



OLIVIA ALVINA OLIVEIRA TONETTI

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS
E MOLECULARES EM SEMENTES DE
Cryptocarya aschersoniana SUBMETIDAS À
SECAGEM E AO ARMAZENAMENTO**

LAVRAS – MG

2013

OLIVIA ALVINA OLIVEIRA TONETTI

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E MOLECULARES
EM SEMENTES DE *Cryptocarya aschersoniana* SUBMETIDAS À
SECAGEM E AO ARMAZENAMENTO**

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

Orientador

Dr. José Marcio Rocha Faria

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Tonetti, Olivia Alvina Oliveira.

Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de *Cryptocarya aschersoniana* submetidas à secagem e ao armazenamento / Olivia Alvina Oliveira Tonetti. – Lavras : UFLA, 2013.

89 p.: il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: José Márcio Rocha Faria.

Bibliografia.

1. Lauraceae. 2. Banco de sementes. 3. Dormência. 4. Tolerância à dessecação. 5. Canela-batalha. I. Universidade Federal de Lavras.

II. Título.

CDD – 634.973931

OLIVIA ALVINA OLIVEIRA TONETTI

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E MOLECULARES
EM SEMENTES DE *Cryptocarya aschersoniana* SUBMETIDAS À
SECAGEM E AO ARMAZENAMENTO**

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

APROVADA em 08 de fevereiro de 2013

Dr. Anderson Cleiton José	UFLA
Dr. Jessé Marques da Silva Júnior	UFLA
Dr. João Almir de Oliveira	UFLA
Dra. Letícia Renata de Carvalho	UFMG

Dr. José Márcio Rocha Faria
Orientador

**LAVRAS – MG
2013**

A minha filha, Bianca, com amor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir concluir este trabalho, muitas vezes as dificuldades que encontramos ao longo da vida quase nos derrotam e o desânimo toma conta... mas Deus esteve lá, sempre...

À Universidade Federal de Lavras, na figura de seus representantes, pela confiança em mim depositada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), por financiar este projeto.

A minha família, mais especificamente, minha mãe, minha irmã e meu cunhado, pelo apoio e paciência ao longo desses quatro anos. Por entenderem minha ausência e por cuidar de mim e de minha filha em todos os momentos. Agradeço ao meu pai (*in memoriam*), pelo legado de uma vida correta e simples, pelos eternos ensinamentos.

A minha amada filha Bianca, e à pequena Rafaela, por serem sempre fontes de energia e otimismo.

Ao meu orientador, José Marcio, pelo apoio constante neste trabalho e pela preciosa amizade.

Aos meus irmãos “postiços” Jessé e Anderson, pela ajuda imensurável neste trabalho e pela amizade que cultivamos.

À amiga Letícia, e ao Prof. João Almir, por terem aceitado participar da banca de defesa e pelas valiosas contribuições na etapa final desta tese.

Ao professor Claudio Davide, pelo incentivo.

Aos meus amigos de pós-graduação (que aqui evito citar nomes, pois poderia me esquecer de citar alguém, o que seria imperdoável), todos vocês participaram, de alguma forma, de minha vida nesses últimos anos, o apoio de vocês certamente foi decisivo para a conclusão deste trabalho.

Que Deus proteja todos vocês!

RESUMO GERAL

Em função da importância das espécies de lauráceas nas formações florestais brasileiras, este trabalho teve como objetivo estudar o comportamento de sementes de *Cryptocarya aschersoniana* durante a secagem e o armazenamento e caracterizar o banco de sementes no ambiente original da espécie e em área antropizada. O experimento foi conduzido em três anos, sendo as sementes, após beneficiadas, secas até atingirem umidades pré-determinadas, quando foram avaliadas umidade, germinação, estrutura celular (por microscopia de varredura e óptica com testes histoquímicos para amido e lipídeos), padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor e das enzimas esterases e peroxidase e quantificados açúcares e lipídeos. O armazenamento foi realizado em câmara fria (5°C/40% UR) com sementes sem secagem e com pré-secagem até 35% de grau de umidade, em dois anos. Aos 0, 3, 6 e 12 meses foram testadas germinação e umidade, acompanhadas de análises da ultraestrutura e microscopia óptica com reação para amido, lipídeos e compostos fenólicos. O banco de sementes foi induzido no sub-bosque de uma floresta sendo no segundo ano também testado em condição de borda antropizada. As amostras, individualizadas em redes de *nylon*, foram enterradas sendo retirada uma a cada mês para avaliação da umidade, germinação, sementes dormentes e mortas. No segundo ano, foi analisada a umidade do solo nos dois ambientes. Os dados foram analisados e comparados com dados de precipitação e temperatura. Os resultados encontrados permitem concluir que sementes dessa espécie começam a perder a viabilidade quando secas abaixo de 28,1% de umidade, sendo a umidade letal entre 21,5 e 18,1 %. A perda da viabilidade durante a secagem parece estar ligada aos danos sobre o sistema de membrana por oxidação dos lipídeos. As sementes são dormentes no momento da dispersão e a secagem de poucos pontos percentuais ajuda na sua superação. No armazenamento, foi possível verificar que, se mantidas úmidas e a 5°C, as sementes suportam o armazenamento por pelo menos 12 meses e têm sua dormência superada. Imagens sugerem consumo de reservas durante o armazenamento. No banco de sementes em ambiente natural da espécie, foi possível verificar que as mesmas se adaptaram para superar a fase desfavorável para o estabelecimento das plântulas em função da dormência e de algum mecanismo que minimiza as perdas de água, garantindo sua sobrevivência no banco por cerca de 180 dias, quando as condições parecem favorecer a germinação. Em área antropizada, as sementes germinaram pouco e as plântulas não encontraram condições de se estabelecer, o que evidencia a importância da manutenção de áreas de mata nativa para a perpetuação da espécie.

Palavras-chave: Canela-batalha. Tolerância à dessecação. Banco de sementes. Lauraceae.

GENERAL ABSTRACT

Due to the importance of Lauraceae species in Brazilian forests, this study aimed to investigate the behavior of *Cryptocarya aschersoniana* seeds during drying and storage and characterize the seed bank in its natural habitat and in an altered area. The experiment was carried out during three years with seeds dried until predetermined moisture content when the following was evaluated: moisture content, germination, cell structure (through scanning and optical microscopy, histochemical tests for lipids and starch), quantifying of sugars and lipids, and electrophoretic pattern of heat resistant protein and enzymes esterases and peroxidase. Seeds were stored at 50C and 40% RH either without drying and after pre-drying to 35% moisture content, in two consecutive years. At 0, 3, 6 and 12 months were evaluated germination and moisture content, as well as analyzes of ultrastructure and optical microscopy with reaction to starch, lipids and phenolic compounds. The seed bank was induced in two consecutive years on the understory of a forest, and in the second year also on an anthropic edge. Seeds were put in individualized nylon nets and buried, being sampled each month for evaluation of moisture content, germination, dormant and dead seeds. In the second year soil moisture was analyzed in both environments. The data were analyzed and compared with data on precipitation and temperature. The results allow us to conclude that seeds start to lose viability when dried below 28.1% moisture content, with lethal moisture content between 21.5 and 18.1%. The loss of viability during drying appears to be linked to damage to the membrane system by oxidation of the lipids. The seeds are dormant at the time of dispersal and mild drying help in overcoming it. In storage, it was observed that, if kept moist and at 50C, they support storage for at least 12 months and have overcome their dormancy. Images suggest consumption of reserves during storage. In the seed bank in the natural environment of the species, it was verified that they have adapted in order to overcome unfavorable season for seedling establishment due to the dormancy and some mechanism that minimizes water loss, ensuring their survival in the bank for about 180 days, when conditions appear to favor germination. In the altered edge, the seeds germinated but the seedlings did not find conditions to establish, which highlights the importance of maintaining native forests for perpetuation of the species.

Keywords: Seed dormancy. Desiccation tolerance. Seed bank. Lauraceae.

LISTA DE FIGURAS

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

- Figura 1 Comportamento de sementes de canela-batalha (*Cryptocarya aschersoniana*) colhidas em 2009, 2011 e 2012, em função de diferentes graus de umidade.. 40
- Figura 2 Imagem de microscopia eletrônica de varredura da região de transição do eixo embrionário com os cotilédones de sementes de *Cryptocarya aschersoniana*..... 42
- Figura 3 Padrão eletroforético para esterases (A) e peroxidase (B) extraídas de sementes de *Cryptocarya aschersoniana* em diferentes pontos de secagem..... 43
- Figura 4 Padrão eletroforético para proteínas resistentes ao calor extraídas de sementes de *Cryptocarya aschersoniana* em diferentes pontos de secagem..... 44
- Figura 5 Quantificação de lipídeos e açúcares em sementes de *Cryptocarya aschersoniana* em diferentes pontos de secagem..... 45
- Figura 6 Testes histoquímicos em sementes de *Cryptocarya aschersoniana*. 46
- Figura 7 Curvas de secagem de sementes de *Cryptocarya aschersoniana* em sílica gel, colhidas em 2009, 2011 e 2012 48
- Figura 8 Microscopia eletrônica de varredura (A e B) e reação com Lugol (C e D) em sementes de *Cryptocarya aschersoniana*. 49

ARTIGO 2

- Figura 1 Comportamento de sementes de canela-batalha (*Cryptocarya aschersoniana*) armazenadas em câmara fria. 65
- Figura 2 Imagem da região de transição do eixo embrionário com os cotilédones de sementes de *Cryptocarya aschersoniana*, por microscopia eletrônica de varredura. 67
- Figura 3 Testes histoquímicos em sementes de *Cryptocarya aschersoniana*. A 69

ARTIGO 3

Figura 1	Germinação de sementes de canela-batalha (<i>Cryptocarya aschersoniana</i>) recém-colhidas	81
Figura 2	Comportamento de sementes de canela-batalha (<i>Cryptocarya aschersoniana</i>), em banco de sementes induzidos em 2 anos, em dois ambientes. A.....	83

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Tabela 1	Médias de germinação de sementes de <i>Cryptocarya aschersoniana</i> , sementes dormentes e mortas, após 120 dias em condição de teste de germinação.....	48
----------	---	----

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	12
1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	23
	REFERÊNCIAS	24
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	28
	ARTIGO 1 Comportamento fisiológico de sementes de <i>Cryptocarya aschersoniana</i> submetidas à secagem	28
1	INTRODUÇÃO	30
2	MATERIAL E MÉTODOS	32
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	51
	ARTIGO 2 Desempenho fisiológico e alterações celulares de sementes de <i>Cryptocarya aschersoniana</i> armazenadas	55
1	INTRODUÇÃO	57
2	MATERIAL E MÉTODOS	59
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	71
	ARTIGO 3 Estudo de bancos de sementes de <i>Cryptocarya aschersoniana</i> em floresta e em área antropizada	74
1	INTRODUÇÃO	76
2	MATERIAL E MÉTODOS	78
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS	88

PRIMEIRA PARTE

Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

A família *Lauraceae* é uma das mais expressivas nas formações florestais brasileiras, com espécies frequentemente encontradas em matas ciliares remanescentes da região Sudeste do Brasil. Várias espécies dessa família encontram-se classificadas no grupo ecológico das clímax e apresentam produção irregular de sementes. Os poucos estudos existentes sugerem que, para várias espécies desse grupo, as sementes sejam sensíveis à dessecação, além de apresentarem indícios de dormência, tipo de relato que tem sido frequente para sementes dispersas com alto teor de água e que apresentam certa sensibilidade à dessecação, como é o caso de sementes de uma das espécies de *Lauraceae*, *Cryptocarya aschersoniana* (CARVALHO, 2006). Curiosamente, em sementes dessa espécie, há um segundo incremento nos valores de germinação após o armazenamento a 5°C, como verificado em trabalhos anteriores (CARVALHO, 2000, 2006).

Comportamentos como esses podem ser resultados de diferentes estratégias encontradas pelas espécies ao longo da evolução, dando melhores condições de propagação para as mesmas no ambiente natural. No entanto, essas adaptações, muitas vezes, representam uma dificuldade a mais na manipulação das sementes, dificultando sua utilização e armazenamento. Assim, torna-se de fundamental importância entender como as sementes se comportam após a dispersão no ambiente de origem e entender suas limitações.

Os objetivos deste trabalho foram caracterizar as alterações fisiológicas e celulares em sementes de *Cryptocarya aschersoniana* durante a secagem e o

armazenamento e avaliar o comportamento das mesmas em condições de banco de sementes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Família Lauraceae

Estima-se que a família Lauraceae englobe entre 2500 e 3000 espécies divididas em 42 gêneros, dispersas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (MARQUES, 2001), sendo que, somente no continente americano são encontrados 27 gêneros, totalizando pelo menos 1000 espécies (FERREIRA-PEREIRA, 2009). Desse total, 52 espécies em 12 gêneros apresentam interesse econômico, com usos na culinária, construção civil, marcenaria, indústria química e na medicina popular (MARQUES, 2001). A família aparece em grande parte dos levantamentos florísticos nos remanescentes florestais no Sul de Minas Gerais (OLIVEIRA FILHO, 2010) e dentre as espécies, pode-se destacar *Cryptocarya aschersoniana*, também conhecida como canela-batalha, uma espécie que ocorre em florestas pluviais de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul (LORENZI, 1998).

Sementes de algumas espécies da família Lauraceae, incluindo a citada, têm sido frequentemente classificadas como não ortodoxas (CARVALHO, 2000, 2006; CARVALHO et al., 2008; PIRES et al., 2009). Além disso, pesquisas com sementes de *Lauraceae* normalmente relatam uma germinação lenta, distribuída no tempo, indicando ocorrência de dormência (CARVALHO, 2006; MUXFELDT et al., 2012).

Apesar de baixa germinação inicial, estudos prévios com sementes de *Cryptocarya aschersoniana* relatam incrementos significativos no total de germinação após as sementes passarem por pequena redução no grau de umidade (DAVIDE; TONETTI; CARVALHO, 1999; MUXFELDT et al., 2012). Outra melhoria nos resultados de germinação é observada quando as sementes são armazenadas úmidas a 5°C, sendo que o máximo de germinação foi atingido

com sementes de *Cryptocarya aschersoniana* após 60 dias nessa condição (DAVIDE; TONETTI; FARIA, 2000), *Persea pyrifolia* após 90 dias (CARVALHO, 2000), *Nectandra nitidula* e *Nectandra lanceolata*, respectivamente após 90 e 180 dias de armazenamento (CARVALHO, 2006).

Informações como essas, aliadas ao fato de que a dispersão das sementes de *C. aschersoniana* ocorre entre fevereiro e abril (LORENZI, 1998), estação chuvosa nas regiões de origem, compõem um panorama pouco comum que merece maior investigação na tentativa de entender os mecanismos que regulam a estratégia reprodutiva da espécie.

2.2 Tolerância à dessecação

Tolerância à seca é a capacidade de enfrentar quantidades subótimas de água e não secagem ou equilíbrio com o ar seco (MARCOS FILHO, 2005), já tolerância à dessecação é a habilidade de um organismo recuperar suas funções biológicas normais ao absorver água novamente, após entrar em equilíbrio higroscópico com o ar seco (ALBERT; OLIVER, 2002), e sobreviver após um equilíbrio higrostático com uma umidade relativa abaixo de 50% (WALTERS, 2000), incluindo estratégias de sobrevivência em ausência praticamente completa de água (MARCOS FILHO, 2005).

Não se sabe ao certo como algumas espécies vegetais, ou mais comumente, suas sementes, se tornaram tolerantes à dessecação. O mais aceito é que a tolerância à dessecação em sementes é considerada uma evolução da sensibilidade (PAMMENTER; BERJAK, 2000a; TWEDDLE et al., 2003). Essa teoria se baseia no fato de que a condição encontrada pelos vegetais primitivos era de ambiente úmido, que não exerceu nenhuma pressão sobre as sementes para que elas evoluíssem para tolerantes à dessecação (PAMMENTER; BERJAK, 2000a), e se apoia na ocorrência de sementes com sensibilidade à

dessecação em espécies típicas de ambientes úmidos (HONG; ELLIS, 1996; TWEDDLE et al., 2003), que pelo fato de estarem prontas para germinar assim que são dispersas, conseguem otimizar a germinação em regiões com alguma sazonalidade (TWEDLE et al., 2003).

No entanto, outra teoria afirma que não há relação filogenética para a característica, isso porque são encontradas sementes sensíveis e tolerantes tanto em gimnospermas como angiospermas e grupos basais, primitivas ou evoluídas, considerando apenas a seleção promovida pelo ambiente, que então direcionou as espécies para os diferentes habitats (PAMMENTER; BERJAK, 2000b).

Além de espécies típicas de regiões tropicais, sementes sensíveis à dessecação também podem ser encontradas em espécies de regiões temperadas que apresentam dispersão no outono-inverno (FONSECA; BARONE, 2003), sendo que para essas últimas, sob baixas temperaturas, a perda de água no ambiente é reduzida, diminuindo o risco de morte por dessecação. Geralmente sementes sensíveis de espécies de regiões temperadas são mais tolerantes à dessecação e tem maior longevidade que as de origem tropical (PAMMENTER; BERJAK, 2000a, 2000b).

