

DALCIANA VICENTE

**DORMÊNCIA, SECAGEM, ARMAZENAMENTO E SANIDADE DE SEMENTES DE
Ocotea puberula (Rich.) Nees**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Florestal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Magda de Oliveira
Co-orientadora: Dr^a. Olívia A. Oliveira Tonetti

**LAGES, SC
2014**

**DORMÊNCIA, SECAGEM, ARMAZENAMENTO E SANIDADE DE SEMENTES DE
Ocotea puberula (Rich.) Nees**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Florestal.

Banca examinadora

Orientadora: _____
Prof.^a. Dr.^a. Luciana Magda de Oliveira
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro: _____
Dr.^a. Olívia Alvina Oliveira Tonetti
Universidade Federal de Lavras

Membro: _____
Prof.^a. Dr.^a. Cileide Maria Medeiros Coelho
Universidade do Estado de Santa Catarina

Lages, 26/06/2014.

AGRADECIMENTOS

Agradecer se torna tão essencial neste momento. Não fazemos nada de importante em nenhuma fase de nossas vidas, sozinhos. Agradeço a todos que em algum momento passaram por minha vida, acrescentaram algo a ela e me moldaram na pessoa que sou hoje. Em especial, pelo desenvolvimento do meu trabalho agradeço as seguintes pessoas:

Ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal pela oportunidade de realização deste trabalho. A Universidade do Estado de Santa Catarina e ao FUMDES - Fundo de Apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação Superior, que financiaram este projeto.

À professora Luciana Magda de Oliveira, por aceitar me orientar no mestrado, acreditar no meu potencial, por me ensinar diversas coisas importantes, por todos os conselhos e conversas em sua sala e por me liberar para expandir conhecimentos na Universidade Federal de Lavras.

À doutora Olívia Alvina Oliveira Tonetti, por aceitar o convite de ser co-orientadora, por esclarecer tantas dúvidas no início dos trabalhos e por ser uma facilitadora na minha ida para Lavras.

A professora Cileide Maria Medeiros Coelho pela disponibilidade de participar da banca de defesa deste trabalho.

À equipe de pesquisa em Sementes Florestais CAV/UDESC pela amizade, coletas, ajuda, “retiradas de tegumento” e momentos divertidos neste período, em especial aos amigos Patricia Liesch (Gisele), Mara Luana Engel (Marinha), Vinícius Spolaor Fantinel e Elisama Alves, que foram indispensáveis nesse período, pela amizade, companheirismo e colaboração na realização deste trabalho.

À equipe de pesquisa em Sementes Florestais UFLA pela acolhida surpreendentemente afetiva no período em que estive realizando pesquisas nessa instituição, em especial aos amigos Andreza Martins, Adriano Alves e Prof. José Márcio Faria, pela amizade, troca de conhecimentos e auxílio no andamento das pesquisas com DNA.

Aos meus pais Rosimari e Edison, que eu amo tanto, que nunca me deixaram desanimar e que me apoiaram em todas as etapas... “A águia está voando...”. Meus irmãos e cunhados que entenderam minha ausência, que me incentivaram de diversas formas e que torcem por mim.

Ao meu amor Hélio, cujo tempo e distância já provaram a força desse sentimento. Agradeço por tudo o que fazes por mim, por todo esse tempo em que estivesse ao meu lado e por tudo o que ainda quer me proporcionar... “Te amo!!”.



Fonte: www.tirasarmandinho.com.br

*“Se soubesse que o mundo se acabaria amanhã,
eu ainda hoje plantaria uma árvore.”*
-Martín Luther

RESUMO

VICENTE, Dalciana. **Dormência, secagem, armazenamento e sanidade de sementes de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees**. 2014. 56 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal – Área: Engenharia Florestal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Lages, 2014.

Objetivou-se com este trabalho determinar tratamento eficiente para superação de dormência, verificar o comportamento das sementes durante secagem e armazenamento, averiguar método eficiente para detecção de patógenos em sementes de *Ocotea puberula* e da assepsia, ou não, das sementes antes da detecção dos patógenos e quais gêneros fúngicos infestam sementes desta espécie. Foram utilizadas sementes colhidas em cinco municípios do Estado de Santa Catarina (Fraiburgo, Joaçaba, Curitiba, Ponte Alta e Brunópolis). Para a superação da dormência, foram testados três tratamentos, além da testemunha: 1 - sementes sem o tegumento; 2 - ácido sulfúrico por 5 minutos e 3 - secagem das sementes a 25 °C por 12 horas. Após a utilização dos tratamentos, as sementes foram submetidas ao teste de germinação em caixas gerbox sob substrato de papel mata borrão, em BOD a 30 °C. Foram utilizadas 4 repetições de 20 sementes por tratamento/lote. Em relação aos tipos de secagem, sementes com teor de água inicial de 38% foram secas até 18%, com gradientes de 2%, em estufa (35 °C) e em dessecador com sílica-gel (25 °C). Após cada secagem, foram determinados o teor de água e a viabilidade (testes de tetrazólio e germinação). No estudo de armazenamento, as sementes foram armazenadas com e sem fruto, em câmara fria (UR 40% e Temp. 10 ± 2 °C), pelos períodos de 0, 3, 6 e 9 meses. A cada intervalo de tempo, foram determinados o teor de água, a integridade do DNA e a viabilidade das sementes, por meio dos testes de germinação e tetrazólio. A determinação da sanidade das sementes foi realizada por meio do meio de cultura BDA, meio de cultura V8 e método “*Blotter Test*”. Em cada teste, foram utilizadas sementes com e sem assepsia (desinfestação com hipoclorito de sódio e álcool), totalizando 80 sementes para cada teste. A incubação das sementes foi realizada em câmara com temperatura controlada a 22 °C ±3 °C, com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias, quando ocorreu a avaliação e identificação dos fungos. Foi observado que sementes sem o tegumento iniciaram a germinação após 14 dias do início do teste, com estabilização do estande aos 36 dias, com resultados médios de 71% de germinação. Não foi observada germinação para sementes dos demais tratamentos e testemunha, em todos os lotes utilizados. Em relação à secagem, foi observado que até 32% de umidade não houve alteração na qualidade das sementes, independente do tipo de secagem, sendo verificada significativa perda de germinação após esse valor. Sementes de *Ocotea puberula* perderam sua viabilidade após 3 meses de armazenamento, com ou sem fruto. Foram observados nove gêneros fúngicos: *Penicillium* sp., *Phomopsis* sp., *Epicocum* sp., *Curvularia* sp., *Colletotrichum* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. e *Trichoderma* sp. Conclui-se que o método de retirada do tegumento é eficiente na superação da dormência de sementes de *Ocotea puberula* e que o tipo de secagem não influencia na qualidade dessas sementes; porém, a redução do teor de água abaixo de 32% prejudica a germinação. Sementes de *Ocotea puberula* perdem sua viabilidade após 3 meses de armazenamento em câmara fria e os meios agarizados foram mais sensíveis para a detecção de fungos infestantes nas sementes e a assepsia das sementes com hipoclorito de sódio e álcool reduz a incidência desses fungos, sendo indicado quando se realiza teste de sanidades com sementes dessa espécie.

Palavras-chave: Canela-guaicá, germinação, semente recalcitrante, integridade do DNA, sanidade de sementes.

ABSTRACT

VICENTE, Dalciana. **Dormancy, storage, drying and seed health of *Ocotea puberula* (Rich.) Nees.** 2014. 56 f. Dissertation (Master in Forest Engineering – Area: Forest Engineering) – Santa Catarina State University. Forestry Engineering Graduate Program, Lages, SC. 2014.

The objective of this work was to determine effective treatment for breaking dormancy, check the behavior of the seed during drying and storage, investigate efficient method for detection of pathogens in seeds of *Ocotea puberula* and aseptic or not, the seeds prior to detection of pathogens and which genera of fungi infest seeds of this species. Seeds harvested in five municipalities of Santa Catarina (Fraiburgo Joaçaba, Curitibanos, Ponte Alta and Brunópolis) were used. To break dormancy, three treatments were tested, and the control: 1 - seeds without testa; 2 - sulfuric acid for 5 minutes, 3 - drying the seeds at 25 °C for 12 hours. After use of the treatments, the seeds were subjected to germination test seedling boxes under substratum of blotting paper in BOD at 30 °C. 4 replicates of 20 seeds per treatment/lot were used. The kinds of drying seeds with an initial moisture content of 38% was dried to 18% with gradient of 2% in stove (35 °C) in a desiccator with silica gel (25 °C). After drying, we determined the water content and viability (tetrazolium and germination tests). In the study, the seeds were stored with and without fruit in cold storage (40% RH and Temp. 10 ± 2 °C) for periods of 0, 3, 6 and 9 months. At each time interval were determined water content, DNA integrity and viability of seed germination through and tetrazolium tests. Determination of sanity seeds was performed using the PDA medium culture, V8 medium culture and "Blotter Test" method. With and without seed disinfection (disinfection with sodium hypochlorite and alcohol) for a total of 80 seeds for each test were used in each test. The seed incubation was performed in a chamber with controlled temperature of $22 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$ with a photoperiod of 12 hours for seven days when the assessment and identification of fungi has occurred. It was observed that seeds without testa started germination after 14 days of the start of the test, with stabilizing stand at 36 days, with average scores of 71% germination. Not was observed seed germination for other treatments and control in all lots used. Regarding drying, it was observed that up to 32% humidity no change in seed quality, regardless of the type of drying and verified significant loss of germination after this value. Seeds of *Ocotea puberula* lost their viability after 3 months of storage, with or without fruit. Nine genera of fungi were observed: *Penicillium* sp., *Phomopsis* sp., *Epicocum* sp., *Curvularia* sp., *Colletotrichum* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. and *Trichoderma* sp. We conclude that the method of seed coat removal is effective in breaking dormancy of seeds of *Ocotea puberula* and the type of drying does not affect the quality of the seed; however, reducing the water content below 32% decreased germination. Seeds of *Ocotea puberula* lose their viability after 3 months of storage in cold chamber and agarized media were more sensitive for the detection of fungi weed in seed and seed disinfection with sodium hypochlorite and alcohol reduces the incidence of these fungi, is indicated when conducts sanity test with seeds of this species.

Keywords: Canela-guaicá, germination, recalcitrant seed, DNA integrity, sanity seeds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1: Germinação de sementes de <i>Ocotea puberula</i> , submetidas à secagem lenta e rápida	33
Gráfico 2: Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de <i>Ocotea puberula</i> , submetidas à secagem lenta e rápida.	34
Gráfico 3: T 50 (% de germinação), sementes de <i>Ocotea puberula</i> , submetida a dois tipos de secagem	34
Gráfico 4: Tetrazólio em sementes de <i>Ocotea puberula</i> , submetida a dois tipos de secagem	35
Figura 1 - Gel de agarose (0,8%) de DNAs genômicos, extraído de sementes de <i>Ocotea puberula</i> , ao longo do armazenamento por 0, 3, 6 e 9 meses, em câmara fria. Onde: kb= Pares de base; L1 = Lote 1; L2= Lote 2; L3= Lote 3; L4= Lote 4; L5= Lote 5; CP= Controle Positivo... ..	44

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Dados geográficos e climáticos dos municípios de coleta das sementes de *Ocotea puberula*..... 24
- Tabela 2 - Caracterização inicial de lotes de sementes de *Ocotea puberula* - Grau de Umidade (U%) e Tetrazólio (Tz%) e Germinação (%) de sementes de diferentes lotes de *Ocotea puberula* submetidas a métodos para superação da dormência. T1=testemunha; T2=sementes sem tegumento; T3=sementes em ácido sulfúrico; T4= sementes com secagem. 25
- Tabela 3 - Porcentagens de sementes mortas (SM), dormentes (SD) e sementes predadas (SP) de *Ocotea puberula* observadas no teste de germinação após tratamentos para a superação da dormência. T1=testemunha; T2=sementes sem tegumento; T3=sementes em ácido sulfúrico; T4=sementes com secagem..... 26
- Tabela 4 - Gradientes de umidade pré-estabelecidos (GPE) e atingidos (U%), por meio da utilização de metodologia do peso alvo, em sementes de *Ocotea puberula*. 32
- Tabela 5 - Dados Geográficos e Climáticos dos municípios de coleta de sementes de *Ocotea puberula*. 41
- Tabela 6 - Germinação (%) de sementes de *Ocotea puberula*, armazenadas com (CF) e sem o fruto (SF), pelo período de 9 meses em câmara fria (40%UR e 10 ± °C) 42
- Tabela 7 - Sementes viáveis de *Ocotea puberula* (%), obtidas pelo teste de tetrazólio, armazenadas pelo período de 9 meses, em câmara fria, com (CF) e sem o fruto (SF). 43
- Tabela 8 - Umidade (%) das sementes de *Ocotea puberula* armazenadas em câmara fria pelo período total de 9 meses, com (CF) e sem o fruto (SF)..... 44
- Tabela 9 - Dados geográficos e climáticos dos municípios de coleta das sementes de *Ocotea puberula*. 50
- Tabela 10- Incidência (%) de fungos em sementes de *Ocotea puberula* oriundas de municípios do estado de Santa Catarina, com e sem assepsia, submetidas aos testes de sanidade em meio de cultura agarizado (BDA e V8) e “Blotter Test” 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Graus Célsius

BOD - (Biochemical Oxygen Demand)

% - Porcentagem

UR - Umidade Relativa

Temp. - Temperatura

DNA - Deoxyribonucleic Acid

BDA - Batata Dextrose Ágar

V8 - Meio de cultura com suco de tomate

Sp. - abreviatura de gênero

Cm - centímetro

M - metro

Mm - milímetro

G - gramas

T1 - Tratamento 1

T2 - Tratamento 2

T3 - Tratamento 3

T4 - Tratamento 4

S - Sul

O - Oeste

H - hora

pH - Potencial de Hidrogênio

® - Marca registrada

U - Umidade

Tz - Tetrazólio

SM - Sementes mortas

SD - Sementes dormentes

SP - Sementes predadas

IVG - Índice de Velocidade de Germinação

T 50 - Tempo Médio de Germinação

GPE - Gradientes de umidade pré-estabelecidos

Sec - secagem

Mg - miligramas

ML - mililitro

μ L - Microlitros

RPM - Rotações por minutos

CF - Com fruto

SF - Sem fruto

CV - Coeficiente de variação

F^{cal} - Variância calculada

Kb - Pares de Bases

L1 - Lote 1

L2 - Lote 2

L3 - Lote 3

L4 - Lote 4

L5 - Lote 5

CP - Controle positivo

Atm - atmosfera

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 <i>Ocotea puberula</i> Rich. Ness	12
2.2 DORMÊNCIA DE SEMENTES.....	12
2.3 SECAGEM E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES	13
2.4 SANIDADE DE SEMENTES	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
4 DORMÊNCIA DE SEMENTES DE <i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees	21
4.1 RESUMO	21
4.2 ABSTRACT.....	21
4.3 INTRODUÇÃO.....	21
4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.6 CONCLUSÃO	26
4.7 REFERENCIAL TEÓRICO.....	26
5 SECAGEM LENTA E RÁPIDA EM SEMENTES DE <i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees	28
5.1 RESUMO	28
5.2 ABSTRACT.....	28
5.3 INTRODUÇÃO.....	28
5.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.6 CONCLUSÃO	34
5.7 REFERENCIAL TEÓRICO.....	34
6 VIABILIDADE DE SEMENTES E INTEGRIDADE DO DNA DE SEMENTES DE <i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees AO LONGO DO ARMAZENAMENTO	38
6.1 RESUMO	38
6.2 ABSTRACT.....	38
6.3 INTRODUÇÃO.....	38
6.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6.6 CONCLUSÃO	46
6.7 REFERENCIAL TEÓRICO.....	46
7 SANIDADE DE SEMENTES DE <i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees.....	47
7.1 RESUMO	47
7.2 ABSTRACT.....	47
7.3 INTRODUÇÃO.....	47
7.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
7.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
7.6 CONCLUSÃO	54
7.7 REFERENCIAL TEÓRICO.....	54

1 INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Ocotea puberula* se destaca pela importância ecológica, por ser pioneira, apresentar abundante frutificação, sendo consumida por pássaros, e por ser importante para recuperação de áreas degradadas (BACKES; IRGANG, 2002). Sua propagação é via seminal, sendo a viabilidade das sementes baixa e sua germinação desuniforme (MOURA-COSTA *et al.* 1993); além disso, segundo Mori *et al.* (2012), suas sementes são classificadas como recalcitrantes, ou seja, sementes intolerantes à dessecação, de longevidade curta e que não resistem baixas temperaturas durante o armazenamento. As sementes recalcitrantes apresentam maior dificuldade de armazenamento em comparação às sementes ortodoxas, devido à alta sensibilidade à perda de água; portanto, há necessidade de armazenamento sob condições de alta umidade. Esta situação predispõe ao ataque de microrganismos e ainda pode ocorrer germinação durante o período de armazenamento (MARCOS FILHO, 2005).

Além de problemas para a conservação de suas sementes, a espécie não possui constância na frutificação (MOURA-COSTA *et al.*, 1993), seus frutos sintetizam substâncias que impedem a germinação (RANDI, 1992) e suas sementes possuem dormência (BIANCHETTI; RAMOS, 1983).

Dificuldades para a germinação e conservação de sementes englobam várias espécies florestais e podem estar ligadas a diferentes fatores, como, por exemplo: dormência desconhecida para sementes da espécie, presença de pragas e doenças, manejo incorreto das sementes com recalcitrância, secagem a níveis elevados que causam morte ao embrião ou o excesso de umidade que pode ocasionar a morte pela fermentação da semente.

Como alternativa para a produção de mudas dessa espécie se faz necessário selecionar o método mais eficiente para superar a sua dormência, que ainda é de causa desconhecida. Para a espécie *Ocotea puberula*, Randi (1982) concluiu em suas pesquisas que a germinação de sementes dessa espécie fica condicionada à liberação da mesma na natureza, através de degradação ou de sua ingestão por animais. As sementes desta espécie também apresentam dormência fisiológica, por isso devem sofrer escarificação ácida por cinco minutos em ácido sulfúrico (BIANCHETTI; RAMOS, 1983; FLORIANO, 2004). Mori *et al.* (2012), indica para esta espécie escarificação mecânica, seguida de estratificação em areia úmida por 60 a 120 dias. Sem o tratamento de superação da dormência, a germinação é desuniforme, prolongando-se por até um ano.

Para Randi (1992) os frutos de *Ocotea puberula* sintetizam substâncias que impedem a germinação, uma alternativa possível seria armazenar as sementes dentro do fruto, para tentar maximizar o tempo de viabilidade ao longo do armazenamento.

O estudo da sanidade destas sementes também poderia ser uma alternativa para aumentar o tempo de armazenamento e a produção das mudas desta espécie, pois para Verchiato (2010), entre os fatores que podem afetar a qualidade das sementes florestais estão sem dúvida os de caráter fitossanitário, entre os quais se destacam os fungos.

