

**SENSIBILIDADE À DESSECAÇÃO, ARMAZENAMENTO,
GERMINAÇÃO E MORFOLOGIA DE SEMENTES DE *Cupania*
vernalis Camb.**

CARLOS VINÍCIO VIEIRA

2005

CARLOS VINÍCIO VIEIRA

**SENSIBILIDADE À DESSECAÇÃO, ARMAZENAMENTO,
GERMINAÇÃO E MORFOLOGIA DE SEMENTES DE *Cupania vernalis*
Camb.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. Amauri Alves de
Alvarenga

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

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

Vieira, Carlos Vinício

Sensibilidade à dessecação, armazenamento, germinação e morfologia de sementes de *Cupania vernalis* Camb. / Carlos Vinício Vieira. -- Lavras : UFLA, 2005.

65 p. : il.

Orientador: Amauri Alves de Alvarenga

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Camboatá. 2. Sapindaceae. 3. Variação fisiológica. 4. Variação bioquímica. 5. Variação ultraestrutural. 6. Variação morfoanatômica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-582.16
-634.9

CARLOS VINÍCIO VIEIRA

**SENSIBILIDADE À DESSECAÇÃO, ARMAZENAMENTO,
GERMINAÇÃO E MORFOLOGIA DE SEMENTES DE *Cupania vernalis*
Camb.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 9 setembro de 2005

Pesq. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva UFLA

Prof. Dr Evaristo Mauro de Castro UFLA

Prof. Dr Renato Mendes Guimarães UFLA


Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga
DBI/UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Resplandecente é a sabedoria,
e sua beleza é inalterável:
os que a amam descobrem-na facilmente,
os que a procuram encontram-na.
Sab 6, 12-13,

DEDICO.

À comunidade científica,

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Gostaria eu que essa página fosse suficiente para relatar e agradecer uma parte da minha vida, não apenas no período de pós-graduação, mas que iniciou a partir do momento em que passei no vestibular. Logo em seguida, já no início do curso de agronomia, Deus me presenteou colocando pessoas no meu caminho que foram as melhores amizades, as quais cultivo até nos dias atuais. Amigos de alojamento estudantil. Esses vão ficar gravados pra sempre. Luciano Donizete, mais do que um amigo... seus ensinamentos me fizeram engrandecer ainda mais. Cezinha, meu grande amigo de balada, nossas histórias de bagunça ainda vão gerar muitas risadas. Natalino, vou ser sincero, a moça que casar com você é a maior sortuda, pois, afinal, esse era o único cara sério. Dr. Garga, pessoa humilde como essa, nem de encomenda se encontra mais. Elvis, esse me ensinou que as coisas sempre podem ser resolvidas de uma forma mais fácil. Grande amigo de curso e de estudos. Professor Evaristo, a você sou muito grato por quem sou e onde estou hoje, pessoa que me adotou e me ensinou não apenas anatomia vegetal, mas como lidar com situações futuras, como pessoa e como profissional. "Faça bem feito hoje, que no futuro colheremos bons frutos". Fiz com o coração e hoje sou feliz por isso. Muito obrigado, professor e fique sabendo que não pára por aqui, ainda temos muito para partilhar. Professor Amauri, mais que um orientador, um amigo, pessoa a quem agradeço pelo empenho na minha formação e nas nossas conversas sobre a vida e sobre as oportunidades dadas a mim. Professores Renato Mendes Guimarães, Eduardo Alves e Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, muito obrigado pela disposição e troca de idéias sobre a execução dos experimentos. Agradeço a todos os professores do curso de Fisiologia Vegetal, pelos conhecimentos transmitidos dentro e fora da sala de aula. Agradeço ao grande amigo Morbeck que, nos momentos em que passei por problemas financeiros estava lá com o mensalão disponível. Joel, Odorêncio,

Tanhã, Lena e Barrinha, a amizade de vocês é mais do que um presente. Joel sempre fui eu...

Agradeço a vivência que todos meus colegas de curso me proporcionaram, cada um ficará registrado no coração.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade. À CAPES, pela concessão da bolsa e ao grande amigo Msc Érico de Castro Lima Júnior, pelos conhecimentos compartilhados e que me proporcionaram trabalhar com essa espécie.

Por fim, agradeço aos meus pais, Baltazar Luiz Vieira e Maria Aparecida Inácio Vieira, por terem me incentivado a continuar na vida acadêmica. A todos que por esse momento tenho no coração, aqui fica meu sincero muito obrigado ao pai, Deus. "Caminho, verdade e vida".

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO | i |
| ABSTRACT | ii |
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 2 |
| 2.1 Descrição da espécie | 2 |
| 2.2 Aspectos da tolerância à dessecação e do armazenamento de sementes..... | 3 |
| 2.2.1 Papel de moléculas protetoras na tolerância à dessecação | 9 |
| 2.2.1.1 Oligossacarídeos (carboidratos solúveis) | 9 |
| 2.2.1.2 Proteínas termorresistentes..... | 10 |
| 2.3 Estudos ultra-estruturais..... | 12 |
| 2.4 Germinação, anatomia e morfologia de plântulas | 13 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 14 |
| 3.1 Considerações gerais..... | 14 |
| 3.2 Ponto crítico de secagem das sementes..... | 14 |
| 3.3 Armazenamento das sementes | 16 |
| 3.4 Análise ultra-estrutural da semente durante a secagem e armazenamento..... | 17 |
| 3.5 Determinação de açúcares solúveis totais | 17 |
| 3.7 Extração e quantificação de proteínas termorresistentes..... | 18 |
| 3.8 Caracterização anatômica e morfológica | 19 |
| 3.9 Análise estatística..... | 20 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 21 |
| 4.1 Aspectos da germinação e ultra-estruturais em sementes de <i>Cupania</i> <i>vernalis</i> Camb. submetidas a testes de tolerância à dessecação..... | 21 |
| 4.2 Germinação e aspectos ultra-estruturais de sementes de <i>Cupania</i> <i>vernalis</i> Camb. submetidas ao armazenamento | 26 |
| 4.3 Carboidratos solúveis: açúcares solúveis totais..... | 36 |

| | |
|--|----|
| 4.4 Proteínas termorresistentes..... | 38 |
| 4.5 Características morfológicas e anatômicas de plântulas de <i>Cupania vernalis</i> Camb | 40 |
| 4.5.1 Características anatômicas da semente | 40 |
| 4.5.2 Morfologia da germinação | 42 |
| 4.5.3 Características anatômicas das plântulas nos diferentes estádios de desenvolvimento..... | 43 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 49 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 50 |
| ANEXOS | 59 |

RESUMO

VIEIRA, Carlos Vinício. **Sensibilidade à dessecação, armazenamento, germinação e morfologia de sementes de *Cupania vernalis* Camb.** Lavras: UFLA, 2005. 61 p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal)*

Sementes de *Cupania vernalis* Camb. possuem características recalcitrantes quando submetidas à secagem, além de uma curta longevidade, necessitando da aplicação de conhecimentos relacionados a fatores que interferem no armazenamento e conservação. Nesse estudo, objetivou-se avaliar as variações fisiológicas, bioquímicas, ultra-estruturais e morfoanatômicas de sementes de *Cupania vernalis* Camb., quando submetidas a diferentes temperaturas e teores de água, durante o armazenamento. Para o estudo da dessecação, as sementes foram secadas nos seguintes graus de umidade: 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% e 10%, posteriormente submetidas a testes para identificação de proteínas termorresistentes e colocadas para germinar. No armazenamento, sementes com graus de umidade de 40%, 35%, 30% foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas sob temperatura controlada de 10°C e 25°C, avaliadas nos tempos, 0, 120 e 240 dias, quanto ao grau de umidade, germinação, IVE, açúcares solúveis totais e características ultra-estruturais. Na caracterização dos tecidos da semente, foi empregado teste histoquímico com Sudan III, Floroglucinol e Lugol. Para a descrição anatômica das plântulas, empregou-se azul de astra com safranina. Os resultados referentes ao teste de tolerância à dessecação revelaram que 30% de umidade é o grau crítico, sendo classificada como recalcitrante, havendo expressão de HSP. A combinação do grau de umidade de 40% com a temperatura de 10°C favorece sua conservação. Sementes conservadas a 25°C, apresentaram maior teor de açúcares solúveis totais. As sementes são revestidas por um tegumento lignificado e, aos 60 dias após a protrusão, já é identificado o início da formação de estruturas secundárias na plântula.

* Comitê Orientador: Amauri Alves de Alvarenga (Orientador) – UFLA, Evaristo Mauro de Castro (Co-orientador)- UFLA.

ABSTRACT

VIEIRA, Carlos Vinício. **Sensibility to desiccation, storage, germination and morphology of *Cupania vernalis* Camb. seeds.** Lavras: UFLA, 2005. 61 p. (Dissertation – Master in Agronomy/Plant Physiology)*

Cupania vernalis Camb. seeds have a short longevity with a recalcitrant behavior when submitted to drying. These demand the development and adoption of technologies to improve storage and conservation of the seeds. Thus, the objective of this work was to evaluate physiological, biochemical, ultra-structural and morpho-anatomic aspects of *Cupania vernalis* seeds at different storage temperatures and seed moisture content. For the desiccation sensitivity studies the seeds were dried at eight different water content: 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% and 10%. The expression pattern of proteins resistant to heat and seed germination were verified at each moisture content. Seeds with 40%, 35% and 30% of water content were conditioned in plastic bags and stored at 10°C and 25°C under controlled temperature. During 0, 120 and 240 days of storage seeds were taken for evaluation of water content, germination, emergency index, soluble sugars content and ultra-structural studies. The morpho-anatomic study of the seeds was performed by using a histochemical test with Sudan III, Floroglucinol and Lugol. For the anatomical description of the seedlings was used Astra blue with Safranin. The results regarding to desiccation sensitivity showed that the water content at 30% was critical. During desiccation the recalcitrant behavior was confirmed, although the _expression of proteins resistant to heat was observed at 30% of water content. The moisture content of 40% in combination with 10°C during storage favors seeds conservation. Seeds stored at 25°C showed higher soluble sugars content. The morpho-anatomic studies showed that the seeds were covered by a lignified tegument and at 60 days after radicle protrusion the formation of secondary structures in the seedlings was observed.

* Guidance Committee: Dr. Amauri Alves de Alvarenga -UFLA (Adviser) - UFLA, Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO GERAL

A flora brasileira representa a maior diversidade de espécies vegetais do mundo, com grande potencial de utilização para diversos fins. No entanto, a maioria das espécies carece de estudos relacionados à conservação de sementes e germinação.

Em uma avaliação sobre a importância de uma determinada espécie, torna-se difícil encontrar parâmetros que não a classifiquem como não sendo de interesse conservacionista ou de grande potencial econômico, tendo em vista seus valiosos produtos, como madeira, frutos, resinas, medicamentos e néctares, dentre outros.

Nos últimos anos, não só o país, mas o mundo todo, tem sido vítima de uma exploração extrativista e descontrolada dos recursos naturais, principalmente dos cerrados e florestas, para a ocupação por áreas agrícolas e pecuária, colocando em risco de extinção várias espécies consideradas de grande importância para a integridade dos ecossistemas.

Projetos de recomposição ou recuperação de áreas degradadas são dependentes de formas de coleta, conservação e propagação de espécies com potencial para tal finalidade.

O êxito dos projetos de reflorestamento depende, entre outros fatores, da correta seleção de espécies, bem como da disponibilidade e conservação de suas sementes. Devido à grande diversidade de espécies e as suas complexas inter-relações e interações com o meio, a seleção será tanto mais correta quanto maior for o conhecimento relativo às espécies de interesse principalmente quanto a sua propagação.

Pouco se sabe sobre o armazenamento (conservação) e posterior germinação de *Cupania vernalis* Camb. A sensibilidade à dessecação é admitida como interferente na conservação dessas sementes (Lima Júnior, 2004). Desse

modo, tem-se sugerido o armazenamento com elevados graus de umidade em sacos plásticos. Segundo Lorenzi (2000), a germinação das sementes é lenta e muito baixa; por isso elas devem ser semeadas logo após a colheita, uma vez que a viabilidade é curta.

Diante dessa problemática, este trabalho objetivou avaliar as variações fisiológicas, bioquímicas, ultra-estruturais e morfoanatômicas de sementes de *Cupania vernalis* Camb., quando submetidas a diferentes temperaturas e teores de água, durante o armazenamento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição da espécie

Cupania vernalis Camb., uma das principais espécie da família Sapindaceae, é conhecida popularmente como camboatá, camboatã e arco-de-peneira, dentre outros. As plantas, quando adultas, podem atingir de 10 a 22m de altura, com tronco entre 50-70cm de diâmetro. Suas folhas são simples no estágio inicial de desenvolvimento, lançando, posteriormente, folhas compostas, pinadas e alternas, com 10 a 18 folíolos de 6 a 15cm de comprimento e bordos serrados. As flores são pequenas, em panículas de 10 a 20cm de largura. Floresce entre os meses de março a maio e a maturação dos frutos ocorre entre os meses de setembro a novembro. Os frutos são do tipo cápsula, contendo de uma a três sementes ovóides de cor negra brilhante com arilo amarelo-alaranjado. A espécie é de grande utilidade, pois a sua madeira é própria para obras internas, marcenaria, forma para calçados, lenha e carvão. Pode ser empregada no paisagismo, principalmente na arborização de ruas. É uma espécie de grande utilidade para plantios mistos destinados à recuperação de áreas degradadas de preservação permanente, pois, além de serem adaptadas à

insolação direta, os seus frutos são utilizados na alimentação por pássaros (Lorenzi, 2000).

As espécies da família Sapindaceae são tradicionalmente utilizadas na medicina como diuréticos, estimulantes, expectorantes, sedativos, vermífugos e contra estomatites e dermatites, em diversas partes do mundo. No Brasil, a espécie *Paullinia cupana*, popularmente conhecida como guaraná, é a mais difundida e conhecida representante da família (Cavalcanti, 2001). Extratos da casca da árvore da espécie *Cupania vernalis* são utilizados na medicina popular contra tosse convulsivas e asma (Rodrigues & Carvalho, 2001).

2.2 Aspectos da tolerância à dessecação e do armazenamento de sementes

Durante o desenvolvimento, as sementes que toleram a dessecação progridem por fases de histodiferenciação com aumentos na biomassa e deposição de reservas, seguidas por um ganho rápido de matéria seca durante a maturação e posterior secagem, cessando a acumulação de matéria seca com a diminuição da biomassa e perda de água pela semente. Logo após a histodiferenciação, as sementes adquirem a habilidade de germinar e tornam-se tolerantes à dessecação.

A maior parte das espécies possui sementes denominadas ortodoxas, as quais suportam dessecação a graus de umidade de até 5%; outras produzem sementes classificadas como intermediárias, que toleram dessecação a graus de umidade de até 10% a 12,5%, enquanto outras possuem sementes conhecidas como recalcitrantes, que não toleram dessecação a graus de umidade inferiores a 15% ou 20% (Roberts, 1973; Hong & Ellis, 1996). Recentemente, as sementes ortodoxas, intermediárias e recalcitrantes, que até então apresentavam uma abordagem qualitativa, passaram a ter um enfoque quantitativo (Walters, 2000), levando em consideração a magnitude da tolerância à dessecação entre as

sementes altamente sensíveis e as que suportam a perda de maior parte de água presente (Berjak e Pammenter, 2000).