Quanto às características físicas, sementes sensíveis são geralmente grandes (TWEDDLE et al., 2003), ovais ou esféricas (HONG; ELLIS, 2002), e o fato de serem volumosas é interessante para a manutenção da viabilidade, pois reduz a velocidade de perda de água (PAMMENTER; BERJAK, 2000b) e garante as reservas necessárias para o crescimento rápido em condições de pouca luminosidade (TWEDLE et al., 2003).

A sensibilidade/tolerância à dessecação em sementes é variável entre as espécies, sugerindo a existência de um contínuo de tolerância, com sementes altamente tolerantes, ou ortodoxas, em um extremo, e sementes altamente sensíveis, ou recalcitrantes, em outro (FARRANT et al., 1996; PAMMENTER; BERJAK, 2000b).

2.3 Aquisição da tolerância à dessecação

Em sementes ortodoxas, a aquisição da tolerância à dessecação ocorre ao longo do desenvolvimento, antes da secagem da maturação, na qual, as sementes podem perder até 95% do conteúdo de água original até o momento da dispersão. Essa secagem pode começar com um mecanismo passivo de perda de água por evaporação na superfície da semente ou por um processo metabolicamente ativo (KERMODE; FINCH-SAVAGE, 2002). Independente da forma, a secagem leva a semente a reduzir o metabolismo pouco a pouco, até que fique quase inativo (NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010), deixando-a em um estado quiescente, o que permite sua dispersão em habitats secos ou sobreviver a períodos de estresses (PAMMENTER; BERJAK, 2000b).

Na fase de acúmulo de reservas, mecanismos de proteção e reparo precisam ser ativados, preparando a semente para a secagem de maturação (NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010) e possibilitando sua sobrevivência em estado seco. Esses mecanismos incluem o acúmulo de osmoprotetores, carboidratos, proteínas LEAs (*late embryogenesis abundant*) e proteínas de choque térmico (KRANNER et al., 2010). Como sementes sensíveis à dessecação não passam pela secagem de maturação, podem ter um acúmulo insuficiente de moléculas protetoras, ficando suscetíveis às injúrias por dessecação (KERMODE; FINCH-SAVAGE, 2002) e caso algum mecanismo se manifeste, pode ser deficiente (PAMMENTER; BERJAK, 1999).

As proteínas LEA, ou proteínas de “maturação”, são hidrofílicas e estáveis sob altas temperaturas. Essas moléculas estão envolvidas na proteção do sistema de membranas da célula, juntamente com os açúcares solúveis (principalmente sacarose, estaquiose e rafinose), que começam a se acumular antes da secagem. Esses últimos contribuem com a estabilidade das membranas (LEPRINCE; BUTINK, 2010) ao favorecer as relações hidrofílicas associadas à

atividade das proteínas durante a desidratação das sementes (MARCOS FILHO, 2005), estando ligados também à longevidade das sementes (PAMMENTER; BERJAK, 2000b).

Outras características, como a desdiferenciação de organelas, principalmente de mitocôndrias (WALTERS, 2000) ou redução dos vacúolos, tanto pela redução do volume como pela fragmentação de um vacúolo maior em vários menores, são também indícios de algum grau de tolerância à dessecação dos tecidos (MARCOS FILHO, 2005).

Superada a fase de secagem, o sistema de reparo precisa funcionar durante a reidratação para que essas estruturas retomem a configuração normal dando condições para a semente germinar, o que só é verificado em tecidos tolerantes à dessecação. A estabilidade das membranas é fator decisivo para que a viabilidade das sementes seja mantida, sendo sua qualidade influenciada pela atividade de enzimas como isoesterases. Assim, se os mecanismos de proteção das sementes, incluindo a remoção de peróxidos pela ação de peroxidases, não forem eficientes, ocorre uma desconfiguração do sistema e, com a embebição, este não tem condições para voltar a exercer suas funções biológicas normais e a semente perde sua viabilidade (MARCOS FILHO, 2005).

2.4 Armazenamento de sementes sensíveis à dessecação

Quando sementes úmidas são armazenadas sob condições que possibilitam o metabolismo, elas podem germinar. Portanto, para serem armazenadas adequadamente, as sementes precisam ter seus níveis de umidade reduzidos. A sensibilidade à dessecação compromete a conservação de sementes não ortodoxas, pois as mesmas precisam ser mantidas úmidas pelo menos o suficiente para que o metabolismo não seja interrompido (WALTERS et al., 2001). No entanto, ainda que garantida a umidade suficiente, o tempo que essas

sementes conseguem se manter viáveis em armazenamento é curto (KERMODE; FINCH-SAVAGE, 2002), sendo também curta sua longevidade ecológica, ou seja o tempo em que as sementes se mantêm viáveis em um banco de sementes natural (PAMMENTER; BERJAK, 2000b). Espécies com essas características geralmente mantêm seus descendentes na forma de banco de plântulas (PAMMENTER; BERJAK, 2000a), sendo a conservação *ex situ* de suas sementes muito dificultada.

Segundo Walters, Hill e Wheeler (2005), existem 5 níveis de hidratação em sementes, sendo a maioria das sementes recalcitrantes dispersas no nível de hidratação 4 (entre 33 e 41%) quando ainda estão ativos a síntese de proteínas, de ácidos nucleicos, assim como os mecanismos de reparo, direcionando as sementes para o início da germinação (MARCOS FILHO, 2005). Algumas vezes, as sementes são dispersas com umidade ainda no nível 5 (acima de 41%), nesse nível de hidratação as mesmas podem entrar em processo germinativo durante o armazenamento. Algumas alternativas têm sido sugeridas para desacelerar esse processo, dentre elas o uso de soluções osmóticas e a aplicação de ácido abscísico (ABA), principalmente para as sementes muito sensíveis à dessecação (FONSECA; BARONE, 2003).

Quando as sementes toleram uma secagem parcial, pode-se fazer a remoção da água livre, deixando-as próximas do nível 4, procedimento que favorece a manutenção da viabilidade, baixando as taxas metabólicas (WALTERS, 2000; BONJOVANI; BARBEDO, 2008). Outra vantagem dessa secagem é que, algumas vezes, ela pode provocar um estresse moderado e gerar alguma resposta positiva nas sementes, como em *Inga vera*, cujo armazenamento em temperaturas mais baixas foi favorecido pela pré-secagem (BONJOVANI; BARBEDO, 2008).

A redução da umidade ao nível 3 (20 a 33%), faixa na qual a maioria das sementes sensíveis (exceto as extremamente recalcitrantes) podem ser

armazenadas, mantêm a taxa de respiração consideravelmente alta e o metabolismo ativo, mas o sistema de reparo já não funciona perfeitamente (MARCOS FILHO, 2005; WALTERS; HILL; WHEELER, 2005). Segundo Walters et al. (2001), nesse nível de hidratação, as sementes sofrem uma aceleração do envelhecimento, o que as leva a morte. É importante lembrar que, durante o armazenamento, há necessidade de promover trocas gasosas, o que diminui o ritmo da deterioração (FONSECA; BARONE, 2003), mas, a atenção especial deve ser dada nesse sentido, pois a aeração pode, pouco a pouco, fazer com que haja perda de umidade (HONG; ELLIS, 2002).

Cada espécie tem suas próprias exigências quanto às condições de armazenamento. Geralmente sementes sensíveis à dessecação de espécies tropicais encontram melhores condições de manter sua viabilidade, ainda que por períodos curtos e sob condições aeradas, quando mantidas com a umidade de dispersão ou com redução de 2 a 5 pontos percentuais dessa umidade, em temperaturas entre 7 e 17°C (HONG; ELLIS, 2002). Já as originadas de regiões temperadas ou mesmo de regiões tropicais com altitudes elevadas, podem ser armazenadas em temperaturas mais baixas, eventualmente negativas (HONG; ELLIS, 1996).

Temperaturas baixas reduzem os processos metabólicos e conseqüentemente a possibilidade de germinação durante o armazenamento (HONG; ELLIS, 2002), no entanto, mesmo em temperaturas reduzidas, o metabolismo ainda está ativo. Dessa forma, as sementes precisariam absorver quantidades adicionais de água para completar o processo de germinação. Como essa água adicional não está disponível, a consequência é a perda da viabilidade (MARCOS FILHO, 2005).

Após a secagem, a taxa de reidratação também é decisiva, nesse sentido, uma hidratação lenta pode prevenir a perda da germinação, visto que à medida que as sementes embebem água lentamente, algum reparo de danos também

ocorre. No entanto, sementes sensíveis à dessecação normalmente têm pouca habilidade de reparar os danos por dessecação durante a embebição, seja ela lenta ou rápida (KERMODE; FINCH-SAVAGE, 2002).

2.5 Dormência

Uma semente dormente é aquela que, mesmo viável, não germina em um período de tempo específico, mesmo que as condições ambientais sejam favoráveis para a espécie (BEWLEY, 1997; BASKIN; BASKIN, 2004), sendo que a semente pode estar embebida e metabolicamente ativa, mas algum mecanismo a impede de completar a germinação (BEWLEY et al., 2013).

A ocorrência da dormência surgiu como uma defesa das sementes contra variações do ambiente, promovidos por diferentes recursos que dificultam sua atividade metabólica normal, representando uma estratégia que os vegetais encontraram para favorecer a continuidade da espécie (MARCOS FILHO, 2005). A ocorrência de dormência em sementes inclui adaptações das espécies para superar condições adversas e distribuir a germinação no tempo (BASKIN; BASKIN, 2004), dando às sementes e plântulas melhores chances de sobrevivência a condições de estresse e ataque de predadores (BEWLEY et al., 2013).

Segundo Baskin e Baskin (2004) as principais formas de dormência podem ser resumidas em dormência fisiológica: causada por um desbalanço hormonal entre promotores e inibidores de germinação que é subdividida em 3 níveis: não profunda, intermediária e profunda; dormência morfológica: caracterizada geralmente pelo embrião bem formado, mas que se apresenta com tamanho reduzido em relação à semente e, após a dispersão, ele apenas precisa crescer antes de germinar; dormência morfofisiológica: parecida com a anterior, porém o crescimento do embrião é controlado fisiologicamente por balanço

hormonal; dormência física (ou tegumentar): causada por impermeabilidade do tegumento à água ou a gases; dormência combinada: geralmente engloba características de dormência física com componentes de dormência fisiológica.

As formas de superação da dormência estão normalmente ligadas às condições encontradas pelas plantas no ambiente natural, durante a estação/período desfavorável, seguida pela favorável, para germinação e crescimento inicial das plântulas. Por exemplo, sementes de espécies típicas de regiões temperadas, que após dispersas precisam suportar o inverno, passar meses sob baixas temperaturas, ou mesmo congeladas, sendo que a passagem pelo frio promove a superação da dormência e dá condições para que a germinação ocorra quando as temperaturas se apresentam favoráveis (BEWLEY et al., 2013, FONSECA; BARONE, 2003; HONG; ELLIS, 2002; PAMMENTER; BERJAK, 2000a). Exigências parecidas podem também aparecer em sementes de espécies tropicais de regiões de maiores altitudes, sendo possível nesses casos, a ocorrência de dormência e sensibilidade à dessecação simultaneamente (HONG; ELLIS, 2002). Segundo Twedle et al. (2003), 24,8% das espécies tropicais não pioneiras apresentam algum tipo de dormência.

A ocorrência da dormência em sementes, muitas vezes indesejável na área agrícola, pode garantir a germinação ao longo do tempo, em uma população de sementes (BEWLEY et al., 2013), sendo fundamental na manutenção de bancos de sementes nativas. Segundo Garwood (1989), existem sete tipos de banco de sementes, considerando ecossistemas tropicais. Em todos eles, a dormência exerce papel decisivo na dinâmica dos bancos, garantindo a sobrevivência das sementes, logo a perpetuação das espécies.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este trabalho é composto por três artigos que tratam do comportamento das sementes de *Cryptocarya aschersoniana*, objetivando fazer uma conexão do comportamento das sementes com o ambiente original da espécie.

No primeiro artigo, foi estudada a sensibilidade à dessecação, sendo possível verificar que as sementes têm sua viabilidade comprometida quando secas abaixo de 28,1% de grau de umidade. Elas são dormentes no momento da dispersão, sendo que a secagem de poucos pontos percentuais ajuda na sua superação. Há indícios de que uma das causas da perda da viabilidade durante a secagem está ligada aos danos provocados sobre o sistema de membranas por oxidação dos lipídeos insaturados, comuns na composição dessas estruturas.

O segundo artigo trata do armazenamento de sementes, sendo possível verificar que as mesmas, quando mantidas úmidas em embalagens semipermeáveis a 5°C, não só suportam o armazenamento por pelo menos 12 meses, como também têm sua dormência superada. Durante o armazenamento, fica evidente o consumo de reservas que podem, em um prazo maior, serem esgotadas, comprometendo a viabilidade das sementes. Houve aumento na quantidade de compostos fenólicos nos tecidos dos cotilédones, no entanto, o estudo não contemplou as possíveis causas ou consequências desse aumento.

O terceiro artigo trata do acompanhamento de bancos de sementes induzidos no ambiente natural da espécie e em área antropizada. Foi possível verificar que as sementes são eficientes em superar uma fase desfavorável para desenvolvimento das plântulas, em função de sua dormência e adaptação, de forma a minimizar as perdas de água, garantindo condições necessárias para sobrevivência das mesmas no banco. Isso só foi verificado no banco induzido no habitat florestal, evidenciando a importância da manutenção de áreas de mata nativa para a perpetuação da espécie.

REFERÊNCIAS

ALBERT, P.; OLIVER, M. J. Drying without dying. In: BLACK, M. PRITCHARD, H.W. (Ed). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Londres: CABI, 2002. p. 4-43.

BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 14, p. 1-16, 2004.

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

BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 7, p. 1055-1066, 1997.

BONJOVANI, M. R.; BARBEDO, C. J. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd.subesp. *affinis* (DC)T.D. Penn. toleram temperatura sub-zero. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 345-356, 2008.

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

CARVALHO, L. R. **Conservação de sementes de espécies dos gêneros *Nectandra*, *Ocotea* e *Persea* (Lauraceae)**. 2006. 75 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

CARVALHO, L. R. et al. Classificação de sementes de espécies florestais dos gêneros *Nectandra* e *Ocotea* (Lauraceae) quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 1-9, 2008.

DAVIDE, A. C.; TONETTI, O. A. O.; CARVALHO, L. R. Efeitos da dessecação na viabilidade de semente de canela-batalha (*Cryptocarya aschersoniana* Mez-Lauraceae). **Informativo Abrates**. Londrina, v. 9. n. 1/2, p. 175, 1999.

DAVIDE, A. C.; TONETTI, O. A. O.; FARIA, J. M. R. Armazenamento de sementes de canela-batalha (*Cryptocarya aschersoniana* Mez – Lauraceae) – Resultados parciais. In: CONGRESSO E EXPOSIÇÃO INTERNACIONAL SOBRE FLORESTAS, 6., 2000, Porto Seguro. **Anais...** Rio de Janeiro: Instituto Ambiental Biosfera, 2000. p. 12-13.

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

FERREIRA-PEREIRA, H. E. Lauraceae del herbario nacional de Venezuela (Ven). **Acta Botánica Venezuelica**, Caracas, v. 32, n. 1, p. 237-250, 2009.

FONSECA, S. C. L.; BARONE, H. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 2, p. 297-303, 2003.

GARWOOD, N. C. Tropical soil seed banks: a review. In: LECK, M. A.; PARKER, V. T.; SIMPSON, R. L. **Ecology of soil seed banks**. San Diego: Academic, 1989. p. 149-210.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Reading: The University of Reading, 1996. 62 p. (Technical Bulletin, 1).

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Storage. In: VOZZO, J. A. **Tropical tree seed manual**. Washington: USDA Forest Service's, Reforestation, Nurseries & Genetics Resources, 2002. p. 125-136.

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

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, Cambridge, v. 188, p. 655-673, 2010.

LEPRINCE, O.; BUITINK, J. Desiccation tolerance: from genomics to the field. **Plant Science**, Limerick, v. 179, n. 6, p. 554-564, 2010.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1998. 352 p.

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

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lendl. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.

MUXFELDT, R. E. et al. Utilização do teste de raios-X na avaliação dos efeitos da dessecação e infestação em diásporos de canela-batalha *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae). **Cerne**, Lavras, v. 18, n. 4, p. 654-666, 2012.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination - still a mystery. **Plant Science**, Limerick, v. 179, n. 6, p. 574-581, 2010.

OLIVEIRA FILHO, A. T. **TreeAtlas 2.0, Flora arbórea da América do Sul cisandina tropical e subtropical: um banco de dados envolvendo biogeografia, diversidade e conservação**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2010. Disponível em: <<http://www.icb.ufmg.br/treetlan/>>. Acesso em: 18 jan. 2013.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 9, p. 13-37, 1999.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Aspects of recalcitrant seed physiology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, n. 12, p. 56-69, 2000a. Especial.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Evolutionary and ecological aspects of recalcitrant seed biology. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 10, p. 301-306, 2000b.