Objetivou-se com este trabalho determinar tratamento eficiente para a superação de dormência, verificar o comportamento das sementes durante secagem e armazenamento, averiguar método adequado para detecção de patógenos em sementes de *Ocotea puberula*, da assepsia, ou não, das sementes antes da detecção dos patógenos e quais gêneros fúngicos infestam sementes desta espécie.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Ocotea puberula* Rich. Ness

Conhecida popularmente por canela-guaicá, canela-sebo, guaicá, canela parda, canela-de-corvo e canela-pimenta, a *Ocotea puberula* Rich. Ness (Lauraceae) é uma planta perenifólia, presente na Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Densa Sub-Montana, Floresta Estacional Decidual e Semidecidual, além da Selva Misionera e Selva Tucumana-Boliviana (CARVALHO, 1994). Possui ampla distribuição geográfica na América do Sul, desde as Guianas, Venezuela e Colômbia, até a Argentina e Uruguai. No sul do Brasil habita todas as regiões fisiográficas, sendo uma das mais importantes na sucessão secundária das florestas nativas (MARCHIORI, 1997).

Segundo Carvalho (2003), sua árvore atinge altura de 15 a 25 metros em plantas adultas. Tronco de 20 a 60 cm de diâmetro, normalmente reto e cilíndrico, fuste de até 12 m. Copa ampla, umbeliforme e com densa folhagem sempre verde. A casca tem espessura de até 30 mm, rugosa e castanho acinzentada, com pequenas fendas e lenticelas grandes. As folhas são simples, alternas glabras e pecioladas (2 a 3 cm), margem ondulada, subcoriáceas, quando maceradas tem um cheiro característico tornando-se pegajosas.

Planta dióica com flores unissexuadas, pequenas, cor branca a bege, agrupadas em densas panículas axilares multifloras que floresce no mês de março em Santa Catarina. Os frutos são do tipo drupa sub-globosa, preto azulado, com 6 a 7 mm de diâmetro, possuem um pequeno múcron apical e cúpula pequena, quase plana, de margem ondulada e cor vermelha e a frutificação ocorre nos meses de dezembro a fevereiro. As sementes são elípticas de cor marrom-escuras com estrias pretas de 10 mm de comprimento. O número de sementes por quilo é de aproximadamente 7.500 a 7.861 (EIBL *et al.*, 1994; CARVALHO, 2003).

Como importância econômica é possível listar: usos em química aplicada (IACOBUCCI *et al.*, 1951; BARALLE *et al.*, 1972; FARAGO *et al.*, 2010; MORTRUCCHIO *et al.*, 2012), medicinal (BACKES; IRGANG, 2002; MARQUESINI, 1995), madeireiro (RIZZINI *et al.* 1976), recuperação de áreas degradadas e plantios comerciais (MONTAGNINI *et al.*, 1992; FERNÁNDEZ *et al.*, 1997; ZANGARO *et al.*, 2000; ZANGARO *et al.*, 2003; MONTAGNINI *et al.*, 2006).

A produção de mudas desta espécie é feita via seminal e é limitada devido a características intrínsecas da espécie. Os frutos da *O. puberula* sintetizam substâncias que inibem a germinação das sementes, conforme Randi (1982), que concluiu que esses inibidores poderiam atuar no impedimento da germinação das sementes dessa espécie dentro dos frutos.

As sementes da canela guaicá são de comportamento recalcitrante ao armazenamento (Eibl *et al.*, 1994), perdendo totalmente a viabilidade em ambiente não controlado em três meses, sendo difícil a sua conservação. Segundo Reitz *et al.*, 1978, os frutos de *O. puberula* são freqüentemente atacados, ainda na árvore, pelo fungo *Botryconis palida*, reduzindo consideravelmente a produção de sementes férteis.

2.2 DORMÊNCIA DE SEMENTES

Para Baskin; Baskin (2004), sementes que não têm a capacidade de germinarem em um período específico de tempo (variando de dias a meses conforme

a espécie), sob qualquer combinação dos fatores ambientais e físicos normais (temperatura, luz etc), que são favoráveis para a sua germinação, são consideradas sementes dormentes. BASKIN; BASKIN (2004) descrevem cinco causas de dormência: fisiológica, onde semente é dispersa com o embrião imaturo; morfológica, semente dispersa com embrião diferenciado, porém subdesenvolvido quanto o tamanho; morfofisiológica, embrião subdesenvolvido e algum componente fisiológico que requer tratamento para a superação da dormência; física, quando há algum impedimento físico para a entrada de água; e física+fisiológica ou dormência combinada; onde há o bloqueio físico da entrada de água e embrião imaturo.

O impedimento estabelecido pela dormência, segundo Fowler (2000), constitui-se numa estratégia benéfica, pela distribuição da germinação ao longo do tempo, aumentando a probabilidade de sobrevivência da espécie. Entretanto, a dormência pode dificultar a produção de mudas, sendo necessário o uso de métodos adequados para sua superação.

As Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) indicam tratamentos para superação da dormência de sementes, como armazenamento em locais secos, nitrato de potássio, ácido giberélico, luz, embebição, escarificação mecânica e química. Entretanto a escolha do método depende das causas da dormência e da espécie.

Bilia *et al.*, (1998) em diaspóros de *Ocotea corymbosa* (Meissn.) Mez afirmam que a excisão do embrião mostrou ser um método eficiente para antecipar o início da germinação. Fowler; Bianchetti (2000) em sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) recomendam a estratificação em areia úmida por 150 dias para superar a dormência embrionária desta espécie. Jayasuriya *et al.* (2013), estudando 100 espécies com dormência, indicam para sementes de *Sesbania* (*Sesbania grandiflora*, *Sesbania rostrata* e *Sesbania sesban*), escarificação manual.

Randi (1982) concluiu em suas pesquisas que a germinação de sementes de *Ocotea puberula* fica condicionada à liberação da mesma na natureza, através de degradação ou de sua ingestão por animais. Segundo Bianchetti; Ramos (1983), as sementes desta espécie apresentam dormência fisiológica, por isso devem sofrer escarificação ácida por cinco minutos em ácido sulfúrico. Sem o tratamento de superação da dormência, a germinação é desuniforme, prolongando-se por até um ano. Este estudo foi reafirmado por Floriano (2004), que indicou como quebra de dormência desta espécie o uso de ácido sulfúrico pelo mesmo período de tempo.

2.3 SECAGEM E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES

Roberts (1973) dividiu as sementes em dois grupos distintos, que considerava basicamente, a intolerância à dessecação, a curta longevidade e a intolerância às temperaturas baixas de um grupo de sementes, então denominadas recalcitrantes, em contraste com as ortodoxas. Posteriormente, Ellis *et al.* (1990) definiram uma terceira categoria, as intermediárias, que são relativamente tolerantes à dessecação, mas que não resistem à remoção de água nem ao armazenamento em baixas temperaturas até os níveis tolerados pelas ortodoxas.

Sementes recalcitrantes não podem perder grande porcentagem de água ou serem armazenadas por períodos que excedam algumas semanas ou meses, o que representa um desafio para sua conservação *ex situ* (MARCOS FILHO, 2005). No momento da dispersão, apresentam alto conteúdo de água, estão metabolicamente

ativas e, em muitos casos, iniciando a germinação (KERMODE; FINCH-SAVAGE, 2002).

Apesar das sementes recalcitrantes não tolerarem a perda de água, a secagem pode ser realizada até níveis seguros, que dependem da espécie. Assim, na dessecação de sementes recalcitrantes devem ser considerados o grau de umidade de segurança, o grau de umidade crítico e o grau de umidade letal para cada espécie. O grau de umidade de segurança corresponde àquele que poderá ser atingido com a secagem sem prejuízos à viabilidade das sementes (HONG; ELLIS, 1992); o grau de umidade crítico refere-se ao valor no qual é detectado o início da perda da viabilidade (ANDRADE; CUNHA, 1996), já o letal equivale ao ponto a partir do qual todas as sementes perdem a viabilidade (HONG; ELLIS, 1992).

A forma de secagem pode influenciar a resposta de sementes recalcitrantes à dessecação (WESLEY-SMITH *et al.*, 2001; JOSÉ *et al.*, 2011). Alguns autores sugerem que a secagem rápida de sementes reduz mais efetivamente os danos pela perda da viabilidade (FARRANT *et al.*, 1985; BERJAK *et al.*, 1990; PRITCHARD, 1991; PAMMENTER *et al.*, 1998). Enquanto que a secagem lenta pode promover melhor tolerância à dessecação, devido ao tempo, onde a indução e operação dos mecanismos de proteção para a semente (SILVA *et al.*, 2007).

Para Magistrali *et al.* (2013), em estudos com sementes de *Genipa americana*, a secagem lenta (câmara de secagem) aumentou a capacidade de tolerância à dessecação e ao armazenamento. Em sementes de café (*Coffea canephora*), a secagem rápida (estufa) causou uma maior redução na qualidade fisiológica, quando comparado com secagem lenta e intermediária (ROSA *et al.*, 2005).

Sementes recalcitrantes de *Ekebergia capensis*, quando secas rapidamente, mantiveram a viabilidade próxima da viabilidade ótima em um índice de água razoavelmente baixo (0,7/g de água por gramas de peso seco); enquanto que secagem lenta levou a perda completa da viabilidade (PAMMENTER *et al.*, 1998).

O armazenamento de sementes permite a disponibilidade das mesmas aos programas de reflorestamento e pesquisas sobre tecnologia e fisiologia de sementes (CARVALHO, 2008). Hong *et al.* (1996) afirmam que informações sobre o comportamento no armazenamento de sementes de espécies de Lauraceae são escassas, estes autores verificaram que, dentre 34 espécies, 74% apresentavam indícios de recalcitrância, como *Nectandra grandiflora*, *Nectandra lanceolata*, *Nectandra oppositifolia*, *Ocotea corymbosa* e *Ocotea pulchella* (CARVALHO *et al.*, 2008); *Ocotea porosa*, *Ocotea catharinensis* e *Ocotea odorifera* (MORITZ, 2009); *Cinnamomum zeylanicum* (SILVA *et al.*, 2012); *Ocotea puberula* (MORI *et al.*, 2012).

Na última década, ocorreu um aumento do número de estudos sobre a classificação fisiológica das sementes de espécies florestais nativas do Brasil, quanto à capacidade de armazenamento, devido à crescente necessidade de sementes viáveis para atender aos programas de conservação e de produção florestal (PINHO *et al.*, 2009).

O armazenamento tem a finalidade de diminuir a deterioração com a perda da máxima qualidade fisiológica atingida no momento da maturação da semente, a deterioração é inevitável, irreversível, variável com a espécie e entre lotes (POPINIGIS, 1977). Considera-se um bom sistema de armazenamento, quando este diminui a velocidade de deterioração da qualidade fisiológica e prolonga o período de viabilidade da semente (AGUIAR *et al.*, 1993).

A conservação de espécies que apresentam sementes recalcitrantes é especialmente necessária, pois nem sempre o período de coleta é o ideal para a

semeadura para produção de mudas (FONSECA; FREIRE, 2003), e sua longevidade é curta, podendo ser de 30 dias, como estudos para a espécie *Erythroxylum coca* (KING; ROBERTS, 1979) a 6 meses para *Ocotea porosa* (TONIN, 2006).

Sementes de *Ocotea puberula* são de comportamento recalcitrante ao armazenamento (EIBL *et al.*, 1994; MORI *et al.*, 2012), perdendo totalmente a viabilidade em ambiente não controlado em três meses, sendo difícil a sua conservação (EIBL *et al.*, 1994). Randi (1982) recomenda que as sementes desta espécie devem ser armazenadas com os frutos, pois os mesmos possuem substâncias inibidoras da germinação, garantindo, desse modo, a dormência.

Os trabalhos científicos que incluem o armazenamento de sementes em seus frutos, como alternativa para sementes sensíveis ao dessecamento são escassos, mas com efeito positivo, como para sementes de *Caesalpinia leiostachya* (BIRUEL *et al.*, 2007); e *Crambe abyssinica* (COSTA *et al.*, 2012).

Sementes com baixa viabilidade perdem a eficiência em sintetizar RNA e as lesões ao DNA acentuam a redução dessas atividades que podem gerar um processo de transcrição defeituoso da mensagem genética. Tais danos são acumulados mais rapidamente em sementes úmidas que nas secas, e estão relacionados ao envelhecimento e à perda da viabilidade das sementes (MARCOS FILHO, 2005).

2.4 SANIDADE DE SEMENTES

Entre os fatores que podem afetar a qualidade das sementes florestais estão sem dúvida os de caráter fitossanitário, entre os quais se destacam os fungos (VERCHIATO, 2010). As sementes podem carregar, na sua superfície ou internamente, fungos e outros organismos (RAHALKAR; NEERGAARD, 1969), servindo como meio de transmissão ou transporte desses, constituindo-se desta forma, em um dos principais meios de disseminação de patógenos de plantas.

A contaminação das sementes e frutos de essências florestais ocorre predominantemente no solo onde são colonizados por diversos fungos, incluindo saprófitas e parasitas facultativos que têm vida saprofítica no solo ou na matéria orgânica, tais como: *Alternaria* sp., *Cylindrocladium* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Trichoderma* sp., dentre outros (FEREIRA, 1989). Quando as sementes e frutos são levados para o beneficiamento e/ou armazenamento, os fungos são disseminados para as sementes sadias, por isso, muitas vezes, há a necessidade de se realizar tratamento de sementes.

A presença de fungos pode reduzir a capacidade germinativa de um lote de sementes e apresentar problemas na interpretação dos resultados dos testes de germinação conduzidos em condições de laboratório (SANTOS, *et al.*, 2011). Em muitos casos a baixa germinabilidade de um lote, pode estar associada com a contaminação de patógenos, e este pode ser descartado erroneamente.

Há diversas formas de detectar a presença de fungos em sementes, e sua escolha depende da espécie. Dentre essas formas, o método do papel filtro ou "Blotter Test" é o mais utilizado nos testes rotineiros de sanidade de sementes (MATHUR, 1983; NEERGAARD, 1983). A incidência de muitos fungos e bactérias infestantes, que crescem rapidamente neste substrato, podem impedir a frutificação dos fungos-alvo, dificultando a sua identificação e quantificação, sobretudo os de crescimento lento. Nesse último caso, a incidência pode ser subestimada (TEMPE, 1970; NEERGAARD, 1973; REIS *et al.*, 1999).

Os meios nutritivos com ágar são outra forma de detectar fungos em sementes, necessitam de uma fonte de carbono, que pode ser a glicose, nitrogênio além de outros elementos em menor quantidade, tais como potássio, fósforo, enxofre, ferro, magnésio, zinco, manganês e vitaminas (ZAUZA *et al.*, 2007). Segundo Medeiros *et al.* (1992), entre os principais meios utilizados na detecção de fungos está o meio de cultura de BDA (batata-dextrose-ágar).

Além do uso de método de detecção adequado, a assepsia superficial das sementes é recomendada nos testes de sanidade, pois permite a identificação correta de microrganismos associados às sementes florestais, como já observado em testes com sementes de canafístula (*Peltophorum dubium*), maricá (*Mimosa bimucronata*) e timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum*) (MUNIZ *et al.*, 2007).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

AGUIAR, I.B., PINÃ-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília, ABRATES, 1993, 350 p.

ANDRADE, A.C.S.; CUNHA, R. Grau crítico de umidade? **Informativo do Comitê Técnico de Sementes Recalcitrantes**. Brasília, n.1, p.2-3, 1996.

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul**. Porto Alegre: Instituto Souza Cruz, Clube da Árvore. 2002, 318p., il.

BARALLE, F.; SCHVARZBERG, N.; VERNENGO, M.; COMIN, J. Dehydroocoteine and didydroocoteine from *Ocotea puberula*. **Experientia**. v.28, n.8, p.875-876, 1972.

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

BERJAK, P.; FARRANT, J. M.; MYCOCK, D. J.; PAMMENTER, N. W. Recalcitrant (homoiohydrous) seeds: the enigma of their desiccation-sensitivity. **Seed Science and Technology**, v. 18, n. 2, p. 297-310, 1990.

BIANCHETTI, A.; RAMOS, A. **Escarificação ácida associada a estratificação em areia úmida para uniformizar e acelerar a germinação de sementes de canela-guaicá (*Ocotea puberula* Nees) em laboratório**. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 4., 1982, Belo Horizonte. Anais. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1983. p.181-182. Publicado na Silvicultura, n.28, 1983.

BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J.; MALU, A. M. Germinação de diásporos de Canela (*Ocotea Corymbosa* Meissn. Mez – LAURACEAE) em função da temperatura, do substrato e da dormência. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 1, p. 189-194, 1998.

BIRUEL, R.P.; AGUIAR, I.B.; PAULA, R.C. germinação de sementes de pau-ferro submetidas a diferentes condições de armazenamento, escarificação química, temperatura e luz. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 151-159, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: 2009. 365p.

- CARVALHO, P.E.R. **Espécies Florestais Brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Brasília, EMBRAPA Produção de Informações, 1994, 640 p.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras.** Brasília, EMBRAPA Informação Tecnológica, 2003, 1.039 p.
- CARVALHO, L.R.; DAVIDE, A.C.; SILVA, E.A.A.; CARVALHO, M.L.M. Classificação de sementes de espécies florestais dos gêneros *Nectandra* e *Ocotea* (Lauraceae) quanto ao comportamento no armazenamento. v.30, n.1, p. 1-9, 2008.
- COSTA, L.M.; RSENDE, O.; GONÇALVES, D.N.; SOUZA, K.A. Qualidade dos frutos de crambe durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 2 p. 239 - 301, 2012.
- EIBL, B.I.; SILVA, F.; CARVALHO, A.; CZEREPAK, R.; KEHL, J. Ensayos de germinación y análisis cuantitativo em semillas de espécies forestales nativas de Misiones, R.A. **Yviaretá**, Eldorado, v.5, n.5, 1994, p.33-48.
- ELLIS, R.H., HONG, T.D.; ROBERTS, H. 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? **Journal of Experimental Botany**, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, 1990.
- FARAGO, P.V.; PAULA, J.F.P.; NAKASHIMA, T.; DOLL, P.M.; MANFRON, B.J.; MAIA, B.H.L.N.S. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from bark of *Ocotea puberula* (Rich.) Ness. **Latin America Journal of Pharmacy**. v.29, n.07, p.1242-1245, 2010.
- FARRANT, J. M.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. The effect of drying rate on viability retention of recalcitrant propagules of *Avicena marina*. **South African Journal of Botany**. v.51, p. 32 – 43, 1985.
- FERNÁNDEZ, R.; MONTAGNINI, F.; HAMILTON, H. The influence of five native tree species on soil chemistry in a subtropical humid forest region of Argentina. **Journal of Tropical Forest Science**. v.10, n.2, p.188-196, 1997.
- FERREIRA, F.A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil.** Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570 p.
- FLORIANO, E.P. **Germinação e dormência de sementes florestais.** Santa Rosa: ANORGS. 19p. (Caderno didático nº2). 2004.
- FOWLER, A.J.P.; BIANCHETTI, A. **Dormência em sementes florestais.** Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 27p. (Embrapa Florestas. Documentos, 40).
- FONSECA, S.C.L.; FREIRE, H.B. Sementes recalcitrantes: Problemas na póscolheita. **Bragantia**, v.62, n.2, p.297-303, 2003.
- HONG, T. D.; ELLIS, R.H. **A protocol to determine seed storage behavior.** Rome: IPGRI, 1996. 62p.
- HONG, T. D.; LININGTON, S.; ELLIS, R. H. **Seed storage behaviour: a compendium.** Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. (IPGRI. Handbooks for Genebanks).
- IACOBUCCI, G.A. Isolation of an alkaloid in *Ocotea puberula* Nees. **Ciencia e Investigacion**. v.7, n.1, p.48, 1951.

