáveis, King e Roberts (1980) acreditam que pouco ganho seria obtido com o armazenamento de suas sementes por poucos anos, já que o ideal para manutenção de recursos genéticos a longo prazo é que a viabilidade das sementes seja mantida por períodos mais prolongados. Assim, os autores concluem que o armazenamento dessas sementes a curto ou a longo prazo requer conhecimento a respeito das causas da rápida deterioração.

Considerando que o solo florestal não mantém uma reserva de sementes dessas espécies, elas são mantidas em bancos de plântulas.

2.2 Armazenamento de sementes recalcitrantes

O armazenamento é uma técnica que permite preservar a viabilidade das sementes para finalidades como conservação de recursos genéticos, principalmente de espécies ameaçadas de extinção, através de bancos de germoplasma e também garantir demanda anual de sementes em anos de produção escassa, muito comum para espécies florestais. Assim, o principal objetivo do armazenamento é o de controlar a velocidade de deterioração. A qualidade das sementes não é melhorada mas pode ser mantida com um mínimo de deterioração, desde que armazenadas de forma adequada (Aguiar *et al.*, 1993).

As sementes recalcitrantes apresentam maiores dificuldades no armazenamento quando comparadas com as sementes ortodoxas. Isto se deve à sua alta suscetibilidade à perda de água, o que faz com que seja necessário o armazenamento com alto grau de umidade. Esta umidade interna favorece o ataque de microorganismos e germinação durante o armazenamento (King e Roberts, 1979). O uso de baixas temperaturas, que poderiam inibir estes dois últimos problemas, fica também limitado pois as sementes recalcitrantes sofrem danos por temperaturas próximas ou abaixo de zero. Algumas espécies mais susceptíveis são injuriadas mesmo com temperaturas um pouco abaixo de 10-15°C, como as sementes de cacau (King e Roberts, 1982).

Diferentes métodos de armazenamento de sementes recalcitrantes têm sido estudados. Em geral os que têm apresentado os melhores resultados são os que levam em consideração os fatores limitantes, evitando a perda de água, realizando tratamento preventivo contra microorganismos, evitando a germinação durante o armazenamento e mantendo o suprimento de oxigênio

(King e Roberts, 1980). Estes mesmos autores realizaram um levantamento bibliográfico sobre testes de conservação de sementes de cerca de setenta espécies recalcitrantes. Os métodos mais empregados foram: sacos de polietileno, recipientes selados, carvão, areia e turfa. São citados também o armazenamento em água, pó de serra, latas e frascos de vidro.

Para Bonner (1978), as sementes recalcitrantes se conservam melhor em sacos de polietileno, pois as perdas de água são evitadas. O mesmo autor, porém, não recomenda o uso de recipientes herméticos. Alguma troca gasosa deve ocorrer entre as sementes e a atmosfera, pois, com altos teores de umidade, a respiração das semente ocorre em altas taxas e o bloqueio destas trocas pode causar a morte das sementes. Para evitar este fato, o autor recomenda sacos de polietileno com 0,1 mm de espessura, que permitem uma troca de gases suficiente, mas evitam a perda de vapor de água.

No levantamento bibliográfico realizado por King e Roberts (1979, 1980), cerca de 40% dos trabalhos obtiveram boa conservação por períodos de 1 a 5 meses e 35%, por períodos de 6 a 12 meses. Estes dados confirmam a opinião de que, mesmo em condições técnicas adequadas (câmaras, embalagens), o armazenamento das sementes só é possível por poucos meses, apresentando poucas perspectivas de avanços através de pesquisa, pois estas espécies sofreram pressão de seleção natural, na qual a germinação quase imediata, após serem liberadas pela planta matriz, é um mecanismo de sobrevivência de seus locais de origem.

2.1.1 Armazenamento de sementes de *Araucaria angustifolia*

A *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze é uma espécie característica da floresta subtropical brasileira, conhecida como pinheiro-brasileiro, pinheiro-do-Paraná ou araucária. Por possuir um alto valor econômico, madeireiro, resinífero e alimentar, tem havido uma progressiva extinção das populações naturais.

Outro fator que vem contribuindo para a vulnerabilidade da espécie é o fato de as sementes terem curta longevidade natural, sendo recalcitrantes, ou seja, perdem a viabilidade ao serem desidratadas, impossibilitando a sua conservação, principalmente a longo prazo em Bancos de Germoplasma, em que normalmente se reduz o grau de umidade das sementes a níveis entre 3 e 7% (Eira *et al.*, 1994).

A conservação, portanto, só pode ser realizada, a curto prazo, com sementes armazenadas em embalagens plásticas, que mantenham o seu grau de umidade original e sob temperatura de 4-6°C (Ferreira 1977).

O armazenamento de sementes com alto grau de umidade apresenta uma série de problemas, como a proliferação de fungos, insetos e a germinação de sementes no interior da embalagem, causando rápida deterioração.

Farrant *et al.*(1989) observaram que o armazenamento úmido de sementes de *A. angustifolia*, *Scadoxus membranaceus*, *Landolphia kirkii*, todas recalcitrantes, promoveu eventos típicos do processo de germinação, incluindo aumento de organização mitocondrial, indicando aumento nos níveis de síntese protéica; aparecimento de corpúsculo de Golgi, indicando alta atividade subcelular em geral e mobilização de reservas. Esses autores citam ainda que, com o decorrer do tempo, pode haver danos subcelulares nas sementes armazenadas, devido ao início da divisão celular.

Para minimizar tais problemas, o grau de umidade das sementes deve ser reduzido a níveis que ainda permitam a sua sobrevivência. Em 1982, Tompsett introduziu o conceito de nível crítico de umidade, abaixo do qual há perda de viabilidade, determinando que, para sementes de *Araucaria hunsteinii*, também recalcitrantes, esse nível estaria em torno de 32%. Em 1984, esse mesmo autor, trabalhando com sementes de *A. angustifolia*, determinou que elas não podem ser secas abaixo de 37% sem sofrerem danos e que a desidratação a 25% conduz a perda total de viabilidade.

Ramos (1987) estudou o efeito da embebição e da secagem na deterioração de sementes de araucária. Ele observou que tanto as sementes armazenadas durante o período de 1 a 6 meses, quanto as envelhecidas artificialmente a 42°C durante o período de 0 a 16 horas apresentaram redução na viabilidade e no vigor durante o envelhecimento.

Eira *et al.* (1994) verificaram que, para a *A. angustifolia*, o nível crítico de umidade, abaixo do qual há perda total de viabilidade, está em torno de 38% para sementes com e sem tegumento. As diferenças encontradas quanto ao nível crítico de umidade, em relação ao trabalho de Tompsett (1984), podem ser explicadas pelo fato desse autor ter utilizado como critério de germinação apenas a emissão de radícula, enquanto que Eira utilizou o critério de plântulas normais.

De acordo com Eira *et al.* (1994), as sementes de *Araucaria angustifolia* são muito sensíveis à redução do teor de água, perdendo a viabilidade mesmo quando ocorrem pequenas quedas no grau de umidade. Assim, para a conservação das sementes, mesmo a curto prazo, deve-se procurar armazená-las logo após a colheita, de modo que haja troca gasosa, com o máximo grau de umidade possível, e se evite perda de água durante esse período.

2.3 Envelhecimento artificial de sementes (E.A.)

O teste de envelhecimento tem como base o fato de que a taxa de deterioração das sementes é aumentada consideravelmente através da exposição das mesmas a níveis muito adversos de temperatura e umidade relativa, considerados os fatores ambientais mais relacionados à deterioração. Assim, considera-se que amostras com baixo vigor apresentam maior queda de sua viabilidade quando submetidas a essa situação; e as sementes mais vigorosas, geralmente, retêm sua capacidade de produzir plântulas normais e apresentam germinação mais elevada após serem submetidas ao “envelhecimento”(Marcos Filho *et al.* 1987; Vieira e Carvalho, 1994).

Segundo Lin (1988), o envelhecimento artificial de semente utilizando altas temperatura e umidade, permite que mudanças na qualidade, que usualmente levariam meses ou anos, ocorram em poucos dias ou semanas.

No teste de envelhecimento artificial, a semente é exposta a duas variáveis ambientais de maior influência na deterioração da semente: temperatura alta (40-45°C) e umidade relativa alta (90-100 %), por períodos curtos de tempo. Estes valores dependem da espécie em questão. Nestas condições extremas, a taxa de deterioração é acelerada e, segundo Delouch e Baskin (1973) e Marcos Filho *et al.* (1987), o decréscimo na germinação é proporcional ao potencial fisiológico inicial da semente. Aquelas sementes que produzem plântulas normais após o EA são consideradas vigorosas.

Segundo Popiningis (1977), o teste de EA é eficiente na comparação do vigor entre lotes de sementes, na estimativa do potencial de desempenho de semente em condições de campo e na determinação do potencial de armazenamento. É ainda aplicável a uma gama muito grande de espécies, sendo consistente para avaliação da qualidade de um lote de sementes.

Marcos Filho (1994) salientou que o teste de envelhecimento artificial está sendo incluído em programas de controle de qualidade adotados por empresas produtoras de sementes, pois, em poucos dias, pode-se ter uma idéia do potencial de armazenamento dos lotes processados.

Delouche e Baskin (1973) afirmaram que no teste de envelhecimento artificial, as condições ambientais e o período de exposição requeridos para obter diferenças máximas em respostas entre lotes varia com o tipo de semente. Em geral, as condições satisfatórias são 100% UR, temperatura entre 40-45°C e períodos de exposição de 2 a 8 dias. Em algumas situações, um regime menos severo (30°C, 75% UR e 6-24 semanas) apresenta melhores resultados. Para escolher as condições de teste de envelhecimento acelerado é importante

considerar o fator tempo. Em alguns casos, é importante obter informação o mais rápido possível, o que exige o uso de condições mais severas.