PIRES, L. A. et al. Germination of *Ocotea pulchella* (Nees) Mez (Lauraceae) seeds in laboratory and natural resting environment conditions. **Brazilian Journal of Biology**, Campinas, v. 69, n. 3, p. 935-942, 2009.

TWEDLE, J. C. et al. Ecology of seed desiccation sensitivity. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 91, p. 294-324, 2003.

WALTERS, C. et al. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 11, p. 135-148, 2001.

WALTERS, C.; HILL, L. M.; WHEELER, L. J. Dying while dry: kinetics and mechanisms of deterioration in desiccated organisms. **Integrative and Comparative Biology**, Mclean, v. 45, p. 751-758, 2005.

WALTERS, C. Leves of recalcitrance in seeds, **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12, p. 7-21, 2000. Especial.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Comportamento fisiológico de sementes de *Cryptocarya aschersoniana* submetidas à secagem

RESUMO

Sementes de *Cryptocarya aschersoniana*, assim como de outras espécies da família *Lauraceae*, têm sido frequentemente relatadas como sensíveis à dessecação, fato que dificulta sua conservação *ex-situ*. Este trabalho teve o objetivo estudar as mudanças que ocorrem durante a secagem dessas sementes. Sementes colhidas em três anos foram beneficiadas e secas a 20°C, em caixas contendo sílica-gel (UR entre 13,5 e 40%) até atingirem as umidades-alvo de 40, 35, 30, 25 e 20%. Para as sementes recém-colhidas e a cada ponto de secagem foram retiradas amostras das sementes e realizados testes de umidade $103^{\circ}(\pm 2^{\circ}\text{C})/17(\pm 1\text{h})$, e germinação, entre areia autoclavada, sob temperatura constante de 25°C, por até 120 dias. Foram feitas análises celulares por microscopia de varredura e microscopia ótica (com reações para lipídeos e amido), determinados o padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor e de enzimas (esterases e peroxidase) e quantificados açúcares e lipídeos. Os resultados permitiram concluir que sementes de *Cryptocarya aschersoniana* são sensíveis à dessecação e, dentro das condições testadas, o grau crítico de umidade se situa entre 28,1 e 26,3 e o grau letal entre 21,5 e 18,1%. Elas são dispersas dormentes, sendo essa dormência, em parte, superada por secagem parcial, respeitando-se o limite mínimo de 28,1% de umidade. Essas sementes possuem alguns sistemas de proteção à dessecação como síntese de proteínas resistentes ao calor e aumento nas concentrações de sacarose e rafinose durante a secagem artificial, no entanto, esses sistemas não foram eficientes para proteger as sementes de danos causados pela dessecação mais intensa. As isoformas para esterase e peroxidase foram eficientes ao indicar a perda da qualidade das sementes quando elas se aproximaram do grau crítico de umidade e sugerem que essa alteração nos padrões está ligada a danos irreversíveis no sistema de membranas. As imagens obtidas só permitiram verificar mudanças no ponto em que as sementes já se encontravam totalmente inviáveis.

Palavras-chave: Lauraceae. Tolerância à dessecação. Membranas. Eletroforese de enzimas.

ABSTRACT

Physiological behavior of *Cryptocarya aschersoniana* seeds subjected to drying. Seeds of *Cryptocarya aschersoniana*, as well as other species in the family Lauraceae, have often been reported as sensitive to desiccation, which makes their *ex-situ* conservation difficult. This study aimed to investigate the changes that occur during drying of these seeds. Seeds harvested at three years have been processed and dried at 20°C in drying box containing silica gel (RH from 13.5 to 40%) to achieve the target seed moisture contents of 40, 35, 30, 25 and 20%. Samples of fresh seeds and in each target moisture content were taken for evaluating moisture content ($103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/17\text{h}$), and germination (in autoclaved sand, 25°C for up to 120 days). Cellular analyzes were performed by scanning electron microscopy and optical microscopy (with reactions for lipids and starch). The electrophoretic pattern of heat resistant proteins and enzymes (esterases and peroxidase) was determined and quantified sugars and lipids. The results showed that seeds are sensitive to desiccation and, under the conditions tested, the critical moisture content is between 28.1 and 26.3%, with the lethal moisture content between 21.5 and 18.1%. Seeds are dormant at dispersal, and this dormancy is partly overcome by mild drying. These seeds have some protection systems against desiccation as synthesis of heat resistant protein and increasing of concentrations of sucrose and raffinose during artificial drying, however, these systems were not effective in protecting seeds from damage caused by desiccation more intense. Isoforms for esterases and peroxidase were effective in indicating the loss of seed quality when they approached the critical moisture content, suggesting that this change in patterns is linked to irreversible damage to the membrane system. The images obtained allow to verify changes only at the point at which the seeds were already totally unviable.

Keywords: Lauraceae. Desiccation tolerance. Membranes. Electrophoresis of enzymes.

1 INTRODUÇÃO

A família Lauraceae aparece em grande parte dos levantamentos florísticos nos remanescentes florestais no Sul de Minas Gerais, realçando também sua importância ecológica (OLIVEIRA FILHO, 2010). Dentre as muitas espécies da família, merece destaque *Cryptocarya aschersoniana* (canela-batalha), uma espécie clímax comum em florestas pluviais de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul (LORENZI, 1998; OLIVEIRA FILHO, 2010).

Sementes dessa espécie, assim como outras da família Lauraceae, têm sido frequentemente classificadas como sensíveis à dessecação (CARVALHO, 2000, 2006; CARVALHO et al., 2008; THAPHIYAL; PHARTYAL; NAYAL, 2004) o que dificulta o manuseio das mesmas, comprometendo a condução de pesquisas com a espécie e seu armazenamento e, conseqüentemente a disponibilidade de sementes, levando a um gargalo na produção de mudas de qualidade.

De modo geral, sementes sensíveis à dessecação são comuns em espécies típicas de regiões tropicais, onde as características do ambiente original não exigem que as mesmas sejam tolerantes, já em regiões temperadas é comum a ocorrência de espécies com sementes recalcitrantes, no entanto com menor sensibilidade à perda de água (PAMMENTER; BERJAK, 2000a, 2000b; TWEDLE et al., 2003).

Em sementes ortodoxas, a aquisição da tolerância à dessecação ocorre ao final do desenvolvimento, fase na qual há acúmulo de reservas e os mecanismos de proteção como a produção de osmoprotetores, carboidratos, antioxidantes, proteínas LEAs (*late embryogenesis abundant*) e proteínas de choque térmico (KRANNER et al., 2010) são ativados, preparando a semente para a secagem de maturação e possibilitando sua sobrevivência em estado seco. Em sementes sensíveis, como essas não passam pela fase de secagem, esses

mecanismos podem não ser ativados ou, muitas vezes se manifestam de forma incompleta, gerando um acúmulo insuficiente de moléculas protetoras, dando origem a sementes suscetíveis às injúrias por dessecação (KERMODE; FINCH-SAVAGE, 2002; PAMMENTER; BERJAK, 1999).

Informações como essas, aliadas ao fato de que a dispersão das sementes de *C. aschersoniana* ocorre entre fevereiro e março (LORENZI, 1998), estação chuvosa para as regiões de ocorrência da espécie, compõem um panorama pouco comum que merece maior investigação na tentativa de entender os mecanismos que regulam a estratégia reprodutiva da espécie.

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento de sementes de *Cryptocarya aschersoniana* durante a secagem, caracterizando as mudanças que ocorrem ao longo desse processo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização do material

Frutos maduros (com coloração amarela) de *Cryptocarya aschersoniana* foram colhidos na região de Lavras, MG, no mês de fevereiro de 2009, 2011 e 2012. O beneficiamento foi sob água corrente, friccionando os frutos sobre uma peneira até completa remoção da polpa, sendo consideradas “sementes” as estruturas de dispersão, formadas pela semente dentro de um endocarpo lenhoso. E foram deixadas em camada única, ao ar livre, até perda da água superficial e denominadas sementes recém-colhidas, sendo retiradas amostras para a caracterização inicial do lote, como teste de umidade e germinação (todos os anos colhidos), análise de imagens (microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz), extração e quantificação de lipídeos e açúcares e análise de padrão eletroforético para proteínas resistentes ao calor, esterases e peroxidase (apenas para sementes colhidas em 2012).

2.2 Secagem

Após a caracterização inicial, o restante das sementes foi acondicionado em caixas plásticas contendo sílica gel no fundo, em uma sala climatizada (20°C). A sílica gel foi trocada sempre que a cor do indicador de umidade (azul) se tornou pálida, mantendo uma condição interna nas caixas de 20°C e UR entre 13,5 e 40%. Ao atingir as umidades-alvo de 40, 35, 30, 25 e 20%, foram retiradas amostras das sementes e todos os testes realizados com as sementes recém-colhidas foram repetidos.

2.3 Testes realizados

Para caracterização do material e a cada ponto de interesse, foram realizados os testes ligados a seguir.

2.3.1 Teste de umidade

O teste de umidade foi feito em estufa a $103^{\circ}(\pm 2^{\circ}\text{C})/17(\pm 1\text{h})$, com 4 repetições de 5 sementes cada, sendo as sementes cortadas (BRASIL, 2009). Foram utilizados como recipiente barquetes de papel alumínio e o resultado foi a média das 4 repetições, calculadas em base úmida.

2.3.2 Teste de germinação

O teste de germinação foi feito com 4 repetições de 25 sementes, previamente lavadas em hipoclorito de sódio (1%/10 minutos), entre areia autoclavada, em bandejas plásticas (27 x 40 cm), conduzido em germinador tipo *Mangelsdorf*, a 25°C , com luz contínua. Foram consideradas germinadas as sementes que deram origem a plântulas normais, sendo o teste encerrado quando houve estabilização da formação de plântulas. Ao final do teste, as sementes que não germinaram foram cortadas e imersas em solução de tetrazólio (0,5% por 24h a 25°C) e posteriormente avaliadas, sendo consideradas viáveis as sementes que apresentaram coloração rósea/vermelha, indicando atividade respiratória.

2.3.3 Análise da ultraestrutura

As amostras foram analisadas quanto à ultraestrutura, por microscopia eletrônica de varredura, no Laboratório de Microscopia Eletrônica/UFLA. As

amostras foram compostas de 5 sementes cortadas transversalmente na região do eixo embrionário e fixadas em solução *Karnovsky* modificado (glutaraldeído 2,5%; formaldeído 2,5%, em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2, CaCl₂ 0,001M) por pelo menos 24 horas. Os espécimes foram cortados com lâmina de barbear, formando a superfície de observação, lavados em água destilada e desidratados em série crescente de acetona (25, 50, 75, 90 e 100 %), por 10 minutos em cada concentração, sendo que as amostras foram mantidas na concentração de 100% por três vezes. As amostras, já desidratadas, foram transferidas para um aparelho de ponto crítico modelo (Bal-Tec) para a evaporação da acetona sem perda da conformação dos tecidos.

As amostras secas foram coladas sobre fita de carbono, em *stubs* revestidos com papel alumínio, submetidas ao processo de metalização em um evaporador de ouro *Sputter Coater* SCB 050 e examinadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura (LEO EVO 40 XVP), sendo as imagens obtidas na região de transição do eixo embrionário para os cotilédones e registradas em velocidade de 9v. Foram consideradas como padrão as características encontradas em todas as 5 amostras analisadas para cada ponto.

2.3.4 Testes histoquímicos

As análises foram realizadas a partir de 5 sementes, em secções manuais transversais, com auxílio de lâmina de barbear. As amostras, mantendo cortes de cada semente em separado, foram mantidas em água destilada, sendo posteriormente transferidas para soluções específicas, de acordo com a molécula a ser identificada, conforme descrito a seguir.

Localização de amido

Os cortes foram deixados em solução de lugol “fraca” (0,02% de iodo livre) por 30 segundos, transferidos diretamente para uma lâmina contendo água glicerinada, cobertos com lamínula e analisados em microscópio. Áreas ricas em amido foram identificadas pela coloração roxa/negra nas imagens.

Localização de lipídeos

Os cortes foram transferidos para uma solução de Sudan (3% em álcool etílico 70%) e mantidos por 10 minutos. Em seguida foram lavados em álcool etílico 70%, transferidos para uma lâmina contendo água glicerinada, com as amostras de cada semente individualizadas por lâmina, cobertos com lamínula e observadas em microscópio. Áreas ricas em lipídeos foram identificadas pela coloração laranja.

As análises foram feitas em um microscópio *Olympus* BX 51 sendo as imagens registradas em câmara *Olympus* C 5060-ADU utilizando o sistema de análise de imagens *Image – Pro-plus 5.1*, com as observações se concentrando na região de transição do eixo embrionário com os cotilédones. Como controle foram analisados cortes sem que passassem por nenhuma solução prévia, para verificação do aspecto dos tecidos.

2.3.5 Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor e enzimas

Foram analisadas 3 repetições de 10 sementes cada. Cada semente foi cortada ao meio (sendo utilizada apenas a parte que continha o eixo embrionário), imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em *deep freezer* (-80°C) até o momento da extração, quando foram maceradas em almofariz com pistilo, usando nitrogênio líquido durante a maceração.

Para a análise de proteínas resistentes ao calor, foram usados 100 mg de macerado para 1 mL de solução de extração (Tris HCl 0,05M pH 7,5). As

amostras foram centrifugadas a 14000 rpm/30 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e mantido por 15 minutos a 85°C, após o qual foi centrifugado novamente.

Uma alíquota de 70 µL desse extrato (sobrenadante) foi misturada com 40 µL de tampão de corrida (glicerol 12,5%, SDS 1,6mM e azul de bromofenol 0,1% diluídos em Tris HCl 0,05M pH 7,5) e fervida por 5 minutos. Amostras de 50 µL foram aplicadas em canaletas, em gel SDS descontínuo (concentrador a 6,0% e o separador a 7,5% de acrilamida), em duas repetições técnicas. O conjunto foi imerso em tampão de corrida SDS 1X (solução de tris base 0,052 M, glicina 0,053M e SDS 0,0035M), no qual foi aplicada uma corrente de 150V por 7 horas.

O gel foi corado com *Comassie Blue* 1% (solução de ácido acético 10% e etanol 50%) por 16 horas, sendo posteriormente descolorido com solução de ácido acético 10% e etanol 5%, por 5 horas. As imagens foram comparadas com o padrão do marcador (*BenchMark*® *Protein Ladder Invitrogen*) e digitalizadas usando um escâner (*Imagescanner - Amersham Biosciences*).

Para extração de enzimas, foi utilizado protocolo indicado para sementes de café, com modificações, conforme descrito a seguir.

Peroxidase: foram utilizados 100 mg do macerado diluídos em 250 µL de tampão fosfato (solução aquosa de fosfato de sódio bibásico 34 mM, ácido ascórbico 5,7 mM, bórax 2,5 mM, sacarose 0,2 M, com 2% de PEG 6000, 2,56% de PVP e 0,2% de β-mercaptoetanol). Os tubos contendo a mistura foram agitados em vortex, mantidos em geladeira por 2 horas e centrifugadas 14.000 a 4°C por 30 minutos. Do extrato resultante, foram aplicados 50 µL em gel descontínuo (concentrador a 6,0% e separador a 7,5% de acrilamida), em duas repetições técnicas. O conjunto foi imerso em tampão de corrida 1X (solução de tris base 0,052 M, glicina 0,053M), no qual foi aplicada uma corrente de 150V por 6 horas, sendo a revelação feita em solução de o-dianisidina 0,5 mM, com

0,03% de peróxido de hidrogênio em tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,5, a 37°C por 30 minutos. A imagem foi registrada em um *Imagescanner* (*Amersham Biosciences*).

Para a análise do padrão de esterases foram utilizados 100 mg do macerado diluídos em 250 µL do tampão de extração (Tris HCl 0,2M pH 8,0) com 0,1% de β-mercaptoetanol. Os tubos contendo a mistura foram agitados em vortex, mantidos em geladeira por 2 horas e centrifugados a 14.000 RPM a 4°C por 30 minutos. Do extrato resultante, foram aplicados 50 µL em gel descontínuo (concentrador a 6,0% e o separador a 7,5% de acrilamida), em duas repetições técnicas. O conjunto foi imerso em tampão de corrida 1X, conforme já descrito para peroxidase, no qual foi aplicada uma corrente de 150V por 6 horas, sendo a revelação em solução 2,6mM de α e β naftil acetato, 4,2mM de *fast blue* RR, acetona 5% em tampão Tris-HCl 0,05M (pH 7,1) sob temperatura de 37°C por 30 minutos.

2.3.6 Quantificação de açúcares e lipídeos

Para extração e quantificação de lipídeos e açúcares, foram utilizadas 3 repetições de 20 sementes cada, secas em estufa a 40°C/48 horas, maceradas e congeladas (-20°C) até o momento dos testes. As amostras foram colocadas em cartuchos de papel-filtro, pesadas e transferidas para conjunto extrator *soxhlet* por um período de 24 horas, sendo a extração realizada a frio, com éter de petróleo e o resultado expresso em percentagem de lipídios (óleos) extraídos.

O extrato livre de lipídeos foi congelado e enviado ao Bio Agro, localizado no campus da UFV. Foram quantificados glicose, frutose, rafinose e estaquiose, em aparelho de HPLC (Cromatografia Líquida de Alto desempenho) marca *SHIMADZU*, em 3 alíquotas de 20 µl.