JAYASURIYA, K.M.G.G.; WIJETUNGA, A.S.T.B.; BASKIN, J. M.; BASKIN, C.C. Seed dormancy and storage behaviour in tropical Fabaceae: a study of 100 species from Sri Lanka. **Seed Science Research**, v. 23, p. 257–269, 2013.

JOSÉ, A. C.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C.; MELO, A. J. S.; TOOROP, P. E. Effects of drying rate and storage time on *Magnolia ovate* Spreng. seed viability. **Seed Science and Technology**, v. 39, n. 2, p. 425-434, 2011.

KERMODE, A.R.; FINCH-SAVAGE, B.E. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H.W. (Ed.). **Desiccation and survival in Plants: Drying without dying**. Oxon: CABI Publishing, 2002. 422p.

KING, M.W.; ROBERTS. E.H. **The storage of recalcitrant seeds: achievements and possible approaches**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1979. 96p.

MAGISTRALI, P. R.; JOSE, A. C.; FARIA, J. M. R.; GASPARIN, E. Physiological behavior of *Genipa americana* L. seeds regarding the capacity for desiccation and storage tolerance. **Journal of Seed Science**. vol.35, n.4, p. 495-500, 2013.

MARCHIORI, J.N.C. **Dendrologia das Angiospermas: das magnoliáceas às flacurtiáceas**. Santa Maria, Ed. UFSM, 1997, 271 p.

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

MARQUESINI, NR. **Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil - Guarani, Kaingang, Xogleg, Ava-Guarani, Kraô e Cayuá**. Dissertação (Mestrado). Curitiba: UFPR, 290p. 1995.

MATHUR, S.B. Testing seeds of tropical species for seed-borne diseases. **Seed Science & Technology** 11:113-128. 1983.

MEDEIROS, A.C.S.; MENDES, M.A.S.; FERREIRA, M.A.S.V.; ARAGÃO, F.J.L. Avaliação quali-quantitativa de fungos associados a sementes de Aroeira (*Astronium urundeuva* (FR. ALL.) ENGL.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.14, n.1, p. 51-55, 1992.

MONTAGNINI, F. Mixed tree plantations: experiments with native trees in Costa Rica and Argentina. **Agroforestry Today**. v.4, n.3, p.4-5, 1992.

MONTAGNINI, F.; EIBL, B.; FERNÁNDEZ, R. Rehabilitation of degraded lands in Misiones, Argentina. *Bois et Forêts des Tropiques*. v.288, n.2, p.51-65, 2006.

MORI, E.S.; PINÃ-RODRIGUES, F.C.M. FREITAS, N.P.; MARTINS, R.B. (org.). **Sementes florestais: guia para germinação de 100 espécies nativas**. São Paulo: Instituto Refloresta, 159 p., 2012.

MORITZ, A.; DEGENHARDT, J.; DUTRA, L.F.; HANSEL, F.A.; LIMA, B.H.; FRANCESCHI, C.R.B.; FRANCISCON, L. Estabelecimento *in vitro* de *Ocotea odorifera*, *O. catharinensis* e *O. porosa*. **Pesquisa Florestal Brasileira**. n.59, p. 37-44, 2009.

MORTRUCCHIO, D. P.; MIGUEL, O.G.; ZANIN, S.M.W.; SILVA, G. A.; CARDOSO, A.M.; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive effects of a chloroform extract and the alkaloid

dicentrine isolated from fruits of *Ocotea puberula*. **Planta Med.** v. 78, n.14, p. 1543-1548, 2012.

MOURA-COSTA, T. H. V. A. M.; MANTELL, S. H. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 35, p. 279, 1993.

MUNIZ, M. F. B.; SILVA, M. L.; BLUME, E. Influência da assepsia e do substrato na qualidade de sementes e mudas de espécies florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p. 140-146, 2007.

NEERGAARD, P. Detection of seed-borne pathogens by culture tests. **Seed Science & Technology** 1:217-254. 1973.

PAMMENTER, N. W.; GREGGAINS, V.; KIOKO, J. I.; WESLEY-SMITH, J.; BERJAK, P.; FINCH-SAVAGE, W. E. Effects of differential drying rates on viability retention of recalcitrant seeds of *Ekebergia capensis*. **Seed Science Research**, v. 8, p. 463 - 471, 1998.

PINHO, D. S.; BORGES, E.E.L.; CORTE, V. B.; NASSER, L. C. B. Evaluation of the physiological quality of *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. seeds during storage. **Rev. Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 27-33, 2009.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília, DF: AGIPLAN, 289p., 1985.

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

RAHALKAR, P.W.; NEERGAARD, P. Studies on aureofungin as seed treatment in controlling seed borne fungal diseases. **Hindustan Antibiotics Bulletin**, v. 11, n. 3, p. 163-165, 1969.

RANDI, A.M. **Estudo preliminar sobre inibidores de germinação em frutos de *Miconia cinnamomifolia* e *Ocotea puberula***. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 1982, Campos do Jordão. Anais ... São Paulo: Instituto Florestal, 1982. p.238-242.

REIS, A.C.; REIS, E.M.; CASA, R.T. et al. Erradicação de fungos patogênicos associados a sementes de milho e proteção de fungos de solo pelo tratamento com fungicida. **Fitopatologia Brasileira**, n. 20, p. 585-591. 1999.

REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. **Projeto madeira de Santa Catarina**. Sellowia: Itajaí, n. 28/30, p. 3-320, 1978.

RIZZINI, C. T. & MORS, W. B. **Botânica Econômica Brasileira**. São Paulo: Editora EDUSP e EPU, 1976.

ROSA, S. D. V. F.; BRANDÃO JÚNIOR, D.; VON PINHO, E. V.; VEIGA, A. D.; CASTRO E SILVA, L. H. Effects of different drying rates on the physiological quality of *Coffea canephora* Pierre seeds. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.17, n.2, p.199-205, 2005.

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

SANTOS, A.F.; PARISI, J.J.D.; MENTEN, J.O.M. (Ed. Técnicos). **Patologia de sementes florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2011. 236 p.

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

SILVA, K.B.; ALVES, E. U.; BRUNO, R.L.A.; SANTOS, S. S.; BARROSO, L. M. Tolerância à dessecação de sementes de *Cinnamomum zeylanicum* Ness. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 587-594, 2012.

TONIN, G.A.; CRISTINA, S.; PEREZ, J.G.A. qualidade fisiológica de sementes de *Ocotea porosa* (Nees et Martius ex. Nees) após diferentes condições de armazenamento e semeadura. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 26-33, 2006.

VECHIATO, M.H. **Importância da qualidade sanitária de sementes de florestais na produção de mudas.** Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=136> . Acesso em: 06 de maio de 2014.

WESLEY-SMITH, J.; PAMMENTER, N.; BERJAK, P. The Effects of Two Drying Rates on the Desiccation Tolerance of Embryonic Axes of Recalcitrant Jackfruit (*Artocarpus Heterophyllus* LAMK.) seeds. **Annals of Botany**. v. 8, n. 4, p. 653 – 664, 2001.

ZANGARO, W.; BONONI, V.L.R.; TRUFEN, S.B. Mycorrhizal dependency, inoculum potencial and habitat preference of native woody species in South Brazil. **Journal of Tropical Ecology**. v.16, n.04, p.603-622, 2000.

ZANGARO, W.; NISIZAK, S.M.A.; DOMINGOS, J.C.B.; NAKANO, E.M. Mycorrhizal response and successional status in 80 woody species from south Brazil. **Journal of Tropical Ecology**. v.19, n.3, p. 315-324, 2003.

ZAUZA, E.A.V. ; ALFENAS, A.C. ; MAFIA, R.G. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (Eds.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. p. 23 – 51.

4 DORMÊNCIA EM SEMENTES DE *Ocotea puberula* (Rich.) Nees

4.1 RESUMO

A espécie *Ocotea puberula* é uma das mais importantes na sucessão secundária das florestas nativas. A produção de mudas desta espécie é feita via seminal e é limitada devido a características intrínsecas da espécie. Estudos comprovam que há inibição na germinação destas sementes; portanto, objetivou-se com este trabalho avaliar a eficiência de métodos para a superação da dormência de sementes de *Ocotea puberula*. Foram utilizadas sementes colhidas em cinco cidades do Estado de Santa Catarina (Fraiburgo, Joaçaba, Curitibanos, Ponte Alta e Brunópolis). Para a superação da dormência, foram testados três tratamentos, além da testemunha (T1): T2- sementes sem o tegumento; T3 - ácido sulfúrico por 5 minutos e T4 - secagem das sementes a 25 °C por 12 horas. Após a utilização dos tratamentos, as sementes foram submetidas ao teste de germinação em caixas *gerbox* sob substrato de papel, em B.O.D. a 30 °C. Foram utilizadas 4 repetições de 20 sementes por tratamento/ lote. Foi observado que sementes sem o tegumento iniciaram a germinação após 14 dias do início do teste, com estabilização do estande aos 36 dias, com resultados médios de 71% de germinação. Não foi observada germinação para sementes dos demais tratamentos e testemunha, em todos os lotes utilizados. Conclui-se que o método de retirada do tegumento é eficiente na superação da dormência de sementes de *Ocotea puberula*.

Palavras-chave: Canela-guaicá, sementes florestais, dormência, tegumento.

4.2 ABSTRACT

The *Ocotea puberula* species is one of the most important in secondary succession of native forests. The production of seedlings of this species is via seminal and is limited due to the intrinsic characteristics of the species. Studies show that there is inhibition of germination of these seeds; therefore, the aim of this work was to evaluate the efficiency of methods for overcoming dormancy of *Ocotea puberula*. Seeds harvested in five cities in the state of Santa Catarina (Fraiburgo, Joaçaba, Curitibanos, Ponte Alta and Brunópolis) were used. For overcoming dormancy, three treatments were tested and the control treatment (T1): T2- seeds without testa; T3- sulfuric acid for 5 minutes and T4- seed drying at 25 °C for 12 hours. After use of the treatments, the seeds were subjected to germination test in box *gerbox* under paper substrate in B.O.D. at 30 °C. 4 replicates of 20 seeds per treatment/lot were used. It was observed that seeds without testa started germination after 14 days of the start of the test, with stabilizing stand at 36 days, with average scores of 71% germination. Not for seed germination of other treatments and control was observed in all lots used. We conclude that the method of seed coat removal is effective in overcoming dormancy of seeds of *Ocotea puberula*.

Keywords: Canela-guaicá, forest seeds, dormancy, testa.

4.3 INTRODUÇÃO

A *Ocotea puberula* ocorre de forma natural no norte e nordeste da Argentina (MARTINEZ- CROVETTO, 1963), no sul da Bolívia (KILLEAN *et al.*, 1993) e no Sul do Brasil habita todas as regiões fisiográficas, sendo uma das mais importantes espécies na sucessão secundária das florestas nativas (MARCHIORI, 1997). Essa espécie é de grande importância ecológica, é pioneira, apresenta abundante frutificação, sendo consumida pelos pássaros, e é importante para recuperação de áreas degradadas (BACKES; IRGANG, 2002).

A produção de mudas desta espécie é feita via seminal e é limitada devido a características intrínsecas de suas sementes, pois segundo Randi (1982), os frutos da *O. puberula* sintetizam substâncias que inibem a germinação das sementes.

Estudos com sementes de Lauraceae normalmente relatam que a germinação é lenta e desuniforme, indicando ocorrência de dormência (CARVALHO, 2006; MUXFELDT *et al.*, 2012).

Para Baskin; Baskin (2004), sementes que não têm a capacidade de germinarem em um período específico de tempo, variando de meses a anos dependendo da espécie, sob qualquer combinação dos fatores ambientais e físicos normais (temperatura, claro/escuro, etc), que são favoráveis para a sua germinação, são consideradas sementes dormentes. Para os autores existem diferentes causas de dormência de sementes entre as diversas espécies de plantas, que podem ser divididos em: fisiológica, onde semente é dispersa com o embrião imaturo; morfológica, semente dispersa com embrião diferenciado, porém subdesenvolvido quanto o tamanho; morfofisiológica, embrião subdesenvolvido e algum componente fisiológico que requer tratamento para a superação da dormência; física, quando há algum impedimento físico para a entrada de água; e física+fisiológica ou dormência combinada; onde há o bloqueio físico da entrada de água e embrião imaturo.

A dormência é uma característica complexa, pois é influenciada por fatores ambientais e endógenos. Além disso, o nível final de dormência é determinado pelas contribuições genéticas de uma semente (GRAEBER *et al.*, 2012).

As Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) indicam tratamentos para superação da dormência de sementes, como armazenamento em locais secos, nitrato de potássio, ácido giberélico, luz, embebição, escarificação mecânica e química. Entretanto a escolha do método depende das causas da dormência e da espécie.

Bilia *et al.*, (1998) em trabalho realizado com diaspóros de *Ocotea corymbosa* (Meissn.) Mez afirmam que a excisão do embrião mostrou ser um método eficiente para antecipar o início da germinação, já a escarificação, punção ou corte do endocarpo aumentou a porcentagem de sementes mortas durante o teste de germinação. Fowler; Bianchetti (2000), em estudo sobre a dormência de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), observaram que a estratificação em areia úmida por 150 dias foi o melhor método para superar a dormência embrionária desta espécie. Já Jayasuriya *et al.* (2013), estudando 100 espécies com dormência, indicam para sementes de *Sesbania* (*Sesbania grandiflora*, *Sesbania rostrata* e *Sesbania sesban*), escarificação manual, obtendo valores de 100% de germinação após a aplicação deste tratamento.

Para *Ocotea puberula*, Randi (1982) concluiu em suas pesquisas que a germinação de suas sementes fica condicionada à degradação do seu fruto ou que ocorra sua ingestão por animais. Silva *et al.* (2002) avaliou a porcentagem de germinação de sementes de *Ocotea puberula* após regurgitação por pássaros, obtendo valores de 64% de germinação. Segundo Bianchetti; Ramos (1983) e Floriano (2004), as sementes desta espécie apresentam dormência fisiológica, por isso devem sofrer escarificação ácida por cinco minutos em ácido sulfúrico, sendo que sem o tratamento de superação da dormência, a germinação é desuniforme, prolongando-se por até um ano. Silva *et al.* (2002) realizou trabalhos com escarificação por ácido sulfúrico pelo tempo de cinco minutos e obteve 27% de germinação para *O. puberula*. Quando comparado com os outros tratamentos, testemunha (38% germinação) e trato intestinal de aves (64% germinação), as sementes cujos frutos foram consumidos por aves encontram-se em uma condição mais viável para a germinação.

Bilia *et al.* (1998), realizaram cinco diferentes métodos para superação em dormência de *Ocotea corymbosa*: testemunha, escarificação, perfuração, corte e remoção manual do endocarpo. Concluíram que o endocarpo coriáceo reduz a velocidade o período para estabelecimento das plântulas e a porcentagem final de germinação. A remoção manual mostrou ser um método eficiente para antecipar o início da germinação.

Objetivou-se com este trabalho avaliar a eficiência de métodos para a superação da dormência de sementes de *Ocotea puberula*.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *Ocotea puberula* foram coletadas no estado de Santa Catarina, nos municípios (lotes) de Joaçaba, Fraiburgo, Curitibaanos, Ponte Alta e Brunópolis (Tabela 1).

Tabela 1: Dados geográficos e climáticos dos municípios de coleta das sementes de *Ocotea puberula*.

Lote	Município	Latitude	Longitude	Altitude	Temp. Média	Clima
1	Joaçaba	27°10'41"S	51°30'17"O	522 m	18 °C	Subtropical Úmido
2	Fraiburgo	27°03'20"S	50°03'34"O	1048 m	16,1 °C	Subtropical Úmido
3	Curitibaanos	27°16'44"S	50°34'57"O	987 m	15,2 °C	Subtropical Úmido
4	Ponte Alta	27°29'03"S	50°22'49"O	856 m	16 °C	Subtropical Úmido
5	Brunópolis	27°18'21"S	50°52'06"O	843 m	19 °C	Subtropical Úmido

Fonte: Governo do Estado de Santa Catarina (2014) e Köppen (1936).

Foram coletadas sementes de cinco matrizes, em cada município, com exceção de Fraiburgo, onde foram encontradas apenas duas matrizes. A coleta dos frutos foi realizada quando apresentavam coloração preto-azulada, com auxílio de podão. A remoção da polpa foi feita manualmente, com o auxílio de peneiras e água corrente. O excesso de água foi retirado com papel toalha.

As sementes foram submetidas à determinação do teor de água e ao teste de tetrazólio, para caracterização inicial dos lotes, e aos métodos para superação da dormência, seguido do teste de germinação.

A determinação do teor de água foi realizada pelo método de estufa, onde as sementes foram submetidas à temperatura de $103 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Foram utilizadas 2 repetições para cada lote, contendo 10 sementes por repetição. Os resultados foram expressos em porcentagem com base no peso úmido das sementes, conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Para o teste de tetrazólio foi utilizada solução de 2,3,5 trifetil cloreto de tetrazólio (pH 6,5 a 7,0), na concentração de 0,5%, a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, segundo metodologia descrita por Kalil Filho *et al.* (2008). Para esta avaliação foram utilizadas 4 repetições de 20 sementes, que foram seccionadas longitudinalmente, através do centro do eixo embrionário, com auxílio de um bisturi e imersas na solução pelo período de 1 hora. Para auxiliar a visualização de todos os detalhes das sementes, foram utilizadas lupas de mesa com lâmpada fluorescente. Os critérios de análise foram: 1- semente viável

(coloração avermelhada), 2- sementes inviáveis (sem coloração). Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes viáveis.