Sementes recalcitrantes, ou seja, aquelas não toleram perdas significativas do conteúdo de água e baixas temperaturas, sofrem histodiferenciação até certo ponto, de forma semelhante às sementes ortodoxas, que é seguida por uma fase de acumulação de reservas (Farrant et al., 1992). Porém, o padrão de desenvolvimento em sementes recalcitrantes se apresenta de forma diferencial com acumulação de matéria seca até o momento da dispersão (Lin e Chen, 1995).

De todas as espécies já estudadas, com exceção de *Avicennia marina*, nas demais existe uma redução no conteúdo de água com a etapa final do desenvolvimento da semente. Em sementes de *A. marina*, o conteúdo de água permanece inalterado durante o desenvolvimento, com a mesma taxa de matéria seca e água. Isso ocorre em função das reservas principais nessa espécie serem açúcares solúveis, em vez de compostos insolúveis (Farrant et al., 1992).

A diminuição no conteúdo de água ao final do desenvolvimento é acompanhada por um aumento na tolerância à dessecação na maioria das sementes recalcitrantes. Isso foi demonstrado nas seguintes espécies: *Acer pseudoplatanus* (Hong & Ellis, 1990), *Quercus robur* (Finch-Savage, 1992), *A. hippocastanum* (Pritchard, 1991; Farrant et al., 1997), *Camellia sinensis* (Berjak et al., 1993) e *Machilus thunbergii* (Lin & Chen, 1995). Durante o desenvolvimento das sementes de *Q. robur*, o aumento na tolerância à dessecação foi acompanhado por um aumento na quantidade de proteínas termorresistentes pertencentes à família das dehydrinas e ABA (Farrant et al, 1997), embora o conteúdo de ABA crescente fosse associado à prevenção da germinação precoce. Em sementes em desenvolvimento de *Machilus thunbergii*, a concentração de ABA declinou com o fim do desenvolvimento, enquanto a tolerância à dessecação aumentava, sugerindo que o ABA não tenha induzido a

tolerância à dessecação (Lin e Chen, 1995). Esses autores ainda sugerem que a recalcitrância em sementes é uma consequência prematura do desenvolvimento.

A água, como fator fundamental da semente, participa de vários eventos metabólicos relacionados à estabilidade de membranas, bem como na conformação de proteínas. Quando removida abaixo do limite suportado pela célula, podem ocorrer danos aos microtúbulos (Faria et al., 2004), aumento da concentração dos solutos, alteração do pH intracelular, aceleração de reações degenerativas, desnaturação de proteínas e perda da integridade de membranas (Sun & Leopold, 1997). Alguns mecanismos de proteção têm sido reportados para a aquisição de tolerância à dessecação e manutenção de viabilidade durante o armazenamento: a atuação de sistemas antioxidantes, a concentração e a ação de moléculas protetoras, incluindo as LEA proteínas (Late embryogenesis abundant), a formação do estado vítreo em função da presença de oligossacarídeos da série rafínósica (estaquiose e verbascose) e a operação de sistemas de reparo durante a reidratação (Su & Leopold, 1997; Berjak e Pammenter, 2000; Hoekstra et al., 2001).

Teoricamente, a tolerância à dessecação tende a aumentar com o número de mecanismos de proteção em atividade de tal modo que, provavelmente, exista um gradiente de tolerância dependente da interação efetiva entre os mecanismos que estão presentes (Berjak & Pammenter, 2000).

Embora a secagem de sementes recalcitrantes resulte no declínio da viabilidade (Roberts, 1973), a literatura tem reportado, entre as espécies, considerável variação na sensibilidade à dessecação. Farrant et al. (1988), admitindo esta variação, propuseram a separação das sementes recalcitrantes nas categorias altamente recalcitrantes (pequena tolerância à dessecação), moderadamente recalcitrantes (moderada tolerância à dessecação) e minimamente recalcitrantes (elevada tolerância à perda de água).

A secagem parcial pode contribuir para a conservação de sementes recalcitrantes (Chin, 1988), mesmo naquelas que toleram dessecação a valores ligeiramente inferiores ao grau de umidade original. Porém, pode ocorrer perda de viabilidade em função dessa desidratação, podendo ser atribuída a duas causas principais: como consequência de metabolismo desequilibrado durante a desidratação e, possivelmente, também quando são armazenadas na condição hidratada ou, então, em função de danos causados pela desidratação, quando a água é essencial para a integridade de estruturas intracelulares (Berjak e Pammenter, 2003).

Em função da inevitável deterioração das sementes e da grande variação existente entre as espécies, entre lotes da mesma espécie e entre unidades do mesmo lote, buscam-se, no armazenamento, estratégias para manter as sementes íntegras e viáveis por períodos prolongados logo após a sua dispersão. Para as espécies florestais, na maioria das vezes, torna-se difícil preservar a viabilidade e o vigor das sementes; por isso, fatores, como temperatura e umidade, devem ser considerados durante o armazenamento, visando prolongar a longevidade e a sua viabilidade (Ramos, 1980; Alvarenga, 1987; Corrêa, 1997; Oladiran & Agunbiade, 2000). Embora haja algumas discordâncias ou dificuldades na diferenciação entre causas e consequências da deterioração, a seqüência provável de eventos envolve redução na velocidade de germinação, redução do potencial de armazenamento, desuniformidade e retardamento do crescimento e desenvolvimento inicial de plântulas, aumento na sensibilidade a adversidades ambientais, redução de emergência de plântulas no campo e aumento de plântulas anormais com consequente morte (Delouche & Baskin, 1973).

A deterioração pode ser considerada um parâmetro que mede a qualidade de um lote de sementes determinando seu potencial de conservação (Gentil, 2003). Toda e qualquer semente armazenada sofre deterioração, podendo ser rápida ou lenta, dependendo das características ambientais e das características

das próprias sementes. Geralmente, a redução da luminosidade, da temperatura e da umidade de sementes e ambiente faz com que seu metabolismo seja reduzido e que os microrganismos que as deterioram fiquem fora de ação, aumentando sua longevidade (Vieira et al., 2001).

Elliott, citado por Hong e Ellis (2003), dividiu as sementes de árvores de florestas temperadas em três classes: as que podem ser desidratadas, as que podem sobreviver com desidratação parcial e as que raramente podem ser desidratadas.

A classificação de sementes em ortodoxas e recalcitrantes, proposta por Roberts, em 1973, é a mais utilizada atualmente para o comportamento de sementes quanto às condições de armazenamento (Roberts citado por Hong e Ellis, 2003). Uma terceira categoria foi proposta por Ellis et al. (1990), citados por Hong e Ellis (2003), as intermediárias, cuja definição está baseada na resposta de longevidade ao ambiente de armazenamento; estas apresentam tendência para longevidade crescente, quanto menor o grau de umidade da semente no armazenamento (sob condição de ar-seco). Mas, esta condição é invertida a um grau de umidade relativamente alto e, a partir deste ponto, a redução do grau de umidade implica em redução da longevidade. Segundo Bonner (1989), as sementes que podem ser estocadas com menos de 10% de umidade mantendo ou aumentando a longevidade são consideradas ortodoxas; as sementes recalcitrantes não podem ser desidratadas para graus de umidade abaixo de 25% a 50%, dependendo da espécie, sem perder a viabilidade (Bonner, 2001). Esta sensibilidade para dessecação tem implicações importantes no armazenamento de sementes. Sementes ortodoxas podem ser desidratadas sem danos para baixos graus de umidade e, sob uma extensa gama de ambientes, sendo que a longevidade no armazenamento aumenta com a diminuição do grau de umidade e da temperatura de modo controlado (Hong e Ellis, 2003).

O armazenamento de sementes recalcitrantes sob condições de elevada umidade e temperatura gera condições favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos. A incidência de microrganismos em sementes recalcitrantes com grau de umidade acima de 10% a 13% pode comprometer a viabilidade (Harrington, 1972). Diversos fungos, principalmente do gênero *Fusarium* (Boyce, 1989), têm sido encontrados em associação com sementes recalcitrantes armazenadas. A ação prejudicial desses microrganismos pode requerer o tratamento com fungicidas (Fu et al., 1990).

Tratamentos fúngicos aplicados em sementes de *Eugenia calycina*, uma espécie considerada altamente recalcitrante, reduziu a incidência de fungos saprofíticos, não afetando a germinação final das sementes. Por outro lado, o excesso de determinados fungicidas pode reduzir a velocidade de germinação (Joachim et al., 1994).

Uma aplicação prática para evitar a proliferação de fungos em condições de armazenamento tem sido usar ambientes com temperaturas em torno de 0°C a 5°C; contudo, particularmente em espécies de origem tropical, a sensibilidade a baixas temperaturas dificulta a prática do uso de temperaturas inferiores a 10°C (King & Roberts, 1979).

Diversos trabalhos relatam o papel de fungos na deterioração de sementes recalcitrantes durante o armazenamento, porém, não existe nenhum trabalho publicado sobre estratégias de defesa de sementes contra ataque de fungos, como os mecanismos que são descritos e bem conhecidos em plantas (Calistru et al., 2000; Sutherland et al., 2002). A possível resposta quanto à vulnerabilidade de sementes recalcitrantes a fungos poderia ser a inabilidade pela resposta de hipersensibilidade, sugerindo a ausência de genes de resistência que poderiam interagir com os genes de avirulência dos patógenos (Merhar et al., 2003).

2.2.1 Papel de moléculas protetoras na tolerância à dessecação

2.2.1.1 Oligossacarídeos (carboidratos solúveis)

Diversas evidências suportam a idéia de açúcares solúveis, agindo como “substitutos de água”, podem desempenhar um papel chave na tolerância à dessecação e, conseqüentemente, na conservação de sementes. Este fato se deve à proteção das membranas, na fase de transição de lipídeos induzida pela dessecação, além de proteger as proteínas, e ou por formar vidro sob temperaturas fisiológicas. Todavia, diversos autores relatam uma alta concentração de sacarose e oligossacarídeos durante o desenvolvimento de sementes recalcitrantes (Farrant, Pammenter e Berjak, 1993), sugerindo que a capacidade de tolerar desidratação não é somente devido à presença desses carboidratos. Entretanto, os efeitos protetores dos açúcares, in vivo, são, provavelmente, mais complexos que os observados nestes modelos de sistemas (Leprince, Hendry e McKersie, 1993).

A acumulação de açúcares não redutores, particularmente da série refinósica, deduz a presença de tolerância, podendo ser de dois modos. O primeiro é que, quando ocorre a desidratação, açúcares específicos substituem a água associada com a superfície da membrana, mantendo o espaçamento correto dos grupos de lipídios, prevenindo assim as transições da fase cristalina para a fase gel. No segundo modo, foi sugerido que a trealose poderia ser o mais efetivo dos açúcares que poderia substituir a água dessa maneira. Isto parece que não ocorre em sementes de angiospermas, nas quais a sacarose se apresenta como o mais abundante dos oligossacarídeos (Pammenter e Berjak, 1999). O segundo modo refere-se à vitrificação da fase aquosa referindo a um estado vítreo. Quando ocorre perda de água, a sacarose e certos oligossacarídeos formam uma alta viscosidade, impondo efeitos na atividade intracelular, reduzindo efeitos danosos do metabolismo desordenado e, talvez, protegendo as

macromoléculas de desnaturação ou minimizando o efeito de transições da fase gel das membranas fosfolipídicas.

Leopold et al., (1994) sugeriram que o papel da vitrificação não é tanto o de conferir tolerância à dessecação, mas para manter a viabilidade das sementes por um período prolongado no estado seco. Porém, a habilidade para a formação de vitrificação não pode ser declarada como tolerância à dessecação, pois foi mostrado que ocorre também em algumas sementes sensíveis à dessecação. Walters et al. (1997) sugeriram outro papel para os açúcares, associando-os com LEAs de forma a controlar a perda de água.

Hoekstra et al. (1997) afirmaram que enquanto açúcares são primordiais na formação do estado vítreo, eles podem não ser particularmente efetivos em termos de interação com os grupos cabeça das moléculas de lipídios, propondo que a estabilização mais efetiva seria alcançada pela migração de moléculas anfipáticas.

2.2.1.2 Proteínas termorresistentes

Durante a dessecação de sementes em desenvolvimento, pode ocorrer a acumulação de um grupo particular de mRNAs e proteínas relacionadas, denominadas "Late Embryogenesis Abundant". LEA mRNAs, que aparecem em tecidos embrionários no início da dessecação e tornam-se as mais prevalentes espécies de mRNA, no estado seco, declinando progressivamente várias horas após a embebição da semente (Baker, Steele e Durs, 1988). A regulação dos genes LEA parece ser principalmente transcricional, em que o ABA desempenha um importante papel (Baker, Steele e Durs, 1988; Williamson e Quatrano, 1998; Robertson e Chandler, 1992), embora, em alguns casos, a regulação pós-transcricional seja relatada (Williamson e Quatrano, 1998).

A síntese de LEAs parece estar associada a elevados níveis de ABA que ocorrem durante o desenvolvimento das sementes (Kermode, 1990). Porém, a expressão de um segundo grupo de genes de LEAs foi registrada acontecendo

com o início da maturação e secagem, quando os níveis de ABA são relativamente baixos (Oliver e Bewley, 1997). Isso demonstra que a regulação da expressão de genes LEA envolve componentes de rotas de transdução diferentes das responsáveis pelo ABA (Kermode, 1997).

A síntese de LEAs pode ser regulada por diferentes mecanismos em diferentes tipos de sementes. Oliver e Bewley (1997) sugerem que uma evidência equivocada é a de que o ABA tenha papel direto na indução e manutenção da tolerância à dessecação. A visão que existe a respeito dessas proteínas deve-se à sua natureza anfipática, com capacidade de inibir a desnaturação de várias macromoléculas. As LEAs possuem propriedades de estabilizar estruturas intracelulares sob condições de estresse, incluídos os estresses causados por perda severa de água, devido à sua propriedade de ligação com íons e água (Close, 1997). Um outro papel adicional que é realizado pelas proteínas LEAs é a capacidade de associação com açúcares, em que ambos operam em proteção quando ocorre perda de água na fase de maturação e secagem (Walters et al., 1997).

Em um estudo comparativo de duas espécies tropicais recalcitrantes, Han et al. (1997) observaram que não havia a presença de proteínas LEAs em uma das espécies, mas ocorria a acumulação durante o desenvolvimento da outra. Tratamentos que normalmente induzem à produção destas proteínas (aplicação de ABA ou resfriamento) não tiveram nenhum efeito na espécie que não apresentou LEA. Dessa forma, fica claro que a habilidade ou a falta de expressão de proteínas LEAs não podem ser levadas como indicações de que sementes de uma espécie podem resistir à desidratação, (Blackman et al., 1991). Isso indica que a tolerância à dessecação em sementes não pode ser resultado apenas da presença de LEAs e, sim, provavelmente, por meio de muitos mecanismos ou processos de expressão variável.