2.4 Análise dos dados

Todos os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram testados quanto à normalidade sendo determinadas as curvas, bem como suas equações e determinado o valor de R^2 para cada curva apresentada, em cada variável de interesse, pelo Pacote Estatístico R.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sementes recém-colhidas, com grau de umidade acima de 45%, apresentaram, em geral, baixos valores de germinação, não ultrapassando 30%, sendo que a maioria das sementes viáveis ainda estava dormente ao final de 120 dias em condição de germinação (Figura 1A, 1C e 1E). Com a dessecação das sementes, os valores de germinação (exceto para o lote de 2009) foram diferentes significativamente (Figura 1A, 1C e 1D) e tenderam a aumentar, assim como a velocidade de germinação (Figura 1B, 1D e 1F), indicando que, dentro de uma faixa definida de grau de umidade, há superação de alguma forma de dormência, explicada pela queda na contagem de semente dormentes e maior germinação acumulada (Figura 1B, 1D e 1F), que, conforme ressaltado por Bewley et al. (2013), é uma indicação da superação de dormência. Esse tipo de comportamento é geralmente observado em sementes de espécies clímax de regiões temperadas ou originadas de regiões subtropicais com maiores altitudes (FONSECA; BARONE, 2003; PAMMENTER; BERJAK, 2000a, 2000b).

Com o avanço da secagem, até próximo a 30% de umidade, maiores percentuais de germinação foram obtidos, além de maior velocidade (Figura 1B, D e F), queda na incidência de dormência e praticamente nenhuma alteração na contagem de sementes mortas ao final do teste de germinação. No entanto, com o avanço da secagem até uma umidade inferior a 30%, os valores de viabilidade (considerando germinação e sementes dormentes) caem rapidamente, chegando a valores próximos de zero com umidade ainda acima de 20%, sendo encontrado nesse ponto, o percentual máximo de sementes mortas.

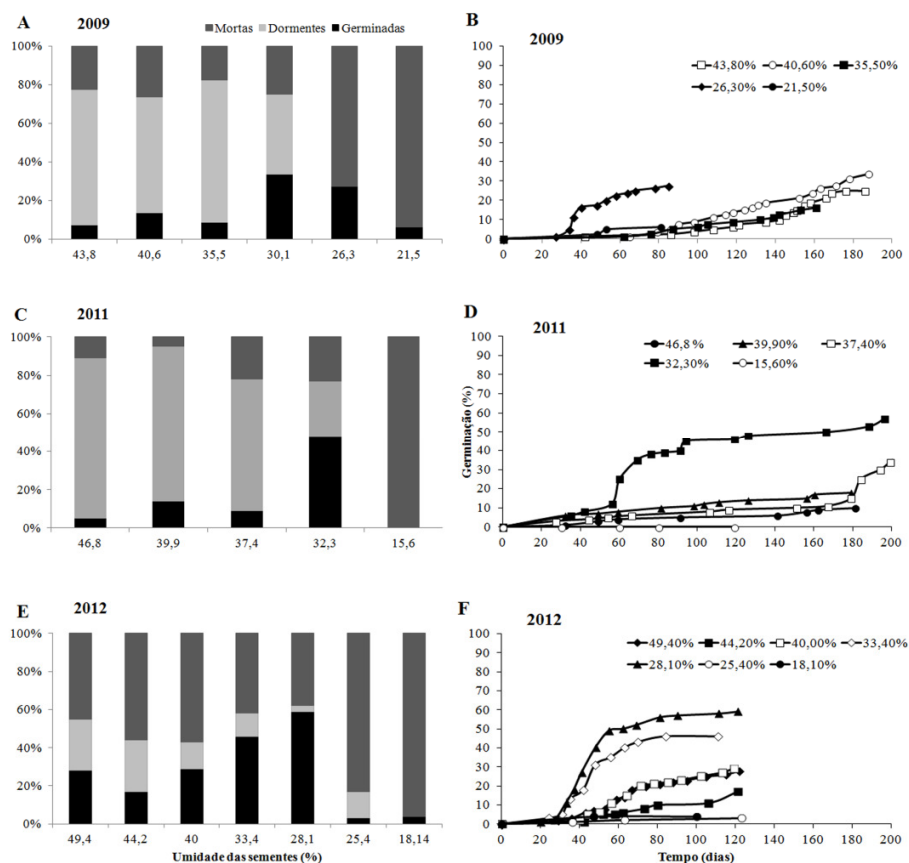


Figura 1 Comportamento de sementes de canela-batalha (*Cryptocarya aschersoniana*) colhidas em 2009, 2011 e 2012, em função de diferentes graus de umidade. A, C e E: percentuais finais obtidos após 120 dias em condições de germinação. B, D e F: percentual de germinação acumulada. Germinação: 2009: NS; 2011: $y = -86,6096 + 7,688x - 0,1239x^2$ ($R^2 = 0,90$); 2012: $y = -105,7266 + 7,9754x - 0,1101x^2$ ($R^2 = 0,52$). Sementes dormentes: 2009: $y = -221,0345 + 12,923x - 0,1432x^2$ ($R^2 = 0,77$); 2011: $y = -49,39 + 2,965x$ ($R^2 = 0,90$); 2012: $y = -13,9854 + 0,7974x$ ($R^2 = 0,87$); Sementes mortas: 2009: $y = 426,1072 - 211732x - 0,2746x^2$ ($R^2 = 0,86$); 2011: $y = 226,1267 - 9,826x + 0,1114x^2$ ($R^2 = 0,80$); 2012: $y = 201,55121 - 7,57451x + 0,09233x^2$ ($R^2 = 0,95$). x = umidade (%).

Esses resultados estão de acordo com os obtidos anteriormente para a mesma espécie por Muxfeldt et al. (2012), sendo que Hirano (2004) sugere que o grau crítico de umidade (ponto a partir do qual há redução significativa da viabilidade) para sementes dessa espécie é entre 31,1 e 27,5% e o grau letal (ponto no qual há perda total da viabilidade) entre 25,8 e 22,8 % de umidade. Vários trabalhos com sementes de algumas espécies da família *Lauraceae*, incluindo a do presente estudo, as classificam como sensíveis à dessecação (CARVALHO, 2000; CARVALHO et al., 2008; MUXFELDT et al., 2012; PIRES et al., 2009; THAPHIYAL; PHARTYAL; NAYAL, 2004; TONETTI, 2000).

Espécies com sementes sensíveis à dessecação são típicas de regiões tropicais, mas também ocorrem em regiões temperadas ou regiões com maiores altitudes que apresentam dispersão no outono-inverno (FONSECA; BARONE, 2003). Nesses casos, sob baixas temperaturas, há também uma menor perda de água, reduzindo o risco de morte por dessecação. Sementes sensíveis de espécies de regiões temperadas são geralmente mais tolerantes à dessecação e tem maior longevidade que as de origem tropical (PAMMENTER; BERJAK, 2000a, 2000b).

Ao longo da secagem, foi possível observar que as células aparentemente não sofreram modificações físicas até o grau de umidade letal, sendo as modificações observadas apenas quando as sementes já se encontravam inviáveis, quando então as células perdem a configuração normal, exibindo dobras nas paredes celulares, bem como uma redução do conteúdo celular (Figura 2B). De acordo com Walters (2000), somente após atingir o grau crítico é que os tecidos começam a exibir dano aparente nas células.

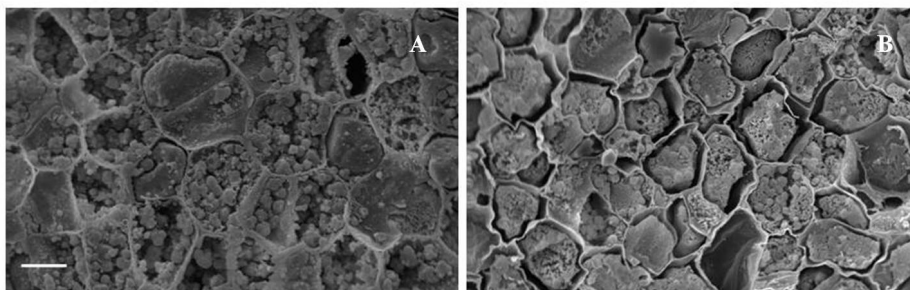


Figura 2 Imagem de microscopia eletrônica de varredura da região de transição do eixo embrionário com os cotilédones de sementes de *Cryptocarya aschersoniana*. A: semente recém-colhida, com 49,4% de umidade; B: semente seca até 18,4% de umidade (barra = 20 μm)

A condição das membranas também pode ter sido comprometida, o que, apesar de não ser visível nas imagens, é indicado pelo aumento das bandas no padrão de esterase observado ao longo da secagem (Figura 3A). A atividade dessa enzima está diretamente ligada à perda da capacidade de estabilização das membranas e sua alteração nos tecidos indica perda da qualidade das mesmas (MARTINS et al., 2012; PADILHA et al., 2001). A ação dessa enzima pode levar à destruição dos lipídeos das membranas, oxidação de aminoácidos, degradação de DNA e proteínas e produção de radicais livres levando à formação de aldeídos tóxicos (MARCOS FILHO, 2005).

Quanto ao padrão de peroxidase, à medida que a secagem avançou, houve intensificação das bandas (Figura 2B). O aumento de uma atividade antioxidante pode estar ligado à alta atividade respiratória dos tecidos ainda muito hidratados (MARTINS; LAGO; SALES, 2009). A maior intensidade das bandas também pode ser um reflexo do estresse iniciado pela secagem, e as sementes, na tentativa de contornar os danos oxidativos, aumentam a expressão/atividade de algum sistema, tentando proteger as células dos efeitos nocivos de radicais livres (LEPRINCE; BUITINK, 2010; MARTINS et al., 2012).

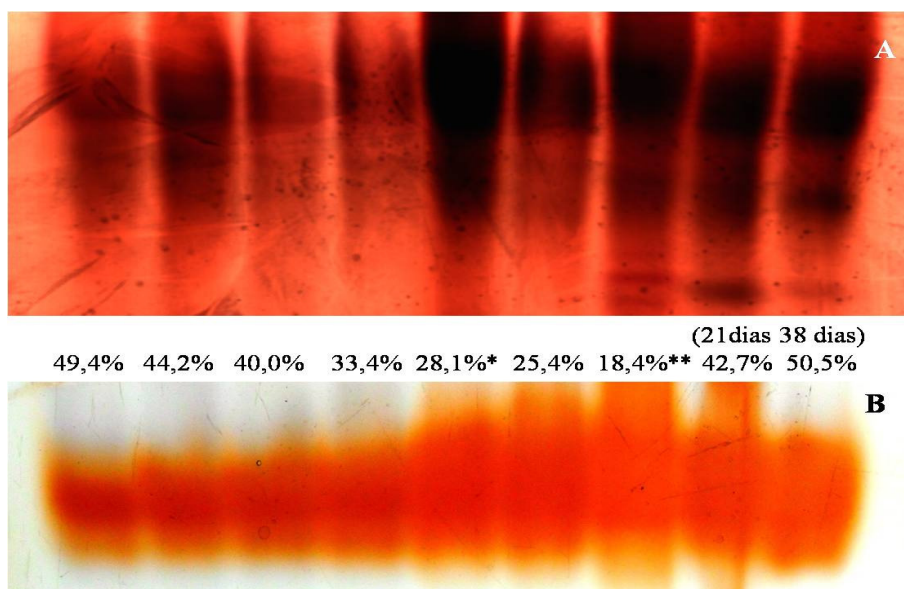


Figura 3 Padrão eletroforético para esterases (A) e peroxidase (B) extraídas de sementes de *Cryptocarya aschersoniana* em diferentes pontos de secagem 21 e 38 dias = sementes deixadas em umidade inicial pelos tempos para secagem a 28,1% (*) e 18,4% (**) de umidade.

Quanto ao padrão eletroforético para proteínas resistentes ao calor, pode-se observar que a presença de bandas só foi notada após o início da secagem (Figura 4). Assim, no momento da dispersão elas estão praticamente ausentes e à medida que a semente é submetida à dessecação, a síntese das mesmas é intensificada, indicando que, com o início da secagem, algum sistema de proteção é ativado. Isso pode ser resultado indireto do acúmulo de outras moléculas protetoras culminando na tentativa de ajustar o potencial osmótico das células (LEPRINCE; BUITINK, 2010). Padrões como esse são observados em sementes ortodoxas durante as fases finais do desenvolvimento, sendo frequentemente associados à aquisição de tolerância à dessecação (WALTERS, 2000).

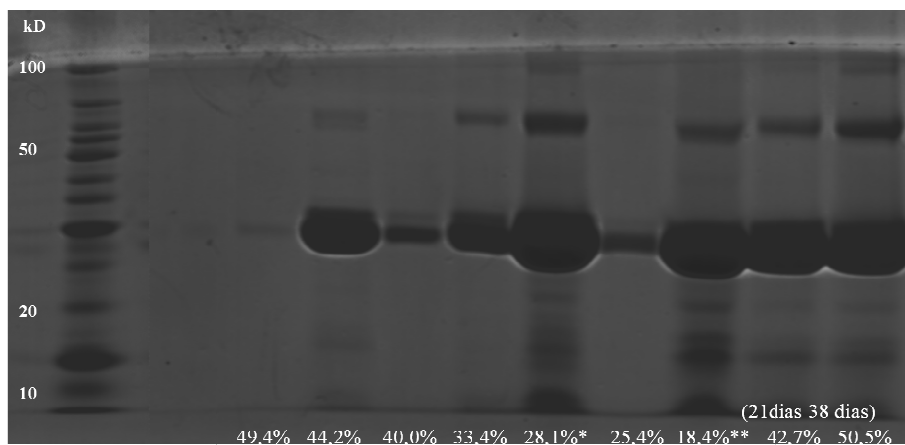


Figura 4 Padrão eletroforético para proteínas resistentes ao calor extraídas de sementes de *Cryptocarya aschersoniana* em diferentes pontos de secagem 21 e 38 dias = sementes deixadas em umidade inicial pelos tempos para secagem a 28,1% (*) e 18,4% (**) de umidade.

Como essas sementes são dispersas sem passar pela fase de secagem, os genes ligados às LEAs estariam presentes, mas não teriam sido ativados, assim como de outras proteínas de choque térmico (KRANNER et al., 2010), que no padrão encontrado também aumentam de intensidade, reforçando a ideia de algum sistema de proteção foi ativado quando as sementes passaram pela secagem artificial, mas, conforme ressaltado por Pammenter e Berjak (1999), vários outros sistemas estão envolvidos na tolerância à dessecação, e apenas um ou poucos, ainda que funcionais, não são suficientes para evitar os danos gerados com o progresso da secagem.

Pode-se observar também que houve síntese das proteínas nas sementes mantidas úmidas pelo mesmo tempo em que as demais foram secas, indicando que há uma resposta das sementes quando são deixadas em condição úmida por alguns dias. Nessas condições, as sementes não encontram um ambiente propício para conduzir seu metabolismo para a germinação, já que ainda há restrição de alguns fatores. Situações como essa podem gerar uma condição de estresse que

culmina em algumas manifestações metabólicas, dentre elas, a síntese de proteínas LEAs, visto que ela aparece também em função de outros estímulos, como no caso de estresses osmóticos ou térmicos (WISE; TUNNACLIFFE, 2004).

Ao longo da secagem houve aumento no teor de sacarose e de rafinose enquanto que outros açúcares não apresentaram mudanças significativas (Figura 5). A sacarose está mais relacionada à disponibilização de reservas, sendo produzida pelas plantas na fotossíntese, como esse não é o caso das sementes, o aumento da quantidade de sacarose pode ter se originado pela beta oxidação de lipídeos (via glicogênica) ou pela degradação do amido (TAIZ; ZEIGER, 2009) que aparece muito abundante nas células, como evidenciado pela reação com lugol (Figura 6A e 6B).