Para a superação da dormência, foram utilizados três tratamentos, além da testemunha (T1): T2 - sementes sem o tegumento, que foram retirados manualmente, com o auxílio de bisturi; T3 - ácido sulfúrico durante 5 minutos, conforme metodologia proposta por Bianchetti; Ramos (1983); T4 - secagem das sementes, realizada por meio de sílica gel e dessecador, a temperatura de 25 °C durante 12 h. Para cada tratamento/lote, foram utilizadas quatro repetições de 20 sementes.

Após a utilização dos tratamentos, as sementes foram submetidas ao teste de germinação em caixas do tipo *gerbox*, contendo uma folha de papel filtro previamente umedecida, com volume de água de 2 vezes o peso do papel, e encaminhadas a B.O.D. com temperatura de 30 °C e luz branca constante. Foram computadas as porcentagens de plântulas normais, anormais, sementes mortas e dormentes, segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), aos 36 dias após a montagem do teste, quando ocorreu a estabilização do estande.

Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e à análise de variância, não sendo necessário transformá-los (SANTANA; RANAL, 2004). Constatando significância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, as análises foram realizadas com o programa estatístico ASSISTAT®.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes foram coletadas com teores de água que variaram de 35,61% (Lote 2, Fraiburgo) até 41,07% (Lote 5, Brunópolis) (Tabela 2). Os altos valores de umidade, observados na coleta, são característicos de sementes recalcitrantes. Walters (2005) afirma que a maioria das sementes recalcitrantes é dispersa com teor de água entre 33 – 41%.

Um estudo de Hirano; Possamai (2008) indicou que, para a espécie *Ocotea puberula*, deve-se realizar a coleta dos frutos quando o teor de água nas sementes estiver entre 34,1 a 40,2%, coincidindo com os encontrados neste estudo.

Tabela 2: Caracterização inicial de lotes de sementes de *Ocotea puberula* - Grau de Umidade (U%) e Tetrázólio (Tz%) e Germinação (%) de sementes de diferentes lotes de *Ocotea puberula* submetidas a métodos para superação da dormência. T1=testemunha; T2=sementes sem tegumento; T3=sementes em ácido sulfúrico; T4=sementes com secagem.

LOTES	U (%)	Tz(%)	Germinação (%)				
			T1	T2	T3	T4	T5
1	36,13 b	74 a	0	66 bc	0	0	0
2	35,61 b	77 a	0	95 a	0	0	0
3	40,33 a	53 bc	0	75 b	0	0	0
4	38,85 a	72 ab	0	68 bc	0	0	0
5	41,07 a	50 c	0	52 c	0	0	0
CV	1,49	13,62	0	12,12	0	0	0
F ^{cal}	36,7956*	7,7425*	0	12,988*	0	0	0

* significativo ao nível de 5% de probabilidade (0,01 =< p < 0,05)

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

Fonte: produção do próprio autor.

Em relação ao teste de tetrazólio, foi verificada diferença significativa entre os lotes. Os lotes que tiveram maior porcentagem de sementes viáveis pelo teste de tetrazólio foram 1, 2 e 4, com 74%, 77% e 72% de viabilidade, respectivamente (Tabela 2). O teste de tetrazólio, segundo Brasil (2009), é de particular relevância para espécies com sementes de lenta germinação ou que não germinam por encontrarem-se dormentes.

Em relação aos métodos de superação de dormência das sementes de *Ocotea puberula*, foi observada germinação, durante o período de condução do teste, apenas nas sementes submetidas ao tratamento sem tegumento (T2). O lote 2 foi o que apresentou a maior porcentagem de germinação - 95%, e o lote 5 o menor resultado numérico (52%) (Tabela 2). O início da germinação, para sementes sem tegumento, se deu 14 dias após o início do teste.

Comparando os resultados numéricos, dos testes de tetrazólio e de germinação, pode-se observar que o lote 2 apresentou maiores porcentagem de sementes viáveis pelo teste de tetrazólio e de germinação, o último diferenciando-se estatisticamente dos demais tratamentos.

O tratamento com ácido sulfúrico ocasionou a morte de grande parte das sementes (Tabela 3). Estes resultados diferiram Silva *et al.* (2002) e Floriano (2004), que obtiveram 40% e 27% de germinação, respectivamente, nas sementes de *Ocotea puberula* submetidas ao tratamento ácido sulfúrico.

Nos demais tratamentos foram observados baixos valores de mortalidade das sementes, sendo que a grande maioria foi classificada como dormente, ou seja, sementes que embeberam, mas sem que ocorresse a germinação (Tabela 3).

Tabela 3: Porcentagens de sementes mortas (SM), dormentes (SD) e sementes predadas (SP) de *Ocotea puberula* observadas no teste de germinação após tratamentos para a superação da dormência. T1=testemunha; T2=sementes sem tegumento; T3=sementes em ácido sulfúrico; T4=sementes com secagem.

LOTES	TRATAMENTOS											
	T1			T2			T3			T4		
	SM (%)	SD (%)	SP (%)	SM (%)	SD (%)	SP (%)	SM (%)	SD (%)	SP (%)	SM (%)	SD (%)	SP (%)
1	0	55	45	6	0	34	70	0	30	0	63	37
2	6	80	14	0	5	0	86	4	10	0	90	10
3	1	83	16	0	13	12	85	3	12	0	83	17
4	0	94	6	1	19	12	91	3	6	0	81	19
5	3	85	12	8	24	16	93	1	6	0	93	7

Fonte: produção do próprio autor.

Os resultados obtidos indicam que a dormência presente nas sementes desta espécie é provavelmente causada por substâncias inibidoras presentes no tegumento das sementes, reafirmando os estudos de Randi (1982), que ressalta que inibidores poderiam estar atuando no impedimento da germinação das sementes dessa espécie. Para confirmar essa observação, são necessários estudos para detecção da presença desses inibidores no tegumento das sementes.

4.6 CONCLUSÃO

A retirada de tegumento, realizada de forma manual, é eficiente para a superação da dormência de sementes de *Ocotea puberula*.

4.7 REFERENCIAL TEÓRICO

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul**. Porto Alegre, Instituto Souza Cruz, Clube da Árvore. 2002, 318p., il.

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

BIANCHETTI, A.; RAMOS, A. Escarificação ácida associada a estratificação em areia úmida para uniformizar e acelerar a germinação de sementes de canela-guaicá (*Ocotea puberula* Nees) em laboratório. In: **Congresso Florestal Brasileiro**, 4., 1982, Belo Horizonte. Anais. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1983. p.181-182. Publicado na Silvicultura, n.28, 1983.

BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J.; MALU, A. M. Germinação de diásporos de Canela (*Ocotea Corymbosa*) Meissn. Mez – LAURACEAE) em função da temperatura, do substrato e da dormência. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 1, p. 189-194, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: 2009. 365p.

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.

FLORIANO, E.P. **Germinação e dormência de sementes florestais**. Santa Rosa: ANORGS. 2004. 19p. (Caderno didático nº2).

FOWLER, A.J.P.; BIANCHETTI, A. **Dormência em sementes florestais**. Colombo: *Embrapa Florestas*, 2000. 27p. (*Embrapa Florestas*. Documentos, 40).

GOVERNO DO ESTADO DE SANTA CATARINA. 2013. Disponível em: <<http://www.sc.gov.br>>. Acesso em 16 jan. 2014.

GRAEBER, K.; NAKABAYASHI, K.; MIATTON, E.; LEUBNER-METZGER, G.; SOPPE, W.J.J. Molecular mechanisms of seed dormancy. **Plant, Cell and Environment**. v. 35, n.10, p.1769 – 1786, 2012.

HIRANO, E.; POSSAMAI, E. Estádio de maturação do fruto e germinação de três sementes espécies de Lauraceae (Nota científica). **Scientia Agraria**. v.9, n.2, p.219 - 223, 2008.

JAYASURIYA, K.M.G.G.; WIJETUNGA, A.S.T.B.; BASKIN, J. M.; BASKIN, C.C. Seed dormancy and storage behaviour in tropical Fabaceae: a study of 100 species from Sri Lanka. **Seed Science Research**, v. 23, p. 257–269, 2013.

KALIL FILHO, A. N.; LOPES, A.J.; RÊGO, G.M.; TOMACHITZ, A. Avaliação da Qualidade Fisiológica de Sementes de Imbuia pelo Teste do Tetrázólio (Nota científica). **Pesquisa Florestal Brasileira**. n.57, p.69 -72, 2008.

KILLEAN, T.J.; GARCIA E., E.; BECK, S.G. **Guia de arboles de Bolívia**. La Paz: Herbario Nacional de Bolívia / St. Louis: Missouri Botanical Garden, 1993. 958p.

KÖPPEN, W. Das geographische system der klimate. In: KÖPPEN, W.; GEIGER, R. (Ed.). **Handbuch der klimatologie**. Berlin: Gebruder Borntraeger, 1936. v. 1, p. 1-44.
MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Circular. **Técnica 62 – Ocotea puberula**. Colombo: EMBRAPA, 2002. 11p.

MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das angiospermas: das magnoliáceas às flacurtiáceas**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 1997. 271p.

MARTINEZ-CROVETTO, R. Esquema fitogeográfico de La província de Misiones (República Argentina). **Bonplandia**: Corrientes, v.1, n.3, p.171-223, 1963.

MUXFELDT, R.E.; FARIA, J.M.R.; TONETTI, O.A.O.; SILVA, E.A.A. 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.

RANDI, A.M. **Estudo preliminar sobre inibidores de germinação em frutos de *Miconia cinnamomifolia* e *Ocotea puberula***. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 1982, Campos do Jordão. Anais ... São Paulo: Instituto Florestal, 1982. p.238-242.

SANTANA, D.G.; RANAL, M.A. **Análise da germinação: um enfoque estatístico**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2004. 248 p.

SILVA, A. C.; PORTELA, O.; LORDELLO, A. L. L.; NOGUEIRA, A. C. Efeito do pH no grau de germinação de sementes de *Ocotea puberula* (Lauraceae). **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 3, n. 1, p. 19 -22, 2002.

5 SECAGEM LENTA E RÁPIDA EM SEMENTES DE *Ocotea puberula* (Rich.) Ness

5.1 RESUMO

Objetivou-se com o trabalho avaliar a influência de tipos de secagem na qualidade de sementes, consideradas recalcitrantes, de *Ocotea puberula* e determinar o seu grau de umidade crítico e grau letal. Sementes colhidas em Brunópolis, SC, com teor de água inicial de 38%, foram secas até 18%, com gradientes de 2%; utilizando a equação de peso alvo para garantir este gradiente, em estufa (35 °C) e em dessecador com sílica-gel (25 °C). Após cada secagem, as sementes foram avaliadas quanto ao teor de água, porcentagem e velocidade (IVG) de germinação, T50 e tetrazólio. Foi observado que até 32% de teor de água não houve alteração na qualidade das sementes, independente do tipo de secagem, sendo verificada significativa perda de germinação após esse valor. Conclui-se que o tipo de secagem não influencia na qualidade dessas sementes; porém, por tratar-se de uma semente recalcitrante, a redução do teor de água abaixo de 32% prejudica a germinação, sendo seu grau de umidade crítico e sementes com 22% de teor de água não tiveram germinação, sendo neste estudo o grau de umidade letal desta espécie.

Palavras-chave: canela-guaicá, germinação, semente recalcitrante, teor de água.

5.2 ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the influence of types of drying on seed quality, as recalcitrant, *Ocotea puberula* and determine their degree of critical humidity and lethal degree. Seeds harvested in Brunópolis, SC, with an initial moisture content of 38%, were dried to 18%, with gradients of 2%; using the equation of target weight to ensure that gradient in the stove (35 °C) and in a desiccator with silica gel (25 °C). After drying, the seeds were evaluated for water content, percentage and index of germination speed (IVG), tetrazolium and T50. It was observed that up to 32% water content did not change in seed quality, regardless of the type of drying and verified significant loss of germination after this value. We conclude that the type of drying does not affect the quality of the seed; however, because it is a recalcitrant seed, reducing the water content below 32% decreased germination, and its degree of critical humidity and seeds with 22% moisture content had no germination in this study is the degree of lethal humidity of this species.

Keywords: canela-guaicá, germination, recalcitrant seed and water content.

5.3 INTRODUÇÃO

As sementes são classificadas, de acordo com a tolerância à dessecação, a longevidade e a tolerância às temperaturas baixas, em ortodoxas (tolerantes) e recalcitrantes (intolerantes) (ROBERTS, 1973). Ellis *et al.* (1990) definiram, ainda, uma terceira categoria, as intermediárias, que são relativamente tolerantes à dessecação, mas que não resistem ao armazenamento em baixas temperaturas até os níveis tolerados pelas ortodoxas.

Devido ao fato das sementes recalcitrantes não poderem perder grande porcentagem de água ou serem armazenadas por períodos que excedam algumas semanas ou meses, sua conservação representa um desafio (MARCOS FILHO, 2005). No momento da dispersão, apresentam alto conteúdo de água, estão metabolicamente ativas e, em muitos casos, iniciando a germinação (KERMODE; FINCH-SAVAGE, 2002). Farrant *et al.* (1985), sugeriram que existem diferentes tipos de sementes

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

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

A forma de secagem pode influenciar a resposta de sementes recalcitrantes à dessecação (WESLEY-SMITH *et al.*, 2001; JOSÉ *et al.*, 2011). Alguns autores sugerem que a secagem rápida de sementes reduz mais efetivamente os danos pela perda da viabilidade (FARRANT *et al.*, 1985; BERJAK *et al.*, 1990; PRITCHARD, 1991; PAMMENTER *et al.*, 1998). Enquanto que a secagem lenta pode promover melhor tolerância à dessecação, devido ao tempo, onde há indução e operação dos mecanismos de proteção para a semente (SILVA *et al.*, 2007).

Sementes recalcitrantes de *Ekebergia capensis*, por exemplo, quando secas rapidamente, mantiveram a viabilidade em um teor de água razoavelmente baixo (0,7/g de água por gramas de peso seco); enquanto que a secagem lenta levou a perda completa da viabilidade (PAMMENTER *et al.*, 1998). Para Magistrali *et al.* (2013), em estudos com sementes de *Genipa americana*, a secagem lenta aumentou a capacidade de tolerância à dessecação e ao armazenamento. Em sementes de café (*Coffea anéfora*), a secagem rápida causou uma maior redução na qualidade fisiológica, quando comparada com secagem lenta e intermediária (ROSA *et al.*, 2005).

A espécie *Ocotea puberula*, segundo MORI *et al.* (2012), tem suas sementes classificadas como recalcitrantes, e, com base no exposto acima, objetivou-se neste trabalho verificar a influência da secagem em estufa e em sílica gel, na qualidade destas sementes e determinar o seu grau de umidade crítico e grau letal.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *Ocotea puberula* foram coletadas no município de Brunópolis, SC, que possui latitude de 27°18'21"S, longitude de 50°52'06"O, altitude de 843 m, temperatura média de 19 °C e precipitação média anual de 1.733 mm (GOVERNO DO ESTADO DE SANTA CATARINA, 2013; CLIMATE-DATA, 2014).

Foram coletadas sementes de cinco matrizes, com o auxílio de podão, de frutos com coloração preto-azulada, considerados maduros. A remoção da polpa foi

feita manualmente, com o auxílio de peneiras e água corrente. O excesso de água foi retirado com papel toalha.

A determinação do teor de água foi realizada pelo método de estufa, onde as sementes foram submetidas à temperatura de $103 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Foram utilizadas 2 repetições, contendo 10 sementes por repetição. Os resultados foram expressos em porcentagem com base no peso úmido das sementes, conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Para a secagem das sementes, foram estabelecidos 10 gradientes de umidade diferentes, iniciando com 38 (umidade inicial do lote) e tendo como último gradiente 18%, variando de 2 em 2%. Os gradientes de umidade foram obtidos pela diferença de peso, entre o inicial e o peso alvo, conforme fórmula abaixo, descrita por Hong; Ellis (1996):

$$[1] \quad \text{Peso alvo} = [(100 - U_{\text{inicial}}) / (100 - U_{\text{alvo}})] \times \text{Peso inicial da amostra}$$

Após as sementes terem alcançado cada gradiente de umidade pré-estabelecidos, foi determinado o teor de água pelo método de estufa, como descrito acima, com a finalidade de aferir os resultados obtidos com a fórmula citada acima.

Para a secagem lenta, 160 sementes foram pesadas e colocadas em 11 sacos do tipo "Tule", que permite a passagem de ar e água. Os sacos foram dispostos de forma aleatória em um dessecador com sílica em gel em temperatura constante de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Já para a secagem rápida, 160 sementes foram pesadas e colocadas em 11 telas de alumínio, para facilitar a retirada de água. As telas foram dispostas de forma aleatória em uma estufa de ventilação forçada e com temperatura constante de $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras, de ambos os métodos de secagem, eram pesadas regularmente até atingirem o peso alvo e então eram submetidas à determinação da umidade e aos testes de viabilidade e vigor.

A qualidade fisiológica das sementes foi determinada utilizando-se os testes de germinação (BRASIL, 2009); Índice de Velocidade de Germinação (IVG) com fórmula proposta por Maguire (1996); Tempo Médio de Germinação (T 50) relatado por Copeland; McDonald (1985); e Tetrázólio (Tz) com metodologia de Kalil Filho (2008).

Para os testes de germinação, IVG e T 50 as sementes foram condicionadas em papel *germitest*, previamente umedecido com 2 vezes o peso do papel e colocadas para germinar em germinador *Mangendorffii*, com temperatura de $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sob luz constante. Para cada gradiente de umidade foram utilizadas quatro repetições de 20 sementes, com a retirada manual do tegumento. Os resultados foram expressos em porcentagem de plantas normais, segundo Brasil (2009).

Para o teste de tetrázólio, 60 sementes, divididas em quatro repetições, foram seccionadas longitudinalmente, através do centro do eixo embrionário, com auxílio de um bisturi e imersas na solução de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrázólio (pH 6,5 a 7,0), na concentração de 0,5%, pelo período de 1 hora. Para auxiliar a visualização de todos os detalhes das sementes, foram utilizadas lupas de mesa com lâmpada fluorescente. Os critérios de análise foram: 1- semente viável (coloração avermelhada), 2- sementes inviáveis (sem coloração), os resultados foram expressos em porcentagem de sementes viáveis.

Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram testados quanto à normalidade e submetidos à análise de variância. Os dados de germinação e T 50, expressos em porcentagens, mostraram-se não homogêneos pelo teste de Shapiro-Wilk, foram, então, transformados em

$\arcsen \sqrt{x/100}$, e os dados de IVG foram transformados em $\sqrt{x} + 0,5$, conforme metodologia sugerida por Santana; Ranal (2004). Constatando significância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, as análises foram realizadas com o programa estatístico ASSISTAT®.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes submetidas aos métodos de secagem em estufa e em sílica gel levaram, respectivamente, 240 horas (10 dias) e 602 horas, (25 dias), para chegarem até o último ponto de secagem (18%). Devido a esta diferença, o método de estufa foi denominado como secagem rápida e o método de sílica gel como secagem lenta.