Conforme Delouche e Baskin (1973), a reprodutividade dos resultados do teste de envelhecimento artificial depende do controle das condições a que foram submetidas as sementes. A temperatura não pode ter uma tolerância maior que à $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. O tempo deve ser respeitado rigorosamente; no entanto, quanto mais longo é o período e menos severa as condições do envelhecimento artificial, a duração torna-se menos crítica. Obter 100% de UR é fácil e econômico, mas tem uma série de desvantagens: favorece o crescimento de fungos e a condensação pode tornar-se um problema se a câmara é aberta freqüentemente. Tomes *et al.* (1988) também afirmaram que, durante o envelhecimento das sementes, a temperatura deve apresentar uma variação não maior que $0,5^{\circ}\text{C}$. Estes autores constataram que a elevação da temperatura promove efeitos mais drásticos sobre a germinação que o prolongamento do período de envelhecimento.

Baskin (1981) afirmou que, no teste de envelhecimento artificial, todas as sementes podem ser tratadas ou não tratadas com fungicidas. Não se pode comparar resultados obtidos com sementes com e sem tratamento.

McDonald (1977) e Tao (1979) salientaram que um dos fatores que incidem na falta de reprodutividade do teste de envelhecimento artificial dentro e entre laboratórios é a umidade inicial das sementes. A um mesmo nível inerente de vigor de um lote, as sementes com maior umidade sofrerão uma deterioração mais rápida que aquelas com menor umidade. Isto porque as sementes de menor umidade chegam a um mesmo nível de umidade que as de alta umidade durante o teste.

Conforme Matthews (1980), o teste de envelhecimento artificial é um método menos preciso de deterioração de sementes, porque estas absorvem umidade da atmosfera a diferentes taxas. Em decorrência, as diferenças de

resposta ao envelhecimento dependem tanto da condição inicial da semente como da rapidez em que atingem o maior conteúdo de umidade. Alguns lotes deterioram-se mais que outros, porque passam mais tempo com alto conteúdo de umidade.

McDonald (1980) estabeleceu que as características positivas do teste de EA são as seguintes: rápido, barato, simples, permite a avaliação da semente individual e não necessita treinamento adicional para avaliar as plântulas. O principal problema é a falta de reprodutividade dos resultados dentro e entre laboratórios. As variações devem-se a muitos fatores. Existem evidências experimentais de que o uso da caixa plástica e a uniformidade inicial da umidade das sementes podem ajudar a atingir a padronização do teste de envelhecimento artificial.

Krzyzanowski e Miranda (1990) concluíram que o teste de envelhecimento artificial poderá ser utilizado rotineiramente em laboratórios de análise, desde que seja atingida precisão na calibração da temperatura dos equipamentos usados para envelhecer as sementes.

2.4 Germinação e vigor de sementes

Dentro do conceito de vigor existem duas idéias envolvidas: vigor “per se” em susceptibilidade às condições desfavoráveis. Ou seja, como propriedade intrínseca da semente ou como resultado da interação semente-ambiente. Este debate tem sido mantido por anos e tem originado várias definições (Woodstock, 1973).

A definição do que seja vigor de sementes foi um dos aspectos que mais causou divergências no Comitê de Vigor e entre tecnologistas de sementes do mundo todo, sendo difícil encontrar uma única definição. As duas principais associações que congregam tecnólogos de sementes (a ISTA e a AOSA) têm, cada uma, a sua definição. A ISTA (1981) define vigor de sementes como a

soma daquelas propriedades que determinam o nível potencial de atividade e desempenho de uma semente ou de um lote de semente durante a germinação e a germinação da plântula; segundo a AOSA (1983), o vigor de sementes compreende aquelas propriedades que determinam o potencial para uma germinação rápida e uniforme e para o desenvolvimento de plântulas normais sob uma ampla faixa de condições ambientais.

Em tecnologia de sementes, a germinação é definida como germinação e o desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, manifestando sua capacidade para dar origem a uma plântula normal sob condições ambientais favoráveis. Os objetivos principais do teste de germinação visam à obtenção de informações que permitam determinar o valor das sementes para a semeadura e a comparação do valor de diferentes lotes (Marcos Filho *et al.*, 1987). As regras para análise de sementes do Brasil (BRASIL, 1992) consideram como semente germinada aquela que demonstra sua aptidão para produzir uma planta normal, sob condições favoráveis de campo. A porcentagem de germinação corresponde à porcentagem de sementes que produziram plântulas normais, sob condições e limites de tempo estabelecidas nas próprias RAS.

Para Bewley e Black (1994), o termo germinação tem sido muitas vezes usado incorretamente na literatura científica e explicam que a germinação inicia com a absorção de água pela semente e finaliza com a alongação do eixo embrionário, usualmente a radícula. Isto inclui numerosos eventos como síntese de proteínas, mudanças nas estruturas subcelulares, respiração, síntese de macromoléculas e aumento da célula. Esses efeitos combinados propiciam um intenso metabolismo, culminando em crescimento. Acrescentam ainda que germinação no “sensu stricto” não inclui o crescimento da plântula, o que se inicia quando termina a germinação. Consequentemente, é incorreto igualar germinação com germinação de plântula, visto que a germinação finaliza antes que a plântula seja visível. Testes de sementes, muitas vezes, referem-se à

germinação no sentido de estabelecimento de plantas vigorosas, contudo, os fisiologistas não concordam, embora reconheçam que é muito comumente utilizado por tecnólogos de sementes. Em plântulas emergentes, ocorrem processos que não fazem parte da germinação, sendo considerados eventos pós germinação.

Segundo Abdul-Baki e Anderson (1972), a redução do poder germinativo é um dos critérios mais amplamente aceitos para avaliar a deterioração das sementes. O retardamento da germinação é o sinal de perda de qualidade que aparece mais cedo e tem sido usado para determinar o vigor, principalmente quando o lote de sementes tem seu histórico conhecido.

Uma das maneiras de se avaliar o vigor de um lote de sementes é através da velocidade de germinação em condições controladas de laboratório, estabelecidas para teste de germinação. Considerando que as sementes com maior velocidade de germinação são as mais vigorosas, então há uma relação direta entre velocidade e o vigor que as sementes possuem.

A perda de viabilidade leva a falhas na germinação, mesmo em condições favoráveis e na ausência de dormência, e é uma mudança degenerativa (Roberts, 1972a), que, dependendo da extensão, pode ou não ser reversível.

O vigor da semente, como indicativo de qualidade, é relativamente novo em relação à capacidade de germinação e pureza. Na pesquisa com sementes florestais, a maioria dos trabalhos apresenta os resultados avaliados em função da capacidade germinativa e do índice de energia germinativa. A energia germinativa mede a velocidade de germinação e pode ser expressa por vários índices, sendo uma forma de exprimir o vigor das sementes.

A perda de viabilidade e vigor está associada a mudanças no metabolismo básico: metabolismo respiratório, sínteses de proteínas e ácidos

nucléicos, integridade das membranas celulares e material genético (Halmer e Bewley, 1984).

Matthews (1985) salientou que o envelhecimento é a soma total dos processos de deterioração que levam à morte. Em sementes das principais culturas, o envelhecimento antes da colheita e durante o armazenamento é o principal determinante do vigor de um lote. As manifestações do envelhecimento em sementes com alta viabilidade são: taxa de germinação lenta, plântulas menores, aumento da proporção de plântulas anormais e decréscimo na capacidade de reter solutos no processo de embebição.

2.5 Longevidade e deterioração de sementes

O termo longevidade está relacionado com o período de tempo em que a semente se mantém viável. A longevidade da semente é característica da espécie; sementes de algumas espécies se deterioram rapidamente, enquanto que as de outras mantêm sua viabilidade por longo período (Carneiro e Aguiar, 1993).

De acordo com Carvalho e Nakagawa (1983), esta diversidade se deve à influência de vários fatores: características genéticas da espécie ou cultivar, vigor da planta mãe, condições climáticas predominantes durante a maturação das sementes, grau de dano mecânico durante a colheita e o beneficiamento e as condições nas quais é feito o armazenamento.

A deterioração não pode ser evitada, mas o grau de prejuízo pode ser controlado através das condições de armazenamento. O período em que a viabilidade das espécies recalcitrantes pode ser mantida varia de algumas semanas a alguns meses, dependendo da espécie, fazendo com que as pesquisas com armazenamento de sementes de espécies florestais nativas assumam caráter de extrema importância (Carneiro e Aguiar, 1993).

A perda do poder germinativo é a consequência final da deterioração das sementes. Diversas teorias sobre as causas da deterioração têm sido propostas, mas as causas reais e seus mecanismos ainda permanecem obscuros. Para Roberts (1973b), isto se deve ao grande volume de alterações citológicas e metabólicas detectadas no processo, o que torna difícil o estabelecimento das primeiras causas ou mesmo a identificação da causa efeito de uma resposta deteriorativa específica.

As alterações na fase inicial do armazenamento de sementes recalcitrantes sugerem associação com o processo de germinação. Trabalhos com *Avicennia marina*, uma espécie de mangue cujas sementes apresentam comportamento recalcitrante, mostraram que quando as sementes são armazenadas em recipiente fechado, sofrem modificações ultraestruturais, que embora deteriorativas, são indicativas de aumento da atividade intracelular a curto prazo (quatro a cinco dias), como foi verificado por Pammenter *et al.*, 1984. Se a dessecação continua ou se não há disponibilidade adicional de água, o processo é interrompido, os embriões tornam-se internamente desorganizados e a viabilidade é perdida.