Um dos mecanismos mais estudados na adaptação dos organismos à condição de estresse é a indução de proteínas resistentes ao calor, *heat shock proteins* (HSP), que inclui várias famílias de proteínas conservadas. Segundo Vertucci & Farrant (1995), a função das HSP tem sido relacionada com a preservação e o reparo das estruturas macromoleculares durante a desidratação ou reidratação, respectivamente. Embora todos os organismos sintetizem HSP em resposta ao calor, o balanço de proteínas sintetizadas e a relativa importância das famílias individuais de HSP na tolerância ao estresse variam enormemente entre organismos (Queitsch et al., 2000). As principais classes das HSP, citadas por Hong & Vierling (2000), estão presentes em plantas e incluem proteínas de peso molecular que variam de 15 a 28 kDa; Hsp60; Hsp70; Hsp90 e Hsp100.

2.3 Estudos ultra-estruturais

Estudos de ultra-estrutura conduzidos durante os últimos anos vêm contribuindo para compreensão a respeito das diferentes respostas à desidratação e armazenamento apresentadas por sementes altamente recalcitrantes, como as de *Avicennia marina* e por sementes ortodoxas, como as de *Phaseolus vulgaris*. Membranas das organelas celulares, o citoesqueleto e o nucleoesqueleto são essenciais para o perfeito funcionamento da célula e danos a essas estruturas durante a desidratação podem levar à perda de viabilidade. O estado do metabolismo ou fisiologia celular reflete na diferenciação da mitocôndria e em sinais visíveis na síntese de membranas e proteínas fornecidas pelo complexo de Golgi e o retículo endoplasmático. Esses marcadores ultra-estruturais mostram os danos celulares causados pela secagem excessiva imposta em sementes recalcitrantes e mostram também que as sementes recalcitrantes passam pelos estádios iniciais de germinação quando armazenadas com grau de umidade relativamente alto (Berjak e Pammenter, 2000).

2.4 Germinação, anatomia e morfologia de plântulas

Estudos relacionados à propagação de plantas envolvem conhecimentos relacionados às estruturas das sementes, bem como mudanças que ocorrem desde o momento da embebição, passando pela protrusão da radícula até a formação da plântula.

Segundo Camargo et al. (2000), o conhecimento das estruturas morfológicas das sementes pode contribuir para um melhor entendimento do processo de germinação.

Crestana e Beltrati, citados por Camargo et al. (2000), comentam em seus trabalhos que estudos anatômicos e morfológicos da germinação em espécies florestais são fundamentais e de caráter urgente, em função da drástica e elevada redução de populações naturais decorrentes de alterações ambientais causadas pelo desmatamento continuado.

Segundo Lorenzi (2000), a espécie *Cupania vernalis* Camb. apresenta germinação lenta e muito baixa e suas sementes devem ser semeadas logo após a colheita, pois sua viabilidade é curta. Em função dessa curta longevidade, Lima Júnior (2004) ressalta que esse fator constitui-se num entrave no processo de propagação e, conseqüentemente, na produção de mudas dessa espécie.

Algumas sementes, quando atingem a maturação, podem expressar dormência primária causada por embrião imaturo, presença de inibidores, tegumento impermeável à água e gases, conferindo resistência física à protrusão da radícula (Tigabu & Oden, 2001).

Lima Júnior (2004), trabalhando com a espécie *Cupania vernalis*, não verificou nenhum impedimento para a absorção de água em suas sementes. Entretanto, verificou-se, ao longo do período de observação, um retardamento na absorção de água em sementes intactas em relação às sementes destituídas de tegumento. Nesse mesmo estudo, fazendo uma comparação da porcentagem final de germinação e IVG entre sementes intactas e sem tegumento, foi possível

verificar que a presença do tegumento contribuiu efetivamente para a redução da germinação das sementes da citada espécie, pelo fato de atuar no retardamento da absorção de água e, muito provavelmente, na resistência física ao crescimento do embrião. A presença de uma densa e espessa camada de esclerênquima na testa da semente atua como uma barreira à retomada do crescimento do eixo embrionário.

Por meio do conhecimento da estrutura da semente, podem-se obter indicações sobre a germinação, armazenamento, viabilidade e métodos de semeadura (Kuniyoshi, 1983), enquanto os estudos morfológicos tendem a auxiliar na identificação botânica da espécie, interpretando os testes de laboratório e o reconhecimento da espécie em bancos de sementes do solo e em fase de plântulas em formações florestais. Estas análises contribuem para os estudos dos mecanismos de dispersão, sucessão e regeneração natural das espécies (Melo et al., 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações gerais

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas, Setor de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, MG. Os frutos de *Cupania vernalis* Camb. foram coletados na época de dispersão (setembro de 2004), em árvores localizadas em Macaia, município de Bom Sucesso, MG, próximo à Hidrelétrica do Funil.

3.2 Ponto crítico de secagem das sementes

Após a deiscência dos frutos sobre bancadas em condições de laboratório, determinou-se a umidade inicial das sementes por meio do método

de estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$, por 24 horas (Brasil, 1992), utilizando-se três repetições de 10 sementes. Os resultados, expressos em porcentagem, foram calculados com base no peso úmido. Em seguida, procedeu-se o abaixamento do grau de umidade de 46% até 10% em estufa de ventilação regulada para 35°C constante. Foram realizados testes de germinação, quando as sementes submetidas à secagem atingiram as respectivas umidades: 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% e 10%. Os teores de água das sementes verificados após a determinação inicial foram avaliados por pesos, por meio da equação descrita por Cromarty et al. (1985):

$P_f = p_i (100 - U_i) \times (100 - U_f)^{-1}$, em que:

P_f = peso da amostra (g) após a secagem;

P_i = peso da amostra (g) antes da secagem;

U_i = grau de umidade (%) antes da secagem;

U_f = grau de umidade (%) desejado após a secagem.

Para cada teste de germinação foi utilizada uma amostra de 100 sementes, constituída de 4 repetições de 25 sementes. As sementes foram acondicionadas em caixas tipo gerbox com vermiculita. A germinação foi conduzida a uma temperatura de 30°C em câmaras de germinação modelo BOD 347 Fanem ou Eletrolab (Lima Júnior, 2004). As avaliações de germinação foram realizadas diariamente, utilizando-se, como parâmetro de germinação, a protrusão da radícula e a emissão do hipocótilo a $\pm 5\text{mm}$. A velocidade de emergência das plântulas foi realizada no mesmo experimento de germinação, sendo considerada como emersas as plântulas que apresentavam, no mínimo, 3mm de parte aérea. Para o cálculo do índice de velocidade de emergência (IVE) foi empregada a equação proposta por Maguire (1962).

3.3 Armazenamento das sementes

Inicialmente, foi retirada uma amostra para a verificação do grau de umidade inicial do lote. Após essa determinação, as sementes foram submetidas à secagem, em ambiente controlado com 35°C em estufa de ventilação, visando à obtenção dos tratamentos 40%, 35% e 30%, referentes aos graus de umidade desejados. Durante a secagem, as sementes foram colocadas em sacos de papel perfurados sobre prateleiras de metal perfuradas.

Os tratamentos foram obtidos por meio do acompanhamento de perda de peso das sementes durante a secagem. Para isso, amostras de sementes, com pesos iniciais previamente conhecidos, foram acondicionadas em sacos de papel e distribuídos nas prateleiras da estufa para posterior pesagem em intervalos regulares. Os pesos finais das amostras, correspondentes a cada um dos graus de umidade desejados, foram previamente determinados por meio da equação descrita por Cromarty et al. (1985).

À medida que foram sendo conseguidos os graus de umidade próximos aos desejados, amostras foram retiradas, homogeneizadas e divididas em frações que, por sua vez, foram embaladas em sacos plásticos e mantidas, provisoriamente, em temperatura ambiente de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, durante a obtenção dos demais tratamentos. Posteriormente, as amostras, correspondentes aos diferentes graus de umidade, foram estocadas em ambientes com temperaturas controladas de 10°C , em câmara fria e em estufa a 25°C . As sementes foram submetidas a avaliações no início do armazenamento (caracterização em graus de umidade, perfazendo os tratamentos adicionais) e aos 120 e 240 dias. Para a identificação qualitativa da presença de microrganismos durante o armazenamento, as sementes foram submetidas a técnicas de microscopia eletrônica de varredura e posterior análise no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

3.4 Análise ultra-estrutural da semente durante a secagem e armazenamento

Análise ultra-estrutural da semente durante a secagem e armazenamento foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural (LME) do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. Fragmentos de 3mm foram retirados de cinco sementes de cada tratamento (graus de umidade e períodos de armazenamento), localizadas na região do eixo embrionário e, em seguida, foram fixados numa solução composta de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%) em tampão cacodilato, pH 7,0 0,05M + CaCl₂ 0,001M por um tempo superior a uma hora, em temperatura controlada por geladeira. Posteriormente, esses fragmentos foram lavados em tampão cacodilato 0,05M (três vezes de 10 minutos) e imersos em glicerol 30% por um tempo de 30 minutos. Com o auxílio de uma chapa de aço inoxidável e bisturi, procedeu-se ao descarte de pontas do material e seccionamento das regiões de interesse. Esses foram lavados em água destilada e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05 M, por 1-2 horas, para posterior desidratação em gradiente de acetona (30, 50, 70, 90 por 10 minutos e três vezes por 10 minutos em 100%). Em seguida, as amostras foram secadas ao ponto crítico, montadas nos stubs para sofrerem o procedimento de metalização em ouro e observação em microscópio eletrônico de varredura da marca LEO Evo 40 com aplicação do software LEOQUIF (Leo User Interface). Para o procedimento de montagem das pranchas e melhoria das imagens, foi utilizado o software Photoshop 7.0, com auxílio do CorelDRAW 8.

3.5 Determinação de açúcares solúveis totais

Sementes de *Cupania vernalis* Camb. foram separadas em amostras durante o período de armazenamento e, posteriormente, congeladas em freezer a

uma temperatura de -20°C. As avaliações foram efetuadas nos tempos zero (testemunha), quatro e oito meses. Para a testemunha, foi considerada apenas a semente nas umidades de 40%; 35% e 30%. Já nos intervalos de quatro e oito meses além das umidades, foram considerados também os ambientes de armazenamento, câmara fria a 10°C e estufa regulada para 25°C.

Os açúcares solúveis totais foram extraídos pela homogeneização (maceração) de 100mg de massa fresca da região do eixo embrionário em 3mL de água, seguida de centrifugação a 10.000g por 15 minutos a 4°C e coleta do sobrenadante. O processo foi realizado por duas vezes e os sobrenadantes combinados.

A partir de alíquotas do sobrenadante, foram quantificados açúcares solúveis totais pelo método da Antrona (Yemm & Willis, 1954).

3.7 Extração e quantificação de proteínas termorresistentes

Foram utilizadas amostras de 10 sementes de *Cupania vernalis* para cada tratamento referente aos graus de umidade de, 45%, 40%, 35% e 30%, maceradas em nitrogênio líquido. O pó obtido foi armazenado em “deep freezer” a -85°C.

A extração da fração protéica foi realizada, adicionando-se, em 100mg de tecido embrionário, 1,0 mL do tampão de extração (50mM tris-HCl-7,5; 500 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM PMSF), centrifugados por 30 minutos a 4°C, seguido de incubação a 80°C, por 15 minutos. Em seguida, os tratamentos foram liofilizados e ressuspensos em 200µl do tampão de extração.

O extrato obtido foi submetido à quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976). Antes da aplicação no gel, os tubos de amostras contendo extrato mais 10µl de solução tampão da amostra (5mL de glicerol; 2,5mL de solução tampão do gel concentrado; 2,5mg de azul bromofenol e completado o volume para 25mL de água deionizada), foram colocados em

banho-maria com água em ebulição por 3 minutos. Foram aplicados 5µg de proteína total de cada tratamento em géis de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 4% (gel concentrador). O padrão aplicado foi BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen). A corrida eletroforética foi realizada a 150V, por cerca de 3 horas. Após a migração eletroforética, os géis foram corados em Coomassie Blue a 0,05%, conforme Alfnas et al. (1991), durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10%.

3.8 Caracterização anatômica e morfológica

Para a execução desse experimento, plântulas foram obtidas por meio da germinação conduzida a uma temperatura de 30°C em câmara de germinação modelo BOD (Lima Júnior, 2004). Foram consideradas germinadas sementes que apresentaram 5mm de parte aérea e radícula com \pm 5mm de comprimento. A partir desse ponto, foram considerados os seguintes estádios de desenvolvimento: 1° (logo após a protrusão \pm 5 dias); 2° (10 dias após a protrusão); 3° (30 dias) e 4° (estádio referente à 60 dias após a protrusão). Depois de completados esses estádios de desenvolvimento, as plântulas foram fixadas em álcool 70% e submetidas à avaliações anatômicas por meio de seções transversais distanciadas a \pm 2mm do ponto de inserção dos cotilédones, obtidas em cortes à mão livre com auxílio de lâmina de barbear e posterior coloração com safranina e azul de astra, na proporção de 5% de safranina com 95% de azul de astra. Os cotilédones provenientes de material fresco foram submetidos a cortes transversais, para determinar o tipo de reserva, utilizando-se os seguintes reagentes, Lugol, para detectar a presença de amido e Sudam III, para detectar lipídios (Kraus & Arduim, 1997). Para o estudo histoquímico do tegumento foram empregados safranina e floroglucinol, em material fresco. Para todos estudos, seguiu-se montagem de lâminas provisórias e semipermanentes,

segundo técnicas descritas por Johansen (1940). As observações foram realizadas em microscópio Olympus CBB.

O diâmetro do cilindro vascular e córtex foi avaliado por meio de seções transversais de lâminas semipermanentes em 5 sementes pós-germinadas, sendo as medições realizadas com uso do microscópio KEN-A-VISION 2100 equipado com uma ocular micrométrica. As medidas foram realizadas em três campos por radícula e ou hipocótilo, perfazendo-se um total de 30 medições para cada região avaliada, em cada estágio de desenvolvimento.

Para o estudo da morfologia das plântulas, foi feita uma repicagem das plântulas logo depois de ocorrida a germinação para bandejas plásticas de 80 x 40 x 20cm sobre bancadas em sala de crescimento, tendo vermiculita como substrato. Foram retiradas plântulas em diversos estádios de desenvolvimento, que foram fixadas em álcool 70% e, posteriormente, fotocopiadas em scanner para estudo da morfologia.

3.9 Análise estatística

O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial $3 \times 2 \times 2$ (três graus de umidade, 40%, 35% e 30%, com duas condições de armazenamento, 10°C e 25 °C, dois períodos de armazenamento, 120 e 240 dias), mais três tratamentos adicionais, constituindo a testemunha na época de avaliação (0), perfazendo, 40%, 35%, e 30% de umidade, com quatro repetições. Na análise estatística, os dados foram transformados em arco seno raiz quadrada de $x/100$. Na comparação das médias, foi utilizado o software SISVAR, aplicando-se regressão e teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Aspectos da germinação e ultra-estruturais em sementes de *Cupania vernalis* camb. submetidas a testes de tolerância à dessecação

As sementes de *Cupania vernalis* apresentaram grau de umidade inicial de 46%, com conseqüentes respostas à perda de água durante a dessecação, caracterizando alguns pontos distintos de forma significativa entre os tratamentos, os quais podem ser observados na Figura 1. A redução no grau de umidade de 45% até 30% não afetou o desempenho fisiológico das sementes de forma significativa, porém, abaixo de 30% de umidade, danos à dessecação reduziram o percentual final de germinação. Quando o grau de umidade foi reduzido abaixo de 11,5%, não houve mais germinação. Lima Júnior (2004) observou para esta espécie que 30% é o grau de umidade no qual é possível verificar uma redução acentuada no percentual de germinação, afetando negativamente a germinação dessas sementes e caracterizando o grau de umidade crítico. Porém, as avaliações observadas na Figura 3B revelaram danos de secagem a um grau de umidade de 35%, quando ainda não se observava redução na germinação. Resultados semelhantes foram observados por Lima Júnior (2004).