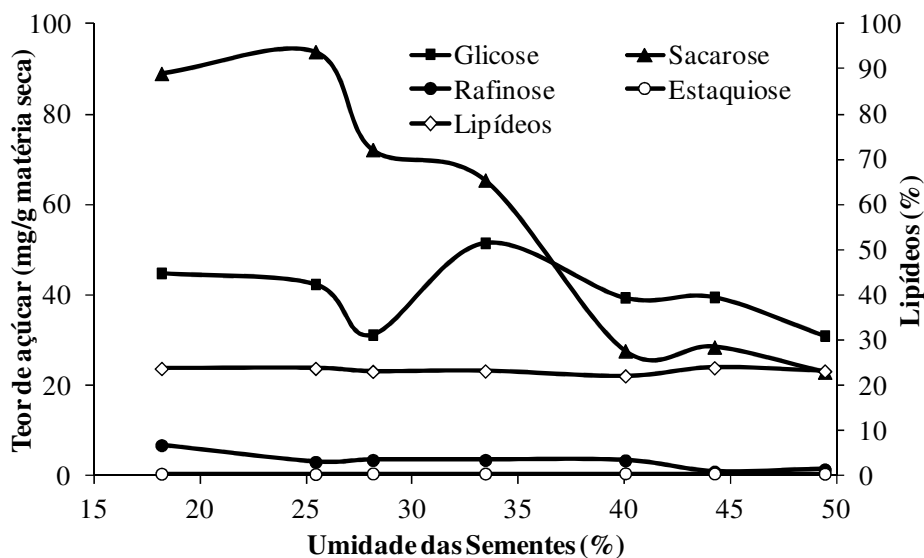


Figura 5 Quantificação de lipídeos e açúcares em sementes de *Cryptocarya aschersoniana* em diferentes pontos de secagem. Glicose: NS; Rafinose: $y=8,2599-0,1458x$ ($R^2=0,51$); Sacarose: $y=146,016-2,606x$ ($R^2=0,75$); Estaquiase: NS; Lipídeos: NS. y =umidade (%)

A sacarose é um carboidrato utilizado pelas células como fonte de energia para consumo imediato, sendo bastante comum em sementes com tolerância à dessecação (LEDUC, 2007). Quando em associação com rafinose, a sacarose aparece também promovendo proteção das membranas ou na formação do estado vítreo das células, reduzindo as reações químicas (WALTERS, 2000), diminuindo assim, o risco de reações deletérias nas sementes. Eventos como esses podem ser encontrados em sementes sensíveis à dessecação (KERMODE; FINCH-SAVAGE, 2002), onde alguns mecanismos de proteção estão presentes, mas não são suficientes para proteger as mesmas dos danos causados pela dessecação (PAMMENTER; BERJAK, 1999).

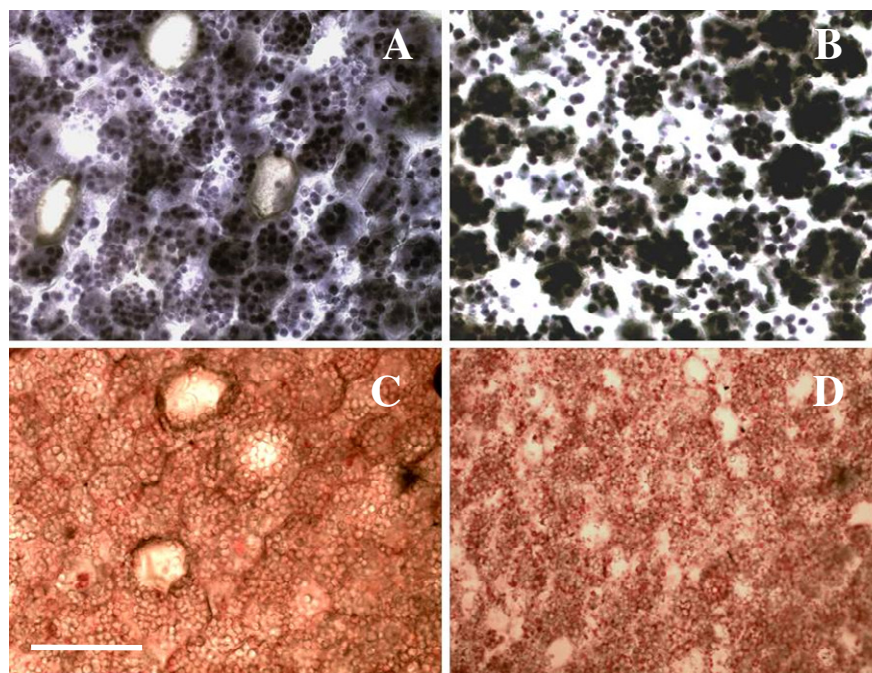


Figura 6 Testes histoquímicos em sementes de *Cryptocarya aschersoniana*. A e B: Reação com Lugol, em sementes com 49,4 e 18,4 % de umidade, respectivamente; C e D: reação com Sudam em sementes com 49,4 e 18,4 % de umidade, respectivamente (barra = 100 μ m).

À medida que as sementes secaram, não houve alteração significativa na quantidade de lipídeos (Figura 5), mas aparentemente houve mudanças na forma como estão armazenados nas células, conforme evidenciado na reação com Sudan (Figura 6C e 6D). Essa informação, juntamente com os resultados obtidos pelo padrão eletroforético para peroxidase (Figura 3B), indicam uma possível peroxidação dos lipídeos que geralmente leva à liberação de peróxidos que ataca membranas (ricas em lipídeos insaturados) levando as sementes à perda da viabilidade (MARCOS FILHO, 2005).

O tempo de secagem para o lote de 2012, nas condições do experimento, se prolongou por até 38 dias (Figura 7), sendo que, durante esse tempo, as perdas na qualidade das sementes foram em função da perda de água e do tempo em que as sementes ficaram expostas às condições de temperatura aliada à umidade das sementes (49,4% de umidade inicial). Pode-se observar que há perda da viabilidade das sementes com o tempo, em qualquer das condições de umidade, visto que o percentual de sementes mortas aumenta à medida que o tempo avança (Tabela 1). Os maiores percentuais de sementes mortas são observados após o período de 38 dias, sejam elas secas a 18,1% de umidade ou mantidas com o teor de água original.

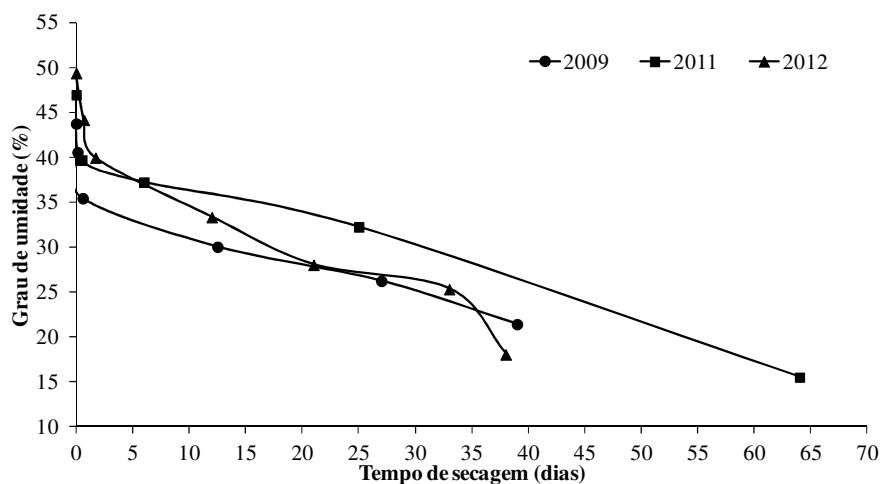


Figura 7 Curvas de secagem de sementes de *Cryptocarya aschersoniana* em sílica gel, colhidas em 2009, 2011 e 2012.

Tabela 1 Médias de germinação de sementes de *Cryptocarya aschersoniana*, sementes dormentes e mortas, após 120 dias em condição de teste de germinação.

Condição	Germinação	Sementes dormentes	Sementes mortas
Recém-colhida	28 b	27 c	45 a
Úmida (21 dias)	26 b	16 bc	58 ab
Úmida (38 dias)	20 bc	12 bc	68 b
Seca por 21 dias	59 a	3 ab	38 a
Seca por 38 dias	4 c	0 a	96 c
CV (%)	27,7	15,6	55,9

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

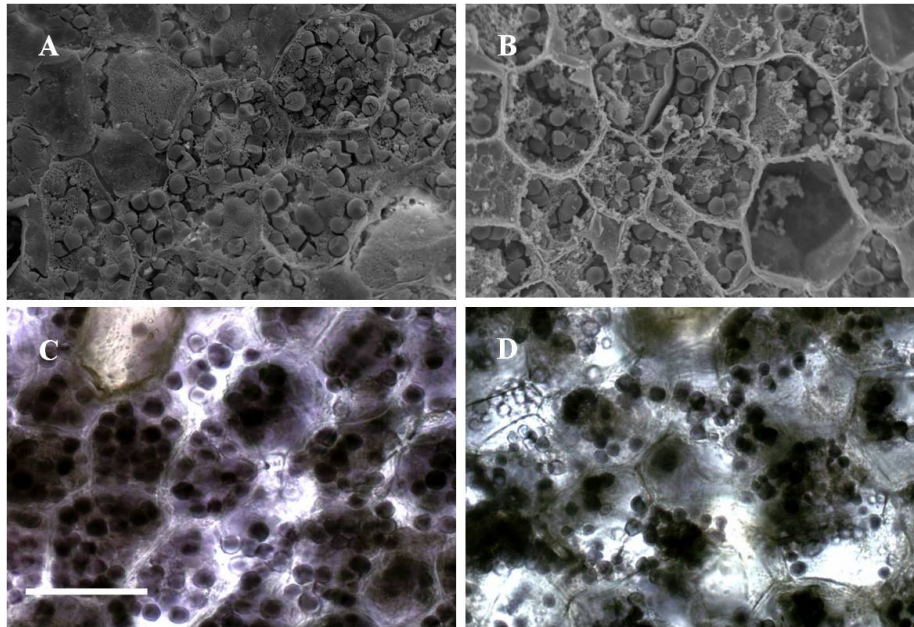


Figura 8 Microscopia eletrônica de varredura (A e B) e reação com Lugol (C e D) em sementes de *Cryptocarya aschersoniana*. A e C: sementes recém-colhidas; B e D: sementes mantidas com umidade inicial após 38 dias de armazenamento a 20°C (barra = 50 μ m).

4 CONCLUSÕES

Sementes de *Cryptocarya aschersoniana* são sensíveis à dessecação sendo que o grau crítico de umidade se situa entre 28,1 e 26,3 e o grau letal entre 21,5 e 18,1%.

Sementes de *Cryptocarya aschersoniana* são dispersas dormentes, sendo essa dormência, em parte, superada por secagem parcial, respeitando o limite mínimo para secagem de 28,1% de umidade.

Alguns sistemas de proteção à dessecação estão presentes em sementes de *Cryptocarya aschersoniana* (como síntese de proteínas resistentes ao calor e aumento nas concentrações de sacarose e rafinose) durante a secagem.

Os padrões eletroforéticos para esterases e peroxidase indicaram perda da qualidade das sementes quando elas se aproximaram do grau crítico de umidade, constituindo-se em possíveis indicadores de qualidade de lotes de sementes de *Cryptocarya aschersoniana*, visto que essa perda está ligada a danos irreversíveis no sistema de membranas.

Mudanças ultraestruturais foram observadas apenas no ponto em que as sementes já se encontravam totalmente inviáveis.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 2009. 399 p.
- CARVALHO, L. R. **Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais quanto à capacidade de armazenamento**. 2000. 97 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- CARVALHO, L. R. **Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais quanto à capacidade de armazenamento**. 2000. 97 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- CARVALHO, L. R. et al. Classificação de sementes de espécies florestais dos gêneros *Nectandra* e *Ocotea* (Lauraceae) quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 1-9, 2008.
- FONSECA, S. C. L.; BARONE, H. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 2, p. 297-303, 2003.
- HIRANO, E. **Maturação fisiológica, tolerância à dessecação e conservação de sementes de lauráceas da mata de araucária de Santa Catarina**. 2004. 130 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- KERMODE, A. R.; FINCH-SAVAGE, B. E. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Londres: CABI, 2002. p. 149-184.

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, Cambridge, v. 188, p. 655-673, 2010.

LEDUC, S. N. M. **Indução de tolerância a dessecação e variações de carboidratos solúveis em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (Pau-Brasil) durante a maturação.** 2007. 117 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2007.

LEPRINCE, O.; BUITNK, J. Desiccation tolerance: from genomics to the field. **Plant Science**, Limerick, v. 179, n. 6, p. 554-564, 2010.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa: Plantarum, 1998. 352 p.

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

MARTINS, D. C. et al. Physiological maturity of eggplant seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 534-540, 2012.

MARTINS, L.; LAGO, A. A.; SALES, W. R. M. Conservação de sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex A.DC.) Standl) em função do teor de água das sementes e da temperatura de armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 86-95, 2009.

MUXFELDT, R. E. et al. Utilização do teste de raios-X na avaliação dos efeitos da dessecação e infestação em diásporos de canela batalha *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae). **Cerne**, Lavras, v. 18, n. 4, p. 654-666, 2012.

OLIVEIRA FILHO, A. T. **TreeAtlas 2.0, Flora arbórea da América do Sul cisandina tropical e subtropical**: um banco de dados envolvendo biogeografia, diversidade e conservação. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2010. Disponível em: <<http://www.icb.ufmg.br/treeatlan/>>. Acesso em: 18 jan. 2013.

PADILHA, L. et al. Relação entre o teste de deterioração controlada e o desempenho de sementes de milho em diferentes condições de estresse. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 198-204, 2001.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 9, p. 13-37, 1999.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Aspects of recalcitrant seed physiology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, n. 12, p. 56-69, 2000a. Especial.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Evolutionary and ecological aspects of recalcitrant seed biology. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 10, p. 301-306, 2000b.

PIRES, L. A. et al. Germination of *Ocotea pulchella* (Nees) Mez (Lauraceae) seeds in laboratory and natural restinga environment conditions. **Brazilian Journal of Biology**, Campinas, v. 69, n. 3, p. 935-942, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

THAPLIYAL, R. C.; PHARTYAL, S. S.; NAYAL, J. S. Germination, desiccation tolerance and storage of seed of a tropical evergreen tree - *Cryptocarya floribunda* Nees (Lauraceae). **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 32, n. 2, p. 537-545, 2004.

TONETTI, O. A. O. **Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de canela-batalha (*Cryptocarya aschersoniana*) – Mez**. 2000. 22 p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

TWEDLE, J. C. et al. Ecology of seed desiccation sensitivity. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 91, p. 294-324, 2003.

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

WISE, M. J.; TUNNACLIFFE, A. POPP the question: what do LEA proteins do? **Trends in Plant Science**, Berlin, v. 9, n. 1, p. 13-17, 2004.

ARTIGO 2

Desempenho fisiológico e alterações celulares de sementes de *Cryptocarya aschersoniana* armazenadas

RESUMO

Várias espécies de lauráceas encontram-se classificadas no grupo ecológico das clímax, com produção irregular de sementes, sendo essas, geralmente sensíveis à dessecação. Fatos que comprometem a disponibilidade de sementes e dificulta sua conservação, visto que as mesmas precisam ser mantidas úmidas pelo menos o suficiente para que o metabolismo não seja interrompido durante o armazenamento. Este trabalho teve por objetivo estudar as características fisiológicas e celulares de sementes de *Cryptocarya aschersoniana* armazenadas. Sementes foram obtidas de frutos colhidos e beneficiados em dois anos. Uma parte das sementes foi mantida na umidade original e outra seca até a umidade alvo de 35%, ambas foram armazenadas em sacos plásticos semipermeáveis, em câmara fria (5°C/40% UR). Aos 0, 3, 6 e 12 meses foram retiradas amostras e realizados testes de umidade, germinação, análises ultraestruturais por microscopia eletrônica de varredura e análises por microscopia ótica (com reação para compostos fenólicos, amido e lipídeos). Os resultados encontrados permitem concluir que, nessas condições de armazenamento, sementes de *Cryptocarya aschersoniana* se mantêm viáveis por pelo menos 12 meses, independentes de serem mantidas na umidade de dispersão ou secas até o grau de umidade de 35,5%. As sementes são dispersas com dormência, que é superada pelo armazenamento em câmara fria por pelo menos 6 meses. Análises por microscopia indicam que há síntese de compostos fenólicos em sementes armazenadas e, para sementes armazenadas úmidas, as reservas são, em parte, consumidas durante o período de armazenamento avaliado, podendo levar à perda da viabilidade em períodos superiores a 12 meses.

Palavras-chave: Lauaceae. Armazenamento. Análises ultraestruturais. Histoquímica.

ABSTRACT

Physiological performance and cellular changes in stored seeds of *Cryptocarya aschersoniana*. Several species of Lauraceae family are classified as climax, regarding ecological group, with irregular production of seeds, which are generally sensitive to desiccation. These characteristics compromise their availability and storage, since they need to be kept moist at least enough so that the metabolism is not interrupted during storage. This study aimed to analyze the cellular and physiological characteristics of stored seeds of *Cryptocarya aschersoniana*. Seeds were obtained from fruits harvested and processed in two years. Part of the seeds was kept at its original moisture content and other was dried to the target moisture content (35%), and stored in semipermeable plastic bags in a cold room (5°C/40% RH). At 0, 3, 6 and 12 months samples were taken for evaluation of moisture content, germination, ultrastructural analysis by scanning electron microscopy and optical microscopy analyzes (with reaction for phenolics, starch and lipids). The results indicate that, under these storage conditions, seeds remain viable for at least 12 months, independent of being kept at their original moisture content or dried to 35.5%. The seeds are dispersed with dormancy, which is overcome by the cold storage for at least 6 months. Analysis by microscopy indicated that there is synthesis of phenolic compounds during storage and, for seeds stored without drying, reserves are partly consumed during the storage period assessed, which can lead to loss of viability if longer than 12 months.

Keywords: Lauraceae. Storage. Ultrastructural analysis. Histochemistry.

1 INTRODUÇÃO

A família Lauraceae é uma das mais expressivas nas formações florestais brasileiras, com espécies frequentemente encontradas em matas ciliares remanescentes da região Sudeste do Brasil. Várias espécies dessa família encontram-se classificadas no grupo ecológico das clímax (LORENZI, 1998), com produção irregular de sementes, sendo essas, geralmente sensíveis à dessecação, fatos que comprometem a disponibilidade de sementes.