Embora os sintomas de deterioração antes da morte da semente sejam bem esclarecidos, as suas causas ainda não são. De acordo com Roberts (1973b), alterações citológicas e metabólicas são os fatores que melhor se associam com a perda da viabilidade. Como causas citológicas, o autor cita danos no núcleo, nas mitocôndrias, nos plastídeos, nos ribossomos, no vacúolo, no retículo endoplasmático e na membrana celular. O autor ressalta, ainda, que em adição às mudanças que podem estar associadas com a degeneração ultraestrutural, há também aquelas na atividade de enzimas e na quantidade de constituintes químicos. Eventos como atraso na germinação são também relacionados à deterioração das sementes (Heydecker, 1972; Smith e Berjak, 1995), podendo atuar independentemente, sendo difícil discriminar entre eles quais são primários

e quais são secundários (Smith e Berjak, 1995). Woodstock (1973) sugeriu que a morte de semente seja vista como um processo gradual e cumulativo, no qual um aumento do número de células mortas em determinadas partes da semente levaria a uma queda no desempenho das suas funções essenciais.

2.6 Alterações no material genético

As dificuldades intrínsecas ao estudo da senescência, uma vez que este processo afeta praticamente todas as células, órgãos e sistemas, desde o nível molecular até ao do organismo como um todo, tornam a relação entre os fenômenos difícil de ser estabelecida.

Roberts (1973c) propôs 4 etapas para mostrar a evolução do conhecimento sobre como as lesões cromossômicas e as mutações herdáveis ocorrem à medida que as sementes envelhecem. A primeira etapa corresponde às alterações visíveis na planta, e foram percebidas por De Vries (1901) e Nilsson (1931), ambos trabalhando com *Oenothera*. Esses autores verificaram que mutantes fenotípicos eram produzidos em plantas obtidas de lotes de sementes velhas, quando comparados com plantas obtidas de sementes jovens. No entanto, erradamente, eles concluíram que genótipos mutantes estavam presentes desde o início nas populações de sementes e que a posse destes conferia potencial de aumento de longevidade da semente.

Numa segunda etapa, foram verificadas alterações diretamente nos cromossomos. Navashin (1933 a,b) observou aberrações cromossômicas em meristemas de raízes de sementes velhas de *Crepis* e Peto (1933) observou anormalidades semelhantes em sementes de milho. Cartledge e Blakeslee (1933, 1934) mostraram que, em plantas produzidas a partir de sementes envelhecidas de *Datura*, ocorreu aumento na frequência de aborto de pólen devido ao acúmulo de mutações recessivas deletérias que, na condição haplóide, causaram perda de viabilidade do gametófito. A partir deste trabalho, novas

observações de mudanças fenotípicas em plantas originadas de sementes velhas, usadas para a produção de material segregante nas gerações seguintes foram realizadas (Blakeslee e Avery, 1934; Avery e Blakeslee, 1936). Outros trabalhos relataram a ocorrência de aumento de aberrações com o aumento do período de envelhecimento em um grande número de espécies, como em cebola (Nichols, 1941; Kato, 1951; Sax e Sax, 1964); ervilha (D'Amato, 1951); trigo, cevada centeio e ervilhas (Gunthardt, Smith, Haferkamp e Nilan, 1953); alface (Harrison e McLeish, 1954; Harrison, 1966), e milho (Berjak, 1968).

Em uma terceira etapa, ficou evidente, em trabalhos citológicos realizados em *Crepis* (Navashin e Gerassimova, 1936a,b) e em investigações sobre aborto de pólen em *Datura* (Carthedge, Barton e Blakeslee, 1936), que o envelhecimento de sementes não poderia ser considerado isoladamente, sendo importante considerar as condições de armazenamento. Nos trabalhos com aborto de pólen, concluiu-se que, em geral, a velocidade com que as mutações ocorrem aumenta com o aumento do teor de umidade e período de tratamento. A importância da temperatura durante o armazenamento também foi relatada, considerando que temperaturas elevadas induziram quebras cromossômicas. Peto (1933) demonstrou que sementes de cevada tratadas a 95°C por 25 minutos ou 40°C com alta umidade por 30 dias apresentaram células mitóticas aberrantes. Efeitos semelhantes de temperatura elevada sobre a indução de aberrações cromossômicas mitóticas foram descritos em uma série de trabalhos realizados por Navashin e Shkvarnikov (Navashin e Shkvarnikov, 1933a,b; Shkvarnikov e Navashin, 1934 e 1935; Shkvarnikov, 1936, 1939). Estes autores mostraram que o efeito do armazenamento por 20 dias em sementes frescas de trigo e *Crepis*, a uma temperatura que variou de 50-60°C, foi comparado ao envelhecimento de sementes secas em temperatura ambiente, por 6-7 anos. O aumento da umidade também eleva a frequência de aberrações cromossômicas, principalmente associadas a altas temperaturas. Smith (1943, 1946), todavia, não estava de

acordo com os resultados encontrados e mostrou que a exposição de sementes de cereais a temperaturas de 50-70°C por 5-15 dias ou 80°C por 45-80 minutos apresentaram pouca ou nenhuma alteração sobre a frequência de aberrações cromossômicas. No entanto, trabalhos posteriores confirmaram que a combinação de tempo, temperatura e teor de umidade levam ao surgimento de mudanças genéticas e perda de viabilidade nas sementes envelhecidas.

Numa quarta etapa, iniciada a partir de 1960, foi investigada a relação quantitativa entre tempo, temperatura e teor de umidade durante o armazenamento e a ocorrência de mudanças cromossômicas, aborto de pólen e mutações genéticas em cevada, feijão e ervilha (Roberts, Abdalla e Owen, 1967; Abdalla e Roberts, 1968, 1969). Os trabalhos mostraram que a combinação de tempo, temperatura e teor de umidade levam à perda de vigor devido a mutações genéticas nas sementes sobreviventes. Roberts e Abdala (1968), em estudos com cevada, feijão e ervilha, armazenadas a 25°C e 45°C em combinação com 12% e 18% de umidade, observaram que a temperatura e/ou teor de umidade mais elevadas aceleraram a perda de viabilidade. Usando o mesmo material e a mesma condição de armazenamento, também foi mostrado claramente que a frequência de anáfases aberrantes foi acelerada pela ação da alta temperatura e aumento do tempo de armazenamento. Aberrações cromossômicas aumentaram mais rapidamente, à medida que a temperatura ou o teor de umidade aumentaram, e seu surgimento foi associado com consequente perda de viabilidade das sementes. Os autores acrescentaram ainda que isto se deu devido ao acúmulo de mudanças nucleares, o que resulta em quebra no cromossomo e, a um nível crítico, tornam as sementes incapazes de germinar.

Condições de armazenamento, principalmente temperatura e teor de umidade das sementes, são os principais fatores que influenciam a perda de viabilidade e mudanças genéticas de muitas espécies (Roberts, 1972a,b,).

Villiers (1974), discutindo a perda de viabilidade em sementes armazenadas a seco, sugere que, nos tecidos, as enzimas que controlam o reparo devem desaparecer temporariamente e que isso deve ser um fator importante na perda de viabilidade de sementes armazenadas, além de aumento na taxa de aberrações cromossômicas. O autor também constatou que o armazenamento de sementes embebidas em água aumentou a capacidade de germinação por longos períodos, e diminuiu a incidência de aberrações cromossômicas. A partir destes dados, o autor elaborou a hipótese de que o envelhecimento seria consequência da crescente incapacidade operacional dos mecanismos que promovem o reparo de danos às macromoléculas e organelas em tecidos secos. A manutenção desses sistemas é essencial para um perfeito funcionamento da atividade celular.

Uma estreita relação entre a perda de viabilidade e surgimento de anomalias cromossômicas também foi relatado por Murata *et al.* 1981, em estudos sobre mudanças genéticas que ocorreram durante o envelhecimento de sementes de cevada submetidas a altas temperaturas. Foi mostrado que a frequência de células com anáfases anormais aumentou com o aumento do tempo e condições de envelhecimento. Estas aberrações foram relacionadas com a perda de viabilidade, que foi maior com o aumento da temperatura de 21°C para 32°C e 38°C.

Mais recentemente, o emprego da microscopia eletrônica tornou-se uma importante ferramenta no auxílio de exames ultraestruturais realizados em sementes armazenadas. Pammenter *et al.* (1984); Berjak *et al.* (1984); Farrant *et al.* (1986) e Farrant *et al.* (1988) utilizaram sementes de *Avicennia marina*, uma espécie originária de mangue e, com o emprego de microscópio eletrônico, observaram as características das organelas celulares dos primórdios radiculares do embrião. Essas observações foram realizadas em diferentes fases da vida das sementes, desde a liberação pela planta matriz e, periodicamente, até 30 dias após o armazenamento com sílica gel ou sílica gel mais fluxo de ar, para acelerar

a secagem. Mesmo no ambiente seco, favorecendo a perda de umidade, as alterações observadas nas células durante os primeiros 4 a 5 dias indicaram aumento da atividade celular (Berjak *et al.* 1984). Depois de poucos dias de armazenamento, 4 dias no trabalho de Palmmentes *et al.* (1984) e 7 dias no trabalho de Berjak *et al.* (1984), o aumento da atividade celular foi caracterizado pelo início da formação de vacúolos, matriz mitocondrial mais densa, agregação de polissomas, aumento de atividade do complexo de Golgi e nucléolo bem organizado e com granulosidade (Berjak *et al.*, 1984). Esse aumento de atividade celular foi considerado semelhante ao ocorrido em sementes frescas, às quais foram fornecidas condições propícias para a germinação (Pammenter *et al.*, 1984). Nessa fase, para que a germinação prossiga, é necessário um suprimento adicional de água, e o ponto em que esta necessidade ocorre parece coincidir com o início da divisão celular e formação de vacúolos (Farrant *et al.*, 1988).

Estudos envolvendo avaliação da atividade de enzimas correlacionadas com danos cromossômicos produzidos em sementes envelhecidas também têm sido realizados. Cheach e Osborne (1978) constataram que fragmentos de DNA nuclear e a ativação de DNase ocorrem com a perda de viabilidade de sementes de centeio armazenadas, sugerindo que a perda da integridade do DNA poderia causar aberrações cromossômicas. Estes dados confirmam a hipótese de Villiers (1974), que propõe que a perda de viabilidade e mudanças genéticas durante o envelhecimento de sementes estão relacionadas com a inativação do sistema de reparo para danos a macromoléculas e organelas.