Os danos causados pela secagem das sementes podem ser observados na Figura 3B, evidenciados pela desorganização do vacúolo, que se apresenta de forma dilacerada. Paralelamente, observou-se que as sementes não toleram a dessecação a valores iguais ou inferiores a 11,5% de água, embora os danos observados para esses níveis já sejam irreparáveis, em função da forte evidência de dilaceração de membrana e parede celular (figura 3D).

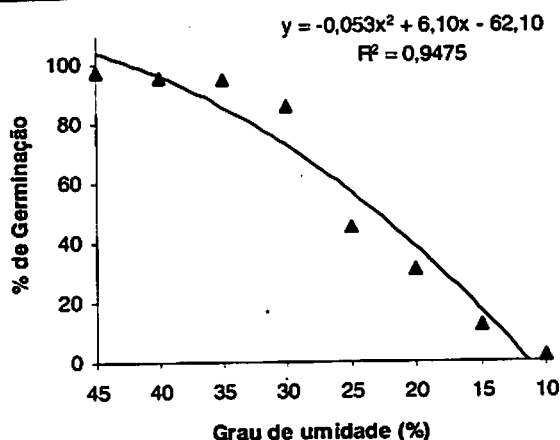


FIGURA 1. Efeito da secagem no percentual de germinação de sementes de *Cupania vernalis* submetidas ao teste de tolerância à dessecação. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Lima Júnior (2004), trabalhando com sementes de *Cupania vernalis*, verificou que as sementes, quando desidratadas em estufa sem circulação de ar, atingiram menores médias de umidade quando comparadas às sementes secas em condições de temperatura ambiente, durante todo período de secagem, perdendo a viabilidade aos 33 dias de secagem e atingindo um grau de umidade de 18%. Isso mostra que a taxa de secagem afeta a porcentagem de germinação, sendo mais favorável a secagem rápida.

Resultados semelhantes foram encontrados quando utilizada o uso de estufa regulada para 35°C com circulação de ar (Figura 2). Provavelmente, a perda de umidade de forma lenta pela semente se deve à estrutura do tegumento que possui uma camada de células em forma de paliçada com características hidrofóbicas (Figura 10).

Estudando o efeito da secagem controlada em sementes de *Eugenia involucrata*, de 57% até 13% umidade, Maluf et al. (2003) concluíram que a

velocidade de secagem não altera a sensibilidade dos diásporos (semente mais endocarpo) à dessecação. Porém, a redução do grau de umidade para níveis inferiores a 51% prejudica a capacidade germinativa e o potencial de armazenamento.

Resultados divulgados pela FAO (1993) revelaram que descobertas relacionadas ao grau crítico de umidade são prioridade nas pesquisas sobre conservação de sementes. Ele pode ser obtido através da elaboração de curvas de desidratação confrontadas com curvas de viabilidade, objetivando determinar o grau de umidade ideal para a manutenção de viabilidade das sementes durante o armazenamento.

Sementes de *Cupania vernalis* apresentam grau crítico de umidade próximo de 30%, permitindo, nessa faixa, uma melhor utilização para posterior conservação em armazenamento (Figura 2). Carvalho (2000) classificou essa espécie como recalcitrante, mediante o uso de um protocolo associando taxa de secagem com baixas temperaturas de armazenamento, sendo a dessecação feita em sala climatizada a 20°C com 60% de umidade relativa e posterior armazenamento por 5°C e (-)18 °C, durante 90 dias.

A redução da germinação das sementes secadas a 20% provavelmente ocorreu em função dos danos ao sistema de membranas das células e ou ao citoesqueleto do eixo embrionário por ocasião da secagem, de forma que as paredes das células apresentam algumas irregularidades com o conteúdo celular compacto (Figura 3C).

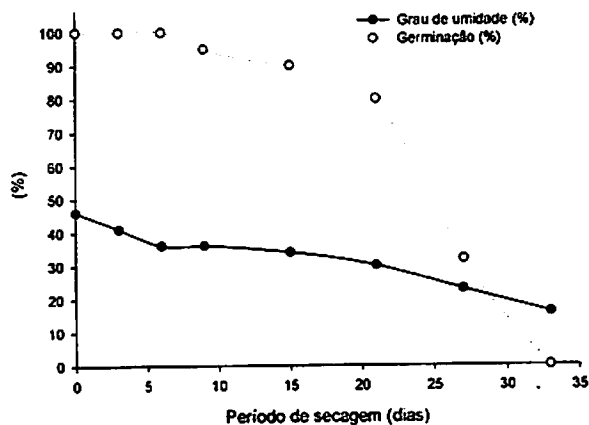


FIGURA 2. Relação entre porcentagem de germinação e grau de umidade com o período de secagem das sementes. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Por meio das organizações celulares do eixo embrionário, é possível verificar a viabilidade da semente, pois consiste de pontos iniciais para a translocação de sinalizadores ou mensageiros químicos para o endosperma e ou cotilédones para que ocorram a degradação e a mobilização de suas reservas que, no final, irá culminar com a protrusão radicular. Comparando-se os resultados da Figura 3 com os dados do gráfico da Figura 1, quando o grau de umidade foi reduzido para níveis de 25% de umidade, observa-se que houve uma redução no percentual de germinação de aproximadamente 55%. Esse decréscimo no percentual é devido à natureza de recalcitrância da espécie, não tolerando a perda de água. Para sementes de espécies recalcitrantes, o mais comum é o surgimento da ruptura de membranas e coalescência de corpos protéicos (Brandão Júnior, 2002). Nas Figuras 3C e 3D, observa-se uma desorganização celular característica de perda da integridade de membranas.

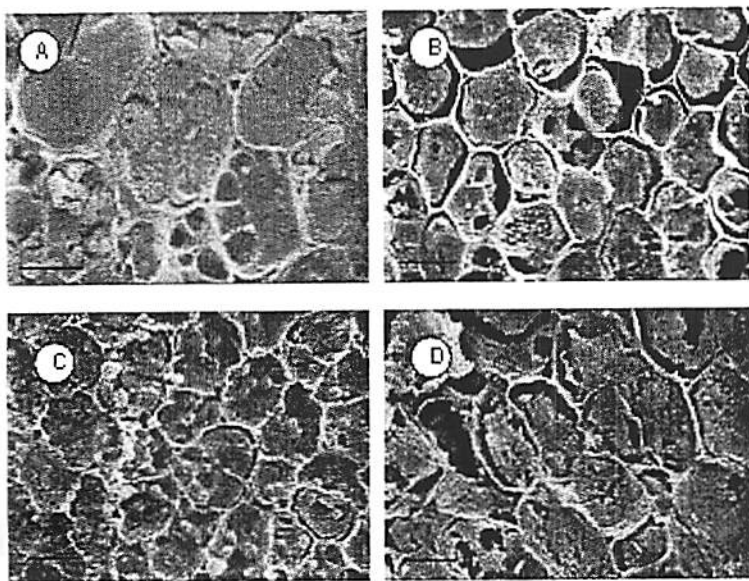


FIGURA 3. Fotomicrografias obtidas com aplicação de microscopia eletrônica de varredura. LEO Evo 40, software LEOQUIF (Leo User Interface). A representa 45%, B 35%, C 25% e D 15% de umidade na semente. LME do Departamento de Fitopatologia, julho, 2005. Barra: 10 μ m. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Nas Figuras 3B e 3D estão representadas estruturas contrastantes. Na semente com 35% de umidade é possível observar a presença do núcleo e vacúolo com início de aparente desorganização. Na Figura 3D, com 15% de umidade, observa-se o início da formação de cristais nos espaços intercelulares e um desarranjo de toda a estrutura do eixo embrionário. Essas observações são condizentes com a literatura, conforme resultados encontrados por Brandão Júnior (2000) em sementes de *Coffea arábica* e *Coffea canephora* submetidas a testes de tolerância à dessecação.

Esses resultados demonstram que a espécie *Cupania vernalis* apresenta danos com a secagem e que demonstra comportamento recalcitrante,

apresentando respostas condizentes com as encontradas na literatura. Contudo, ainda necessita de uma investigação mais detalhada para a identificação de estruturas resultantes de estresses causados em função da perda de água do tecido embrionário.

4.2 Germinação e aspectos ultra-estruturais de sementes de *Cupania vernalis* Camb. submetidas ao armazenamento

O grau de umidade das sementes permaneceu sem alterações significativas durante todo o período de armazenamento. Esses resultados refletem na eficiência da embalagem de saco plástico na manutenção do grau de umidade, independente do ambiente de armazenamento (Tabela 1).

Lima Júnior (2004), trabalhando com o armazenamento de *Cupania vernalis* em câmara fria e embaladas em sacos plástico, constatou, ao final de 120 dias de armazenamento, uma redução do grau de umidade de 46% para 40%.

TABELA 1. Grau de umidade (%) de sementes de *Cupania vernalis* Camb., durante o armazenamento. UFLA, Lavras, MG, 2005.

| Temperatura | Período de armazenamento (dias) | | |
|-------------|---------------------------------|-----|-----|
| | 0 | 120 | 240 |
| 25°C | 40 | 40 | 35 |
| | 35 | 34 | 30 |
| | 30 | 30 | 28 |
| 10°C | 40 | 40 | 40 |
| | 35 | 35 | 32 |
| | 30 | 30 | 30 |

Durante todo período de armazenamento, maior porcentagem de germinação foi obtida com as sementes de *Cupania vernalis* armazenadas em

câmara fria a 10°C (Tabela 2, Figura 4). Os dados da Tabela 2 revelam que a umidade de 40%, pré-definida para o armazenamento associado à baixa temperatura, apresenta uma maior porcentagem de germinação, comparando os níveis de umidade para cada ambiente de armazenamento, sendo essa a melhor umidade indicada para o armazenamento.

Ferreira e Gentil (2003), estudando graus umidade relacionados com ambiente de armazenamento em sementes de camu-camu, definiram que o ideal é o armazenamento com grau de umidade elevado (próximo a 46%) e, preferencialmente, sob temperatura de 20 °C, para manter a viabilidade e o vigor pelo período de 150 dias. O mesmo comportamento é observado para sementes de *Cupania vernalis*, no período compreendido entre 120 e 240 dias, com as sementes a 40% de umidade, porém, com a temperatura de armazenamento de 10°C.

O armazenamento de sementes sob baixas temperaturas é benéfico para várias espécies; algumas vezes é essencial, porém, pode ser prejudicial a outras (Roberts, 1973; Andrade et al., 1997).

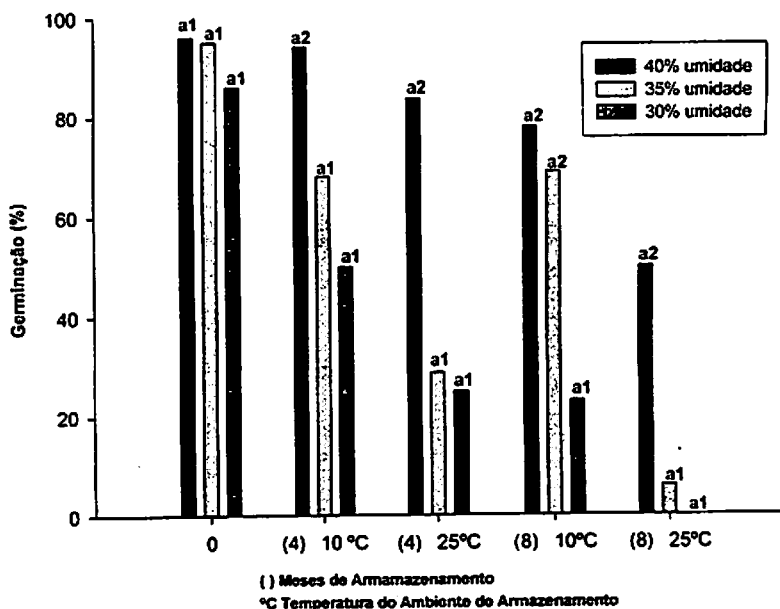


FIGURA 4. Valores médios de porcentagem de germinação de sementes de *Cupania vernalis* dentro de cada época de avaliação durante 4 meses (120 dias) e 8 meses (240 dias) de armazenamento a 10°C e 25°C. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Para as sementes armazenadas a 25°C houve uma queda acentuada na germinação. Essa queda ocorreu em função da temperatura de armazenamento ser próxima à temperatura ótima de germinação para essa espécie, ocasionando a germinação dentro da embalagem (Figura 5). Lima Júnior (2004) obteve melhores resultados de germinação em temperaturas entre 25°C e 35°C.

Em geral, o armazenamento de sementes com graus de umidade mais elevados é favorecido pela adoção de temperaturas inferiores à do ambiente de produção (Barbedo, 1997). A elevação da temperatura, nesses casos, pode acelerar a deterioração (Harrington, 1972; Roberts, 1972).

TABELA 2. Comparação de médias de germinação dos níveis de umidade dentro dos níveis do fator temperatura durante o armazenamento. Letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, dentro de cada fator, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. UFLA, Lavras, MG, 2005.

| Temperatura | Umidade | | |
|-------------|---------|-------|-------|
| | 30% | 35% | 40% |
| 10°C | 36 aA | 68 bA | 86 bA |
| 25°C | 14 aB | 15 aB | 50 bB |

Comparando-se os tratamentos adicionais em formas de contrastes com o esquema fatorial, observa-se que existem diferenças significativas para os três adicionais e, comparando-se os tratamentos adicionais com as melhores médias observadas durante o armazenamento, encontrou-se que, os tratamentos correspondentes aos graus de umidade de 40% armazenados por 120 dias a 10°C e 25°C não apresentaram diferenças significativas em comparação com os adicionais. Já para a condição de 40% de umidade aos 240 dias de armazenamento a 10°C, foram observadas diferenças significativas, sendo sua média inferior ao tratamento adicional correspondente ao grau de umidade de 40%.

A redução do grau de umidade de 40% para 30% afetou negativamente a viabilidade e o vigor das sementes armazenadas, causando uma redução da velocidade de emergência das plântulas (Tabela 3). Os resultados demonstraram diferenças significativas quanto aos fatores épocas de avaliação e temperaturas de armazenamento. Para o fator época, o melhor IVE foi observado aos 120 dias de armazenamento e a melhor temperatura foi de 10°C. O IVE mede a qualidade de um lote de sementes, de forma que, quanto maior seu valor, pode-se

considerar melhor vigor para as sementes. Resultados semelhantes foram encontrados por Maluf et al. (2003), trabalhando com a espécie *Eugenia involucrata*, segundo os quais, a redução do grau de umidade a níveis de 53% permitiu a conservação dos diásporos por até 180 dias, sob condições de câmara fria e em embalagens plásticas.