Com o auxílio da fórmula do peso alvo (HONG; ELLIS, 1996), foi possível determinar os teores de água aproximados pré-estabelecidos no estudo, que foram semelhantes aos verificados por meio da determinação em estufa (Tabela 4).

Tabela 4. Gradientes de umidade pré-estabelecidos (GPE) e atingidos (U%), por meio da utilização de metodologia do peso alvo, em sementes de *Ocotea puberula*.

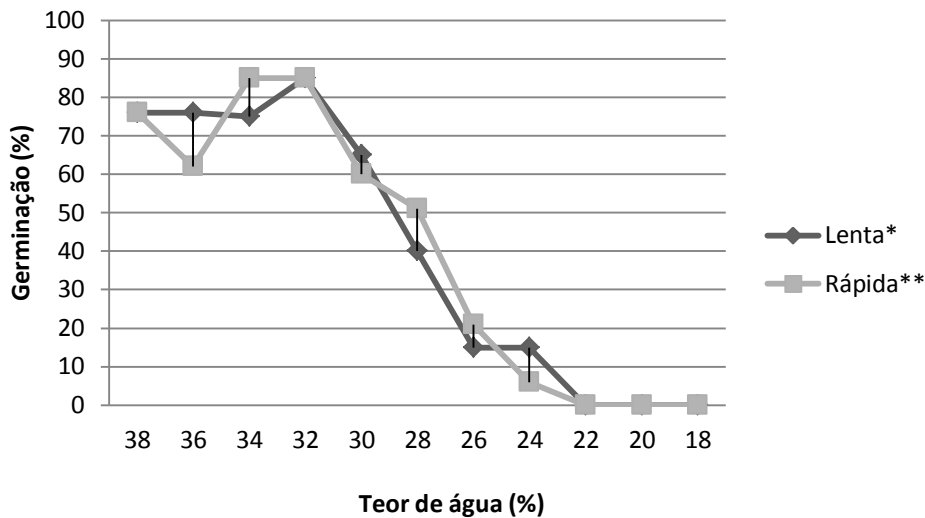
Secagem Rápida		Secagem Lenta	
GPE	U%	GPE	U %
38	37,79	38	38,28
36	36,39	36	36,34
34	33,71	34	34,52
32	32,13	32	32,11
30	29,69	30	30,37
28	29,31	28	28,74
26	26,63	26	26,99
24	23,65	24	24,77
22	22,53	22	21,88
20	20,79	20	20,97
18	19,45	18	18,99

Fonte: produção do próprio autor.

A germinação das sementes de *Ocotea puberula* variou ao longo da secagem. A germinação inicial, com as sementes recém colhidas, foi de 76%, que manteve-se para o gradiente de 36% na secagem lenta, mas diminuiu na secagem rápida (62%). Foi observado que a porcentagem de germinação aumentou nos dois próximos gradientes (34 e 32%), na secagem rápida, mas diminuiu até chegar a zero aos 22% de teor de água, para ambos os tipos de secagem (Gráfico 1).

Este aumento de geminação para sementes quando submetidas a uma secagem parcial também foi observado nos trabalhos com sementes de *Averrhoa carambola* (Oliveira *et al.*, 2011), e *Caesalpinia férrea* (Gnoatto; Cruz-Silva, 2011). Não se sabe ao certo quais fatores elevam a germinação, mas alguns estudos sugerem que funções normais celulares, das sementes recém colhidas, podem ser alteradas quando são submetidas a secagens, podendo desativar mecanismos de dormência ou acelerando processos germinativos (BERJAK *et al.*, 1990; PAMMENTER *et al.*, 1998; LEPRINCE *et al.*, 2000).

Gráfico 1: Germinação de sementes de *Ocotea puberula*, submetidas à secagem lenta e rápida.



*Regressão linear Sec. Lenta: $y=20,774+0,212x$ ($R^2=0,823$).

**Regressão linear Sec. Rápida: $y=20,484+0,218x$ ($R^2=0,835$).

Fonte: produção do próprio autor.

A umidade crítica encontrada para esta espécie foi 32%, sendo que abaixo deste gradiente os valores da viabilidade das sementes foram decrescentes até chegar em 15% (secagem lenta) e 6% (secagem rápida) no gradiente de umidade de 24%. A partir do gradiente 22% não houve germinação, sendo esse considerado seu grau de umidade letal. Hirano (2002), realizando trabalho de pontos de secagem com a mesma espécie, constatou que a queda acentuada de germinação de *Ocotea puberula* se iniciou quando as sementes atingiram 31,8% de umidade.

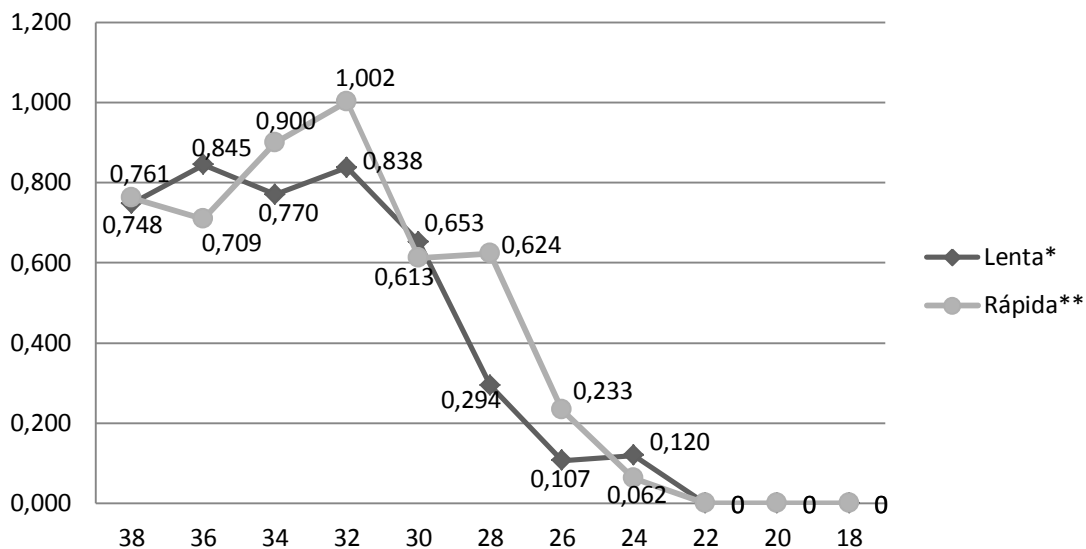
Os graus de umidade críticos e letais dependem da espécie. Em sementes de *Cryptocarya aschersoniana*, da família Lauraceae, Tonetti (2013) concluiu que o grau crítico de umidade situa-se entre 28,1 e 26,3 e o grau letal entre 21,5 e 18,1%. Para sementes de *Archantophoenix alexandrae*, de comportamento recalcitrante, a umidade considerada crítica foi de 24,84% em estudo realizado por Andrade *et al.* (2005).

A germinação das sementes de *Ocotea puberula* foi estatisticamente diferente, em relação aos tipos de secagem, em seis pontos. No entanto, de forma geral, os dois métodos de secagem demonstraram pontos de umidade crítica e letal semelhantes. Os mesmos resultados foram encontrados por Gemaque *et al.* (2005) em sementes de *Tabebuia impetiginosa* Mart. Standl, por Oliva *et al.* (2012) em sementes de *Crambe abyssinica* Hochst, e por Nery (2006), em sementes de *Calophyllum brasiliense* Cambess.

A maioria das sementes que não germinaram estavam dormentes até os 32% de teor de água, embeberam água porém não lançaram radícula, abaixo de 32% do teor de água as sementes não germinadas encontravam-se mortas, com o embrião escuro (dados não apresentados).

Quanto ao vigor (IVG e T50), foram observados decréscimos a partir de 32% de umidade, independente do tipo de secagem. Estes índices decaem até atingirem zero no grau de umidade crítico (Gráficos 2 e 3).

Gráfico 2: Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de *Ocotea puberula*, submetidas à secagem lenta e rápida.

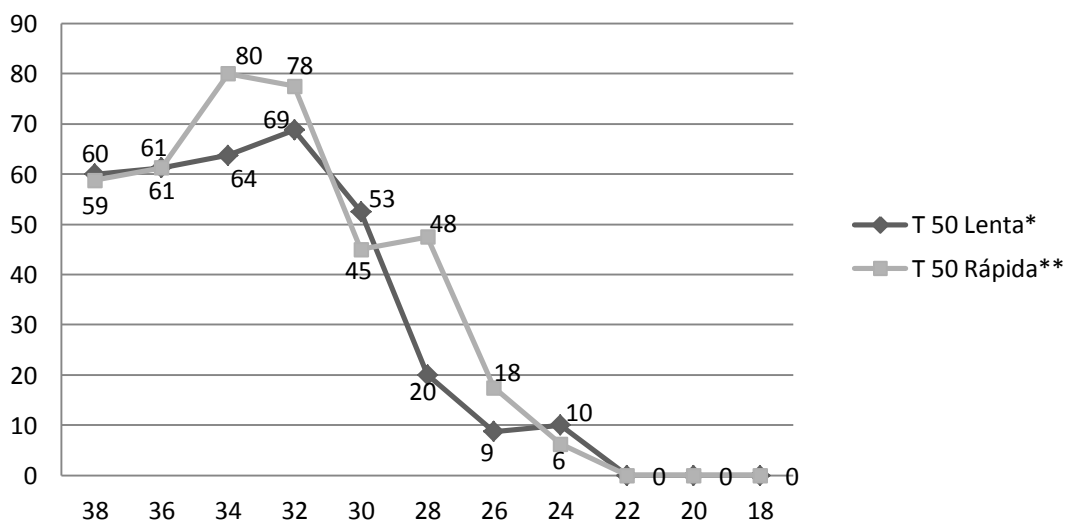


*Regressão linear Sec. Lenta: $y=12,641+15,332x$ ($R^2=0,854$).

**Regressão linear Sec. Rápida: $y=13,129+14,338x$ ($R^2=0,804$).

Fonte: produção do próprio autor.

Gráfico 3: T 50 (%) de sementes de *Ocotea puberula*, submetidas a secagem lenta e rápida.



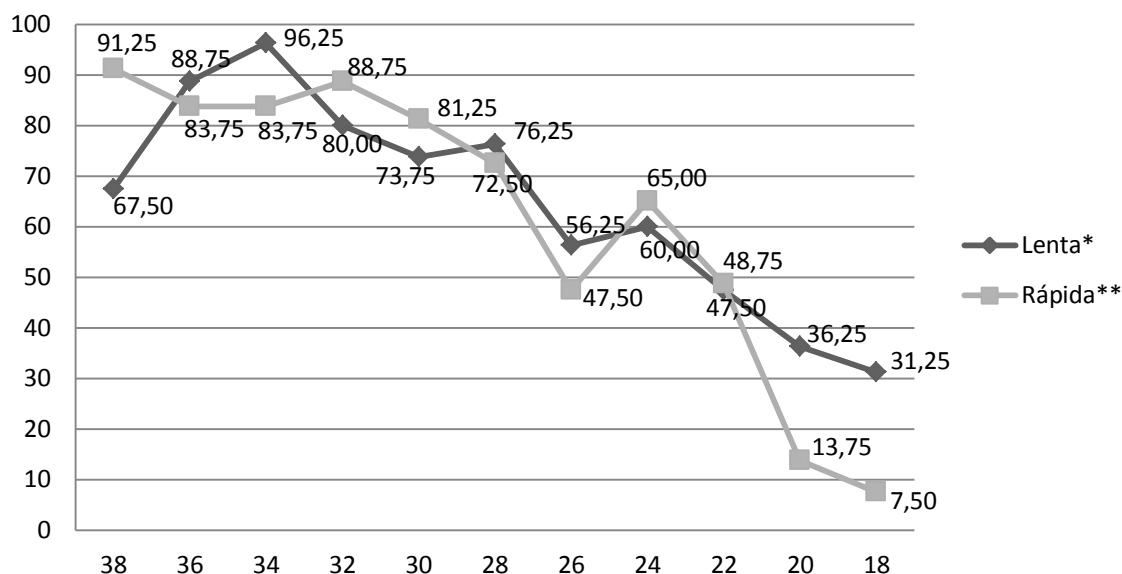
*Regressão linear Sec. Lenta: $y=20,709+0,253x$ ($R^2=0,835$).

**Regressão linear Sec. Rápida: $y=20,709+0,229x$ ($R^2=0,793$).

Fonte: produção do próprio autor.

Em relação ao teste de tetrazólio, foram verificados maiores valores em relação aos obtidos no teste de germinação. Com 22% do teor de água, por exemplo, considerado nível letal para as sementes, não foi verificada germinação das sementes, mas foram obtidos valores superiores a 45% no teste de tetrazólio (Gráfico 4).

Gráfico 4: Viabilidade (teste de tetrazólio) de sementes de *Ocotea puberula*, submetidas a secagem lenta e rápida.



Fonte: produção do próprio autor.

*Regressão linear Sec. Lenta: $y=17,968+0,166x$ ($R^2=0,359$).

**Regressão linear Sec. Rápida: $y=16,128+0,191x$ ($R^2=0,763$).

A explicação para este fato pode estar nos estudos de Marcos Filho (2005) e Walters *et al.* (2005), onde afirmam que a redução da umidade da semente a níveis intermediários de 20 a 33%, faixa na qual a maioria das sementes recalcitrantes podem ser armazenadas, mantêm a taxa de respiração consideravelmente alta e o metabolismo ativo, mas o sistema de reparo já não funciona perfeitamente, fazendo com que haja redução no potencial de germinação. Para Walters *et al.* (2005), nesse nível de hidratação, as sementes sofrem uma aceleração do envelhecimento, o que as leva a morte.

5.6 CONCLUSÃO

A redução do teor de água abaixo de 32% prejudica a germinação de sementes de *Ocotea puberula*, sendo esse valor considerado o grau de umidade crítico, e 22% o grau de umidade letal para sementes desta espécie, independente do tipo de secagem (em sílica gel ou estufa).

5.7 REFERENCIAL TEÓRICO

ANDRADE, A.C.S.; CUNHA, R. Grau crítico de umidade? **Informativo do Comitê Técnico de Sementes Recalcitrantes**. Brasília, n.1, p.2-3, 1996.

ANDRADE, R.R.; SCHORN, L.A.; NOGUEIRA, A.C. tolerância à dessecação em sementes de *Archantophoenix alexandrae* Wendl. and Drud (Palmeira real australiana). **Ambiência**, v.1, n.2, p. 279 – 288, 2005.

BERJAK, P.; FARRANT, J. M.; MYCOCK, D. J.; PAMMENTER, N. W. Recalcitrant (homoiohydrous) seeds: the enigma of their desiccation-sensitivity. **Seed Science and Technology**, v. 18, n. 2, p. 297-310, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: 2009. 365p.

CLIMATE-DATA. 2014. Disponível em: <<http://pt.climate-data.org/>>. Acesso em: 24 de março de 2014.

COPELAND, L.O.; McDONALD, M.B. **Principles of seed science and technology**. 2ed. New York: Macmillan, 1985. 321 p.

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

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

GEMAQUE, R.C.R.; DAVIDE, A.C.; SILVA, E. A. A.; FARIA, J.M.R. efeito das secagens lenta e rápida em sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.). **Cerne**, v. 11, n. 4, p. 329 - 335, 2005.

GNOATTO, F.L.C.; CRUZ-SILVA, C.T.A. Superação da dormência em sementes de pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *leiostachya* Benth.). **Cascavel**, v.4, n.2, p.81-94, 2011.

GOVERNO DO ESTADO DE SANTA CATARINA. 2013. Disponível em: <<http://www.sc.gov.br>>. Acesso em: 16 janeiro 2014.

HIRANO, E. Maturação Fisiológica, Tolerância à Dessecação e Conservação de Sementes de Lauráceas da Mata de Araucária de Santa Catarina. **Seed Science Research**, v.4, p. 123-126, 2002.

HONG, T. D.; ELLIS, R.H. **A protocol to determine seed storage behavior**. Rome: IPGRI, 1992. 62p.

HONG, T. D.; ELLIS, R.H. **A protocol to determine seed storage behavior**. Rome: IPGRI, 1996. 62p.

JOSÉ, A. C.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C.; MELO, A. J. S.; TOOROP, P. E. Effects of drying rate and storage time on *Magnolia ovate* Spreng. seed viability. **Seed Science and Technology**, v. 39, n. 2, p. 425-434, 2011.

KALIL FILHO, A. N.; LOPES, A.J.; RÉGO, G.M.; TOMACHITZ, A. Avaliação da Qualidade Fisiológica de Sementes de Imbuia pelo Teste do Tetrázólio (Nota científica). **Pesquisa Florestal Brasileira**. n.57, p.69 -72, 2008.

KERMODE, A.R.; FINCH-SAVAGE, B.E. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H.W. (Ed.). **Desiccation and survival in Plants: Drying without dying**. Oxon: CABI Publishing, 2002. 422p.

LEPRINCE, O.; HARREN, F.J.M.; BUITINK, J.; ALBERTA, M.; HOEKSTRA, F.A. Metabolic dysfunction and unabated respiration precede loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles. **Plant Physiology**. v. 122, n. 2, p. 597 – 608, 2000.

MAGISTRALI, P. R.; JOSE, A. C.; FARIA, J. M. R.; GASPARIN, E. Physiological behavior of *Genipa americana* L. seeds regarding the capacity for desiccation and storage tolerance. **Journal of Seed Science**. vol.35, n.4, p. 495-500, 2013.

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

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

MORI, E.S.; PINÃ-RODRIGUES, F.C.M. FREITAS, N.P.; MARTINS, R.B. (org.). **Sementes florestais: guia para germinação de 100 espécies nativas**. São Paulo: Instituto Refloresta, 159 p., 2012.

NERY, F. C. **Aspectos da germinação, armazenamento de sementes, crescimento inicial e anatomia de plantas jovens de *Calophyllum brasiliense* Cambess.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras: Lavras, 173 p. 2006.

OLIVA, A.C.E.; BIAGGIONI, M.A.M; CAVARIANI, C. Efeito imediato do método de secagem na qualidade de sementes de crambe. **Energia na Agricultura**. v. 27, n. 3, p.16-30, 2012.

OLIVEIRA, M.T.R.; BEBER, P. A.; CARLESSO, V. O.; THIÉBAU, J. T. L.; VIEIRA, H. D.; PEREIRA, R. C. Efeito da secagem por convecção na germinação de sementes de carambola. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 2 p. 233 - 240, 2011.

PAMMENTER, N. W.; GREGGAINS, V.; KIOKO, J. I.; WESLEY-SMITH, J.; BERJAK, P.; FINCH-SAVAGE, W. E. Effects of differential drying rates on viability retention of recalcitrant seeds of *Ekebergia capensis*. **Seed Science Research**, v. 8, p. 463 - 471, 1998.