Cherry e Skadsen (1983) e Aguilar *et al.* (1992) sugerem que a perda de viabilidade de sementes é acompanhada por redução na capacidade de sintetizar proteínas, devido ao declínio de componentes como ribossomo, RNA mensageiro e alterações ao nível de transcrição e tradução durante o envelhecimento das sementes.

Dentre as proteínas, as enzimas desempenham um importante papel na evolução da deterioração de sementes e sua atividade pode ser um indicativo da perda de qualidade.

Para McGee (1983), a desnaturação de enzimas e inativação dos ácidos nucléicos e membranas não funcionais estão ligadas a danos cromossômicos que podem levar à diminuição na eficiência metabólica de organelas, células e órgãos.

Estando várias enzimas associadas ao processo de duplicação do DNA na divisão celular e sendo o DNA constituinte dos cromossomos, base para a formação dos RNAs, e estes responsáveis pela síntese protéica, a constatação das alterações no metabolismo do DNA ajuda a compreender fatos como os observados por Chean e Osborne (1978) e McGee (1983), isto é, quebra de cromossomos durante o armazenamento de sementes, bem como a quebra de RNA (Ghosh, Adhikary e Benerjee, 1981) levando à incapacidade de sintetizar proteínas (Cherry e Skadsen, 1983; Aguilar *et al.*, 1992). Em consequência da redução de enzimas atuantes no processo germinativo, acontece uma germinação mais lenta ou a perda da viabilidade.

Vázquez *et al.* (1988) e Vázquez, Montiel e Vázquez Ramos (1991) verificaram a diminuição da atividade da DNAPolimerase e da DNALigase no processo de deterioração artificial em sementes de milho, resultando em perda de viabilidade e vigor.

Gutiérrez *et al.* (1993), estudando alterações no metabolismo de DNA de sementes de híbridos de milho, observaram redução da atividade da DNAPolimerase e DNALigase em condições de envelhecimento natural ou artificial através de elevação da temperatura e da umidade do ambiente, e também perda de viabilidade.

Coello e Vázquez-Ramos (1996) também observaram, em sementes de milho envelhecidas artificialmente (40°C, 100% UR, durante 6 dias), um

decréscimo em até 50% na atividade da DNApolimerase, devido ao efeito da deterioração, afetando a germinação.

As implicações práticas destes trabalhos são claras. O surgimento de mudanças genéticas em lotes de sementes que sofreram pouca perda de viabilidade não é tão importante em termos de produção de sementes para alimentação. Porém, as implicações são extremamente importantes para a produção de sementes para o armazenamento em bancos de germoplasma. Um lote de semente que tenha sofrido uma pequena perda de viabilidade pode conter uma grande quantidade de mutações. Essas mudanças, quando recessivas, não se mostram na geração desenvolvida dessas sementes, devendo começar a segregar nas gerações subseqüentes (Roberts, 1981). Assim, a principal conseqüência das mudanças genéticas está no fato de que uma linha pura, após armazenamento inadequado ou por longo período, pode deixar de ser pura. Segundo Purkar *et al.* (1980), essas mudanças genéticas levam a crescentes variações e mudanças no valor médio de características morfológicas e fenológicas das progênies futuras. Por isso, a identificação das alterações cromossômicas é importante para o conhecimento destas transformações, sobretudo em sementes recalcitrantes como as de araucária que perdem rapidamente sua viabilidade durante o armazenamento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Sementes

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia e no Laboratório de Sementes Florestais do Departamento de Ciências Florestais, ambos da Universidade Federal de Lavras - Minas Gerais.

As sementes de araucária que constituíram o lote estudado foram coletadas na região de Curitiba - PR, situada a 49°16' de longitude W e a 25°25' de latitude S a uma altitude de 923m. As sementes foram, logo após a coleta, acondicionadas em sacos de aniagem e transportadas via rodoviária até Lavras.

3.2 Grau de umidade

O grau de umidade das sementes foi avaliado pelo método da estufa a $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 17, horas como indicado pelas regras de análise de sementes (BRASIL, 1992), incluindo-se cortes transversais, como indicado por Ramos (1987) para sementes de araucária.

3.3 Tratamentos aplicados

3.3.1 Envelhecimento artificial

A indução do envelhecimento das sementes foi realizada em dois germinadores tipo Mangelsdorf com umidade relativa de aproximadamente 100%. As sementes foram espalhadas em camada única sobre as prateleiras vazadas de aço inox dos germinadores. Foram utilizadas diferentes combinações de temperatura e tempo, como segue:

- 30°C, retirando-se amostras com 3, 6 e 9 dias de exposição;
- 40°C, retirando-se amostras com 3, 6 e 9 dias de exposição.

Decorrido o tempo necessário para o envelhecimento, as sementes foram colocadas para germinar. A avaliação da germinação foi realizada a cada três dias, computando-se o número de sementes com emissão de raízes.

3.3.2 Armazenamento

As sementes de araucária destinadas ao armazenamento foram acondicionadas em sacos semi-permanentes de polietileno de 0,1 mm de espessura, que foram fechados e armazenados sob temperatura de 5°C. Foram retiradas amostras em intervalos de 30 dias, num período de 90 dias, para análise do vigor, viabilidade e ciclo celular.

3.4 Avaliação da qualidade

3.4.1 Viabilidade

Para o teste de germinação, realizado para determinar a viabilidade, foram utilizadas 100 sementes por tratamento (4 repetições × 25 sementes), que foram colocadas em caixas plásticas de (43×28,5×7,5cm) contendo areia esterilizada, previamente umedecida com água destilada. As sementes foram colocadas para germinar em germinador tipo Mangelsdorf, sendo utilizada temperatura de 25°C e luz constante. Foram consideradas germinadas as sementes que emitiram radícula, pois estas tinham que ser retiradas para análise citogenética logo após a emissão. A avaliação do teste foi feita efetuando-se a 1ª contagem aos 7 dias de instalação do experimento e depois a cada 3 dias durante aproximadamente 50 dias. Os resultados foram expressos em porcentagem média.

3.4.2 Vigor

O índice de velocidade de germinação (IVG), realizado para determinar o vigor das sementes, foi realizado conjuntamente com o teste de germinação. Devido à necessidade de retirada das pontas das raízes para realização da análise citogenética, adaptou-se o cálculo do índice de velocidade de germinação (Maguire, 1962), considerando-se o número de sementes com emissão de radícula. Com os dados das contagens, procedeu-se o cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG) para cada tratamento, que foi calculado através da razão entre a somatória do número de raízes germinadas em cada dia de contagem e o número de dias decorridos entre a semeadura e a emissão das radículas (Maguire, 1962).

$$IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n \text{ onde,}$$

G_1, G_2 e G_n = número de raízes germinadas no 1º, 2º e último dia de contagem.

N_1, N_2, N_n = número de dias que as sementes levaram para germinar, até o enésimo dia de contagem.

3.5 Análise citogenética

As radículas com aproximadamente 0.5cm de comprimento foram fixadas em mistura de etanol-ácido acético (3:1), à temperatura ambiente, por 24h e após este período foram transferidas para álcool etílico 70%, onde permaneceram armazenadas a 4°C até o uso. Para confecção das lâminas, as radículas foram banhadas em água destilada por 30 minutos e depois hidrolisadas em HCl 1N a 60°C por 10 minutos. Após este período, foi feita a interrupção da hidrólise com água gelada e as radículas foram coradas com reativo de Schiff, por 30 minutos. A confecção das lâminas foi feita pelo método do esmagamento, sendo que a região meristemática foi excisada e macerada em

ácido acético 45%. As laminulas foram removidas pelo método do gelo seco e as lâminas foram montadas com Entellan®.

Foram analisadas 5 lâminas por repetição, sendo que cada tratamento continha 4 repetições, totalizando 20 lâminas, sendo avaliadas 2000 células/tratamento. Foi analisado o índice mitótico (n° total de células em divisão/ n° total de células analisadas x 100) e a ocorrência de anomalias nas diferentes fases da mitose.

As fotomicrografias foram realizadas em microscópio de luz (Olympus BX50), utilizando-se filme preto e branco de ASA 100. A revelação foi feita em D-76 (Kodak) e as cópias em papel Kodabrome Print RCF3.

3.6 Análise estatística

Para análise do experimento de envelhecimento artificial, foi realizada análise de variância em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 6 tratamentos e 4 repetições. Uma vez detectada diferença significativa entre os tratamentos, modelos de regressão múltipla foram ajustados, tendo como variáveis regressoras o número de dias de envelhecimento e a temperatura, tendo-se o cuidado de verificar se os desvios de regressão eram significativos, para testar a falta de ajustamento. Foram construídos gráficos de superfície de resposta para melhor visualização do modelo ajustado.

Para a análise do experimento de armazenamento, foi realizada análise de variância em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 4 tratamentos e 4 repetições. Para observar o efeito dos períodos, foi realizada regressão utilizando equação linear.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Grau de umidade

O grau de umidade das sementes, antes da aplicação dos tratamentos de envelhecimento e armazenamento, foi de 38%. Este dado é importante, um vez que a viabilidade das sementes desta espécie é dependente de alta umidade, e esta é perdida quando sua umidade cai abaixo de 38% (Eira, 1994). Assim, podemos afirmar que, com relação ao grau de umidade, as sementes apresentavam-se em boas condições para a realização dos testes.

4.2 Efeito do armazenamento sobre a viabilidade e vigor das sementes de araucaria

A análise dos dados demonstrou que houve diferença significativa entre os períodos de armazenamento utilizados (0, 30, 60 e 90 dias) sobre a germinação e o IVG das sementes de araucaria (Tabela 1).