TABELA 3. IVE em sementes de *Cupania vernalis* Camb. variando o grau de umidade durante o armazenamento. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a de 5% de probabilidade. UFLA, Lavras, MG, 2005.

| Grau de umidade (%) | Médias |
|---------------------|--------|
| 40 | 2,04 a |
| 35 | 1,14 b |
| 30 | 0,64 b |

Semelhante à germinação, para o IVE foram observadas diferenças significativas dos contrastes entre os tratamentos adicionais com o esquema fatorial. A condição de armazenamento em que as sementes tinham 40% de umidade a 10°C durante 120 dias foi superior ao tratamento adicional correspondente ao grau de umidade de 30%. Isso se deve, possivelmente, a uma melhor uniformidade do lote das sementes armazenadas. O tratamento adicional com grau de umidade de 35% apresentou um IVE superior ao tratamento em que as sementes foram submetidas a 35% de umidade em 10°C por 240 dias de armazenamento.

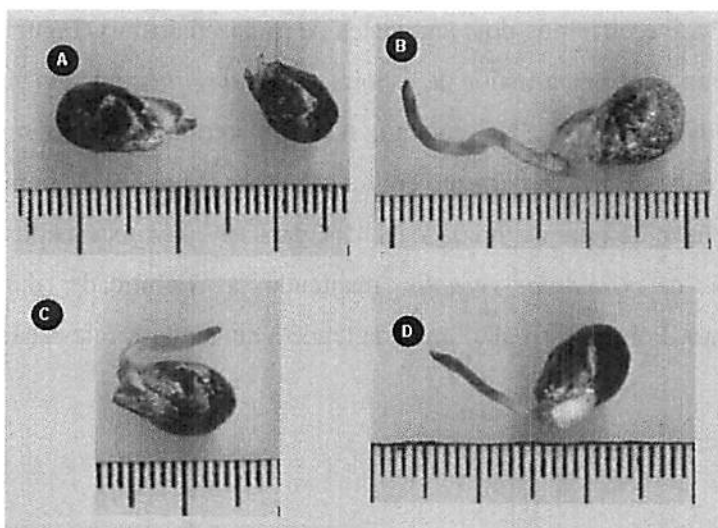


FIGURA 5: Germinação de sementes de *Cupania vernalis* Camb. durante o armazenamento em diferentes temperaturas nas diferentes épocas. **A** e **C**- representam sementes com 30% de umidade ao final de 120 e 240 dias de armazenamento a 10°C e 25°C; **B** e **D**- sementes armazenadas com 40% de umidade ao final de 240 dias de armazenamento, **B**: 25°C e **D**: 10°C. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Outra causa que levou à queda de germinação e conseqüente redução do IVE foi a presença de microrganismos durante o armazenamento. O grau de umidade e a temperatura são definidos como fundamentais no estabelecimento de fungos durante o armazenamento de sementes (Christensen, 1972). *Penicillium sp* e *Aspergillus sp* desenvolvem-se em graus de umidade entre 10% a 20% (Harrington, 1972).

Com o decorrer do período de armazenamento, observou-se um aumento expressivo de ataque desses microrganismos, caracterizando uma das principais causas da deterioração dessas sementes. Após os 120 dias de armazenamento, o ataque de *Alternaria* e *Aspergillus* foi maior para as sementes com graus de

umidade de 35% e 30% nos dois ambientes de armazenamento (Figura 6). Foi observada, uma ocorrência maior de esporos de *Aspergillus* em sementes com grau de umidade de 40%. No entanto, não foi constatado dano severo na porcentagem final de armazenamento em função desse ataque.

A redução do grau de umidade de 45% para 40% favorece a conservação de sementes de *Cupania vernalis* mantendo a viabilidade durante o armazenamento. Porém, essa alta umidade tende a aumentar a infestação desses patógenos.

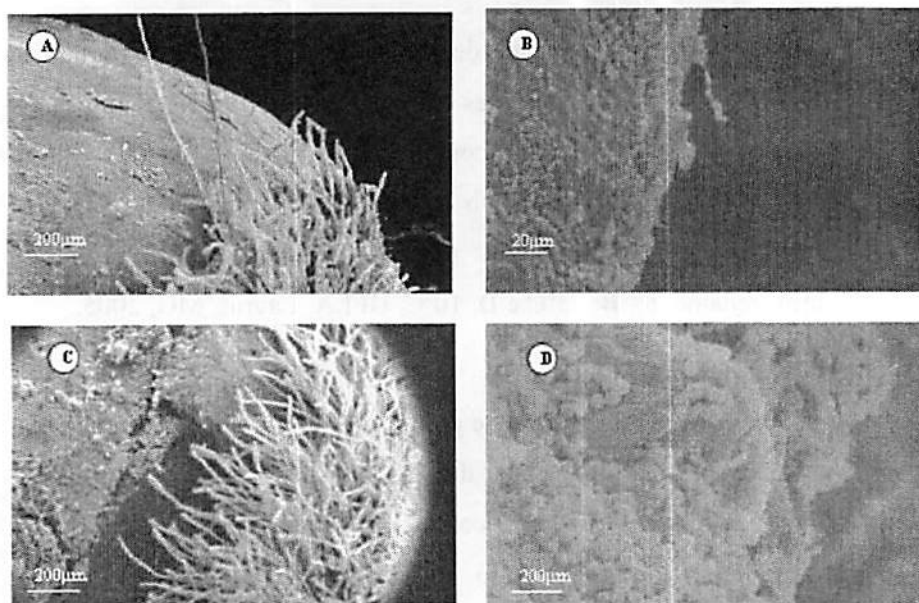


FIGURA 6: Representação do ataque de microrganismos, durante o armazenamento, em sementes de *Cupania vernalis* em ambientes de 10°C e 25°C. (A e C- *Alternaria* sp. B e D- esporos de *Aspergillus* sp.). UFLA, Lavras, MG, 2005.

Os resultados referentes à ultra-estrutura revelaram que, aos 120 dias de armazenamento, houve uma tendência de formação de grandes áreas vacuolares (Figura 7B), sendo essas estruturas identificadas com maior exatidão aos 240 dias de armazenamento (Figura 8, setas). A formação desses vacúolos serve como escape para a manutenção da integridade do conteúdo celular. O que geralmente não é percebido é a importância do vacúolo como centro de retorno intracelular. Em situações de estresse, a vacuolização ou aumento da atividade de vacúolos pré-existentes servem para remover organelas deterioradas ou material redundante que possivelmente esteja no citoplasma (Berjak & Pammenter, 2000).

A remoção de água durante o armazenamento ocasiona a deterioração das membranas celulares em função do estresse. Berjak & Pammenter (2000) deram início a trabalhos com a espécie *Avicennia marina* projetando para averiguar efeitos em situações de variação nas perdas de proporções de água. Os primeiros resultados observados foram de que a remoção de 29% do total original de água presente resultou na deterioração de muitas sementes e, na situação de perda de água de 35% ou mais, houve deterioração por completa (morte letal). A análise ultra-estrutural do primórdio radicular ao conteúdo original de água apresentou células compactas, com pequenos vacúolos. O mesmo comportamento pode ser observado no eixo embrionário das sementes de *Cupania vernalis*, porém, não com perdas significativas no conteúdo de água.

Na ocasião é considerada também a possibilidade de um estresse de desidratação que ativa uma excitação no metabolismo. Esse estresse moderado é confirmado na ativação do metabolismo de eixos embrionários de sementes recalcitrantes e esta excitação parece ser correlacionada com a germinação, fato que ocorreu nas sementes durante o armazenamento. Resultados semelhantes foram confirmados, por meio das indicações ultra-estruturais e bioquímicas, por Berjak & Pammenter (2000).

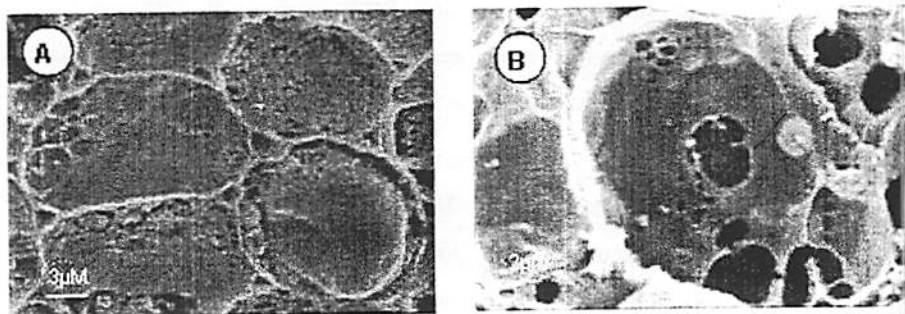


FIGURA 7. Fotomicrografias obtidas com aplicação de microscopia eletrônica de varredura. LEO Evo 40, software LEOQUIF (Leo User Interface) aos 120 dias de armazenamento. Ambas com 40% de umidade, A refere-se a 10°C e B 25°C. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Pelos resultados apresentados relacionados à ultra-estrutura de sementes de *Cupania vernalis*, é possível observar que o metabolismo continua ativo durante situações de armazenamento em condições em que são mantidos os conteúdos de umidade elevados. Com isso, essas sementes ficam crescentemente sensíveis à dessecação, em função de mudanças na germinação. Essas observações são apresentadas pelas fortes evidências de sinais da divisão celular (Figura 8/40% umidade 10°C).

O fato dessas sementes não tolerarem a desidratação as classifica como recalcitrantes, constituindo um dos maiores impasses para o armazenamento das mesmas, pois, na maioria das condições as quais são submetidas acaba ocorrendo a germinação. A conclusão final reflete na impossibilidade de armazenamento dessa categoria de sementes em longo prazo, que não permite perda de água, pois, na condição hidratada, é alcançada a condição fisiológica para divisão celular e conseqüente germinação.

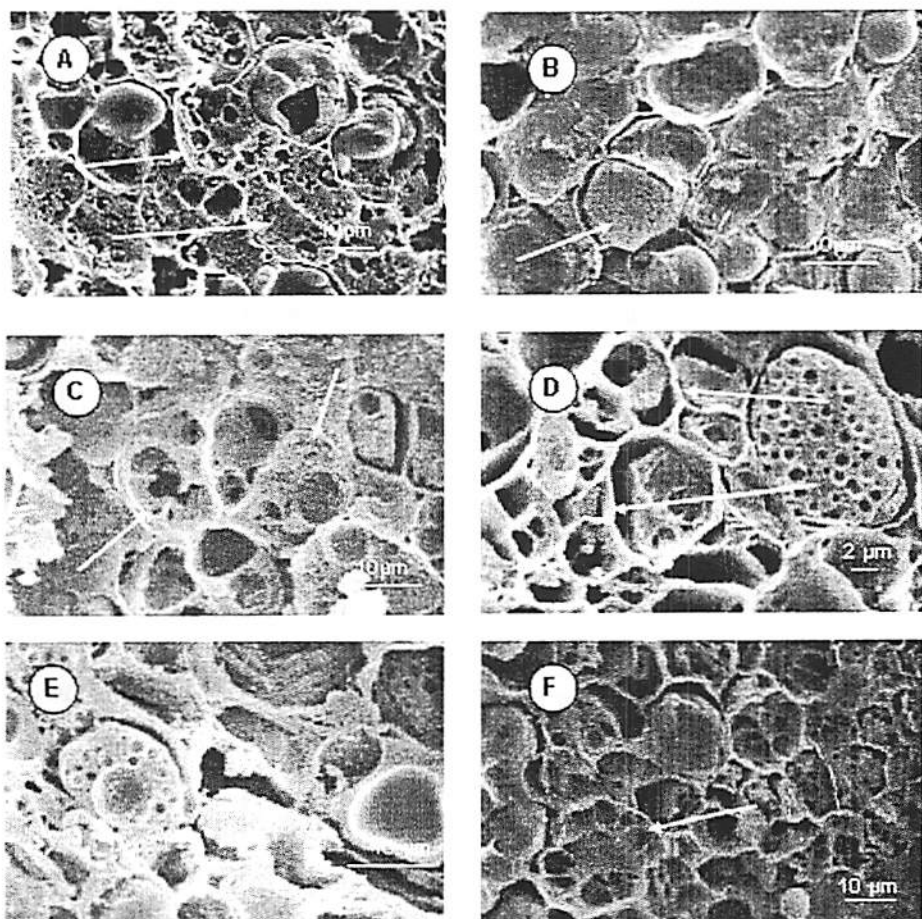


FIGURA 8: Fotomicrografias obtidas com aplicação de microscopia eletrônica de varredura. LEO Evo 40, software LEOQUIF (Leo User Interface) aos 240 dias de armazenamento (Figuras A, C e E, correspondem a 40%, 35%, 30% de umidade armazenadas a 10°C), (Figuras B, D e F, referem-se a 40%, 35% e 30% de umidade armazenadas a 25°C). Setas indicam sinais de divisão celular e formação de vacúolos. UFLA, Lavras, MG, 2005.

de comportamentos semelhantes com relação a diferenças nos teores de açúcares solúveis totais (Pontes et al., 2002).

4.4 Proteínas termorresistentes

As expressões de proteínas termorresistentes em extratos protéicos obtidos de sementes de *Cupania vernalis* submetidas à secagem com redução do grau de umidade de 45% para 30% encontram-se na Figura 9. As proteínas observadas apresentam pesos moleculares entre 10, 25 e 60kDa. Essas observações sugerem que o estresse causado pela redução do grau de umidade pode estar associado à indução de proteínas resistentes ao calor, *heat shock proteins* (HSP).

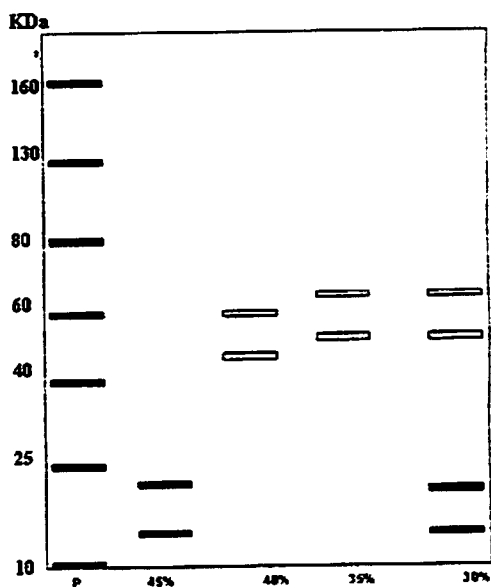


FIGURA 9. Padrão eletroforético de proteínas termotolerantes extraídas de eixos embrionários de sementes de *Cupania vernalis* Camb. durante a dessecação (P, proteína padrão). UFLA, Lavras, MG, 2005.

Para os tratamentos com graus de umidade de 40% e 35% não foi observada a expressão de proteínas com pesos moleculares entre 10 e 25kDa. No entanto, após o choque térmico a 80°C e posterior quantificação pelo método de Bradford (1976), foram observadas quantias expressivas de proteínas semelhantes aos demais tratamentos, que, possivelmente, estão relacionadas ao grupo das HSPs.

Segundo Vertucci & Farrant (1995), as HSP têm sido relatadas como funcionais na preservação e reparo de estruturas macromoleculares durante a desidratação ou reidratação, respectivamente.

Salomão et al. (2002) classificaram as HSP como pertencentes à família do segundo grupo de genes relacionadas à termotolerância. Tanto essas proteínas como as do grupo das LEAs possuem características hidrofílicas, são resistentes à desidratação, estáveis, solúveis a altas temperaturas, não possuindo, no entanto, um estado termodinâmico preferencial. Devido a essas propriedades, tem sido sugerida a função de osmo-protetoras, ou reparadoras de danos causados pela desidratação.