Para serem armazenadas, é necessário que as sementes tenham sua umidade reduzida, desse modo, a conservação de sementes sensíveis à dessecação é dificultada, visto que as mesmas precisam ser mantidas úmidas pelo menos o suficiente para que o metabolismo não seja interrompido (WALTERS et al., 2001). Sementes de espécies tropicais sensíveis à dessecação, quando conservadas, precisam manter-se úmidas e exigem condições que permitam trocas gasosas. Ainda assim, raramente a viabilidade é mantida por longos períodos, visto que, com o metabolismo ativo, as sementes podem germinar durante o armazenamento ou, quando não há água suficiente para a germinação se completar, o consumo exagerado de suas reservas pode levar à perda da viabilidade por exaustão (MARCOS FILHO, 2005).

Algumas alternativas têm sido propostas para a conservação de sementes recalcitrantes, dentre elas a remoção da água livre, procedimento que favorece a manutenção da viabilidade, baixando as taxas metabólicas (BONJOVANI; BARBEDO, 2008; WALTERS, 2000). Algumas vezes, além de diminuir o metabolismo, essa secagem parcial pode também favorecer a qualidade das sementes ao provocar um estresse moderado que gera alguma resposta positiva nas sementes.

Alguns estudos com sementes de *Cryptocarya aschersoniana* afirmam que as mesmas sejam sensíveis à dessecação (CARVALHO, 2000; HIRANO,

2004; MUXFELDT et al., 2012), sendo que as sementes são dispersas no final da estação chuvosa (LORENZI, 1998), exigindo, muitas vezes, um armazenamento, ainda que por curtos períodos, permitindo a semeadura em épocas mais favoráveis. Há relatos de sucesso em armazenamento de sementes de outras espécies de lauráceas por curto prazo (CARVALHO et al., 2008). Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as alterações fisiológicas e celulares em sementes de *Cryptocarya aschersoniana* durante 12 meses de armazenamento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização do material

Frutos maduros (indicado pela coloração amarela) de *Cryptocarya aschersoniana* foram colhidos na região de Lavras, MG, no mês de fevereiro de 2009 e de 2011. O beneficiamento foi feito sob água corrente, friccionando os frutos sobre uma peneira até a completa remoção da polpa, sendo consideradas “sementes” as estruturas de dispersão, formadas pela semente dentro de um endocarpo lenhoso. Essas foram deixadas em camada única, ao ar livre até perda da água superficial, passando a ser denominadas sementes recém-colhidas.

Uma parte das sementes foi mantida na umidade inicial e outra passou por uma pré-secagem até umidade alvo de 35%, em caixas plásticas contendo sílica gel no fundo, em uma sala climatizada (20°C). A sílica gel foi trocada sempre que a cor do indicador de umidade (azul) se tornou pálida, mantendo uma condição interna nas caixas de 20°C e UR entre 13,5 e 40%. A umidade alvo de 35% foi escolhida, pois apesar de não promover aumento nas taxas de germinação, abaixo desse ponto o risco de perda da viabilidade das sementes aumenta (TONETTI, 2000).

Do material biológico assim obtido, foram retiradas amostras para a caracterização fisiológica inicial (teste de umidade e germinação) e análise de imagens (microscopia de luz e eletrônica) conforme descritos a seguir.

2.1.1 Teste de umidade

O teste de umidade foi feito pelo método de estufa $103 \pm 2^\circ\text{C}/17 \pm 1\text{h}$ (BRASIL, 2009), com 4 repetições de 5 sementes cortadas. Foram utilizados

como recipiente barquetes de papel alumínio e o resultado foi a média das 4 repetições calculadas em base úmida.

2.1.2. Teste de germinação

O teste de germinação foi feito com 4 repetições de 25 sementes, previamente lavadas em hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos. As sementes foram dispostas entre areia autoclavada, em bandejas plásticas (27 x 40 cm), em germinador tipo *Mangelsdorf*, a 25°C, com luz contínua. Foram consideradas germinadas as sementes que deram origem a plântulas normais, em um período de 120 dias. Ao final do teste, as sementes que não germinaram foram cortadas e submetidas ao teste de tetrazólio (0,5% / 25°C / 24 h), sendo consideradas viáveis as sementes que apresentaram coloração rósea/vermelha evidenciando atividade respiratória nos tecidos.

2.1.3 Análise ultraestrutural

As amostras foram analisadas quanto à ultraestrutura, via microscopia eletrônica de varredura, sendo preparadas de acordo com o protocolo utilizado pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica/UFLA, com algumas adaptações, conforme descrito a seguir.

As amostras foram compostas de 5 sementes cortadas transversalmente na região do eixo embrionário e fixadas em solução *Karnovsky* modificado (glutaraldeído 2,5%; formaldeído 2,5%, em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2, CaCl₂ 0,001M) por pelo menos 24 horas. Os espécimes foram cortados com lâmina de barbear, formando a superfície de observação, lavados em água destilada e desidratados em série crescente de acetona (25, 50, 75, 90 e 100 %), por 10 minutos em cada concentração, sendo que as amostras foram mantidas na

concentração de 100% por três vezes. As amostras, já desidratadas, foram transferidas para um aparelho de ponto crítico modelo (Bal-Tec) para a evaporação da acetona sem perda da conformação dos tecidos.

As amostras secas foram coladas em *stubs* revestidos com papel alumínio, sobre fita de carbono, submetidas ao processo de metalização em um evaporador de ouro *Sputter Coater SCB 050* e examinadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura (LEO EVO 40 XVP), sendo as observações concentradas na região de transição do eixo embrionário para os cotilédones e registradas em velocidade de 9v. Foram consideradas como padrão as características encontradas em todas as 5 amostras analisadas para cada ponto.

2.1.4 Testes histoquímicos

As amostras foram preparadas a partir de 5 sementes, em cortes manuais com lâmina de barbear, mantendo cortes de cada sementes em separado. As seções foram mantidas em água destilada, sendo posteriormente transferidas para soluções específicas, de acordo com o composto a ser identificado, conforme descrito a seguir.

Presença de compostos fenólicos

As seções foram transferidas para uma solução de dicromato de potássio (10%) e mantidas por 10 minutos. Em seguida foram lavadas em água destilada, transferidas para uma lâmina contendo água glicerinada, cobertas com lamínula e observadas em microscópio. A presença de compostos fenólicos foi identificada pela coloração marrom.

Identificação de amido

As seções foram mantidas em solução de lugol “fraca” (0,02% de iodo livre) por 30 segundos, transferidas diretamente para uma lâmina contendo água, cobertos com lamínula e na sequência visualizadas em microscópio. Áreas ricas em amido foram identificadas pela coloração roxa/negra nas imagens.

Presença de lipídeos

As seções foram transferidas para uma solução de Sudan (3% em álcool etílico 70%), e mantidas por 10 minutos. Em seguida foram lavadas em álcool etílico 70%, transferidas para uma lâmina contendo água glicerinada cobertas com lamínula e observadas em microscópio. Áreas ricas em lipídeos foram identificadas pela coloração laranja produzida.

As análises foram feitas em um microscópio *Olympus* BX 51, sendo as imagens registradas em câmara *Olympus* C 5060-ADU utilizando o sistema de análise de imagens *Image – Pro-plus 5.1*, com as observações se concentrando na região de transição do eixo embrionário com os cotilédones. Como controle foram analisados cortes sem que passassem por nenhuma solução prévia, para verificação do aspecto dos tecidos.

2.2 Armazenamento

Após realizados os testes iniciais, as amostras nas duas umidades, foram armazenadas em câmara fria (5°C/40% UR), em embalagens semipermeáveis (caracterizadas por sacos plásticos selados e furados com estilete), sendo que, aos 3, 6 e 12 meses amostras foram retiradas e as avaliações foram repetidas para comparação com a condição original.

2.3 Análise dos dados

Todos os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram testados quanto à normalidade sendo determinadas as curvas, bem como suas equações e determinado o valor de R^2 para cada curva apresentada, em cada variável de interesse, pelo Pacote Estatístico R.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos resultados iniciais, verificou-se que as sementes colhidas em 2009 se encontravam com 40,6% de umidade e 15,4% de germinação e as colhidas em 2011, 47,0% de umidade e 10% de germinação. Após a pré-secagem, atingiram, respectivamente, 35,5% de umidade, com 8,7% de germinação e 37,3% de umidade, com 9% de germinação. A umidade das sementes se manteve estável durante os 12 meses de armazenamento, não variando significativamente ($p < 0,05$).

Após o armazenamento, para as sementes colhidas nos dois anos, foram registrados aumentos no percentual de germinação, sendo os maiores observados após 6 meses, para o lote de 2009 (Figura 1A e 1C) e após 3 meses de armazenamento para o lote de 2011 (Figura 1E e 1G) sendo que após esses períodos, o total de germinação se manteve estável até os 12 meses, para ambos os lotes.

Durante o período de armazenamento, após as sementes atingirem os maiores valores de germinação, não houve diferença significativa na germinação final dentro de cada lote armazenado, mas pode-se observar uma tendência de maior velocidade de germinação nos lotes armazenados úmidos a partir de 6 meses de armazenamento (Figura 1B e 1F).

A redução da umidade não influenciou o percentual final de germinação ($p < 0,05$), mas houve um atraso na germinação das sementes armazenadas com pré-secagem (Figura 1D e 1H) em relação àquelas mantidas úmidas (Figura 1B e 1F). Segundo Walters (2000), a redução da água livre por uma secagem parcial favorece a longevidade, baixando as taxas metabólicas além de, algumas vezes, provocar um pequeno estresse, que pode gerar alguma resposta positiva nas sementes, no entanto, neste estudo, isso parece não ter acontecido.

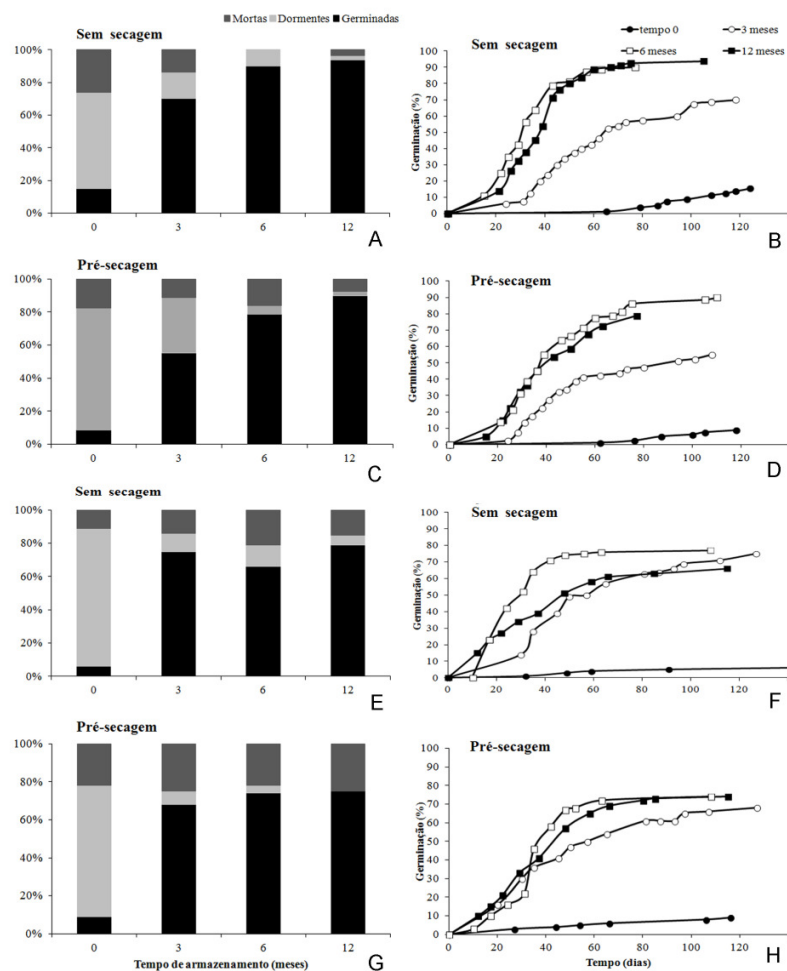


Figura 1 Comportamento de sementes de canela-batalha (*Cryptocarya aschersoniana*) armazenadas em câmara fria (5°C/40%UR). A, B, C e D - Sementes dem2009; E, F, G e H - Sementes de 2011. A, C, E e F = total aos 120 dias; B, D, F e H = germinação diária. Equações, (na ordem para recém-colhidas e com secagem. Germinação: 2009: $y=16,5+19,833x-1,111x^2$ ($R^2=0,92$) e $y=9,6023+16,9413x-0,8554x^2$ ($R^2=0,89$); 2011: ($y = 6+43,361x-8,014x^2+0,409x^3$ ($R^2=0,89$) e $y=9+32,6111x-5x^2+0,2284x^3$ ($R^2=0,81$); Sementes dormentes:2009: $y=43,25-4,071x$ ($R^2=0,59$) e $y=58,25-5,619x$ ($R^2=0,68$); 2011: $y=55,60-5,21x$ ($R^2=0,51$) e $y=45-4,762x$ ($R^2=0,53$); Sementes mortas: 2009: $y=26,05-6,0928x+0,3504x^2$ ($R^2=0,66$) e $y =16,0618-0,2197x-0,03788x^2$ ($R^2=0,55$); 2011: NS. x=tempo (meses).

O armazenamento das sementes em condição de alta umidade (acima de 35%) e em temperatura relativamente baixa (5°C) favoreceu o total de germinação a cada período de avaliação para o lote de 2009 (Figura 1A e 1C) e para o lote de 2011 (Figura 1E e 1G). Esses resultados sugerem que a baixa germinação inicial é devido a algum tipo de dormência, o que pode ser verificado pela mudança no padrão das curvas de germinação acumulada, como ressaltado por Bewley et al. (2013) e que as condições encontradas durante o armazenamento promoveu um ambiente propício para sua superação (Figura 1B, 1D, 1F e 1H).

O comportamento verificado pode estar relacionado à ecologia da espécie, mostrando uma adaptação da espécie às condições de ocorrência natural, visto que *C. aschersoniana* é típica de matas de pinhais, e, em regiões de menores latitudes, aparece com frequência nas áreas mais altas das florestas (LORENZI, 1998). Sua dispersão é no final da estação chuvosa (HIRANO, 2004) havendo a necessidade de atravessar uma estação fria e seca, se mantendo dormentes até que as condições sejam favoráveis para a germinação e o desenvolvimento das plântulas. Adaptações parecidas são comuns em sementes sensíveis à dessecação típicas de regiões frias (recalcitrantes temperadas), que, geralmente dispersam no outono e precisam atravessar o inverno sem germinar, o que justifica a presença de dormência e de alguma estratégia para diminuir a perda de água (BEWLEY et al., 2013; PAMMENTER; BERJAK, 2000).

Resultados similares para armazenamento de sementes de lauráceas foram encontrados para 4 espécies após 4 meses em temperaturas de 4 a 10 °C (HIRANO, 2004), para *Nectandra nitidula* após 90 dias e *Nectandra lanceolata* após 180 dias de armazenamento (CARVALHO, 2006). Sementes de *Persea pyrifolia* e de *Cryptocarya aschersoniana* também tiveram a dormência superada quando armazenadas úmidas durante 3 meses em câmara fria (CARVALHO, 2000). Para sementes de *Quercus ilex*, uma espécie tomada

como modelo de recalcitrante e dormente, o armazenamento das sementes entre areia úmida a 3°C favoreceu a germinação a partir de um mês de armazenamento (PASQUINI et al., 2011).

Não foram observadas diferenças significativas na quantidade de sementes mortas ao final do teste de germinação para sementes de 2011 ($p < 0,05$), sendo essa variável significativa apenas para o lote de 2009. Pelas imagens obtidas pela microscopia de varredura (Figura 2), pode-se verificar que não houve danos à estrutura celular ao longo do armazenamento. No entanto, é possível verificar que, nas sementes armazenadas úmidas (Figura 2B), as reservas formadas por grânulos de amido aparecem menores e em menor quantidade se comparadas com aquelas secas e armazenadas (Figura 2D).