TABELA 1. Resumo das análises de variância para os valores de germinação e índice de velocidade de germinação de sementes de araucaria submetidas ao armazenamento a 5°C em diferentes períodos. UFLA, Lavras, 1998.

QUADRADO MÉDIO			
F.V.	G.L	GERMINAÇÃO	IVG
PERÍODO	3	53,062**	0,520**
RESÍDUO	12	3,812	0,020
C.V. (%)		12,156	14,975

(**) - significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F

As figuras 1 e 2 mostram uma tendência de queda linear para a porcentagem de germinação e IVG com o aumento do período de armazenamento nas sementes armazenadas a 5°C por 0, 30, 60 e 90 dias (Figura 1 e 2). Aos 30, dias a germinação foi de 78%, caindo para 56% aos 60 dias e chegando com apenas 48% de germinação aos 90 dias. O IVG caiu para 1.12 aos 30; 0.89 aos 60 e 0.51 aos 90 dias de armazenamento, indicando a ocorrência de perda de vigor das sementes durante o processo de armazenamento. Isso se deve ao fato de as sementes desta espécie serem recalcitrantes, o que leva a uma rápida perda de viabilidade mesmo quando armazenadas a curto prazo, como observado por Eira *et al.* (1994).

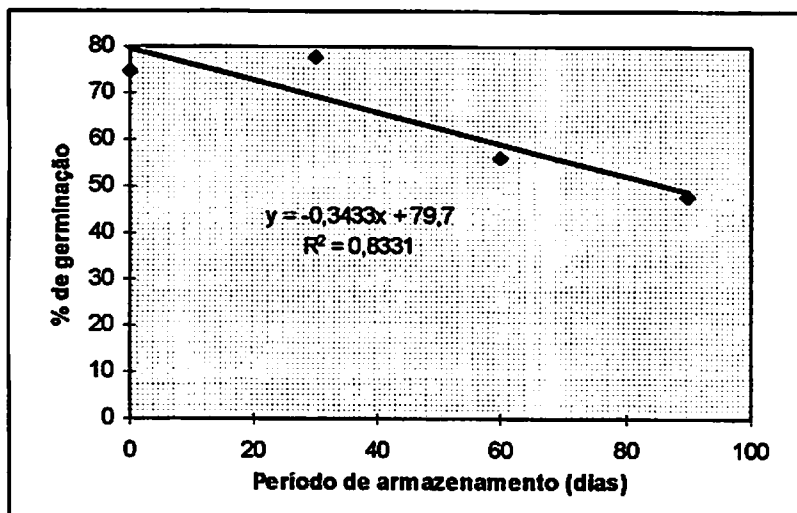


FIGURA 1. Efeito dos períodos de armazenamento sobre a germinação de sementes de araucária. UFLA, Lavras, 1998.

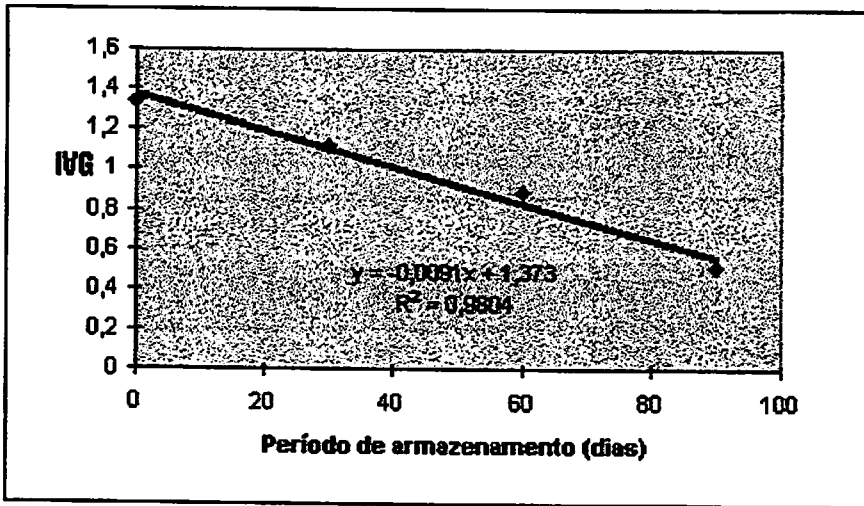


FIGURA 2. Efeito dos períodos de armazenamento sobre o índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de araucaria. UFLA, Lavras, 1998.

Ferreira e Handro (1979) relataram que sementes de *Araucaria angustifolia* estocadas a 4°C mostraram menor germinabilidade e velocidade de germinação que sementes estocadas a temperatura ambiente (15-25°C) por diferentes tempos e com diferentes conteúdo de água.

Ramos (1987), em estudos sobre o efeito da embebição e secagem em sementes de *Araucaria angustifolia* armazenadas de 1 a 6 meses a 4°C e 96% de umidade relativa, também observou perda de viabilidade e vigor, nas sementes desta espécie, durante o armazenamento.

4.3 Efeito do envelhecimento artificial (E.A.) sobre a viabilidade e vigor das sementes de araucaria

A análise dos dados mostrou que houve diferença significativa entre os tratamentos de envelhecimento utilizados sobre a germinação e vigor das sementes de araucária (Tabela 2).

TABELA 2. Resumo das análises de variância para os valores de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de araucaria submetidas ao envelhecimento a 30°C e 40°C em diferentes períodos. UFLA, Lavras, 1998.

C.V.	G.L.	QUADRADO MÉDIO	
		GERMINAÇÃO	IVG
TRATAMENTO	(5)	86,242**	0,429**
REGRESSÃO	3	143,344**	0,686**
DESVIO	2	0,567 ^{NS}	0,044 ^{NS}
ERRO	18	2,875	—
TOTAL	23	—	—

Nesta mesma tabela, observou-se que o critério de avaliação dos efeitos do envelhecimento pôde ser detectado pela simples protusão da radícula, indicando que o efeito do envelhecimento pode estar atuando na germinação radicial.

O índice de velocidade de germinação (IVG) mostrou-se altamente significativo nas sementes envelhecidas, indicando uma queda de vigor relacionada ao envelhecimento das sementes. Este dado é importante quando se deseja testar a capacidade das sementes estabelecerem-se em condições de campo, uma vez que o IVG está diretamente relacionado com o vigor das sementes.

Verifica-se, no gráfico de superfície de resposta (Figuras 3 e 4), que a diminuição significativa na porcentagem de germinação e no vigor ocorreu principalmente quando as sementes foram envelhecidas a 40°C.

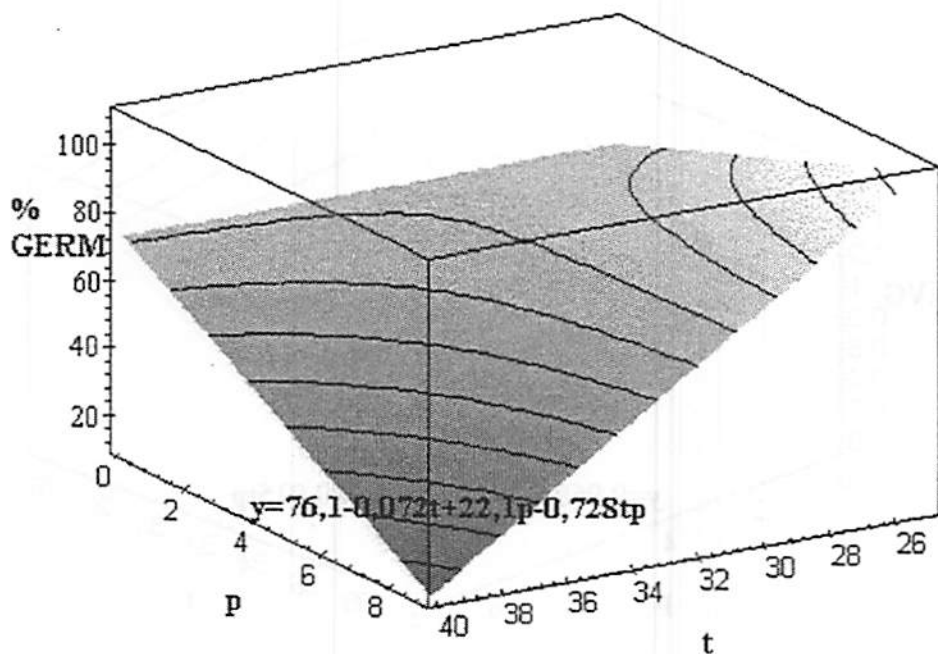


FIGURA 3. Superfície de resposta para modelo de regressão múltipla, envolvendo os período (p) de envelhecimento (0, 3, 6 e 9 dias), temperaturas (t) (30°C e 40°C) e germinação na ordenada. UFLA, Lavras, 1998.