Os resultados observados pelo padrão eletroforético reforçam a possibilidade de que sementes de *Cupania vernalis* possuem quantias expressivas de macromoléculas capazes de garantir a desidratação parcial das sementes, sem contudo, causar danos letais. Porém, a habilidade de expressar ou não HSPs, ou proteínas semelhantes às LEAs e desidrinas, não pode ser tomada como um indicativo de tolerância ou não à desidratação (Blackman et al., 1991).

4.5 Características morfológicas e anatômicas de sementes e plântulas de *Cupania vernalis* Camb.

4.5.1 Características anatômicas da semente

Sementes de *Cupania vernalis* possuem tegumento resistente que confere uma barreira à pronta germinação. Anatomicamente, o tegumento apresenta duas diferentes camadas, evidenciando diferentes grupos celulares: o primeiro, constituído de células estreitas e longas em paliçada, sendo facilmente visível (Figura 10B, seta superior); o segundo grupo é formado por células de formato irregular, com paredes espessas, constituído de vários estratos; já o terceiro grupo de células é caracterizado por uma película (Figura 10B, seta inferior).

Lima Júnior (2004), investigando a incapacidade de sementes de *Cupania vernalis* em absorver água, concluiu que sementes com a presença do tegumento apresentavam uma redução a embebição. Além da baixa capacidade de embebição, o tegumento foi caracterizado como responsável pelo impedimento da protrusão radicular.

Segundo Popinigis (1985), a embebição e as trocas gasosas de sementes com tegumento impermeável à água são impedidas devido à presença de uma camada de células paliçádicas com paredes espessas e recobertas por substâncias hidrófobas. Essas substâncias podem ser observadas nas estruturas do endocarpo de sementes de *Cupania vernalis* (Figura 10A e 10B). Estes resultados foram confirmados por meio de testes histoquímicos com floroglucinol, sudan III e safranina 1%.

O tegumento dessas sementes possui uma cavidade onde é projetado o eixo embrionário (Figura 10A, setas), de forma que, quando ocorre a embebição, pode ocorrer facilidade de ruptura nessa região. Essa estratégia pode ser observada, por meio das características apresentadas pelas células que são

projetadas na região posterior ao eixo, sendo essas de natureza celulósica apresentada pela coloração com azul de astra (Figura 10A). O cotilédone apresenta células volumosas, com seus conteúdos ocupados por uma imensa massa de grânulos de amido (Figura 10C), apresentando ser uma espécie amilácea. Foi observada a presença de lipídios, somente nas células da epiderme dos cotilédones (Figura 10D).

Esses aspectos mencionados refletem no processo de conservação das sementes e propagação sexuada de uma determinada espécie, que depende de informações relacionadas às características estruturais provindas do desenvolvimento de tecidos.

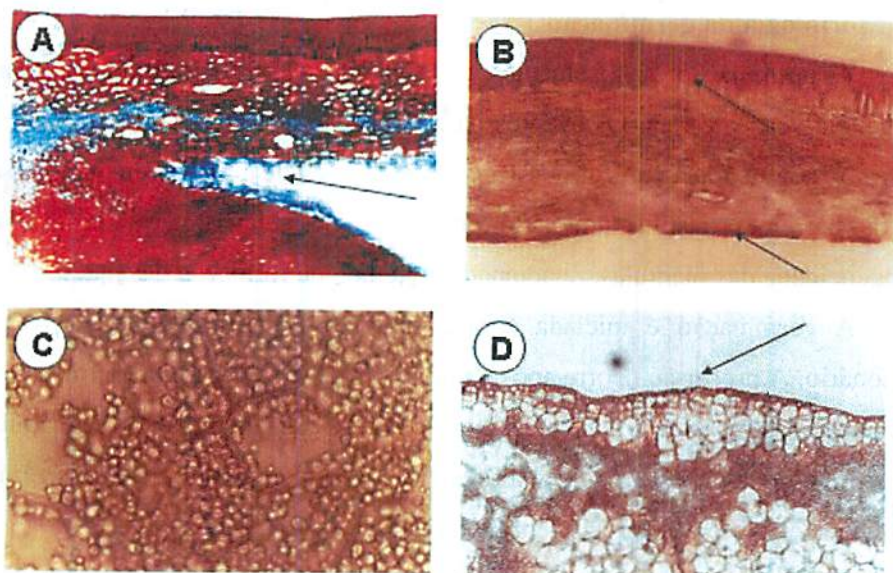


FIGURA 10. Seções transversais de sementes de *Cupania vernalis* Camb. (A e B representando tegumento); (C e D: cotilédone). UFLA, Lavras, MG, 2005.

Para muitas espécies tropicais, a germinação ocorre logo após a completa maturação e conseqüente dispersão das sementes (Alexandre, 1980), enquanto que, para outras espécies, as sementes permanecem dormentes por muitos anos (Carpenter et al., 1993). Sementes de *Cupania vernalis* possuem a capacidade de germinar logo após a dispersão, porém, deve ser desprovida do tegumento (Figura 10A; 10B). Essas sementes apresentam um comportamento semelhante à dormência primária, gerada durante o desenvolvimento, na fase de histodiferenciação de forma que, quando exógena, é causada pela presença de tecido tegumentar ou endosperma, que estão ao redor do embrião (Popinigis, 1985).

4.5.2 Morfologia da germinação

A germinação das sementes de *Cupania vernalis* é hipógea, com emergência vertical ereta. Os eventos da germinação podem ser observados na Figura 11. A embebição só foi possível através da remoção do tegumento. Esse tipo de barreira constitui um sério problema que afeta a germinação e a homogeneidade das plântulas, relacionado ao tempo de formação das mudas.

A germinação é iniciada com a hidratação dos cotilédones e eixo embrionário. A protrusão ocorre após o quinto dia de embebição. Inicialmente, a raiz primária apresenta-se cônica, glabra, curva de cor amarelada e, à medida que ocorrem o alongamento e a diferenciação celular, adquire cor marrom-acinzentada com a presença de tricomas radiculares (Figura 11).

O hipocótilo é cilíndrico, espesso, longo e de coloração marrom. Os cotilédones, inicialmente, são de cor amarelo-claro, de forma que à medida que vai ocorrendo a formação da plântula, tornam-se de cor creme.

A plântula apresenta sistema radicular pivotante com raiz primária axial, sublenhosa, mais espessa na base e afilada no ápice; coifa cilíndrica, castanho escuro, raízes secundárias curtas, com algumas ramificações (Figura 11). As

plântulas de *Cupania vernalis* possuem sistema radicular axial e ramificam-se secundariamente 20 dias após a germinação. O colo, ou coleto, é visível pela diferença de cor entre o hipocótilo clorofilado e a raiz aclorofilada e leve constrição entre estes órgãos. O hipocótilo é curto e glabro; os cotilédones são de coloração esverdeada e espessos, de forma curta e peciolados côncavo-convexos com formato ovado a oblongo; o epicótilo é pouco desenvolvido de forma clorofilada. O primeiro par de folíolos completamente expandidos foi observado aos noventa dias após a germinação, com filotaxia alterno-helicoidal.

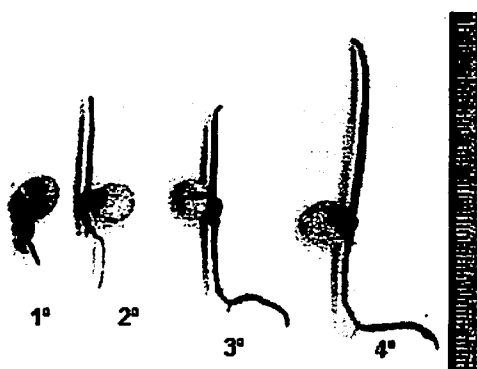


FIGURA 11. Representação esquemática dos estádios iniciais da germinação de sementes de *Cupania vernalis* Camb até o estágio de plântula. UFLA, Lavras, MG, 2005.

4.5.3 Características anatômicas das plântulas nos diferentes estádios de desenvolvimento

Por meio de estudos da anatomia e reconhecimento das estruturas internas das plântulas, foi possível identificar o estado de normalidade das

mesmas. A presença ou ausência de determinadas estruturas permitem inferir sobre o status do desenvolvimento vegetal.

A literatura botânica brasileira registra trabalhos de morfologia de plântulas de espécies de mata (Silva, 2001), mas não estudos de anatomia, o que dificulta, eventualmente, a compreensão de todo o processo de desenvolvimento estrutural, fisiológico e ecológico de plantas florestais nos seus estádios iniciais.

Nos gráficos das Figuras 12 e 13 encontram-se dados que representam a evolução do padrão de desenvolvimento, aparentemente, de crescimento normal de plântulas de *Cupania vernalis*, de forma que é observada uma constante tanto para a descrição do caule quanto das avaliações efetuadas no sistema radicular. Observa-se que, à medida em que ocorre um leve aumento na espessura do feixe vascular, ocorre também um aumento na espessura do córtex, porém, de forma não significativa. Logo após a protrusão, o feixe vascular apresenta uma espessura próxima de $50\mu\text{m}$ e, ao final de 60 dias (4º estágio), aproximadamente $70\mu\text{m}$. Esses resultados permitem garantir a integridade da plântula, sendo essa a maior preocupação depois de ocorrida a germinação. De maneira semelhante, Melo et al. (2004) afirmam que estudos relacionando tanto à morfologia externa como interna, vêm auxiliar na identificação botânica da espécie, seja na interpretação dos testes de laboratório ou no reconhecimento dessas espécies em bancos de sementes durante a fase de plântula em formações florestais.

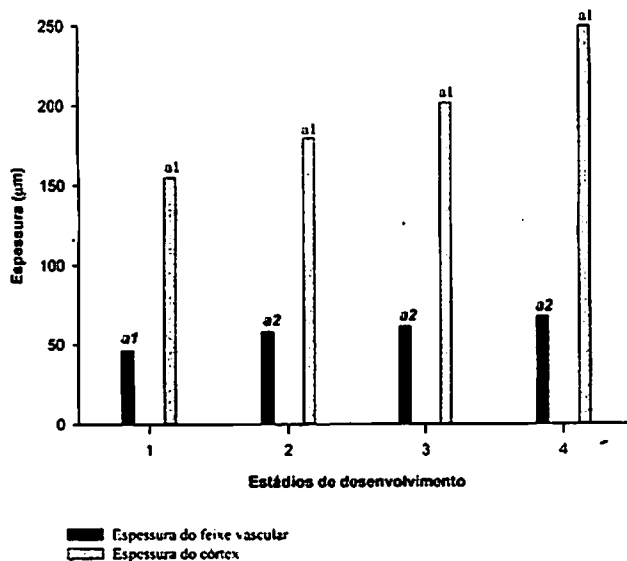


FIGURA 12. Espessura do córtex e feixe vascular do caule de plântulas de *Cupania vernalis* Camb nos diferentes estádios de desenvolvimento. UFLA, Lavras, MG, 2005.

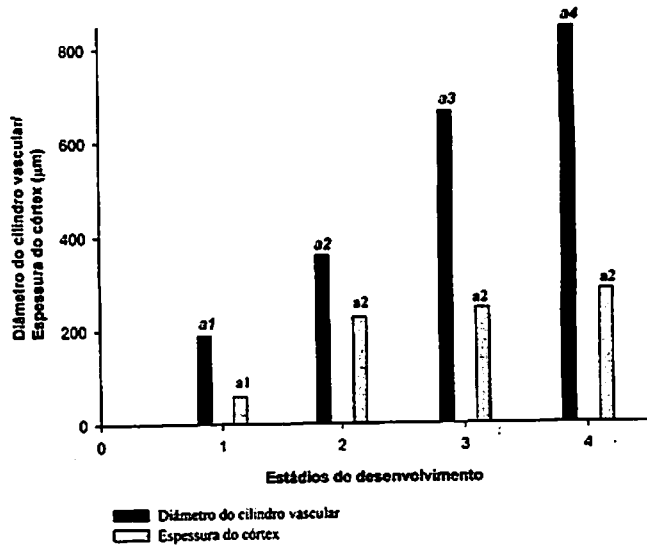


FIGURA 13. Espessura do córtex e diâmetro do cilindro vascular de raízes de plântulas de *Cupania vernalis* Camb nos diferentes estádios de desenvolvimento. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Durante o desenvolvimento do caule e raiz, ocorre também a deposição de lignina e formação de anéis esclerênquimáticos no caule, formando barreiras ao enraizamento, já na fase jovem. Essa característica impede que a espécie venha a ser propagada de forma assexuada por estaquia (Figura 14). Para o sistema radicular, o aumento na espessura do córtex ocorre em função de divisões periclinais e do aumento radial dessas células. Esse crescimento é limitado, sendo que, ao final do desenvolvimento primário e início do desenvolvimento secundário, a camada mais interna é caracterizada pela endoderme, com presença de estrias de Caspary (Figura 15). Aos 60 dias após a germinação, notou-se a presença de raízes secundárias com um alto grau de deposição de lignina, demonstrando uma característica típica de lenhosas nativas (Figura 15D).

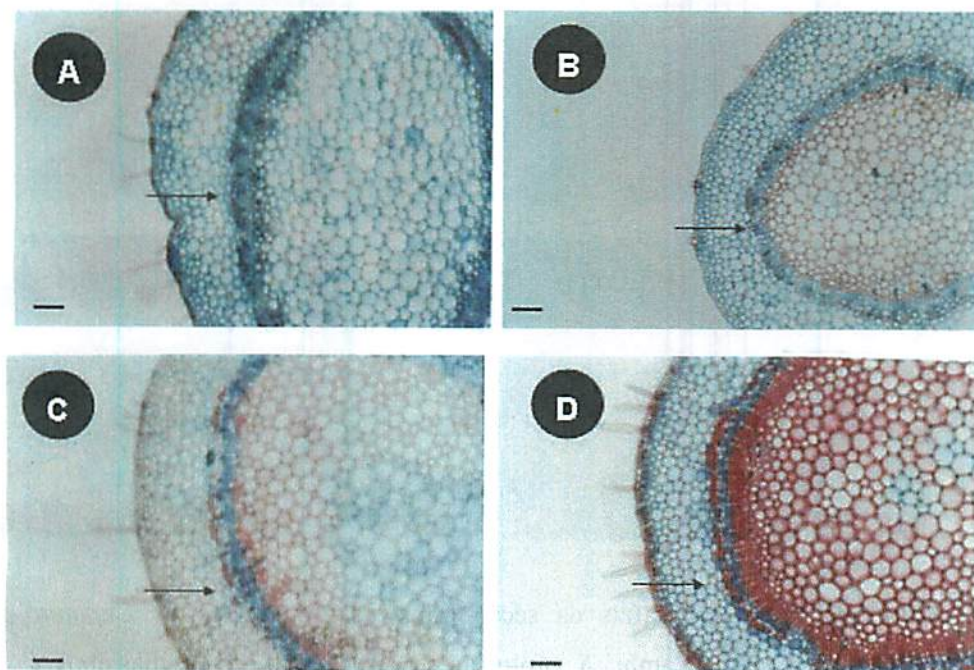


FIGURA 14. Fotomicrografias da seção transversal do caule de *Cupania vernalis* Camb.; **A:** protrusão e **B:** 10; **C:** 30 e **D** 60 dias após a germinação. Barra = 80 μ m. **(A)**- seta indicando o início de formação dos feixes vasculares; **(B)**- início de formação do anel esclerenquimático; **(C)**- Anel esclerenquimático com alguns espaçamentos e **(D)** com formação contínua do anel esclerenquimático. UFLA, Lavras, MG, 2005.