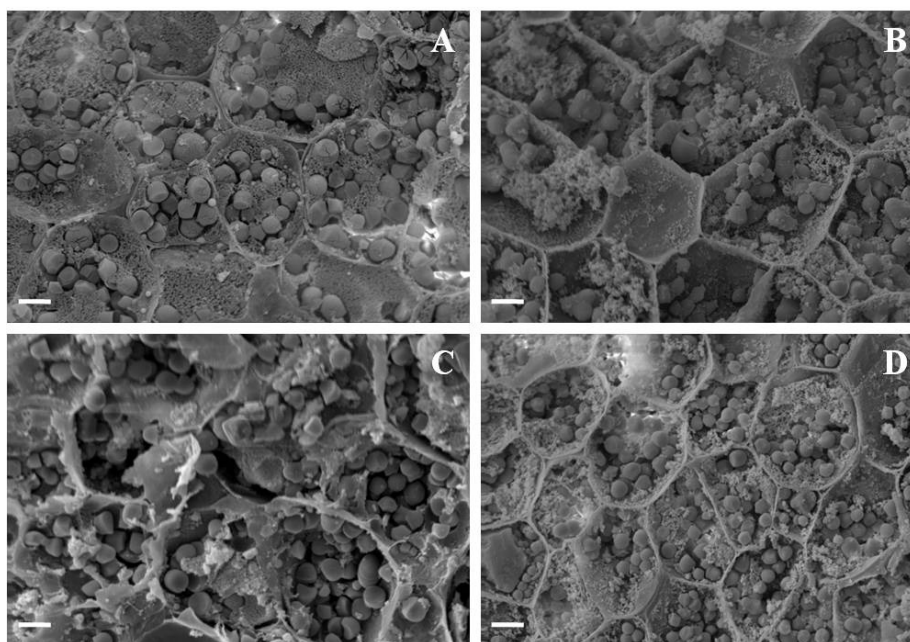


Figura 2 Imagem da região de transição do eixo embrionário com os cotilédones de sementes de *Cryptocarya aschersoniana*, por microscopia eletrônica de varredura. A e B = sementes úmidas aos 0 e 12 meses de armazenamento. C e D = sementes com pré-secagem aos 0 e 12 meses de armazenamento (barra = 10 μm).

A redução das taxas metabólicas é essencial para a conservação das sementes em longo prazo, o que pode ser conseguido diminuindo a quantidade de água livre (WALTERS, 2000; WALTERS; HILL; WHEELER, 2005) em combinação com a redução da temperatura, que impedem o avanço do processo germinativo (HONG; ELLIS, 2002). No entanto, neste estudo, mesmo em temperaturas reduzidas, o metabolismo que permaneceu ativo durante o armazenamento, provavelmente foi ainda em maior intensidade nas sementes sem secagem. Durante o período avaliado, não houve queda na germinação, mas, caso o armazenamento seja prolongado, o consumo das reservas (Figura 2B), pode levar a perda da viabilidade (MARCOS FILHO, 2005), como foi verificado por Faria et al. (2006) em sementes de *Inga vera* e por Tonetti et al. (2011) em sementes germinadas de *Sesbania virgata*.

Pelos resultados encontrados nos testes histoquímicos, pôde-se observar que, a única mudança visível foi na quantidade de compostos fenólicos que aumentou durante o armazenamento (Figuras 3A e 3B), não havendo mudanças no padrão das reações para amido e lipídeos (Figuras 3C, 3D, 3E e 3F).

O acúmulo de compostos fenólicos ocorreu simultaneamente à redução na dormência das sementes. No entanto, como esses compostos não foram identificados, sua origem é incerta, podendo inclusive, serem derivados de algum processo deletério como a peroxidação de lipídeos (MARCOS FILHO, 2005). Esse aumento observado pode indicar que as sementes estão próximas de perder sua viabilidade, como foi verificado em sementes de soja que passaram por envelhecimento acelerado, e que, apesar de manterem a germinação alta, tiveram o vigor reduzido à medida que aumentava a concentração de compostos fenólicos (AVILA et al., 2012). No entanto, em alguns casos, compostos fenólicos podem sofrer oxidação e ter seu conteúdo diminuído durante o armazenamento, conforme verificado por Silva et al. (2011) em sementes de *Tabebuia serratifolia* armazenadas por 12 meses.

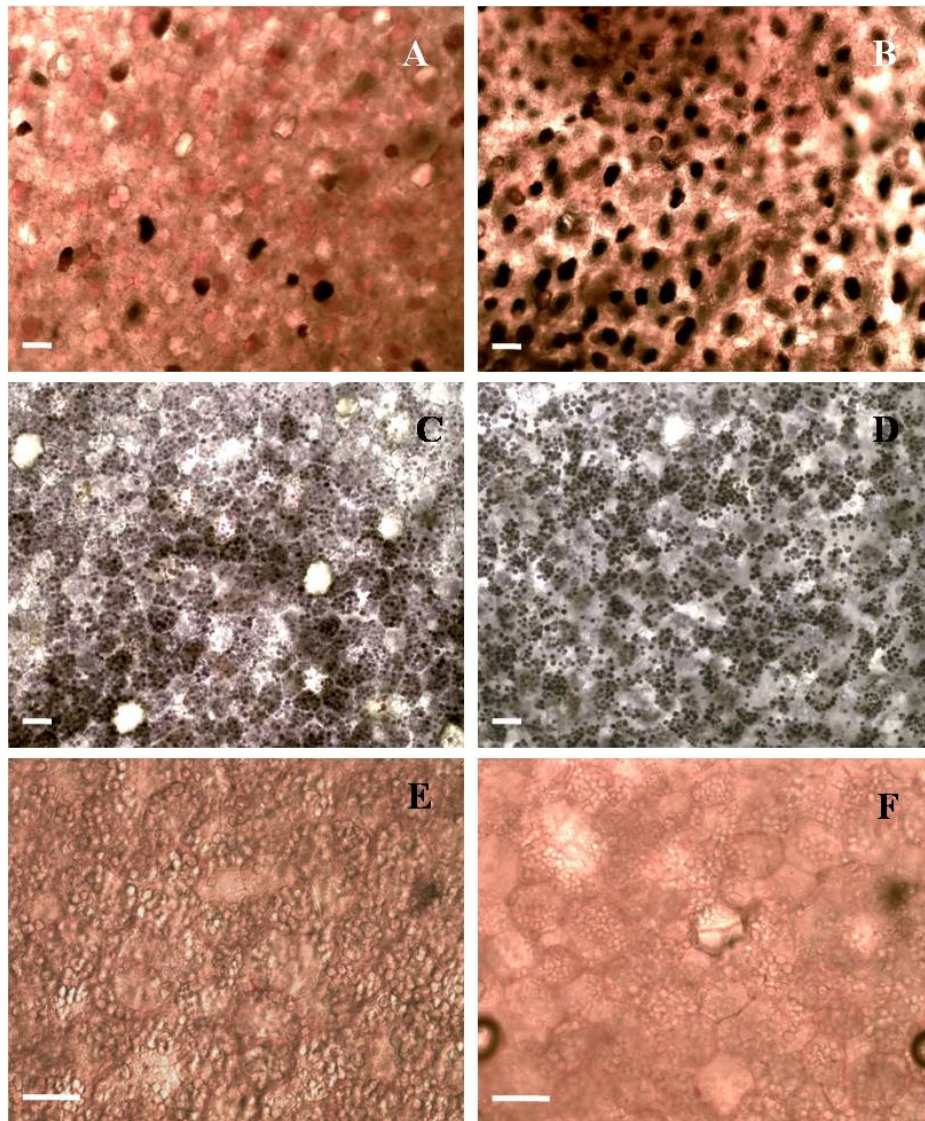


Figura 3 Testes histoquímicos em sementes de *Cryptocarya aschersoniana*. A, C e E = sementes recém-colhidas; B, D e F = sementes armazenadas úmidas por 12 meses. A e B = reação com dicromato de potássio; C e D = reação com lugol; E e F = reação com (barra = 100 μ m).

4 CONCLUSÕES

Sementes de *Cryptocarya aschersoniana* embaladas em sacos plásticos e mantidas em câmara fria (5°C/40%UR) se mantêm viáveis por pelo menos 12 meses, independentes de serem mantidas na umidade de dispersão ou secas até o grau de umidade de 35,5%.

Sementes de *Cryptocarya aschersoniana* são dispersas com dormência que é superada durante o armazenamento em câmara fria (5°C/40%UR).

Análises por microscopia indicam que, para sementes de *Cryptocarya aschersoniana* armazenadas em câmara fria, há síntese de compostos fenólicos e que, para sementes mantidas úmidas, as reservas são, em parte, consumidas pelo metabolismo, conduzindo as mesmas a uma perda da viabilidade em períodos superiores a 12 meses.

REFERÊNCIAS

- AVILA, M. R. et al. Physiological quality, content and activity of antioxidants in soybean seeds artificially aged. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 397-407, 2012.
- BEWLEY, J. D. et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3rd ed. New York: Springer, 2013. 376 p.
- BONJOVANI, M. R.; BARBEDO, C. J. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subesp. *affinis* (DC)T.D. Penn. toleram temperatura sub-zero. **Revista Brasileira de Botânica**. São Paulo, v. 31, n. 2, p. 345-356, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 2009. 399 p.
- CARVALHO, L. R. **Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais quanto à capacidade de armazenamento**. 2000. 97 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, 2000.
- CARVALHO, L. R. **Conservação de sementes de espécies dos gêneros *Nectandra*, *Ocotea* e *Persea* (Lauraceae)**. 2006. 75 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- CARVALHO, L. R. et al. Classificação de sementes de espécies florestais dos gêneros *Nectandra* e *Ocotea* (Lauraceae) quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 1-9, 2008.
- FARIA, J. M. R. et al. Physiological and cytological aspects of *Inga vera* subsp. *affinis* embryos during storage. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. , n. 4, p. 503-513, 2006.

HIRANO, E. **Maturação fisiológica, tolerância à dessecação e conservação de sementes de lauráceas da mata de araucária de Santa Catarina.** 2004. 143 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Storage. In: VOZZO, J. A. **Tropical tree seed manual.** Washington: USDA Forest Service's, Reforestation, Nurseries & Genetics Resources, 2002. p. 125-136.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa: Plantarum, 1998. 352 p.

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

MUXFELDT, R. E. et al. Utilização do teste de raios-X na avaliação dos efeitos da dessecação e infestação em diásporos de canela batalha *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae). **Cerne**, Lavras, v. 18, n. 4, p. 654-666, 2012.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Evolutionary and ecological aspects of recalcitrant seed biology. **Seed Science Research.** Wallingford, v. 10, p. 301-306, 2000.

PASQUINI, S. et al. Effect of different storage conditions in recalcitrant seeds of holm oak (*Quercus ilex* L.) during germination. **Seed Science and Technology**, Cambridge, v. 39, p. 165-177, 2011.

SILVA, D. G. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante o armazenamento de sementes de *Tabebuia serratifolia*. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 1, p. 1-7, 2011.

TONETTI, O. A. O. et al. Effect desiccation on roots of germinated seeds of *Sesbania virgata*. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL SOCIETY SEED SCIENCE, 10., 2011, Costa do Sauípe. **Informativo Abrates**, Londrina, v. 21, p. 219, 2011.

TONETTI, O. A. O. **Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de canela-batalha (*Cryptocarya aschersoniana*) – Mez**. 2000. 22 p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

WALTERS, C. et al. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 11, p. 135-148, 2001.

WALTERS, C.; HILL, L. M.; WHEELER, L. J. Dying while dry: kinetics and mechanisms of deterioration in desiccated organisms. **Integrative and Comparative Biology**, Mclean, v. 45, p. 751-758, 2005.

WALTERS, C. Levels of recalcitrance in seeds, **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 12, p. 7-21, 2000. Especial.

ARTIGO 3

Estudo de bancos de sementes de *Cryptocarya aschersoniana* em floresta e em área antropizada

RESUMO

Dormência é o mecanismo pelo qual as sementes de várias espécies vegetais distribuem a germinação no tempo, evitando-a em condições adversas, sendo uma característica decisiva na dinâmica dos bancos de sementes. Sementes de *Cryptocarya aschersoniana* são dispersas dormentes e ao final da estação chuvosa, levando a crer que podem formar um banco de sementes no solo. O objetivo deste trabalho foi acompanhar o comportamento de bancos de sementes de *Cryptocarya aschersoniana* induzidos no ambiente natural da espécie e em área antropizada. Sementes recém-colhidas foram caracterizadas quanto ao grau de umidade, germinação e viabilidade pelo teste de tetrazólio. Amostras individualizadas em redes de *nylon* foram enterradas superficialmente no sub-bosque de uma floresta semidecídua nos anos de 2011 e 2012, sendo que em 2012 também foram enterradas amostras numa área de borda antropizada pela remoção da vegetação. Mensalmente foi retirada uma amostra sendo avaliadas umidade, germinação e viabilidade das sementes remanescentes no banco, pelo teste de tetrazólio. No experimento conduzido em 2012 também foi analisada a umidade do solo. Os dados obtidos foram analisados comparando com dados de precipitação e temperatura do ar. Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que sementes de *Cryptocarya aschersoniana* formam um banco com viabilidade ecológica de aproximadamente 180 dias, quando em sub-bosque de uma floresta estacional semidecídua. Fora do ambiente natural, as sementes perdem a viabilidade em poucos meses e as sementes que saíram do banco por germinação não encontraram condições para se estabelecer e morreram, o que realça a importância da manutenção da cobertura florestal para a espécie em estudo.

Palavras-chave: Conservação ambiental. Espécie florestal. Dormência. Dispersão. Canela-batalha. Sementes recalcitrantes.

ABSTRACT

Study of seed banks of *Cryptocarya aschersoniana* in forest and disturbed area. Dormancy is the mechanism by which the seeds of various plant species distribute the germination throughout time, avoiding it under adverse conditions, being a critical feature for the dynamics of seed banks. *Cryptocarya aschersoniana* seeds are dispersed dormant at the end of the rainy season, suggesting that they can form a seed bank in the soil. The aim of this study was to investigate the behavior of such seed banks induced both in the natural habitat of the species and in the disturbed edge. Fresh seeds were characterized regarding moisture content, germination and viability by tetrazolium test. Individual samples in nylon nets were buried in a understory of a semi deciduous forest in 2011 and 2012, and in 2012 also buried in a disturbed edge. Individual samples were taken each month and evaluated regarding moisture content, germination and viability of seeds remaining in the bank through tetrazolium test. In the experiment conducted in 2012, soil moisture was also analyzed. Data were analyzed relating them with records of precipitation and air temperature. It was possible to conclude that seeds form a bank with ecological viability of approximately 180 days in the understory of a semideciduous forest. Outside of the natural environment, the seeds lose viability in a few months and those that came out of the bank by germination did not find conditions to grow and died, which emphasizes the importance of maintaining forest cover for the species under study.

Keywords: Environmental conservation. Forest species. Dormancy. Dispersal. Recalcitrant seeds.

1 INTRODUÇÃO

Uma semente dormente é aquela que não tem capacidade de germinar em um período de tempo específico, ainda que sob condições ambientais favoráveis para a espécie (BEWLEY, 1997) e inclui adaptações das espécies para superar condições adversas, assim como distribuir a germinação no tempo, desempenhando importante papel ecológico (BASKIN; BASKIN, 2004).

O mecanismo, muitas vezes indesejável na área agrícola, pode garantir a germinação ao longo do tempo, para uma população de sementes (BEWLEY et al., 2013), sendo fundamental na manutenção de bancos de sementes, que ao considerar ecossistemas florestais podem ser classificados em sete tipos básicos (GARWOOD, 1989). A estratégia fundamental para garantir a regeneração e manutenção do ecossistema, não se restringe apenas a espécies invasoras ou pioneiras, conforme ressaltado por Twedle et al. (2003), que relata que 24,8% das espécies arbóreas tropicais não pioneiras apresentam algum tipo de dormência com as mais diversas características.

No ambiente natural, as formas de superação da dormência estão normalmente ligadas às condições encontradas pelas sementes durante a estação/período desfavorável, seguida pela favorável em relação à germinação e crescimento inicial das plântulas. Alguns trabalhos com sementes de espécies de lauráceas relatam a ocorrência de dormência e que o armazenamento sob temperaturas de 5 a 10°C geralmente se mostra eficiente na superação da mesma (CARVALHO, 2000). Esse comportamento se aproxima das exigências que ocorrem em sementes de espécies tropicais de regiões de maiores altitudes, sendo possível, nesses casos, a ocorrência de dormência e sensibilidade à dessecação simultaneamente (HONG; ELLIS, 2002). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos e a estratégia ecológica da espécie em condições de campo.

Diante dessas informações, o objetivo deste trabalho foi acompanhar o comportamento de bancos de sementes de *Cryptocarya aschersoniana* induzidos no ambiente natural da espécie e em área antropizada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização do material

Frutos maduros de *Cryptocarya aschersoniana* foram colhidos na região de Lavras, MG, no mês de fevereiro de 2011 e 2012. O beneficiamento foi sob água corrente, friccionando os frutos sobre uma peneira até completa remoção da polpa, sendo consideradas “sementes” as estruturas de dispersão, formadas pela semente dentro de um endocarpo lenhoso. Essas foram deixadas em camada única, ao ar livre, até a perda da água superficial e denominadas sementes recém-colhidas, das quais foram retiradas amostras para caracterização inicial do grau de umidade e viabilidade (teste de germinação para o lote de 2011 e testes de germinação e tetrazólio para o lote de 2012).

2.1.1 Teste de umidade

O teste de umidade foi feito em estufa a $103^{\circ}(\pm 2^{\circ}\text{C})/17(\pm 1\text{h})$, com 4 repetições de 5 sementes cada, sendo as sementes cortadas (BRASIL, 2009). Foram utilizados como recipiente barquetes de papel alumínio e o resultado foi a média das 4 repetições, calculadas em base úmida.