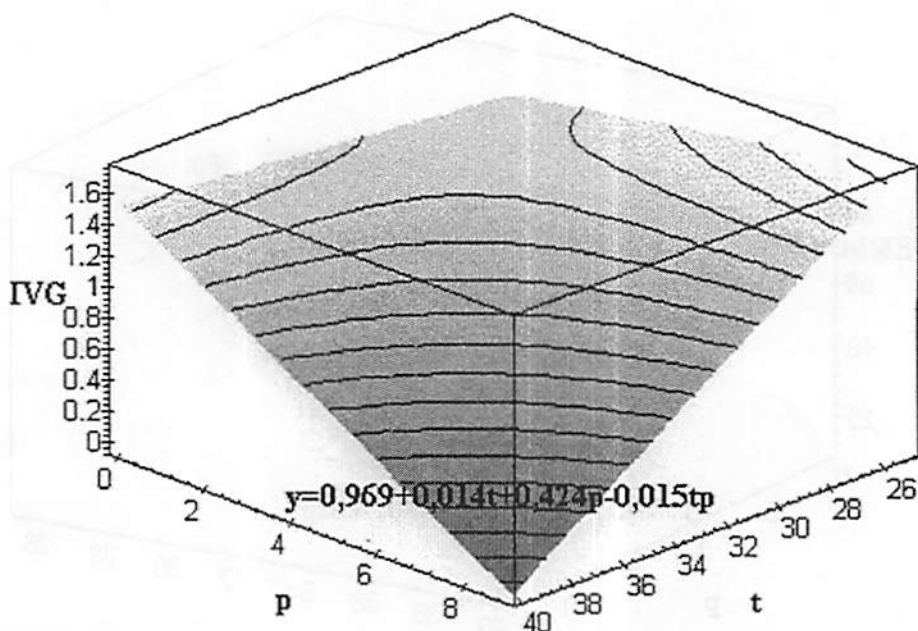


FIGURA 4. Superfície de resposta para modelo de regressão múltipla, envolvendo os períodos de envelhecimento (0, 3, 6 e 9 dias), temperaturas (30°C e 40°C) e o índice de velocidade de germinação (IVG) na ordenada. UFLA, Lavras, 1998.

As médias demonstram (Tabela 3) que não houve grande variação quanto a porcentagem e velocidade de germinação com o aumento do período de envelhecimento nas sementes submetidas a 30°C. A germinação foi de 73% para 3 dias de envelhecimento, 76% aos 6 dias e 77% aos 9 dias, enquanto que o IVG mostrou uma pequena variação de 1.17, 1.27 e 1.10 para os períodos de 0, 3, 6 e 9 dias, respectivamente.

As sementes de araucária germinam numa ampla faixa de temperatura, a mínima entre 3-5°C, a máxima entre 37-39°C, a faixa ótima abrangendo de 12-30°C (Prage, 1964; Ferreira e Handro, 1979). Por este motivo, foram utilizadas

a temperatura de 30°C, por ser mais adequada para estimular a germinação; e 40°C, mais indicada para promover o envelhecimento de sementes na maioria das espécies.

Os efeitos do tratamento de envelhecimento sobre a germinabilidade são claramente mostrados nas sementes submetidas a 40°C. As médias de germinação e IVG decresceram com o aumento do período de envelhecimento a esta temperatura. As sementes apresentaram queda de 75% para 53% na germinação, e de 1.34 para 1.04 no IVG aos 3 dias de envelhecimento, caindo para 31% aos 6 dias e o IVG para 0.44, até chegar a perda total de viabilidade aos 9 dias de envelhecimento (Tabela 3). Isto indica que a perda de viabilidade foi acelerada com o aumento do período e da temperatura, uma resposta que tem sido amplamente relatada para outras espécies (Mattheus, 1981).

TABELA 3. Valores médios de germinação e do índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de araucaria submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial. UFLA, Lavras, 1998.

Tratamento	Período de envelhecimento (dias)	Germinação (%)	IVG
Testemunha	0	75	1,34
Envelhecimento artificial 30°C	3	73	1,17
	6	76	1,27
	9	77	1,10
Envelhecimento artificial 40°C	3	53	1,04
	6	31	0,44
	9	0	0

Quando se compara a variação das médias dos tratamentos, verifica-se que a menor média de índice de velocidade de germinação ocorreu quando as sementes foram envelhecidas a 40°C, no período de 6 dias, coincidindo também com a menor porcentagem de germinação.

É interessante observar que o envelhecimento a 40° C por 3 dias parece simular o armazenamento por 60 dias a 5° C. Este dado é importante quando se deseja estimar o potencial de armazenamento de um lote de sementes. Foi observado também que a temperatura de 40°C e umidade de 100% por um período de 6 dias foi eficiente para promover o envelhecimento das sementes. Isto é importante, uma vez que ainda não há uma recomendação específica para promover o envelhecimento desta espécie.

Ramos (1987) afirmou que alta temperatura ($42^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) promoveu, em sementes de *Araucaria angustifolia*, um decréscimo no poder e na velocidade de germinação desta espécie. Isso se deve ao fato desta temperatura estar dentro da faixa indicada para promover o envelhecimento de sementes, dependendo do período. O que concorda com Deluoche e Baskin (1973) e Marcos Filho et al. (1987), os quais afirmaram que, em geral, as condições mais satisfatórias para promover o E.A. são 90-100% UR, temperatura entre 40-45°C e períodos de exposição que variam de algumas horas a alguns dias, dependendo da espécie.

4.4 Efeito do armazenamento e envelhecimento sobre o ciclo celular de sementes de araucária

Embora tenham ocorrido mudanças significativas na germinação e no vigor das sementes de araucária armazenadas a 5°C por 0, 30, 60 e 90 dias, não foi observada diferença significativa em relação aos índices mitóticos entre os períodos de armazenamento (Tabela 4).

TABELA 4. Resumo das análises de variância para o valor de índice mitótico (IMT), em células meristemáticas de raízes de araucaria, submetidas ao armazenamento à 5°C.

F.V.	G.L.	QUADRADO MÉDIO
		IMT
DIAS	3	0,7910
RESÍDUO	12	0,2659
C.V. (%)		12,0570

Nas sementes submetidas ao envelhecimento artificial, isto é, às temperaturas de 30°C e 40°C, nos períodos de 0, 3, 6 e 9 dias, também não houve efeito significativo entre os tratamentos sobre o índice mitótico (Tabela 5), embora tenha ocorrido diminuição significativa tanto da germinação quanto do vigor das sementes submetidas ao envelhecimento a 40°C.

TABELA 5. Resumo das análises de variância para o valor de índice mitótico (IMT), em células meristemáticas de raízes de araucaria, submetidas ao envelhecimento a 30°C e 40°C.

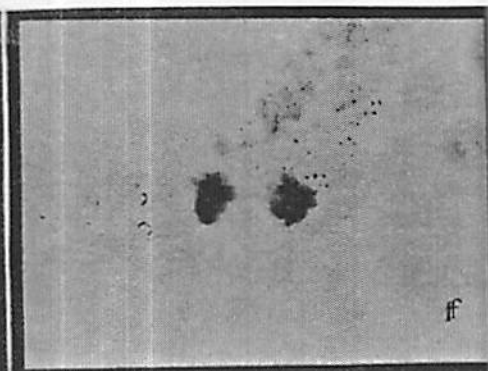
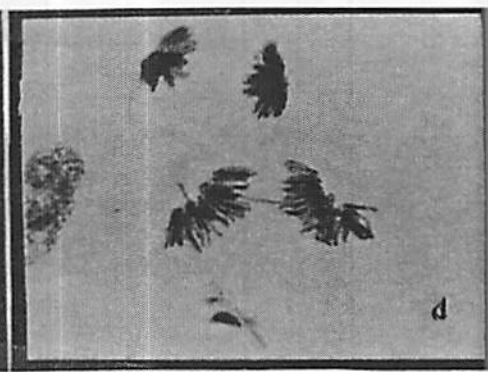
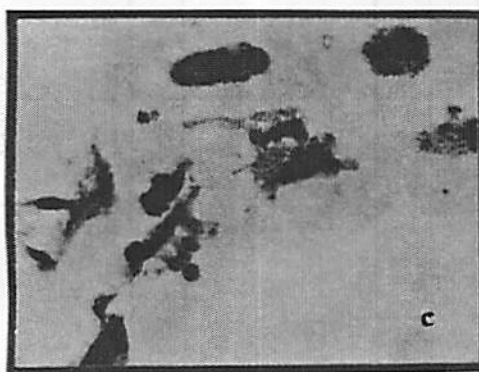
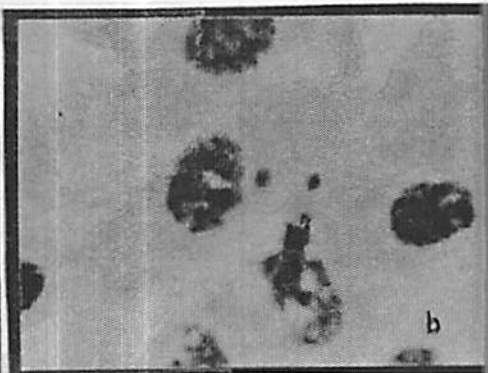
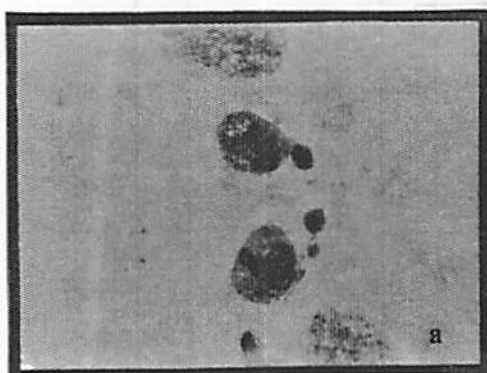
F.V.	G.L.	QUADRADO MÉDIO
		IMT
TRATAMENTO	(5)	2,2136
REGRESSÃO	3	-
DESVIO	2	-
ERRO	18	1,4027
C.V. (%)	23	

Apesar de não terem sido observados efeitos sobre a frequência de células em divisão, pode-se observar, tanto para o armazenamento como para o envelhecimento artificial, sobretudo a 40°C, um aumento na frequência de células anormais, o qual foi proporcional ao tempo de envelhecimento (Tabela 6). Nas sementes armazenadas a 5°C, o número de células anormais por raiz analisada aumentou em média 2,6; 4,2 e 5,6 vezes nos três períodos de armazenamento, respectivamente, em relação à testemunha. O envelhecimento a 30°C com 3, 6 e 9 dias causou, respectivamente, 1,8; 2,5 e 4,8 vezes mais alterações que as observadas na testemunha. Somente as sementes mantidas por 3 e 6 dias a 40°C sobreviveram. Nestas, o número de células anormais foi, respectivamente, 10,2 e 17,3 vezes maior do que ocorreu nas sementes testemunhas. Com relação aos tipos de alterações, foram encontrados micronúcleos, núcleos fragmentados, pontes nas anáfases e nas telófases (Figura 5, 1a-d). Nas testemunhas (Tabela 6), 71,82% das alterações foram anáfases com pontes, 25,45% micronúcleos e 2,73% núcleos fragmentados. Em condições de armazenamento a 5°C (Tabela 6), a frequência de anáfases com pontes correspondeu a 41% das anomalias, os micronúcleos representaram 38% e os núcleos fragmentados 21%. No envelhecimento acelerado a 30°C (Tabela 6), os micronúcleos foram os mais frequentes (42%), seguidos pelas pontes e fragmentos nas anáfases e telófases (39%) e núcleos fragmentados (19%). A 40°C (Tabela 6), entre o número elevado de anomalias (3.019), os núcleos fragmentados foram os mais frequentes (45%), seguidos pelos micronúcleos (31%) e pelas pontes e fragmentos em anáfases e telófases (24%).