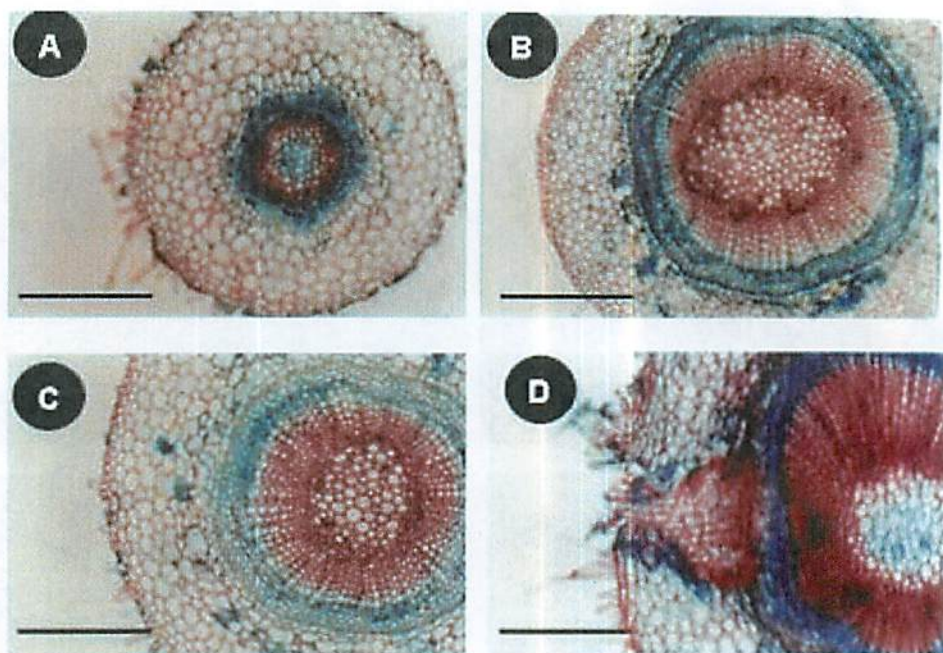


FIGURA 15. Fotomicrografias da seção transversal de raízes de *Cupania vernalis* Camb.; **A:** protrusão e **B:** 10; **C:** 30 e **D** 60 dias após a germinação. Barra: 200 μ m. UFLA, Lavras, MG, 2005.

5 CONCLUSÕES

A redução do grau de umidade de 45% para 35% não afeta o desempenho fisiológico de sementes de *Cupania vernalis* Camb.

Sementes de *Cupania vernalis* Camb apresentam grau de umidade crítico de 30% e grau de umidade letal de 11,5%.

O grau de umidade de 40% prédefinido para o armazenamento, associado à baixa temperatura de armazenamento a 10 °C, confere melhor conservação às sementes.

O ambiente de armazenamento de 25°C proporcionou aumento de translocação de carboidratos para o eixo embrionário, demonstrando não ser uma condição ideal para conservação.

Foi observada a expressão de proteínas termorresistentes (HSP) em resposta à desidratação.

As sementes de *Cupania vernalis* Camb são revestidas por um tegumento com presença de lignina.

Aos 60 dias após a germinação é possível observar a presença contínua de anéis esclerenquimáticos no caulículo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRE, D. Y. Caricature saisonnier de la fructification dans une forêt hygrophile de Côte d' Ivoire. *Terre et la Vie Revie d'Ecologie*, Paris, v. 34, n. 3, p. 335-350, 1980.
- ALVARENGA, S. **Influência de diferentes teores de umidade, embalagens e ambientes sobre a preservação da viabilidade e vigor de sementes de pau-santo (*Kielmeyera coriacea* Mart.).** 1987. 84 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUCE, W.; PASSADOS, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais.** Viçosa: UFV, 1991. 242 p.
- ANDRADE, A. C. S.; CUNHA, R.; REIS, R. B.; ALMEIDA, K. J. **Conservação de sementes de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.)- Myrtaceae.** *Informativo ABRATES*, Brasília, v. 7, n. 1/2, p. 205, jul./ago. 1997.
- BAKER, J.; STEELE, C.; DURS, L. , III. **Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton.** *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 11, n. 3, p. 277-291, 1988.
- BARBEDO, C. J. **Armazenamento de sementes de *Inga uruguensis* HOOK & AM.** 1997. 71 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “ Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. **Orthodox and Recalcitrant Seeds.** In: *Tropical tree seed manual*. [S. l.]: USDA Forest Service's/Reforestation, Nurseries, & Genetics Resources, 2003.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. **What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds.** *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, v. 12, p. 22-55, abr. 2000.
- BERJAK, P.; VERTUCCI, C. W.; PAMMENTER, N. W. **Desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds: Effects of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation-sensitivity in *Camellia sinensis*.** *Seed Science Research*, Wallington, v. 3, n. 2, p. 155-166, June 1993.

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

BLACKMAN, S. A.; WETTLAUFER, S. H.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n. 3, p. 868-874, July 1991.

BONNER, F. T. Seed Biology. In: **Woody plant seed manual.** (S. 1.): USDA Forest Service's/Reforestation, Nurseries, & Genetics Resources, 2001.

BONNER, F. T. Tropical forest seeds: biology, quality and technology. In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE SEMENTES FLORESTAIS, 2., 1989, Atibaia. Anais...** São Paulo: SEMA-SP/IF, 1989. p. 263-274.

BOYCE, K. G. Report of the seed storage. Committee 1986 – 1989. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 17, p. 135-142, 1989. Supplement. 1.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO JUNIOR, D. **Marcadores da tolerância à dessecação de sementes de cafeeiro.** 2000. 144 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BRANDÃO JUNIOR, D. S.; VIEIRA, M. G. G.; HILHORST, H. W. M. Aquisição da tolerância à dessecação nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 673-681, out./dez. 2002.

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

CALISTRU, C.; MCLEAN, M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. The effects of mycofloral infection on the viability and ultrastructure of wet-stored recalcitrant seeds of *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 10, n. 3, p. 341-353, Sept. 2000.

CAMARGO, I. P.; CASTRO, E. M.; GAVILANES, M. L. Aspectos da anatomia e morfologia de amêndoas e plântulas de castanheira-do-brasil. **Cerne**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 011-018, 2000.

CARPENTER, W. J.; OSTMARK, E. R.; RUPPERT, K. C. Promoting rapid germination of needle palm seed. **Proceedings, Florida State Horticultural Society**, Gainesville, v. 106, p. 336-338, May 1993.

CARVALHO, L. R. **Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais quanto à capacidade de armazenamento**. 2000. 97 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CHIN, H. F. **Recalcitrant seeds: a status report**. Rome: IBPGR, 1988. 18 p.

CHRISTENSEN, C. M. Microflora and seed deterioration. In: ROBERTS, E. H. (Ed). **Viability of Seed**. Syracuse university press. 1972. cap3, p. 59-93.

CLOSE, T. J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, n. 2, p. 291-296, June 1997.

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

CORREA, F. L. O. **Efeito da embalagem e do ambiente de armazenamento na germinação e vigor de sementes de goiabeira (*Psidium guajava* L.)**. 1997. 57 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CAVALCANTI, S. B. T.; TELES, H. L.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. New tetra-acetylated oligosaccharide diterpene from *Cupania vernalis* Camb. **Journal of the Braziliam Chemical Society**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 413-416, May/June 2001.

DELOUCHE, J. C.; BASKIN, C. C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 2, p. 427-552, 1973.

DURE, L. H.; CHOUCHE, M.; HARADA, J.; MUNDY, H. J.; QUATRANO, R.; THOMAS, T.; SUNG, Z. R. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 12, n. 5, p. 475-486, May 1989.

FAO. **Ex situ storage of seeds, pollen and in vitro cultures of perennial woody plant species**. **informativo ABRATES**, Brasilia, v. 5, n. 2, p. 184, ago. 1995.

FARIA, J. M. R.; VAN 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, n. 2, p. 165-178, June 2004.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Development of the recalcitrant (homoiohydrous) seeds of *Avicennia marina*: Anatomical, ultrastructural and biochemical events associated with development from histodifferentiation to maturation. **Annals of Botany**, London, v. 70, n. 1, p. 75-86, July 1992.

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

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

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; WALTERS, C. Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 7, n. 2, p. 135-144, June 1997.

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

FINCH-SAVAGE, W. E.; CLAY, H. A.; BLAKE, P. S.; BROWNING, G. Seed development in the recalcitrant species *Quercus robur* L. : water status and endogenous abscisic acid levels. **Jornal Experimental Botany**, Cambridge, v. 43, n. 250, p. 671-679, May 1992.

FU, J. R.; ZHANG, H. Z.; WANG, X. P.; QIAO, Y. P.; HUANG, X. L. Physiological studies on desiccation, wet storage and cryopreservation of recalcitrant seeds of three fruit species and their excised embryonic axes. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 18, n. 3, p. 743-751, 1990.

GENTIL, D. F. O. **Conservação de sementes de *Myrciaria dubia* (H. B. K) McVAUGH**. 2003. 41 p. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP.

- HAN, B.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W.; FARRANT, J. M.; KERMODE, A. R. The recalcitrant plant species, *Castanospermum australe* and *Trichilia dregeana*, differ in their ability to produce dehydrin-related polypeptides during seed maturation and in response to ABA or water-deficit-related stresses. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v. 48, n. 3/4, p 1717-1726, Sept. 1997.
- HARRINGTON, J. F. Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI, T. T. **Seed biology**. New York: Academic Press, 1972. v. 3, p. 145-245.
- HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUTTINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 431-438, Sept. 2001.
- HOEKSTRA, F. A.; WOLKERS, W. F.; BUTTINK, J.; GOLOVINA, E. A.; CROWE, J. H.; CROWE, L. M. Membrane stabilization in the dry state. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 117A, n. 3, p. 335-341, July 1997.
- HONG, S. W.; VIERLING, E. Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 8, p. 4392-4397, Apr. 2000.
- HONG, T. D.; ELLIS, R. H. A comparison of maturation drying, germination, and desiccation tolerance between developing seeds of *Acer pseudoplatanus* L. and *Acer platanoides* L. **New Phytologist**, Cambridge, v. 116, n. 4, p. 589-596, Dec. 1990.
- HONG, T. D.; ELLIS, R. H. A protocol to determine seed storage behaviour: Rome: IPGRI, 1996. 62 p. (IPGRI. Technical bulletin, 1).
- HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Storage. In: **Tropical tree seed manual**. [S. l]: USDA Forest Service's, Reforestation, Nurseries, & Genetics Resources, 2003. Chap. 3.
- JOACHIM, F. W.; BULOW, V.; CARMONA, R.; PARENTE, V. T. Armazenamento e tratamento de sementes de pitanga vermelha do cerrado (*Eugenia calycina*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 961- 970, jun. 1994.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2. ed. Bombay: Tata McGraw-Hill Book Company, 1940.

KERMODE, A. R. Approaches to elucidate the basis of desiccation-tolerance in seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 7, n. 1, p. 75-95, Mar. 1997.

KING, M. W.; ROBERTS, E. H. **The storage of recalcitrant seeds: achievements and possible approaches**. Rome: IBPGR, 1979. 96 p.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR. 198 p.

KUNYOSHI, Y. S. **Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com Araucária**. 1983. 233 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

LEOPOLD, A. C.; SUN, W. Q.; BERNALLUGO, I. The glassy state in seeds: analysis and function. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 4, p. 267-274, Dec. 1994.

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

LIMA JÚNIOR, E. C. **Germinação, armazenamento de sementes e fisiologia anatômica de plantas jovens de *Cupania venalis* Camb.** 2004. 115 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade federal de Lavras, Lavras, MG.

LIN, T. -P.; CHEN, M. -H. Biochemical characteristics associated with the development of the desiccation sensitive seeds of *Machilus thunbergii* Sieb. & Zucc. **Annals of Botany**, London, v. 76, n. 4, p. 381-387, Oct. 1995.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2000. v. 1.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar./Apr. 1962.

MALUF, A. G.; BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J. Drying and storage of *Eugenia involucrata* DC. **SEEDS. Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 3, p. 471-475, Jul./Sept. 2003a.

- MELO, M. G. G.; MENDONÇA, M. S.; MENDES, A. M. S. Análise morfológica de sementes, germinação e plântulas de jatobá (*Hymenaea intermedia* Ducke var. *adenotricha* (Ducke) Lee & Lang.) (Leguminosae-caesalpinioideae). *Acta Amazônica*, Manaus, v. 34, n. 1, p. 9-14, Mar. 2004.
- MERHAR, V. S. A.; CALISTRU, C.; BERJAK, P. A Study of Some Biochemical and Histopathological Responses of Wet-stored Recalcitrant Seeds of *Avicennia marina* Infected by *Fusarium moniliforme*. *Annals of Botany*, London, v. 92, n. 3, p. 401-408, Sept. 2003.
- MUNDY, J.; CHUA, N. H. Abscisic acid and water-stress induce a novel rice gene. *EMBO Journal*, Oxford, v. 7, n. 8, p. 2279-2286, Aug. 1988.
- OLADIRAN, J. A.; AGUNBIADE, S. A. Germination and seedling development from pepper (*Capsicum annum* L.) seeds following storage in different packaging materials. *Seed Science & Technology*, Zurich, v. 28, n. 2, p. 413-419, 2000.
- OLIVER, M. J.; BEWLEY, J. D. Desiccation-tolerance of plant tissues: A mechanistic overview. *Horticultural Reviews*, New York, v. 18, p. 171-213, 1997.
- PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research*, Wallingford, v. 9, n. 1, p. 13-37, Mar. 1999.
- PONTES, A. C.; LIMA E BORGES, E. E.; BORGES, C. G.; SOARES, C. P. B. Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr. (Garapa) durante a embebição. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v. 26, n. 5, p. 593-601, set./out. 2002.
- POPININGIS, F. *Fisiologia de sementes*. Brasília: AGRIPLAN, 1985. 285 p.
- PRITCHARD, H. W. Water potential and embryonic axis viability in recalcitrant seeds of *Quercus rubra*. *Annals of Botany*, London, v. 67, n. 1, p. 43-49, Jan. 1991.
- QUEITSCH, C.; HONG, S. W.; VIERLING, E.; LINDQUIST, S. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, Rockville, v. 12, n. 4, p. 479-492, Apr. 2000.

RAMOS, A. **Influência de cinco tipos de embalagens na germinação e no vigor de sementes de angico - *Parapiptadenia rigida* (benth)brenan, caixeta - *Tabebuia cassinoides* (lam.)dc e caroba - *Jacaranda micrantha* cham. armazenadas em câmara fria e a temperatura ambiente.** 1980. 134 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

ROBERTON, M.; CHANDLER, P. M. Pea dehydrins: identification, characterization and expression. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 19, n. 6, p. 1031-1044, Sept. 1992.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 1, n. 3, p. 499-514, 1973.