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

ROBERTS. E.H. Storage environment and the control of viability. In: ROBERTS, E.H. **Viability of seeds**. London: Syracuse University Press, 1972. p.14-58.

ROSA, S. D. V. F.; BRANDÃO JÚNIOR, D.; VON PINHO, E. V.; VEIGA, A. D.; CASTRO E SILVA, L. H. Effects of different drying rates on the physiological quality of *Coffea canephora* Pierre seeds. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.17, n.2, p.199-205, 2005.

SANTANA, D.G.; RANAL, M.A. **Análise da germinação: um enfoque estatístico**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2004. 248 p.

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

TONETTI, O.A.O. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de *Cryptocarya aschersoniana* submetidas à secagem e ao armazenamento**. Tese (doutorado). Lavras : UFLA, 2013. 89 p.

WALTERS, C.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P.; CRANE, J. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. **Seed Science Research**. 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**. v. 45, p. 751-758, 2005.

WESLEY-SMITH, J.; PAMMENTER, N.; BERJAK, P. The Effects of Two Drying Rates on the Desiccation Tolerance of Embryonic Axes of Recalcitrant Jackfruit (*Artocarpus Heterophyllus* LAMK.) seeds. **Annals of Botany**. v. 8, n. 4, p. 653 – 664, 2001.

6 VIABILIDADE E INTEGRIDADE DO DNA DE SEMENTES DE *Ocotea puberula* (Rich.) Ness AO LONGO DO ARMAZENAMENTO.

6.1 RESUMO

Sementes de *Ocotea puberula* são recalcitrantes, não toleram secagem e baixa temperatura no armazenamento por longos períodos. Objetivou-se com este trabalho verificar a viabilidade e a integridade do DNA destas sementes, durante o armazenamento sem fruto e com fruto. Para o estudo, sementes de cinco lotes, coletados no estado de Santa Catarina, foram armazenadas com e sem fruto, em câmara fria (UR 40% e Temp. 10 ± 2 °C), pelos períodos de 0, 3, 6 e 9 meses. A cada intervalo de tempo, foram determinados o teor de água, a viabilidade das sementes, por meio dos testes de germinação e tetrazólio, além da integridade do DNA das sementes. Para a determinação da integridade do DNA, as sementes foram maceradas em nitrogênio líquido, e a extração do DNA foi realizada pelo método CTAB, e as amostras fotografadas em transluminador. Foi verificado que sementes de *Ocotea puberula* perderam sua viabilidade após 3 meses de armazenamento. A embalagem utilizada (saco de papel "kraft") foi possivelmente prejudicial para o armazenamento, por ser um material permeável, atuou favorecendo a secagem das sementes ao longo do tempo. Com o gel de agarose 0,8% é possível afirmar que a degradação do DNA ocorre em estágios iniciais do processo de deterioração em sementes armazenadas de *Ocotea puberula*.

Palavras-chave: Armazenamento, sementes recalcitrantes, canela-guaicá; DNA.

6.2 ABSTRACT

Seeds of *Ocotea puberula* are recalcitrant, not tolerate drying and low temperature storage for long periods. The objective of this work was to verify the viability and DNA integrity of these seeds during storage, without or with fruit. For the study, five seed lots, collected in the state of Santa Catarina, were stored with and without fruit in cold storage (40% RH and temperature 10 ± 2 °C) for periods of 0, 3, 6 and 9 months. At each time interval were determined water content, the viability of the seeds by means of tetrazolium and germination tests, and the integrity of the DNA of the seeds. To determine the integrity of the DNA, the seeds were ground in liquid nitrogen, and DNA extraction was performed by the CTAB method, and samples were photographed on transilluminator. It was found that seeds of *Ocotea puberula* lost their viability after 3 months of storage. The packaging used (kraft paper) was possibly harmful for storage, being a permeable material, acted favoring the drying of the seed over time. With 0,8 % agarose gel is possible to state that DNA degradation occurs in the early stages of the process of deterioration in stored seeds of *Ocotea puberula*.

Keywords: Storage, recalcitrant seeds, canela-guaicá, DNA.

6.3 INTRODUÇÃO

O armazenamento tem por objetivo conservar as sementes, preservando suas qualidades física, fisiológica e sanitária. Além disso, tem a função de manter uma disponibilidade contínua de sementes viáveis, imprescindíveis aos programas florestais e conservação de bancos de germoplasma (FLORIANO, 2004).

A viabilidade das sementes, no armazenamento, pode ser influenciada pela espécie, variedade, qualidade inicial, umidade das sementes, umidade relativa e temperatura de armazenagem, fungos e insetos, tipo de embalagem e duração do período de armazenamento (ROBERTS, 1972; MINOR; PASCHAL, 1982; POPINIGIS, 1985; TEKRONE *et al.* 1987; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

A principal metodologia para conservação de sementes durante o armazenamento é a redução do seu metabolismo, através da remoção de água por meios artificiais e da redução da temperatura. Contudo, nem todas as sementes toleram ser armazenadas a baixas temperaturas e umidade (MELLO, 2008), perdendo sua qualidade rapidamente. Sementes ortodoxas podem ser secas a graus de umidade baixos e com isso podem ser armazenadas por longos períodos de tempo, enquanto que as recalcitrantes são dispersas com conteúdos elevados de água e não podem perder grande porcentagem de água ou serem armazenadas por períodos que excedam algumas semanas ou meses, o que representa um desafio para sua conservação *ex situ* (MARCOS FILHO, 2005).

A perda da viabilidade das sementes está fortemente correlacionada com alterações na atividade respiratória, acúmulos de substâncias tóxicas, danos à integridade do DNA e a perda gradativa da integridade do sistema de membranas acarretando a liberação de solutos celulares, importantes para o funcionamento da célula. Internamente, as sementes são compostas de muitas substâncias de reserva (carboidratos, proteínas, lipídios) em proporções que variam para cada espécie (SANTOS *et al.*, 2004; MARCOS FILHO, 2005). Sementes com baixa viabilidade perdem a eficiência em sintetizar RNA e as lesões ao DNA acentuam a redução dessas atividades que podem gerar um processo de transcrição defeituoso da mensagem genética. Tais danos são acumulados mais rapidamente em sementes úmidas que nas secas, e estão relacionados ao envelhecimento e à perda da viabilidade das sementes (MARCOS FILHO, 2005).

Hong *et al.* (1996) afirmam que informações sobre o comportamento no armazenamento de sementes de espécies de Lauraceae são escassas, estes autores verificaram que, dentre 34 espécies, 74% apresentavam indícios de recalcitrância, como *Nectandra grandiflora*, *Nectandra lanceolata*, *Nectandra oppositifolia*, *Ocotea corymbosa* e *Ocotea pulchella* (CARVALHO *et al.*, 2008); *Ocotea porosa*, *Ocotea catharinensis* e *Ocotea odorífera* (MORITZ, 2009); *Cinnamomum zeylanicum* (SILVA *et al.*, 2012); *Ocotea puberula* (MORI *et al.*, 2012).

A conservação de espécies que apresentam sementes recalcitrantes é especialmente necessária, pois nem sempre o período de coleta é o ideal para a semeadura para produção de mudas (FONSECA; FREIRE, 2003), e sua longevidade é curta, podendo ser de 30 dias, como estudos para a espécie *Erythroxylum coca* (KING; ROBERTS, 1979), até seis meses, como para *Ocotea porosa* (TONIN, 2006).

Sementes de *Ocotea puberula* são de comportamento recalcitrante ao armazenamento (EIBL *et al.*, 1994; MORI *et al.*, 2012), perdendo totalmente a viabilidade em ambiente não controlado em três meses, sendo difícil a sua conservação (EIBL *et al.*, 1994). Randi (1982) recomenda que as sementes desta espécie devem ser armazenadas com os frutos, pois os mesmos possuem substâncias inibidoras da germinação, garantindo, desse modo, a dormência.

Os trabalhos científicos que incluem o armazenamento de sementes em seus frutos, como alternativa para sementes sensíveis ao dessecamento são escassos, mas com efeito positivo, como para sementes de *Caesalpinia leiostachya* (BIRUEL *et al.*, 2007); e *Crambe abyssinica* (COSTA *et al.*, 2012).

Com base no que foi exposto acima, o objetivo deste trabalho foi determinar a viabilidade e integridade do DNA em sementes de *O. puberula* armazenadas com e sem o fruto, em condições de câmara fria.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *Ocotea puberula* foram coletadas no estado de Santa Catarina, nos municípios de Joaçaba, Fraiburgo, Curitibanos, Ponte Alta e Brunópolis, estabelecendo cinco lotes distintos (Tabela 5).

Tabela 5. Dados Geográficos e Climáticos dos municípios de coleta de sementes de *Ocotea puberula*.

Lote	Município	Latitude	Longitude	Altitude	Temp. Média	Clima
1	Joaçaba	27°10'41"S	51°30'17"O	522 m	18 °C	Subtropical Úmido
2	Fraiburgo	27°03'20"S	50°03'34"O	1048 m	16,1 °C	Subtropical Úmido
3	Curitibanos	27°16'44"S	50°34'57"O	987 m	15,2 °C	Subtropical Úmido
4	Ponte Alta	27°29'03"S	50°22'49"O	856 m	16 °C	Subtropical Úmido
5	Brunópolis	27°18'21"S	50°52'06"O	843 m	19 °C	Subtropical Úmido

Fonte: Governo do Estado de Santa Catarina (2014) e Köppen (1936).

Foram colhidos frutos com coloração preto-azulada, considerados maduros, de cinco matrizes em cada município, com exceção de Fraiburgo, onde foram encontradas apenas duas matrizes. Após a coleta, os frutos foram acondicionados em sacos plásticos e transportados para o Laboratório de Sementes da Universidade Estadual de Santa Catarina.

Para as sementes armazenadas sem o fruto, a remoção da polpa foi feita manualmente, com o auxílio de peneiras e água corrente. O excesso de água foi retirado com papel toalha.

Para o armazenamento, 180 sementes de cada lote, com e sem fruto, foram colocadas em sacos de papel do tipo "Kraft", armazenadas em câmara fria (UR 40% \pm 3; Temp. 10 °C \pm 2). Aos 0, 3, 6 e 9 meses foram retiradas amostras para avaliação da umidade, viabilidade (testes de germinação e tetrazólio) e integridade do DNA.

A determinação do teor de água foi realizada pelo método de estufa à temperatura de 103 °C \pm 2 °C durante 24 h. Foram utilizadas 2 repetições para cada lote, contendo 10 sementes por repetição. Os resultados foram expressos em porcentagem com base no peso úmido das sementes, conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Para o teste de germinação, as sementes foram postas em papel *germitest*, previamente umedecido a 2 vezes o peso do papel (BRASIL, 2009), e colocadas para germinar em germinador tipo Mangerdorffii regulados a 30 °C, sob luz constante. Para cada lote, foram utilizadas quatro repetições de 20 sementes sem tegumento. A avaliação foi realizada após 36 dias da montagem do teste, sendo consideradas germinadas sementes que deram origem a plântula normal.

Para o teste de tetrazólio, 60 sementes, divididas em quatro repetições, foram seccionadas longitudinalmente, através do centro do eixo embrionário, com auxílio de um bisturi e imersas na solução de 2,3,5 trifetil cloreto de tetrazólio (pH 6,5 a 7,0), na concentração de 0,5%, pelo período de 1 hora (KALIL FILHO *et al.*, 2008). Para auxiliar a visualização de todos os detalhes das sementes, foram utilizadas lupas de mesa com lâmpada fluorescente. Os critérios de análise foram: 1- semente viável

(coloração avermelhada), 2- sementes inviáveis (sem coloração), os resultados foram expressos em porcentagem de sementes viáveis.

Para a determinação da integridade do DNA, sementes de ambos os tratamentos foram previamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em *Deep Freezer* (Temp. -70 °C), até o momento das análises. As sementes armazenadas com fruto, foram extraídas antes de serem congeladas em nitrogênio líquido. Para as análises, as sementes foram maceradas em nitrogênio líquido, com o auxílio de um moinho elétrico. Foi utilizado o protocolo CTAB (BRASILEIRO, 1998) para a extração: 40 a 50 mg das amostras maceradas foram colocadas em microtubos de 2 ml e acrescidos 350 µL de tampão CTAB contendo 2% de β-mercaptoetanol, incubadas em banho-maria à 65 °C por 1 hora. Foi adicionado ao microtubo 350 µL da solução CIA (Clorofórmio-álcool-isoamílico) e homogeneizado por 25 minutos. As amostras foram centrifugadas a 1400 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 2 ml, onde foi adicionado 250 µL de isopropanol e colocado em freezer durante 1 hora para decantação do DNA. As amostras foram novamente centrifugadas, onde se descartou o sobrenadante e ao precipitado formado foi adicionado etanol 70% e álcool absoluto (95%) para lavagem. O precipitado foi suspenso em solução TE pH 8 e armazenado em geladeira até a quantificação em gel agarose (0,8%), onde foi acrescido 2 µL de brometo de etídio e corrido em cuba de eletroforese com solução TBE 0,5x, corrente elétrica de 100 volts pelo período de aproximadamente 2 horas. As amostras foram fotografadas em transluminador.

Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram testados quanto à normalidade, e foi realizada a análise de variância. Os dados de germinação e tetrazólio, expressos em porcentagens, que se mostraram não homogêneos pelo teste de Shapiro-Wilk, foram transformados em $\arcseno \sqrt{x/100}$, conforme metodologia sugerida por Santana; Ranal (2004). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, as análises foram realizadas com o programa estatístico ASSISTAT®.

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação observada para sementes recém colhidas variou entre 52 e 95% (Tabela 6). As diferenças encontradas na germinação de lotes de procedências distintas da mesma espécie podem ocorrer, conforme Wielewicki *et al.* (2006), devido à variabilidade genética das espécies florestais silvestres, ou ainda devido a fatores correlacionados à época de maturação, à colheita e ao beneficiamento de sementes. Diversos fatores internos e externos à semente podem interferir na germinação (MALAVASI, 1988; MARCOS FILHO, 2005).

Tabela 6: Germinação (%) de sementes de *Ocotea puberula*, armazenadas com (CF) e sem o fruto (SF), pelo período de 9 meses em câmara fria (40%UR e 10 ± °C).

Lote	Armazenamento							
	0 meses	3 meses		6 meses		9 meses		CV%
		SF	CF	SF	CF	SF	CF	
L1	66 Abc*	56 ABb	51 Bb	14 Cabc	2 Cab	0 C	0 C	27,76
L2	95 Aa	78 Ba	76 Ba	2 Cbc	0 Cb	0 C	0 C	8,99
L3	75 Aab	61 ABab	42 Bb	18 Cab	0 Cb	0 C	0 C	29,32
L4	68 Abc	58 ABab	46 Bb	0 Cc	8 Ca	0 C	0 C	24,08
L5	52 Ac	44 Ab	28 Bc	26 Ba	0 Cb	0 C	0 C	29,47
CV (%)	13,16	16,34	14,08	62,27	158,11	-	-	

F ^{cal}	11,10	6,29	26,75	8,43	4,25	-	-
------------------	-------	------	-------	------	------	---	---

* Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: produção do próprio autor.

Durante o armazenamento, a germinação das sementes foi reduzida gradativamente, independente da presença ou não do fruto, até chegarem aos 9 meses com porcentagens nulas. O mesmo comportamento foi verificado em diversas espécies florestais, como *Tabebuia impetiginosa*, *Euterpe edulis* e *Eugenia pyriformis* (TONIN, 2006; CORRÊA *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2009; SCALON *et al.*, 2012).

Foi verificado que, de forma geral, sementes armazenadas sem o fruto mantêm sua qualidade por até 3 meses. Esses resultados divergem dos obtidos em sementes de *Caesalpinia leiostachya* (BIRUEL *et al.*, 2007); e *Crambe abyssinica* (COSTA *et al.*, 2012), onde o armazenamento com fruto foi eficaz, mantendo a viabilidade por mais tempo. Randi (1982) recomenda que as sementes desta espécie devam ser armazenadas com os frutos, pois os mesmos possuem substâncias inibidoras da germinação, garantindo, desse modo, a dormência. Porém, o que se observou neste trabalho é que sementes quando armazenadas com o fruto tendem a ter uma viabilidade similar ou menor do que as sementes armazenadas sem o fruto.

Os resultados do teste de tetrazólio demonstram que sementes armazenadas sem o fruto mantiveram a qualidade por mais tempo durante o armazenamento (Tabela 7), estes resultados também foram observados superiores ao teste de germinação.

Para o presente trabalho é possível afirmar que as sementes de *Ocotea puberula* perdem sua viabilidade após três meses de armazenamento em ambiente controlado (câmara fria) (Tabela 7). Eibl *et al.* (1994) encontraram comportamento semelhante ao armazenar sementes da mesma espécie em ambiente não controlado, afirmando que as sementes são de comportamento recalcitrante ao armazenamento, perdendo totalmente a viabilidade em ambiente não controlado em três meses, sendo difícil a sua conservação.

Tabela 7: Sementes viáveis de *Ocotea puberula* (%), obtidas pelo teste de tetrazólio, armazenadas pelo período de 9 meses, em câmara fria, com (CF) e sem o fruto (SF).

Lote	Armazenamento							
	0 meses	3 meses		6 meses		9 meses		CV%
		SF	CF	SF	CF	SF	CF	
L1	74 Aa	52 ABab	18 CDd	40BCab	14 CDc	0 D	0 D	41,62
L2	77 Aa	62 ABab	70 Aa	44 Bab	48 Ba	0 C	0 C	19,36
L3	53 Bbc	77 Aa	33 Ccd	57 Ba	24 Cbc	0 D	0 D	23,22
L4	72 Aab	45ABCb	58 ABab	27 CDb	44 BCbc	0 D	0 D	33,26
L5	50 Bc	65 Aab	45 BCbc	48 Bab	33 Cabc	0 D	0 D	15,19
CV (%)	13,62	23,66	21,46	26,84	31,07	-	-	
F ^{cal}	7,74	3,01	17,84	3,72	7,78	-	-	

* Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: produção do próprio autor.

Em relação ao teor de água, foi verificada grande variação ao longo dos 9 meses de armazenamento, sendo que para todos os lotes houve decréscimo significativo. Sementes do Lote 1, que tinham 36,13% de umidade inicial, após 9 meses de armazenamento reduziram as porcentagens para 10,24% em sementes sem o fruto e 8,20% para sementes com fruto (Tabela 8).

Tabela 8: Umidade (%) das sementes de *Ocotea puberula* armazenadas em câmara fria pelo período total de 9 meses, com (CF) e sem o fruto (SF).