TABELA 6 Anomalias no ciclo mitótico em células meristemáticas de raízes de araucaria submetidas a diferentes períodos de envelhecimento. UFLA, Lavras, 1997.

ARMAZENAMENTO A 5°C						
PERÍODO (DIAS)	NF	MN	PF	TOTAIS		
0	03	28	79	110		
30	62	98	125	285		
60	106	167	193	466		
90	113	279	228	620		
				1481		
ENVELHECIMENTO A 30°C						
PERÍODO (DIAS)	NF	MN	PF	TOTAIS	NF	PF
0	03	28	79	110	03	79
3	09	67	118	194	497	244
6	20	138	122	280	872	474
9	157	221	151	529	-	-
				1113	-	3129
ENVELHECIMENTO A 40°C						
PERÍODO (DIAS)	NF	MN	PF	TOTAIS	NF	PF
0	03	28	79	110	03	79
3	09	67	118	194	497	244
6	20	138	122	280	872	474
9	157	221	151	529	-	-
				1113	-	3129

NF - núcleo fragmentado; MN - micronúcleo; NP - ponte e fragmento em anáfase e telófase.



Comparando-se os dados de anomalias com os de porcentagem de germinação e do índice de velocidade de germinação, verifica-se uma relação entre a diminuição destes com o aumento na frequência de células anormais, tanto nas sementes armazenadas quanto nas envelhecidas a 30°C e 40°C (Tabela 7).

TABELA 7. Efeito dos períodos de envelhecimento e temperaturas na porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e ocorrência de anomalias celulares em sementes de araucaria.

Tratamento	Período de envelhecimento (dias)	Germinação (%)	IVG	% média de anomalias em relação a testemunha
Testemunha	0	75	1,34	100
Envelhecimento artificial a 30°C	3	73	1,17	176
	6	76	1,27	254
	9	77	1,10	480
Envelhecimento artificial a 40°C	3	53	1,04	1015
	6	31	0,44	1729
	9	0	-	-
Armazenamento a 5°C	30	78	1,12	259
	60	56	0,89	377
	90	48	0,51	563

Murata *et al.* 1981, em estudos sobre mudanças genéticas durante o envelhecimento de sementes de cevada submetidas a altas temperaturas, mostrou

que a frequência de anáfases aberrantes aumentou com o aumento do tempo e condições de envelhecimento. Estas aberrações também foram relacionadas com a perda de germinabilidade, que foi acelerada com o aumento da temperatura de 21°C para 32°C e 38°C.

O aparecimento de anomalias cromossômicas, devido ao uso de altas temperaturas e umidade para a indução do envelhecimento, já havia sido observado em várias espécies (Abdalla e Roberts, 1968; Roberts, 1973c, 1978; Villiers, 1974; Murata, 1981). Segundo Abdalla e Roberts (1968), isto se deve ao acúmulo de mudanças nucleares, o que resulta em quebras cromossômicas que, em um nível crítico, tornam as sementes incapazes de germinar.

É interessante notar que as três alterações observadas neste trabalho, isto é, núcleos fragmentados, micronúcleos, pontes e fragmentos nas anáfases e telófases, são decorrentes de quebras de DNA. As pontes, fragmentos e micronúcleos são conseqüências da ocorrência de deficiências e inversões de segmentos provocados pelas quebras. Além disso, as quebras expõem o DNA à ação de exonucleases e endonucleases (Cheah e Osborne, 1978), aumentando ainda mais a perda de material genético. Também foi demonstrado que a síntese de DNA e a atividade das enzimas DNA polimerase e ligase tornam-se reduzidas em sementes de milho deterioradas, inibindo ou atrasando os mecanismos de reparo do DNA (Vázquez-Ramos *et al.*, 1988; Vázquez *et al.* 1991, Coello e Vázquez-Ramos, 1996). Com isso, haveria uma transmissão defeituosa de informação do núcleo para o citoplasma, levando a uma perda de vigor ou perda de viabilidade (Vázquez, *et al.* 1991).

O envelhecimento teria, portanto, como uma de suas principais causas as quebras do DNA e as alterações no metabolismo do DNA. Paralelamente a isso, haveria uma crescente redução da capacidade operacional dos mecanismos de sua restauração, especificamente a velocidade com que atua e a fidelidade com que reproduz a estrutura afetada (Warner e Price, 1989). Isto, explicaria a queda

da porcentagem e velocidade de germinação das sementes de araucária, e o aumento de células anormais que se verifica à medida que as sementes se deterioraram.

Apesar de não ter sido constatada alteração significativa no índice mitótico, na taxa de germinação e vigor das sementes, quando submetidas a 30°C, foi observado um aumento progressivo de anomalias nestas sementes. Desta forma, recomenda-se o acompanhamento do desenvolvimento das plântulas produzidas a partir destas sementes, a fim de se avaliar as implicações destas anomalias nas futuras plântulas.

5 CONCLUSÕES

Ocorreram perdas semelhantes de vigor e viabilidade das sementes de araucária submetidas ao armazenamento a 5°C e ao envelhecimento artificial a 40°C. Estas características não foram afetadas pelo envelhecimento a 30°C. Em todas as condições a que foram submetidas as sementes de araucária, não se observou alterações na frequência de células em divisão, observando-se, no entanto, a ocorrência de um grande número de anomalias no ciclo celular, as quais foram ainda mais freqüentes quando o envelhecimento foi feito a 40°C. As anomalias encontradas (micronúcleos, núcleos fragmentados e pontes e fragmentos nas anáfases e telófases) demonstraram que a perda de vigor e viabilidade das sementes de araucária envelhecidas são devidas à quebras nas moléculas de DNA.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, I.B. de; PIÑA-RODRIGUES, I.C.M. *Sementes florestais tropicais*.
Brasília: ABATES, 1993. 350P.
- AGUILAR, R; REYMOSO, E.; ALBORES, M.; SANCHEZ-DE JIMENEZ, E.
Changes in protein synthesis in embryonic axes after long term storage of
maize seeds. *Seed Science Research*, Wallingford, v.2, n.4, p.191-198,
Dec. 1992.
- ABDALLA, F.H.; ROBERTS, E.H. Effects of temperature, moisture, and
oxygen on the induction of chromosome damage in seeds of barley, broad
beans, and pea during storage. *Annals of Botany*, New York, v.32, p.119-
136, 1968.
- ABDALLA, F.H., ROBERTS, E.H. The effects of temperature and, moisture, on
the induction of genetic damage in seeds of barley, broad beans, and pea
during storage. *Annals of Botany*, New York, v.33, p.153-167, 1969.
- ABDUL-BAKI, A.A.; ANDERSON, J.D. Physiological and biochemical
deterioration of seeds. In: KOSLOWSKI, T.T. *Seed Biology*. New York:
Academic, 1972. v.1, 416p.
- AGUILAR, R.; REYMOSO, E.; ALBORES, M.; SANCHEZ-DE JIMENEZ, E.
Changes in protein synthesis in embryonic axes after long term storage of
maize seeds. *Seed Science Research*, Wallingford, v.2, n.4, p.191-198,
Dec. 1992.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS - AOSA. **Seeds Vigour Testing Handbook**. 1983, 93p. (Contribution, 32).

BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 19, n.2, p. 279-286, 1991.

BASKIN, C.C. Accelerated aging test. In: PERRY, D.A., (ed). **Handbook of Vigour Test Methods**. Zurich: ISTA, 1981. p.43-48.

BERJAK, P., DINI, M., PAMMENTER, N.W. Possible mechanism underlying the differing dehydration responses in recalcitrant and orthodox seeds: desiccation-associated subcellular changes in propagules of *Avicennia marina*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.12, n.2, p.365-384, 1984.

BEWLEY, J.D., BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1994. 445p.

BINGHAM, I. J; HARRIS, A.; MACDONALD, L. A comparative study of radicle and coleoptile extension in maize seedlings from aged and unaged seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.22, n.1, p. 127-139, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: DNPV-DISEM, 1992. 365p.

- CARNEIRO, J.G; AGUIAR, I.B. de. Armazenamento de sementes. In: AGUIAR; I.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. *Sementes florestais tropicais*, Brasília: ABRATES, 1993. P.333-350.
- CHEACH, K. S.; OSBORN, D. DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing sye seed. *Nature*, London, v.272, n.5654, p. 593 - 599, Apr. 1978.
- CHERRY, J.H.; SKADSEN, R.W. Nucleid acid and protein metabolism during seed deterioration. In: McDONALD JR., M.D.; NELSON, C.J. *Physiology of seed deterioration*, Wallingford, CSSA, 1983. Cap.4, p.65-87. (Special Publication, 11).
- CHIN, H.F. Production and storage of recalcitrant seeds in the tropics. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v.83, p.17-21, 1978.
- COELLO, P; VÁZQUEZ - RAMOS, M. Maize DNA polymerase 2 (an a-type enzyme) suffers mayor damage after seed deterioration. *Seed Science Research*, Wallingford, v.6, n.1, p.1-7, Mar. 1996.
- DELOUCHE, J. C.; BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relativestorability of seeds lots. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.1, n.2, p.427-452, 1973.
- EIRA, M.S.; SALOMÃO, A.N.; CUNHA, R.; CARRARA, D.K.; MELLO, M.C. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.- Araucariaceae. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v. 16, n.1, p.71-75, 1994.