ROBERTS, E. H. Storage environment and the control of viability. In: Roberts, E. H. (Ed). **Viability of Seed**. Syracuse university press, 1972. cap2, p. 14-58.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: Editora UFLA, 2001. 180 p.

SALOMÃO, A. N.; LIMA, L. H. C.; FERREIRA, M. A. Adaptação de método para extração de proteínas de sementes de cerejeira (*Amburana cearensis* (Fr. All.) A. C. Smith). **Comunicado Técnico**, Brasília, DF, n. 64, p. 1-6, 2002. .

SILVA, L. L. **Morfologia, anatomia e desenvolvimento dos frutos, sementes e plântulas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. , *Esenbeckia grandiflora* Mart. , *Dictyoloma vandellianum* Adr. Juss. e *Balfourodendron riedelianum* (Engler) Engler (Rutaceae).** 2001. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

SUN, W. Q.; LEOPOLD, A. C. Cytoplasmic vitrification and survival anhydrobiotic organisms. **Comparative Biochemistry Physiology**, Oxford, v. 117A, n. 3, p. 327-333, July 1997.

SUTHERLAND, J. R.; DIEKMANN, M.; BERJAK, P. **Forest tree seed health for germoplasm conservation**. Rome: IPGRI, 2000.

TIGABU, M.; ODEM, P. C. Effect of scarification, giberellic acid and temperature on seed germination of two multipurpose *Albizia species* from Ethiopia. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 29 n. 1, p. 11-20, 2001.

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

VIEIRA, A. H.; MARTINS, E. P.; PEQUENO, P. L. de L.; LOCATELLI, M.; SOUZA, M. G. de. **Técnicas de produção de sementes florestais**. Porto Velho: Embrapa, CT 205, 2001. p. 1-4.

WALTERS, C. Levels of recalcitrance in seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia**, Londrina, v. 12, n. 1, p. 7-21, abr. 2000.

WALTERS, C.; RIED, J. L.; WALKERSIMMONS, M. K. Heat-soluble proteins extracted from wheat embryos have tightly bound sugars and unusual hydration properties. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 7, n. 2, p. 125- 134, June 1997.

WILLIAMSON, J. D.; QUATRANO, R. S. ABA-regulation of two classes of embryo-specific sequences in mature wheat embryos. **Plant Physiology**, Rockville, v. 86, n. 1, p. 208-215, Jan. 1998.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, London, v. 53, n. 3, p. 508-514, 1954.

ANEXOS

TABELA A - Análise de variância para germinação durante o armazenamento.

TABELA A1 - Análise de variância para o desdobramento dos níveis de umidade dentro dos níveis do fator temperatura durante o armazenamento.

TABELA A2 - Análise de variância para os contrastes dos tratamentos adicionais com as melhores médias de germinação. Adicional 1 (40% de umidade no tempo 0); Adicional 2 (35% de umidade no tempo 0); Adicional 3 (30% de umidade no tempo 0).

TABELA B - Análise de variância para IVE durante o armazenamento.

TABELA B1 - Análise de variância para os contrastes dos tratamentos adicionais com as melhores médias de IVG. Adicional 1 (40% de umidade no tempo 0); Adicional 2 (35% de umidade no tempo 0); Adicional 3 (30% de umidade no tempo 0).

TABELA C - Análise de variância para os teores de açúcares solúveis totais encontrados durante o armazenamento.

TABELA C1 - Análise de variância para o desdobramento dos níveis de umidade fixado época e temperatura no período de armazenamento.

TABELA C2 - Análise de variância para os contrastes dos tratamentos adicionais com as melhores médias de teores de açúcares solúveis totais.

Adicional 1 (40% de umidade no tempo 0); Adicional 2 (35% de umidade no tempo 0); Adicional 3 (30% de umidade no tempo 0).

TABELA A- Análise de variância para germinação durante o armazenamento.

| FV | GL | SQ | QM | F | Pr>Fc |
|-----------------------|-----------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| Umidade | 2 | 21660,0 | 10830,0 | 34,388 | 0,000 |
| Época | 1 | 5084,1 | 5084,1 | 16,143 | 0,000 |
| Temperatura | 1 | 11844,1 | 11844,1 | 37,608 | 0,000 |
| Ad1 vs Fatorial | 1 | 6574,40 | 6574,40 | 20,875 | 0,000 |
| Ad2 vs Fatorial | 1 | 6242,97 | 6242,97 | 19,823 | 0,000 |
| Ad3 vs Fatorial | 1 | 3645,83 | 3645,83 | 8,859 | 0,004 |
| Um*Época | 2 | 823,0 | 411,5 | 1,306 | 0,289 |
| Um*temperatura | 2 | 2813,0 | 1406,5 | 4,466 | 0,017 |
| Época*temperatura | 1 | 520,1 | 520,1 | 1,651 | 0,205 |
| Um*ep*temp | 2 | 198,0 | 99,0 | 0,314 | 0,578 |
| Erro | 45 | 14172 | 314,93 | | |
| Total | 59 | 76260 | | | |

Tabela A1- Análise de variância para o desdobramento dos níveis de umidade dentro dos níveis do fator temperatura.

| FV | GL | SQ | QM | F | Pr>Fc |
|------------|----|----------|---------|--------|--------|
| Um / 10 °C | 2 | 10081,33 | 5040,66 | 16,005 | 0,0000 |
| Um / 25 °C | 2 | 14391,75 | 7195,87 | 22,849 | 0,0000 |
| Residuo | 45 | 14172,50 | 314,93 | | |

TABELA A2 . Análise de variância para os contrastes dos tratamentos adicionais com as melhores médias de **germinação**. Adicional 1 (40% de umidade no tempo 0); Adicional 2 (35% de umidade no tempo 0); Adicional 3 (30% de umidade no tempo 0).

| FV. | | GL. | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------------|----------|------------|-----------------|---------------|-----------------|
| Contraste | 1 | 1 | 8,00 | 0,025 | 0,8741 |
| Contraste | 2 | 1 | 2,00 | 0,006 | 0,9368 |
| Contraste | 3 | 1 | 128,00 | 0,406 | 0,5270 |
| Contraste | 4 | 1 | 300,125 | 0,953 | 0,3342 |
| Contraste | 5 | 1 | 253,125 | 0,804 | 0,3747 |
| Contraste | 6 | 1 | 10,125 | 0,032 | 0,8585 |
| Contraste | 7 | 1 | 12168,00 | 38,638 | 0,0000 |
| Contraste | 8 | 1 | 578,00 | 1,835 | 0,1823 |
| Contraste | 9 | 1 | 128,00 | 0,406 | 0,5270 |
| Resíduo | | 45 | 314,92 | | |

1= ad1 vs trat1; 2= ad2 vs trat1; 3= ad3 vs trat1; 4= ad1 vs trat2; 5= ad2 vs trat2; 6= ad3 vs trat2; 7= ad1 vs trat3; 8= ad2 vs trat3; 9= ad3 vs trat3.

Observação:

Tratamento 1 (40% de umidade aos 120 dias de armazenamento a 10 °C);
 Tratamento 2 (40% de umidade aos 120 dias de armazenamento a 25 °C) e
 Tratamento 3 (40% de umidade aos 240 dias de armazenamento a 10 °C).

TABELA B-Análise de variância para IVE, durante o armazenamento.

| FV | GL | SQ | QM | F | Pr>Fc |
|-------------------|----|---------|---------|--------|-------|
| Umidade | 2 | 16,2604 | 8,1302 | 31,983 | 0,000 |
| Época | 1 | 1,5052 | 1,5052 | 5,921 | 0,018 |
| Temperatura | 1 | 14,8519 | 14,8519 | 58,426 | 0,000 |
| Ad1 vs Fatorial | 1 | 3,41508 | 3,41508 | 13,434 | 0,000 |
| Ad2 vs Fatorial | 1 | 8,0164 | 8,0164 | 31,537 | 0,001 |
| Ad3 vs Fatorial | 1 | 1,148 | 1,148 | 4,516 | 0,039 |
| Um*Época | 2 | 0,6529 | 0,3265 | 1,284 | 0,286 |
| Um*temperatura | 2 | 1,0138 | 0,5069 | 1,994 | 0,148 |
| Época*temperatura | 1 | 0,1102 | 0,1102 | 0,433 | 0,513 |
| Um*ep*temp | 2 | 0,2529 | 0,1265 | 0,497 | 0,611 |
| Erro | 45 | 11,442 | 0,2542 | | |
| Total | 59 | 60,469 | | | |

TABELA B1. Análise de variância para os contrastes dos tratamentos adicionais com as melhores médias de IVG. Adicional 1 (40% de umidade no tempo 0); Adicional 2 (35% de umidade no tempo 0); Adicional 3 (30% de umidade no tempo 0).

| FV | GL | QM | Fc | Pr>Fc |
|--------------------|-----------|-----------------|---------------|-----------------|
| | 1 | 0.361250 | 1,4211 | 0,239 |
| Contraste 1 | 1 | | | |
| Contraste 2 | 1 | 0.005000 | 0,0196 | 0,889 |
| Contraste 3 | 1 | 1.280000 | 5,0354 | 0,0297 |
| Contraste 4 | 1 | 0.026450 | 0,1045 | 0,7479 |
| Contraste 5 | 1 | 0.696200 | 2,724 | 0,7479 |
| Contraste 6 | 1 | 0.135200 | 0,531 | 0,469 |
| Contraste 7 | 1 | 0.266450 | 1,048 | 0,311 |
| Contraste 8 | 1 | 1.411200 | 5,551 | 0,0228 |
| Contraste 9 | 1 | 0.000200 | 7,867 | |
| Resíduo | 45 | 0.2542 | | |

1= ad1 vs trat1; 2= ad2 vs trat1; 3= ad3 vs trat1; 4= ad1 vs trat2; 5= ad2 vs trat2; 6= ad3 vs trat2; 7= ad1 vs trat3; 8= ad2 vs trat3; 9= ad3 vs trat3.

Observação:

Tratamento 1 (40% de umidade aos 120 dias de armazenamento a 10 °C);
 Tratamento 2 (40% de umidade aos 240 dias de armazenamento a 10 °C) e
 Tratamento 3 (35% de umidade aos 240 dias de armazenamento a 10 °C).

Tabela C - Análise de variância para o desdobramento dos níveis de umidade fixados época e temperatura, no período de armazenamento.

| FV | GL | SQ | QM | F | Pr>Fc |
|-------------------|----|----------|----------|--------|--------|
| Umidade | 2 | 7251 | 3625 | 5,027 | 0,0213 |
| Época | 1 | 34 | 34 | 0,047 | 0,954 |
| Temperatura | 1 | 32204 | 32204 | 44,665 | 0,000 |
| Ad1 vs Fatorial | 1 | 16906,88 | 16906,88 | 23,449 | 0,000 |
| Ad2 vs Fatorial | 1 | 5164,96 | 5164,96 | 7,163 | 0,0172 |
| Ad3 vs Fatorial | 1 | 8536,07 | 8536,07 | 11,839 | 0,003 |
| Um*Época | 2 | 3602 | 1801 | 2,497 | 0,115 |
| Um*temperatura | 2 | 17157 | 8578 | 11,897 | 0,000 |
| Época*temperatura | 1 | 50882 | 50882 | 70,571 | 0,000 |
| Um*ep*temp | 2 | 19472 | 9736 | 13,503 | 0,000 |
| Erro | 15 | 10819 | 721 | | |
| Total | 23 | 139595 | | | |

TABELA C1- Análise de variância para o desdobramento dos níveis de umidade fixados época e temperatura, no período de armazenamento.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------------|----|-----------------|-----------------|---------------|---------------|
| Umidade/1 | 2 | 24748,43 | 12374,21 | 17,162 | 0,0001 |
| Umidade/2 | 2 | 3433,18 | 1716,59 | 2,380 | 0,126 |
| Umidade/3 | 2 | 1368,03 | 684,01 | 0,948 | 0,409 |
| Umidade/4 | 2 | 17928,79 | 8964,39 | 12,433 | 0,0005 |
| Resíduo | 15 | 10819 | 721 | | |

Codificação usada para o desdobramento

| código | Época (dias) | Temperatura °C |
|--------|--------------|----------------|
| 1 | 120 | 10 |
| 2 | 120 | 25 |
| 3 | 240 | 10 |
| 4 | 240 | 25 |

TABELA C2 - Análise de variância para os contrastes dos tratamentos adicionais com as melhores médias de teores de açúcares solúveis totais. Adicional 1 (40% de umidade no tempo 0); Adicional 2 (35% de umidade no tempo 0); Adicional 3 (30% de umidade no tempo 0).

| FV | | GL | QM | Fc | Pr>Fc |
|----------------|----|-----------|------------|-----------|-----------------|
| Contraste | 1 | 1 | 1393,902 | 1,933 | 0,1847 |
| Contraste | 2 | 1 | 5,736 | 0,007 | 0,934 |
| Contraste | 3 | 1 | 13134,306 | 18,216 | 0,0006 |
| Contraste | 4 | 1 | 36227,412 | 50,246 | 0,0000 |
| Contraste | 5 | 1 | 22681,866 | 31,458 | 0,0000 |
| Contraste | 6 | 1 | 1474,176 | 2,044 | 0,173 |
| Contraste | 7 | 1 | 6746,979 | 9,357 | 0,007 |
| Contraste | 8 | 1 | 1798,608 | 2,494 | 0,135 |
| Contraste | 9 | 1 | 4872,040 | 6,757 | 0,0201 |
| Contraste | 10 | 1 | 13826,232 | 19,176 | 0,0005 |
| Contraste | 11 | 1 | 6061,401 | 8,406 | 0,0110 |
| Contraste | 12 | 1 | 1180,266 | 1,636 | 0,220 |
| Contraste | 13 | 1 | 28495,128 | 39,521 | 0,000 |
| Contraste | 14 | 1 | 16660,355 | 23,107 | 0,000 |
| Contraste | 15 | 1 | 284,428 | 0,394 | 0,539 |
| Contraste | 16 | 1 | 62667,612 | 86,917 | 0,0000 |
| Contraste | 17 | 1 | 4354,466 | 61,517 | 0,0000 |
| Contraste | 18 | 1 | 9681,576 | 13,427 | 0,0023 |
| Resíduo | | 15 | 721 | | |

1= ad1 vs trat1; 2= ad2 vs trat1; 3= ad3 vs trat1; 4= ad1 vs trat2; 5= ad2 vs trat2; 6= ad3 vs trat2; 7= ad1 vs trat3; 8= ad2 vs trat3; 9= ad3 vs trat3; 10= ad1 vs trat4; 11= ad2 vs trat4; 12= ad3 vs trat4; 13= ad1 vs trat5; 14= ad2 vs trat5; 15= ad3 vs trat5; 16= ad1 vs trat6; 17= ad2 vs trat6; 18= ad3 vs trat6.

Observação:

Tratamento 1 (40% de umidade aos 120 dias de armazenamento a 10 °C);
 Tratamento 2 (35% de umidade aos 120 dias de armazenamento a 10 °C) e
 Tratamento 3 (30% de umidade aos 120 dias de armazenamento a 10 °C).
 Tratamento 4 (40% de umidade aos 240 dias de armazenamento a 25 °C);
 Tratamento 5 (35% de umidade aos 240 dias de armazenamento a 25 °C) e
 Tratamento 6 (30% de umidade aos 240 dias de armazenamento a 25 °C).