2.1.2 Teste de germinação

O teste de germinação foi feito com 4 repetições de 25 sementes, previamente lavadas em hipoclorito de sódio (1%/10 minutos), entre areia autoclavada, em bandejas plásticas e acondicionadas em germinador tipo *Mangelsdorf*, a 25°C , com luz contínua. Foram consideradas germinadas as sementes que deram origem a plântulas normais, sendo o teste encerrado aos 180

dias de germinação. Ao final do teste, as sementes que não germinaram foram cortadas e incubadas em tetrazólio (0,5% por 24h a 25°C), sendo consideradas viáveis as sementes que apresentaram coloração rósea/vermelha, indicando atividade respiratória.

2.1.3 Teste de tetrazólio

O teste de tetrazólio foi feito com 4 repetições de 25 sementes, cortadas ao meio e separadas do endocarpo, sendo levadas para incubar apenas a metade que continha o eixo embrionário. As metades a serem analisadas foram deixadas por 10 horas em água destilada e transferidas para solução de tetrazólio 0,5 % (p/v), em temperatura de 25°C por 24 horas. Foram consideradas viáveis as sementes que exibiram coloração rósea/vermelha nos cotilédones e eixo embrionário. O resultado final foi dado em porcentagem.

2.2 Condicionamento em bancos de sementes

Após a avaliação inicial nos dois anos, as amostras foram acondicionadas em redes de *nylon* e levadas para avaliação em um banco de sementes induzido no sub-bosque de uma floresta estacional semidecídua (ambiente original da espécie), localizada em Lavras, MG. Para sementes colhidas em 2012, além do banco de sementes no sub-bosque, um segundo banco foi estabelecido em uma situação de sombreamento parcial (região de borda de mata antropizada pela remoção da cobertura original). A distância entre e os dois ambientes foi de aproximadamente 100 m. Mensalmente (por até um ano), amostras independentes foram avaliadas quanto ao grau de umidade e ao percentual de sementes germinadas, mortas e dormentes (pelo teste de

tetrazólio). Nos dois anos, o banco foi estabelecido no mês de março, logo após a dispersão natural das sementes.

No experimento conduzido em 2012, em cada intervalo, também foram colhidas amostras de solo para análise da umidade, em 4 repetições, pelo método da estufa a 105°C por 24 horas.

Os resultados foram analisados considerando-se os dados de precipitação e temperatura (máxima, mínima e média) no período, fornecidos pela Estação Climatológica da UFLA localizada a 500 metros da área de estudo.

2.3 Análise dos dados

Todos os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram testados quanto à normalidade sendo determinadas as curvas, bem como suas equações e determinado o valor do coeficiente de determinação (R^2) para cada curva apresentada, em cada variável de interesse, pelo Pacote Estatístico R.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes colhidas em 2011 estavam inicialmente com grau de umidade de 43,1% e 91% de sementes viáveis (distribuídas em 28% de germinação e 63% de sementes dormentes) após 180 dias de teste. As sementes colhidas em 2012 estavam com valores iniciais de 44,4% de umidade e 79 % de viabilidade, sendo que 71% germinaram e 8% permaneceram dormente 180 dias de germinação. (Figura 1).

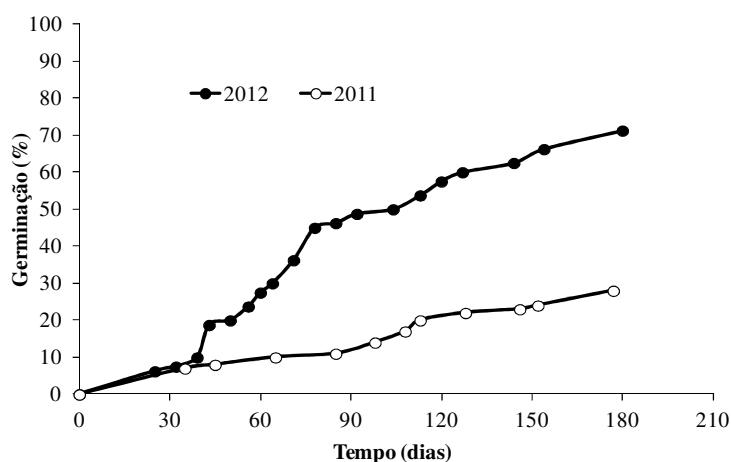


Figura 1 Germinação de sementes de canela-batalha (*Cryptocarya aschersoniana*) recém-colhidas

No banco de sementes induzido em sub-bosque, nos dois anos, as sementes permaneceram dormentes por cerca de 180 dias (até meados de setembro), época que coincide com o início da estação chuvosa na região (Figura 2A e 2C), quando então começaram a germinar enquanto a contagem de sementes dormentes cai gradualmente, sendo que durante o período, não houve alteração significativa no percentual de sementes mortas. Também não houve alteração na umidade das sementes até 180 dias, sendo seu aumento detectado

apenas quando já havia grande proporção de sementes germinadas (plântulas), logo com maior umidade (Figura 2).

Pelas características do banco de sementes, o modelo pode ser definido como um banco de sementes transitório, no qual a maioria das sementes se mantém viável por um período inferior a um ano (BEWLEY et al., 2013; GARDWOOD, 1989), se aproximando, com pequenas alterações, do modelo “Banco de sementes transitório substituído por plântulas”, proposto por Gardwood (1989).

Geralmente, o conjunto de características que conferem dormência às sementes de uma espécie está intimamente ligado a condições ambientais (temperatura e disponibilidade de água principalmente) no momento da dispersão (TWEDLE et al., 2003). Para sementes de espécies florestais subtropicais, é comum a superação de dormência em condições úmidas sob baixas temperaturas, o que as favorecem em condições naturais (BEWLEY et al., 2013).

Sri-ngernyuang et al. (2003), trabalhando com 2 espécies de lauráceas, na Tailândia, encontraram resultados semelhantes para uma espécie que apresenta hábitos parecidos com a utilizada neste estudo, ou seja, dispersão no final da estação chuvosa e comum no interior de mata. As sementes superaram o período mais seco/frio germinando quase 150 dias depois, em um banco de sementes.

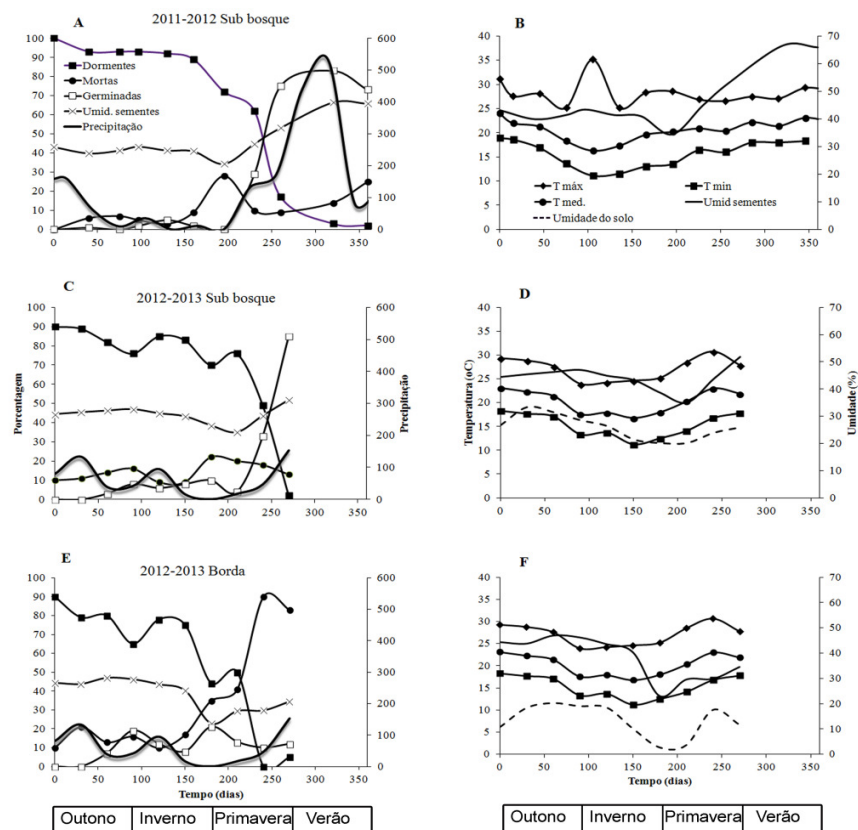


Figura 2 Comportamento de sementes de canela-batalha (*Cryptocarya aschersoniana*), em banco de sementes induzidos em 2 anos, em dois ambientes. A, C e E: condição das sementes e dados de precipitação; B, D e F: temperatura do ar e umidade das sementes e do solo. Equações das curvas: Germinação: 2011: $y = -1,7296677 - 0,053737x + 0,000659x^2$ ($R^2 = 0,81$); 2012 mata: $y = 9,045455 - 0,317753x + 0,001932x^2$ ($R^2 = 0,74$); 2012 borda: $y = -5,077 \cdot 10^{-1} + 5,742 \cdot 10^{-2}x - 2,367 \cdot 10^{-4}x^2 + 2,518 \cdot 10^{-7}x^3$ ($R^2 = 0,57$). Sementes dormentes: 2011: $y = 9,243 \cdot 10^{-1} + 3,197 \cdot 10^{-1}x - 3,181 \cdot 10^{-3}x^2 + 4,288 \cdot 10^{-6}x^3$ ($R^2 = 0,92$); 2012 mata: $y = 9,41 \cdot 10^{-1} - 5,374 \cdot 10^{-1}x + 6,062 \cdot 10^{-3}x^2 - 1,954 \cdot 10^{-5}x^3$ ($R^2 = 0,90$); 2012 borda: $y = 2,162 \cdot 10^{-1} - 3,485 \cdot 10^{-2}x + 1,708 \cdot 10^{-4}x^2 - 1,308 \cdot 10^{-6}x^3$ ($R^2 = 0,84$). Sementes mortas: 2011 $y = 1,6377 + 0,05251x$ ($R^2 = 0,34$); 2012 mata: $y = 9,727273 + 0,052323x - 0,000101x^2$ ($R^2 = 0,40$); 2012 borda: $y = 3,973 - 3,087 \cdot 10^{-2}x + 1,637 \cdot 10^{-4}x^2 + 8,04 \cdot 10^{-7}x^3$ ($R^2 = 0,85$). x = tempo no banco de sementes (dias).

Pode-se observar que em 2012 (Figura 2C e 2E), o início do período chuvoso se atrasou em relação ao ano anterior (Figura 2A), enquanto o ritmo de germinação se manteve inalterado para sementes na condição de sub-bosque, indicando que, aparentemente, a chegada da estação chuvosa não é uma exigência para que a germinação ocorra e que outros estímulos são necessários para que o processo germinativo se desencadeie. No trabalho de Sri-ngernyuang et al. (2003), o início do período de germinação de sementes de *Litsea* sp. e de *Lindera* sp. em um banco de sementes foi induzido por luminosidade e flutuação de temperatura.

As formas de superação da dormência estão intimamente ligadas às condições encontradas pelas plantas no ambiente natural, durante a estação/período desfavorável, seguida pela favorável, para germinação e crescimento inicial das plântulas. Por exemplo, sementes de espécies típicas de regiões temperadas, que após dispersas atravessam o inverno, precisam ser tolerantes ao frio e passar meses submetidas a baixas temperaturas, às vezes negativas, e é essa permanência a baixas temperaturas que supera a dormência e dá condições para que a germinação ocorra (FONSECA; BARONE, 2003; HONG; ELLIS, 2002). Exigências semelhantes podem também ocorrer em sementes de espécies tropicais típicas de regiões de maiores altitudes, sendo possível, nesses casos, a ocorrência de dormência e sensibilidade à dessecação simultaneamente (HONG; ELLIS, 2002).

A disponibilidade de água no solo, apesar de não ser o único fator que estimula o início da germinação, é fundamental para o estabelecimento das plântulas em campo e, provavelmente a espécie se adaptou ao manter as sementes dormentes até que esse suprimento de água seja regular e dê condições para as plântulas se desenvolverem. Isso pode ser reforçado ao se observar o comportamento das sementes que foram avaliadas em situação de borda (Figura 2E), as quais germinaram, inclusive em percentuais iniciais mais elevados que

os alcançados em condição de sub-bosque (Figura 2C) enquanto a dormência foi superada, no entanto, a baixa umidade do solo na estação seca (Figura 2F) provocou uma dessecação tanto das plântulas quanto das sementes levando-as à morte, visto que até o final do inverno, o grau de umidade foi de 22,9%, ou seja, valores inferiores ao grau crítico de umidade para as mesmas que, segundo Muxfeldt et al. (2012) é próximo de 26%, sendo que Hirano (2004) afirma que situe entre 31,1 e 27,5% de umidade.

Em condições de área aberta (borda), em épocas nas quais a umidade do solo se torna extremamente baixa, sementes dessa espécie não conseguem se manter com umidade suficiente para suportar o período desfavorável e o banco de sementes acaba por perder todo o estoque, ou por morte, ou por uma germinação precoce que não favorece as plântulas, visto que as mesmas não encontram condições mínimas de umidade para o seu estabelecimento. Assim, a longevidade ecológica (PAMMENTER; BERJAK, 2000), que no ambiente original da espécie é em torno de 180 dias, é reduzida pelo menos a metade desse tempo quando as sementes são dispersas em áreas abertas. Isso também foi verificado para outras espécies de *Lauraceae*, como *Ocotea odorifera* e *O. porosa*, que também são relatadas por não encontrarem condições de se estabelecer naturalmente em ambientes perturbados (HIRANO, 2004).

A situação foi bem diferente para as sementes que permaneceram no sub-bosque e encontraram uma condição de umidade no solo favorável, visto que esse, ainda no período mais seco, se manteve acima de 20% de umidade (Figura 2B e 2D). Nessas condições, as sementes não perderam água a ponto de comprometer a viabilidade, visto que o menor grau de umidade registrado para as sementes coletadas em 2011 foi de 34,2% (Figura 2 B) e de 35% para as de 2012 (Figura 2D), mantendo as mesmas em um grau de umidade bem distante do ponto crítico de umidade.

Espécies de região temperada, que dispersam suas sementes no final da estação chuvosa, desenvolveram estratégias para superar a estação fria, assim como para reduzir a perda de água para o ambiente (PAMMENTER; BERJAK, 2000). Pelo comportamento da espécie estudada, sendo típica de regiões subtropicais e de maiores altitudes, supõe-se que a mesma possa ter evoluído segundo essas características e, aparentemente, a presença do endocarpo auxilia no equilíbrio da umidade regulando a saída de água das sementes e mantendo-as em um grau de umidade seguro por um tempo relativamente grande. Para *Cryptocarya floribunda*, uma espécie nativa na Índia que apresenta sementes recalcitrantes, uma estrutura parecida apresenta grande quantidade de óleos que impedem a troca de água com o ambiente, o que, além de impor dormência, pode ser útil ao controlar a perda de água para o ambiente (THAPHIYAL; PHARTYAL; NAYAL, 2004). Uma característica como essa, em condições naturais, é extremamente importante, pois ajuda a manter as sementes viáveis até que ocorra uma precipitação e novamente eleve a umidade do ambiente, garantindo assim a sobrevivência das sementes no banco.

4 CONCLUSÕES

Sementes de *Cryptocarya aschersoniana* formam um banco que persiste no solo por até 180 dias quando em sub-bosque de uma floresta estacional semidecídua.

Sementes em banco estabelecido fora do ambiente natural da espécie não encontram condições para se manter viáveis, evidenciando a importância da manutenção da cobertura florestal para a espécie em estudo.

REFERÊNCIAS

BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 14, p. 1-16, 2004.

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

BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 7, p. 1055-1066, July 1997.

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

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

FONSECA, S. C. L.; BARONE, H. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 2, p. 297-303, 2003.

GARWOOD, N. C. Tropical soil seed banks: a review. In: LECK, M. A.; PARKER, V. T.; SIMPSON, R. L. **Ecology of soil seed banks**. San Diego: Academic, 1989. p. 149-210.

HIRANO, E. **Maturação fisiológica, tolerância à dessecação e conservação de sementes de lauráceas da mata de araucária de Santa Catarina**. 2004, 130 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Storage. In: VOZZO, J. A. **Tropical tree seed manual**. Washington: USDA Forest Service's, Reforestation, Nurseries & Genetics Resources, 2002. p. 125-136.

MUXFELDT, R. E. et al. Utilização do teste de raios-X na avaliação dos efeitos da dessecação e infestação em diásporos de canela batalha *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae). **Cerne**, Lavras, v. 18, n. 4, p. 654-666, 2012.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Evolutionary and ecological aspects of recalcitrant seed biology. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 10, p. 301-306, 2000.

SRI-NGERNYUANG, K. et al. Survival and germination of an experimental seed bank population of two species of Lauraceae in a tropical montane forest in Thailand. **Journal of Forest Research**, Chiang Mai, v. 8, n. 4, p. 311-316, 2003.

THAPLIYAL, R. C.; PHARTYAL, S. S.; NAYAL, J. S. Germination, desiccation tolerance and storage of seed of a tropical evergreen tree - *Cryptocarya floribunda* Nees (Lauraceae). **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 32, n. 2, p. 537-545, 2004.

TWEDLE, J. C. et al. Ecology of seed desiccation sensitivity. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 91, p. 294-324, 2003.