- FARRANT, J.M., PAMMENTER, N.W., BERJAK, P. The increasing desiccation sensitivity of recalcitrant *Avicennia marina* seeds with storage time. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.67, n.2, p.291-298, June, 1986.
- FARRANT, J.M., PAMMENTER, N.W., BERJAK, P. Recalcitrance - a current assessment. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.19, n.1, p.155-156, 1988,
- FARRANT, J.M., PAMMENTER, N.W., BERJAK, P. Germination - associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds - a study on three unrelated species. *Planta*, New York, v.178, n.2, p.189-198, May, 1989.
- FERREIRA, A-G; HANDRO, W. Aspects of germination in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, V.2, n.1, p. 7-13, 1979.
- GHOSH, B.; ADHIKARY, J.; BANERJEE, N.C. Changes of some metabolites in rice seeds during ageing. *Seed Science and Technology*, Zurich, v. 9, n. 1, p. 468-473, 1981.
- GUTIÉRREZ, M, G.; CRUZ, F.; MORENO, J.; GONZÁLEZ - HERNÁNDEZ, V. A.; VÁZQUEZ-RAMOS, J.M. Natural and artificial seed ageing in maize: germination and DNA synthesis. *Seed Science Research*, Wallingford, v.3, n.4, p.279-285, Dec. 1993.
- HALMER, P.; BEWLEY, J.D. A physiological perspective on seed vigour testing. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.12, n. 561-575. 1984.

- HARRINGTON, J.F. Seed storage and longevity. In: KOSLOWSKI, T.T. **Seed biology**. New York: Academic, 1972, v.1, 416 p.
- HEYDECKER, W. Vigour. In: ROBERTS, C.H. **Viability of seeds**. London: Chapman and Hall, 1972. 448p.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA. **Handbook of Vigour Test Methods**. Zurich, Switzerland, ISTA, 1981. 72p.
- KGEYAMA, P.Y.; MÁRQUEZ, F.C.M. **Comportamento das sementes de espécies de curta longevidade armazenadas com diferentes teores de umidade inicial (gênero *Tabebuia*)**. IPEF. Circular Técnico, Piracicaba: n.126, 1981. 4p.
- KING, M.W., ROBERTS, E.H. **The storage of recalcitrant seeds; achievements and possible approaches**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1979. 96p.
- KING, M.W.; ROBERTS, E.H. A strategy for future research into the storage of recalcitrant seeds. In: CHIN, H. F.; ROBERTS, E.H. **Recalcitrant Crop Seeds**. Kuala Lumpur: Tropical, 1980. cap.5, p.90-110.
- KING, M.W.; ROBERTS, E.H. The imbibed storage of cocoa (*Theobroma cacao*) seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.10, n.3, p.535-540, 1982.
- KRZYZANOWSKI, F. C; MIRANDA, Z. F. S. **Relatórios do comité de vigor da ABRATES**. Informativo ABRATES, Brasília, v.1, p. 7-25, 1990.

- LIN, S.S. Efeito do período de armazenamento na lixiviação eletrolítica dos solutos celulares e qualidade fisiológica da semente de milho (*Zea mays* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.10, n.3, p.59-67, 1988.
- MAGUIRRE, J.D. Speed of germination - aid seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177, Mar./Apr. 1962.
- MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (eds.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.133-149.
- MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S.M.; SILVA, W.R. da. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230p.
- MATTHEWS, S. Controlled deterioration: a new vigour test for crop seeds. In: HEBBLEWAITE, P.D. (ed). **Seed production**. London: Butterworths, 1980. p.647-660.
- MATTHEWS, S. Evolution of techniques for germination and vigor studies. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 9, p. 543-51. 1981.
- MATTHEWS, S. Physiology of seed ageing. **Outlook on Agriculture**, London v.14, n2, p. 89-94. 1985.
- McDONALD Jr., M.B. The influence of seed moisture in the accelerated aging seed vigor test. **Journal of Seed Technology**, East Lansing, v.2, n.1, p.18-28, 1977.

- McDONALD Jr., M.B. Assessment of seed quality. **Hortscience**, St. Joseph, v.15, n.6, p.784-788. 1980.
- McGEE, D.C. Symposium: deterioration mechanisms in seeds. Introduction. **Phytopatology**, St. Paul, v.73, n.2, p.314-317, 1983.
- MURATA, M.; ROSS,E.E.; TSUCHIYA,T. Chromosome damage induced by artificial seed aging in barley. I. Germinability and frequency of aberrant anaphases at first mitosis. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v.23, n.2, p.267-280,1981.
- NKANG, A. Some aspects of the biochemical basis of viability loss in stored *gukfoylia monostylis* seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.16, n.2, p.247-260, 1988.
- PAMMENTER, N.W.; FARRANT, J.M.; BERJAK, P. Recalcitrant seeds: short-term storage effects in *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. may be germination-associated. **Annals of Botany**, New York, v.54, p.843-846, 1984.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia de Sementes**. Brasilia: MA/AGIPLAN, 1977. 290p.
- PRAGE, P.W. Estudo de conservação do poder germinativo das sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Anuário Brasileiro de Economia Florestal**, Rio de Janeiro, v.16, p.41-53, 1964.

PURKAR, J.K.; BANERJEE, S.K.; MEHNA, R.B. Seed ageing induced variability in quantitative characters of pea and wheat. **ISTA Congress, Vienna, Preprint 60, 1980.**

RAMOS, A. Deterioração de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. em envelhecimento natural e artificial e sua influência na produção de mudas. Curitiba: UFP 1987. (Tese. Doutorado em Engenharia Florestal).

ROBERTS, E.H. Storage environment and the control of viability. In: **ROBERTS, E.H. (ed.). Viability of seeds.** London: Chapman and Hall, 1972a. p. 14-58.

ROBERTS, E.H. Cytological, genetical, and metabolic changes associated with loss of viability. In: **ROBERTS, E.H. (ed.). Viability of seeds.** London: Chapman and Hall, 1972b. p.253-306.

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

ROBERTS, E.H. Loss of seed viability: chromosomal and genetic aspects. **Seed Science and Technology. Zurich, v.1, n.3, p.515-27, 1973b.**

ROBERTS, E.H. Loss of viability: ultrastructural and physiological aspects. **Seed Science and Technology, Zurich, v.1, n.3, p.529-545, 1973c.**

- ROBERTS, E.H. Mutation during storage. *Acta Horticulturae*, Wageningen, V.83, p.279-283, 1978.
- ROBERTS, E.H.; ABDALLA, F.H. The influence of temperature, moisture, and oxygen on period of seed viability in barley, broad beans, and pea. *Annals of Botany*, New York, v.32, p.97-117, 1968.
- ROBERTS, E.H.; KING, M.W. The characteristics of recalcitrant seeds. In: CHIN, H.F.; ROBERTS, E.H. *Recalcitrant crop seeds*. Kuala Lumpur: Tropical, 1980. 152p.
- ROBERTS, E.H. Physiology of ageing and its application to drying and storage. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.9, n.2, p.359-72, 1981.
- SMITH, M.T.; BERJAK, P. Deteriorative changes associated with the loss of viability of storage desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. In: KIMOJEL, Y., GOLILI, G. *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker, 1995. 853 p.
- SUITER FILHO, W. *Conservação de sementes de Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze*. Piracicaba: ESALQ, 1966.
- TAO, K.J. An evaluation of alternative methods of accelerated aging seed vigor test for soybeans. *Journal of Seed Technology*, East Lansing, v.3, n.2, p.30-40, 1979.

- TOMES, L.J.; TEKRONY, D.M.; EGLI, D.B.** Factors influencing the tray accelerated aging test for soybean seed. **Journal of Seed Technology**. East Lansing, v.12, n.1, p. 24-35, 1988.
- TOMPSETT, P. B.** The effect of desiccation on the longevity of seeds of *Araucaria hunsteinii* and *A. cunninghamii*. **Annals of Botany**, New York, v.50, n.5, p. 693-704, 1982.
- TOMPSETT, P. B.** Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. **Annals of Applied Botany**, Webesbourne, v.105, n.3, p. 581-586, 1984.
- TYAGI, C.S.** Evaluating viability and vigour in soybean seed with automatic seed analyzer, **Seed Science and Technology**, Zurich, v.20, n.3, p.687-694, 1992.
- VÁZQUEZ - RAMOS, J.M.; LOPEZ, S.; VÁZQUEZ, E.; MURILLO, E.** DNA integrity and DNAPolymerase activity in deteriorated maize embryo axes. **Journal of Plant Physiology**, London, v.133, p.600-604, 1988.
- VÁZQUEZ, E.; MONTIEL, F.; VÁZQUEZ - RAMOS, J.M.** DNA ligase activity in deteriorated maize embryo axes during germination: a model relating defects in DNA metabolism in seed to loss of germinability. **Seed Science Research**, Willingford, v.1, p.269-273, 1991.
- VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M.** Testes de vigor em sementes. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164p.

VILLIERS, T.A. Seed aging: chromosome stability and extended viability of seed stored fully imbibed. *Plant Physiology*, Osney Mead, v.53, p.875-878, 1974.

WARNER, H.R., PRICE, A.R. Involvement of DNA repair in cancer and aging. *Journal of Gerontology: Biological Sciences*, v.44, n.6, p.45-54, 1989.

WOODSTOCK, L.W. Physiological and biochemical test for seed vigor. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.1, n.1, p.127-157, 1973.