Lote	Armazenamento							
	0 meses	3 meses		6 meses		9 meses		CV%
		SF	CF	SF	CF	SF	CF	
L1	36,13 Ab*	17,13 Bc	14,34 BCb	11,67 CDb	10,24 CDb	10,24 DEb	8,20 Ea	4,62
L2	35,62 Ab	26,88 Ba	22,82 BCa	21,46 BCa	13,21 CDa	13,21 DEa	8,13 Ea	8,69
L3	40,34 Aa	22,13 Bb	16,36 Cab	12,84 Dab	10,32 Eb	10,32 Eb	7,40 Fa	2,73
L4	38,85 Aa	20,81 Bbc	19,94 Bab	16,91 BCab	11,70 CDab	11,70DEab	8,05 Ea	5,41
L5	40,94 Aa	27,05 Ba	22,72 Ba	19,10 Bab	11,46 Cab	11,46 CDab	9,22 Da	6,2
CV (%)	1,53	4,38	10,65	13,79	3,89	3,89	5,87	
F ^{cal}	33,63	35,69	6,76	6,66	15,05	15,05	3,67	

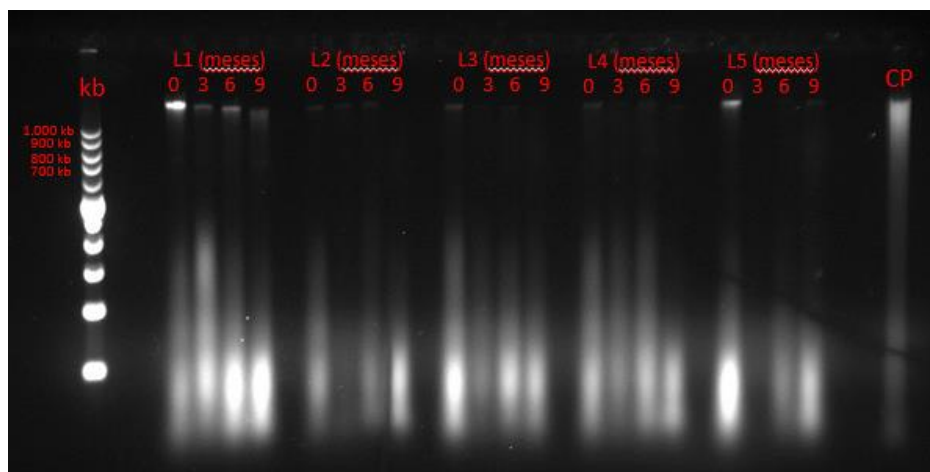
* Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: produção do próprio autor.

Os resultados observados sugerem que a umidade das sementes foi um fator decisivo para o armazenamento. Provavelmente, devido ao uso de papel Kraft as sementes sofreram secagem durante o armazenamento, reduzindo o teor de água além do limite letal, ocasionando a morte das sementes (Tabela 8). O grau de umidade letal equivale ao valor a partir da qual todas as sementes perdem a viabilidade (HONG; ELLIS, 1996).

Na análise da integridade do DNA de sementes sem o fruto foi possível visualizar sua degradação ao longo do armazenamento. Ao serem observadas sementes do Lote 1 (Figura 1), por exemplo, foi possível visualizar que no tempo zero de armazenamento o DNA encontrava-se íntegro, com pouco arraste vertical. Com três meses de armazenamento, o DNA se encontrava menos íntegro, com uma concentração de arraste maior na proporção mediana do gel de agarose. O DNA com seis meses de armazenamento possuía uma pequena proporção íntegra (acumulado no início do gel) e arraste ao longo do gel de agarose, e no armazenamento de nove meses houve uma quantidade menor de DNA íntegro e arraste ao longo do gel de agarose. O mesmo padrão pôde ser notado para os demais lotes (Figura 1).

Figura 1: Gel de agarose (0,8%), de DNAs genômicos extraídos de sementes de *Ocotea puberula*, ao longo do armazenamento por 0, 3, 6 e 9 meses, em câmara fria. Onde: kb= Pares de base; L1 = Lote 1; L2= Lote 2; L3= Lote 3; L4= Lote 4; L5= Lote 5; CP= Controle Positivo.



Fonte: produção do próprio autor.

Células vegetais quando são sujeitas a estresses ambientais possuem um padrão de degradação devido ao processo de morte celular passiva (Wang *et al.*, 1998). A temperatura e a umidade relativa do ar, onde as sementes são armazenadas, são os principais fatores que afetam a sua qualidade fisiológica. Tais danos são acumulados mais rapidamente em sementes úmidas que nas secas, e estão relacionados ao envelhecimento e à perda da viabilidade das sementes (MARCOS FILHO, 2005).

A manutenção da informação genética é um requisito essencial para a tolerância à dessecação e a sobrevivência das células (OSBORNE *et al.*, 2002). Pelos resultados obtidos, podemos inferir que a degradação do DNA ocorre em estágios iniciais do processo de deterioração em sementes armazenadas de *Ocotea puberula*.

Garcia (2012), ao estudar o armazenamento de sementes de *Araucaria angustifolia* durante seis meses em freezer ou refrigerador, pôde inferir através do gel de agarose 0,8% que não ocorreu a degradação do DNA nesse período.

6.6 CONCLUSÕES

Sementes de *Ocotea puberula* perdem sua viabilidade após 3 meses de armazenamento em câmara fria a 40% de UR e 10 ± 2 °C.

A degradação do DNA ocorre em estágios iniciais do processo de deterioração em sementes de *Ocotea puberula*, armazenadas com ou sem o fruto.

6.7 REFERENCIAL TEÓRICO

BIRUEL, R.P.; AGUIAR, I.B.; PAULA, R.C. germinação de sementes de pau-ferro submetidas a diferentes condições de armazenamento, escarificação química, temperatura e luz. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 151-159, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: 2009. 365p.

BRASILEIRO, A.C.M., CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 309 p.

CARVALHO, L.R.; DAVIDE, A.C.; SILVA, E.A.A.; CARVALHO, M.L.M. Classificação de sementes de espécies florestais dos gêneros *Nectandra* e *Ocotea* (Lauraceae) quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**. v.30, n.1, p. 1-9, 2008.

- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.
- CORRÊA, M.G.; CORANDIN, C.M.; SILVA, A.C.; PEREIRA, S.G.; OLIVEIRA, S.A. Armazenamento de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* Mart.). **Anais... IX Simpósio Nacional Cerrado**. Brasília, 2008.
- COSTA, L.M.; RSENDE, O.; GONÇALVES, D.N.; SOUZA, K.A. Qualidade dos frutos de crambe durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 2 p. 239 - 301, 2012.
- EIBL, B.I.; SILVA, F.; CARVALHO, A.; CZEREPAK, R.; KEHL, J. Ensayos de germinación y análisis cuantitativo en semillas de especies forestales nativas de Misiones, R.A Yvyrareta, **Eldorado**, v.5, n.5, p.33-48, 1994.
- FLORIANO, E.P. **Armazenamento de sementes florestais**. Santa Rosa: ANORGS, 2014. 10p. (Caderno Didático).
- FONSECA, S.C.L.; FREIRE, H.B. Sementes recalcitrantes: Problemas na póscolheita. **Bragantia**, v.62, n.2, p.297-303, 2003.
- GARCIA, C. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertolini) Otto Kuntze sob condições controladas de armazenamento**. Dissertação (Mestrado) – UFSC/CCA, Florianópolis, 2012.
- GOVERNO DO ESTADO DE SANTA CATARINA. 2013. Disponível em: <<http://www.sc.gov.br>>. Acesso em 16 jan. 2014.
- HONG, T. D.; ELLIS, R.H. **A protocol to determine seed storage behavior**. Rome: IPGRI, 1996. 62p.
- KALIL FILHO, A. N.; LOPES, A.J.; RÊGO, G.M.; TOMACHITZ, A. Avaliação da Qualidade Fisiológica de Sementes de Imbuia pelo Teste do Tetrazólio (Nota científica). **Pesquisa Florestal Brasileira**. n.57, p.69 -72, 2008.
- KING, M.W.; ROBERTS. E.H. **The storage of recalcitrant seeds: achievements and possible approaches**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1979. 96p.
- KÖPPEN, W. Das geographische system der klimate. In: KÖPPEN, W.; GEIGER, R. (Ed.). **Handbuch der klimatologie**. Berlin: Gebruder Borntraeger, 1936. v. 1, p. 1-44. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Circular. **Técnica 62 – *Ocotea puberula***. Colombo: EMBRAPA, 2002. 11p.
- MALAVASI, M.M. Germinação de sementes. In: PIÑÁ-RODRIGUES, F.C.M. (Coord.). **Manual de análise de sementes florestais**. Campinas: Fundação Cargil, 1988. P. 25-40.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba : Fealq, 2005. 495p.
- MARTINS, C.C.; BOVI, M.L.A., NAKAGAWA, J., MACHADO, C.G. Secagem e armazenamento de sementes de juçara. **Revista Árvore**, v.33, n.4, p.635-642, 2009.
- MELLO, J.I. de O. **Compostos de reserva de sementes e suas relações com diferentes níveis de sensibilidade à dessecação e ao congelamento**. 117f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo, 2008.

- MINOR, H.C.; PASCHAL, E.H. Variation in storability of soybeans under simulated tropical condition. **Seed Science and Technology**, v.10, n.1, p.131-139, 1982.
- MORI, E.S.; PINÃ-RODRIGUES, F.C.M. FREITAS, N.P.; MARTINS, R.B. (org.). **Sementes florestais: guia para germinação de 100 espécies nativas**. São Paulo: Instituto Refloresta, 159 p., 2012.
- MORITZ, A.; DEGENHARDT, J.; DUTRA, L.F.; HANSEL, F.A.; LIMA, B.H.; FRANCESCHI, C.R.B.; FRANCISCON, L. Estabelecimento *in vitro* de *Ocotea odorifera*, *O. catharinensis* e *O. porosa*. **Pesquisa Florestal Brasileira**. n.59, p. 37-44, 2009.
- OSBORNE, D.J.; BOUBRIAK, I.; LEPRINCE, O. Rehydration of dried systems: membranes and nuclear genome. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H.W. (Ed.). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p.343-364.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2.ed. Brasília, DF: AGIPLAN, 1985. 289p.
- RANDI, A.M. Estudo preliminar sobre inibidores de germinação em frutos de *Miconia cinnamomifolia* e *Ocotea puberula*. In: Congresso nacional sobre essências nativas, 1982, Campos do Jordão. **Anais ...** São Paulo: Instituto Florestal, 1982. p.238-242. **Silvicultura**: São Paulo, v. 16 A, parte 1, 1982.
- ROBERTS, E.H. Storage environment and the control of viability. In: ROBERTS, E.H. **Viability of seeds**. London: Syracuse University Press, 1972. p.14-58.
- SANTANA, D.G.; RANAL, M.A. **Análise da germinação: um enfoque estatístico**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2004. 248 p.
- SANTOS, A.F.; PARISI, J.J.D.; MENTEN, J.O.M. (Ed. Técnicos). **Patologia de sementes florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2011. 236 p.
- SCALON, S.P.Q.; NEVES, E.M.S; MASETO, T.E.; PEREIRA, Z.V. Sensibilidade à dessecação e ao armazenamento em sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess. (uvaia). **Rev. Bras. Frutic.**, v. 34, n. 1, p. 269-276, 2012.
- SILVA, K.B.; ALVES, E. U.; BRUNO, R.L.A.; SANTOS, S. S.; BARROSO, L. M. Tolerância à dessecação de sementes de *Cinnamomum zeylanicum* Ness. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 587-594, 2012.
- TEKRONY, D.M.; EGLI, D.B; WHITE, G.M. Seed production and technology. In: WILCOX, J.R. (Ed.). **Soybeans: improvement, production and uses 1**. Madison: American Society of Agronomy, 1987. p.295-353.
- TONIN, G.A.; CRISTINA, S.; PEREZ, J.G.A. qualidade fisiológica de sementes de *Ocotea porosa* (Nees et Martius ex. Nees) após diferentes condições de armazenamento e semeadura. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 26-33, 2006.
- WIELEWICKI, A.P.; LEONHARDT, C.; SCHLINDWEIN, G.; MEDEIROS, A.C.S. Proposta de padrões de germinação e teor de água para sementes de algumas espécies florestais presentes na região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.3, p.191-197, 2006.

7 SANIDADE DE SEMENTES DE *Ocotea puberula* (Rich.) Ness

7.1 RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar o método adequado para detecção de patógenos em sementes de *Ocotea puberula*, da assepsia, ou não, das sementes antes da detecção dos patógenos e quais gêneros fúngicos infestam sementes de desta espécie. O estudo foi realizado com cinco lotes de sementes, oriundos de municípios do Estado de Santa Catarina. Foram realizados os métodos com meio de cultura BDA, meio de cultura V8 e método "Blotter Test". Em cada teste, foram utilizadas sementes com e sem assepsia (desinfestadas com hipoclorito de sódio e álcool), totalizando 80 sementes para cada teste. A incubação das sementes foi realizada em câmara com temperatura controlada a 22 ± 3 °C, com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias, quando ocorreu a avaliação e identificação dos fungos. Foram observados nove gêneros fúngicos: *Penicillium* sp., *Phomopsis* sp., *Epicocum* sp., *Curvularia* sp., *Colletotrichum* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. e *Trichoderma* sp. Os meios agarizados foram mais sensíveis para a detecção de fungos infestantes nas sementes e a assepsia das sementes com hipoclorito de sódio reduz a incidência desses fungos, sendo indicada quando se realiza teste de sanidade com sementes dessa espécie.

Palavras-chave: canela-guaicá, teste de sanidade, assepsia, patógenos de sementes.

7.2 ABSTRACT

The objective of this study was assess the method suitable for detection of pathogens in seeds of *Ocotea puberula*, asepsis, or not, the seeds prior to detection of pathogens and which fungi species infest seeds of this species. The study was conducted with five seed lots, coming from the counties of Santa Catarina. Methods with BDA culture medium, V8 culture medium and "Blotter Test" method were performed. Seeds with and without aseptic (sterilized with sodium hypochlorite and alcohol), a total of 80 seeds for each test were used in each test. The seed incubation was performed in a chamber with controlled temperature of 22 ± 3 °C with a photoperiod of 12 hours for seven days when the assessment and identification of fungi has occurred. Nine genres fungi were observed: *Penicillium* sp., *Phomopsis* sp., *Epicocum* sp., *Curvularia* sp., *Colletotrichum* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. and *Trichoderma* sp. The agarized media were more sensitive for the detection of fungi in seed and weed seed disinfection with sodium hypochlorite reduces the incidence of these fungi is indicated when performing a sanity test with seeds of this species.

Keywords: canela-guaicá, sanity test, asepsisi, seed pathogens.

7.3 INTRODUÇÃO

Entre os fatores que podem afetar a qualidade das sementes florestais estão os de caráter fitossanitário, entre os quais se destacam os fungos (VERCHIATO, 2010). As sementes podem carregar, na sua superfície ou internamente, fungos e outros organismos (RAHALKAR; NEERGAARD, 1969), servindo como meio de transmissão ou transporte desses, constituindo-se desta forma, em um dos principais meios de disseminação de patógenos de plantas.

A contaminação das sementes e frutos de essências florestais ocorre predominantemente no solo onde são colonizados por diversos fungos, incluindo saprófitas e parasitas facultativos que têm vida saprofítica no solo ou na matéria

orgânica, tais como: *Alternaria* sp., *Cylindrocladium* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Trichoderma* sp., dentre outros (FEREIRA, 1989). Quando as sementes e frutos são levados para o beneficiamento e/ou armazenamento, os fungos são disseminados para as sementes sadias, por isso, muitas vezes, há a necessidade de se realizar tratamento de sementes.

Vários autores, avaliando sementes de diferentes espécies florestais, constataram a incidência de fungos como *Alternaria alternata*, *Aspergillus* spp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* spp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., *Rhizopus* sp., e *Trichoderma* sp. (CHEROBINI *et al.*, 2004; GRANDIS *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2004; PADULLA *et al.*, 2010). Para a família Lauraceae, porém, em especial do gênero *Ocotea*, os trabalhos são escassos. Rego *et al.* em 2008 relataram a presença de fungos associados a frutos e sementes de *Ocotea porosa*.

A presença de fungos pode reduzir a capacidade germinativa de um lote de sementes e apresentar problemas na interpretação dos resultados dos testes de germinação conduzidos em condições de laboratório (BRASIL, 2009; SANTOS, *et al.*, 2011). Em muitos casos, a baixa germinabilidade de um lote pode estar associada com a contaminação de patógenos. Por esses motivos a realização dos testes de sanidade é essencial para esclarecer as causas da baixa germinação em amostras com elevados índices de infecção/infestação por microrganismos (HENNING, 2005).

Há diversas formas de detectar a presença de fungos em sementes, e sua escolha depende, principalmente, da espécie. Dentre essas formas, o método do papel filtro ou “Blotter Test” é o mais utilizado nos testes rotineiros de sanidade de sementes (MATHUR, 1983; NEERGAARD, 1983). A incidência de muitos fungos e bactérias infestantes, que crescem rapidamente neste substrato, pode impedir a frutificação dos fungos-alvo, dificultando a sua identificação e quantificação, sobretudo os de crescimento lento. Nesse último caso, a incidência pode ser subestimada (TEMPE, 1970; NEERGAARD, 1973; REIS *et al.*, 1999).

Os meios nutritivos com Agar, outra forma de detectar fungos em sementes, necessitam de uma fonte de carbono, que pode ser a glicose, e nitrogênio além de outros elementos em menor quantidade, tais como potássio, fósforo, enxofre, ferro, magnésio, zinco, manganês e vitaminas (ZAUZA *et al.*, 2007). Segundo Medeiros *et al.* (1992), entre os principais meios utilizados na detecção de fungos está o meio de cultura de BDA (batata-dextrose-ágar).

De um modo geral, o método BDA é utilizado quando o teste em papel filtro não oferece condições adequadas para o crescimento e a esporulação de determinados patógenos, ou quando estes produzem colônias características no meio de cultura (SANTOS *et al.*, 2011).

Além do uso de método de detecção adequado, a assepsia superficial das sementes é recomendada nos testes de sanidade, pois permite a identificação correta de microrganismos associados às sementes florestais, como já observado em testes com sementes de *Peltophorum dubium*, *Mimosa bimucronata* e *Enterolobium contortisiliquum* (MUNIZ *et al.*, 2007).

Com base no exposto acima, objetivou-se com este trabalho avaliar a eficiência de diferentes métodos de detecção de patógenos em sementes de *Ocotea puberula* e da assepsia, ou não, das sementes antes da detecção dos patógenos.

7.4 MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *Ocotea puberula* foram coletadas no estado de Santa Catarina, nos municípios (lotes) de Joaçaba, Fraiburgo, Curitibanos, Ponte Alta e Brunópolis (Tabela 9).

Tabela 9: Dados geográficos e climáticos dos municípios de coleta das sementes de *Ocotea puberula*.

Lote	Município	Latitude	Longitude	Altitude	Temp. Média	Clima
1	Joaçaba	27°10'41"S	51°30'17"O	522 m	18 °C	Subtropical Úmido
2	Fraiburgo	27°03'20"S	50°03'34"O	1048 m	16,1 °C	Subtropical Úmido
3	Curitibanos	27°16'44"S	50°34'57"O	987 m	15,2 °C	Subtropical Úmido
4	Ponte Alta	27°29'03"S	50°22'49"O	856 m	16 °C	Subtropical Úmido
5	Brunópolis	27°18'21"S	50°52'06"O	843 m	19 °C	Subtropical Úmido

Fonte: Governo do Estado de Santa Catarina (2014) e Köppen (1936).

Foram coletadas sementes de cinco matrizes, em cada município, com exceção de Fraiburgo, onde foram encontradas apenas duas matrizes. A coleta dos frutos foi realizada quando apresentavam coloração preto-azulada, considerados maduros, com auxílio de podão. A remoção da polpa foi feita manualmente, com o auxílio de peneiras e água corrente. O excesso de água foi retirado com papel toalha.

Foram realizados três testes de sanidade em sementes, utilizando os métodos com meio de cultura BDA, meio de cultura V8 e "Blotter Test".

O meio de cultura tipo BDA foi preparado em um erlenmeyer de 2000 mL de capacidade, onde foi adicionado caldo da batata (200 g de batata cozidas em 500 mL de água destilada), 15 g de ágar e 20 g de dextrose, ajustado o volume final para 900 mL e autoclavado a 120 °C por 20 minutos (TUIITE, 1969).

Para o meio de cultura V8, foram adicionados 200 ml de suco V8 (Tomato Juice), 4,5 g de CaCo³, 17 g de Ágar e 800 ml de água destilada, com posterior autoclavagem a 120 °C por 20 minutos (FERNANDEZ, 1993).

Após a autoclavagem, os substratos foram resfriados até atingirem a temperatura de aproximadamente 45 °C, onde foram vertidos em caixas *gerbox*, previamente esterelizadas.

Já no método *blotter test*, as sementes foram distribuídas em caixas *gerbox*, previamente esterelizadas com formol e solução de hipoclorito de sódio 1%, forradas com duas folhas de papel filtro, que foram previamente esterilizadas em autoclave a 1 atm (120 °C), por 20 minutos e umedecidas com água destilada esterilizada.

Foram utilizadas 80 sementes de cada lote para cada método de sanidade, divididas em quatro repetições, com ou sem assepsia, a fim de comparar os resultados obtidos quando a assepsia foi adotada. A assepsia consistiu em imergir as sementes em álcool 70%, hipoclorito de sódio 1% e em seguida lavadas com água destilada.

A incubação foi realizada em câmara com temperatura controlada a 22 °C±3 °C, com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias, quando ocorreu a avaliação e

identificação dos fungos. A avaliação, para os testes de sanidade, foi realizada observando-se as estruturas fúngicas, em microscópio estereoscópico e ótico, e a identificação dos fungos foi realizada com o auxílio da chave de identificação (BARNETT; HUNTER, 1972). Os dados da incidência dos fungos foram expressos em percentagem.

Os experimentos foram montados em bloco inteiramente casualizado (DBC), com quatro repetições de cada teste realizado. Os dados foram testados quanto à normalidade e à análise de variância, e foram transformados através da fórmula $\arcsen \sqrt{x/100}$ (SANTANA; RANAL, 2004). Constatando significância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, as análises foram realizadas com o programa estatístico ASSISTAT®.

7.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados em sementes de *Ocotea puberula* os seguintes fungos: *Penicillium* sp., *Phomopsis* sp., *Epicocum* sp., *Curvularia* sp., *Colletotrichum* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. e *Trichoderma* sp. (Tabela 10).

Estes fungos também foram identificados em sementes de *Ocotea porosa* Ness. L. (REGO *et al.*, 2008), *Acacia mearnsii* (BARROSO; *et al.*, 2008), *Tabebuia serratifolia* e *Tabebuia impetiginosa* (BOTELHO *et al.*, 2008), *Seiba speciosa* (LAZAROTTO *et al.*, 2010), *Blepharocalyx salicifolius* (REGO *et al.*, 2012) e *Schizolobium amazonicum* (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Tabela 10: Incidência (%) de fungos em sementes de *Ocotea puberula* oriundas de municípios do estado de Santa Catarina, com e sem assepsia, submetidas aos testes de sanidade em meio de cultura agarizado (BDA e V8) e “Blotter Test”.

		Incidência (%)							
Fungo	Lote	Sem assepsia				Com assepsia			
		V8	BDA	Blotter Test	Média	V8	BDA	Blotter Test	Média
<i>Penicillium</i> sp.	1	5,0 Aa	10,0 Aa	15,0 Aa	10,0 a	13,3 Aa	14,9 Aa	25,3 Aa	17,8 a
	2	15,0 Ba	0,0 Aa	15,0 Ba	10,0 a	14,3 Aa	7,8 Aa	29,8 Ba	17,3 a
	3	0,0 Aa	5,0 Aa	21,2 Aa	8,8 a	3,2 Aa	11,4 Aa	10,3 Aa	8,3 a
	4	5,0 Aa	15,0 Aa	8,8 Aa	9,6 a	0,0 Aa	7,8 Aa	8,9 Aa	5,6 a
	5	10,0 Aa	10,0 Aa	23,8 Aa	14,6 a	0,0 Aa	7,8 Aa	22,3 Ba	10,0 a
Média		7,0 A	8,0 A	16,8 A		6,2 A	9,9 AB	19,3 B	
CV(%)		61,15				44,83			
Fungo	Lote	Sem assepsia				Com assepsia			
		V8	BDA	Blotter Test	Média	V8	BDA	Blotter Test	Média
<i>Phomopsis</i> sp.	1	9,2 Ba	0,0 Aa	0,0 Aa	3,1 a	13,7 Aa	0,0 Aa	20,8 Aa	11,5 a
	2	12,4 Bab	0,0 Aa	0,0 Aa	4,1 a	19,5 Aa	0,0 Aa	16,7 Aa	12,1 a
	3	24,4 Bb	0,0 Aa	0,0 Aa	8,1 a	14,5 Aa	0,0 Aa	17,0 Aa	10,5 a
	4	17,9 Bab	0,0 Aa	0,0 Aa	6,0 a	21,2 Aa	0,0 Aa	6,6 Aa	9,3 a
	5	13,1 Bab	0,0 Aa	0,0 Aa	4,4 a	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 a
Média		15,4 B	0,0 A	0,0 A		13,8 B	0,0 A	12,2 B	
CV(%)		66,53				68,31			

Continua...

Tabela 10: Continuação...

		Incidência (%)							
Fungo	Lote	Sem assepsia				Com assepsia			
		V8	BDA	Blotter Test	Média	V8	BDA	Blotter Test	Média
<i>Epilocum</i> sp.	1	0,0 Aa	4,6 Aa	0,0 Aa	1,5 a	0,0 Aa	20,8 Aa	0,0 Aa	6,9 a
	2	0,0 Aa	5,7 Aa	0,0 Aa	1,9 a	3,2 Aa	14,1 Aa	0,0 Aa	5,8 a
	3	0,0 Aa	9,2 Aa	0,0 Aa	3,a	3,2 Aa	3,2 Aa	0,0 Aa	2,1 a
	4	0,0 Aa	8,9 Aa	0,0 Aa	3,0 a	0,0 Aa	15,7 Aa	0,0 Aa	5,2 a
	5	3,2 Aa	16,6 Aa	0,0 Aa	6,6 a	3,2 Aa	22,4 Aa	0,0 Aa	8,5 a
Média		0,6 A	9,0 B	0,0 A		1,9 A	15,2 B	0,0 A	
CV(%)		76,19				81,41			
<i>Curvularia</i> sp.	1	14,6 Bab	0,0 Aa	0,0 Aa	4,9 a	20,2 Ba	0,0 Aa	0,0 Aa	6,7 a
	2	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 a	15,5 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	5,2 a
	3	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 a	17,0 Ba	0,0 Aa	0,0 Aa	5,7 a
	4	3,2 Aab	7,5 Aa	0,0 Aa	3,6 a	13,2 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	4,4 a
	5	20,6 Bb	0,0 Aa	0,0 Aa	6,9 a	38,3 Ba	0,0 Aa	0,0 Aa	12,8 a
Média		7,7 A	1,5 A	0,0 A		20,8 B	0,0 A	0,0 A	
CV(%)		195,95				83,82			
<i>Colletotrichum</i> sp.	1	0,0 Aa	5,7 Aa	0,0 Aa	1,9 a	0,0 Aa	6,5 Aa	0,0 Aa	2,2 a
	2	0,0 Aa	7,8 Aa	0,0 Aa	2,6 a	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 a
	3	0,0 Aa	4,6 Aa	3,2 Aa	2,6 a	4,6 Aa	3,2 Aa	7,8 Aab	5,2 a
	4	0,0 Aa	0,0 Aa	11,1 Ba	3,7 a	3,2 Aa	5,7 Aa	6,5 Aab	5,1 a
	5	0,0 Aa	7,5 Aa	3,2 Aa	3,6 a	8,9 ABa	0,0 Aa	17,7 Bb	8,9 a
Média		0,0 A	5,12 A	3,5 A		3,3 A	3,1 A	6,4 A	
CV(%)		132,14				107,16			
<i>Aspergillus</i> sp.	1	17,9 Aab	27,2 Aa	13,5 Aa	19,5 a	11,2 Aa	0,0 Aa	11,4 Aa	7,5 ab
	2	14,0 Aa	12,4 Aa	15,7 Aa	14,0 a	11,4 Aa	3,2 Aa	21,3 Aa	12,0 b
	3	32,3 Ab	21,1 Aa	25,4 Aa	26,3 a	3,2 Aa	0,0 Aa	7,8 Aa	3,7 a
	4	24,7 Aab	20,1 Aa	13,1 Aa	19,3 a	3,2 Aa	0,0 Aa	7,5 Aa	3,6 a
	5	23,7 Aab	23,1 Aa	16,5 Aa	21,1 a	6,5 Aa	0,0 Aa	14,0 Aa	6,8 ab
Média		22,5 A	20,8 A	16,8 A		7,1 A	0,6 A	12,4 A	
CV(%)		23,75				92,06			

Continua...

Tabela 10: Continuação...

		Incidência (%)							
Fungo	Lote	Sem assepsia				Com assepsia			
		V8	BDA	Blotter Test	Média	V8	BDA	Blotter Test	Média
<i>Fusarium</i> sp.	1	0,0 Aa	5,7 Aab	12,1 Aa	5,9 a	0,0 Aa	3,2 Aa	3,2 Aa	2,1 a
	2	0,0 Aa	31,7 Bb	7,8 Aa	13,2 a	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 a
	3	0,0 Aa	19,5 Aab	0,0 Aa	6,5 a	0,0 Aa	3,2 Aa	3,2 Aa	2,1 a
	4	0,0 Aa	3,2 Aa	0,0 Aa	1,1 a	0,0 Aa	0,0 Aa	3,2 Aa	1,1 a
	5	0,0 Aa	7,8 Aab	0,0 Aa	2,6 a	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 a
Média		0,0 A	13,6 B	4,0 AB		0,0 A	1,3 A	1,9 A	
CV(%)		125,61				109,54			
<i>Trichoderma</i> sp.	1	3,2 Aa	3,2 Aa	0,0 Aa	2,1 a	4,6 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	1,5 a
	2	0,0 Aa	6,5 Aa	0,0 Aa	2,2 a	0,0 Aa	7,5 Aa	0,0 Aa	2,5 a
	3	0,0 Aa	3,2 Aa	0,0 Aa	1,1 a	0,0 Aa	15,9 Aa	0,0 Aa	5,3 a
	4	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 a	4,6 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	1,5 a
	5	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 a	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 a
Média		0,6 A	2,6 A	0,0 A		1,84 A	4,7 A	0,0 A	
CV(%)		160,6				217,44			
<i>Colletotrichum</i> sp.	1	0,0 Aa	5,7 Aa	0,0 Aa	1,9 a	0,0 Aa	6,5 Aa	0,0 Aa	2,2 a
	2	0,0 Aa	7,8 Aa	0,0 Aa	2,6 a	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 a
	3	0,0 Aa	4,6 Aa	3,2 Aa	2,6 a	4,6 Aa	3,2 Aa	7,8 Aab	5,2 a
	4	0,0 Aa	0,0 Aa	11,1 Ba	3,7 a	3,2 Aa	5,7 Aa	6,5 Aab	5,1 a
	5	0,0 Aa	7,5 Aa	3,2 Aa	3,6 a	8,9 ABa	0,0 Aa	17,7 Bb	8,9 a
Média		0,0 A	5,12 A	3,5 A		3,3 A	3,1 A	6,4 A	
CV(%)		132,14				107,16			

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: produção do próprio autor.

A maior incidência foi verificada pelo fungo *Aspergillus* sp., em todos os lotes analisados. Para sementes sem assepsia a maior infestação encontrada foi no lote 3, onde foi constatado 32,3% de infestação em meio V8, e a menor no lote 2 em meio BDA com 12,4%. Com assepsia houve menor incidência dos fungos, com incidências de 3,2% nos lotes 3 e 4 (meio V8) e lote 2 (meio BDA). A utilização da assepsia reduziu a incidência média deste fungo nas sementes, em todos os lotes avaliados (Tabela 10).

Penicillium sp. foi outro fungo com incidência considerável, em todos os lotes e métodos de detecção. A maior incidência ocorreu no lote 2 (29,8%) no método de "Blotter test" sem assepsia e a menor foi verificada no lote 3 (3,2%), em meio V8 sem assepsia (Tabela 11).

Aspergillus sp. e *Penicillium* também foram identificados em sementes de *Ocotea porosa*, REGO *et al.* (2008); *Ceiba speciosa*, LAZAROTTO *et al.* (2010); *Caesalpinia echinata*, PADULLA *et al.* (2010) e *Schizolobium amazonicum*, OLIVEIRA *et al.* (2012). Tanto *Aspergillus* sp. como *Penicillium* sp. são fungos associados à

deterioração de sementes em condições de armazenamento inadequado, mas a contaminação pode ocorrer logo após a colheita (MACHADO, 1988).

Epicocum sp. foi estatisticamente mais incidente no meio de cultura BDA, tendo como maior incidência (22,4%) para o lote 5 e menor incidência para o lote 3, ambos com assepsia. O contrário aconteceu com *Phomopsis* sp., onde a incidência não foi detectada em meio BDA, com ou sem assepsia, mas ocorreu nos demais métodos. A maior porcentagem de incidência do fungo *Phomopsis* sp. foi de 24,4% no meio de cultura V8 e a menor foi 6,6% no método "Blotter test", sem e com assepsia, respectivamente (Tabela 10).

Rego *et al.* (2008) avaliando a sanidade de sementes de *Ocotea porosa* em método "Blotter test" detectaram a incidência de 11,4% do gênero fúngico *Epicocum* sp.

O método V8 foi o único a detectar a incidência de *Curvularia* sp., nas sementes com e sem assepsia, chegando a ter 38,3% de incidência para o lote 5, em sementes com assepsia. Para *Fusarium* sp., este método de sanidade foi o menos eficiente, sendo estatisticamente diferente para os métodos com as sementes sem assepsia (Tabela 10).

As espécies de *Fusarium* são consideradas fungos de campo, isto é, podem infectar as sementes no período de crescimento e maturação (WETZEL, 1987). Em trabalho com sementes de *Caesalpinia echinata*, Vilela; Pires (2004) e Padulla *et al.* (2010) observaram que, quando as sementes são coletadas após queda ao solo, ficam expostas a flutuações de temperatura, umidade relativa, orvalho, chuva, podendo favorecer o desenvolvimento de fungos de campo. Os fungos deste gênero são potencialmente patogênicos a espécies florestais, responsáveis pelo tombamento tanto de pré como de pós-emergência das plântulas (CARNEIRO, 1987).

O método "Blotter test" não foi eficiente para detectar fungos do tipo *Trichoderma* sp., para sementes com ou sem assepsia. Lazarotto *et al.* (2010), em sementes de *Ceiba speciosa*, encontraram uma baixa incidência deste fungo em "Blotter test" (1,9%) e mais de 24% de incidência nas sementes em meio agarizado BDA. Em sementes de *Ocotea porosa*, Rego *et al.* (2008) detectaram 11,95% de *Trichoderma* sp. no método "Blotter test".

De maneira geral, nos testes de sanidade realizados com meios agarizados (V8 e BDA) foram mais sensíveis para a avaliação da sanidade das sementes, pois apresentaram maiores porcentagens de incidência de patógenos, quando comparados com o método "Blotter test", para sementes com ou sem assepsia.

A incidência de muitos fungos e bactérias infestantes, que crescem rapidamente no substrato "Blotter test", pode impedir a frutificação dos fungos-alvo, dificultando a sua identificação e quantificação, sobretudo os de crescimento lento. Nesse último caso, a incidência pode ser subestimada (TEMPE, 1970; NEERGAARD, 1973; REIS *et al.*, 1999).

O meio agarizado V8 foi citado por Montemor *et al.* (2011), como o mais indicado para detecção do patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*, pois é um meio mais nutritivo e oferece melhores condições para o fungo se desenvolver, possui na sua composição química teores consideráveis de proteína, carboidrato, açúcares, magnésio, vitaminas A e C, ferro e cálcio.

O fungo *Alternaria* sp. não desenvolveu-se em sementes sem assepsia, para todos os lotes e métodos de sanidade. Já para sementes com assepsia os meios agarizados foram mais eficientes para este patógeno. A maior incidência deste fungo foi de 18% em meio BDA no lote 2. Lazarotto *et al.* (2010) identificaram 37% de

incidência deste fungo em sementes de *Ceiba speciosa* utilizando também o meio de cultura do tipo BDA e Rego *et al.* (2008) em sementes de *Ocotea porosa* detectaram 7,35% deste fungo pelo método “Blotter test”.

A assepsia superficial das sementes é recomendada nos testes de sanidade, pois permite a identificação correta de microrganismos associados às sementes florestais, como já observado em testes com sementes de *Pelptophorum dubium*, *Mimosa bimucronata* e *Enterolobium contortisiliquum* (MUNIZ *et al.*, 2007). Em geral, para a assepsia de sementes de espécies florestais nativas do Brasil tem sido recomendado, entre outros produtos, o hipoclorito de sódio nas concentrações de 1 a 2% por dois minutos (FERRAZ; CALVI, 2010).

7.6 CONCLUSÃO

Foram identificados em sementes de *Ocotea puberula* os fungos *Penicillium* sp., *Phomopsis* sp., *Epicocum* sp., *Curvularia* sp., *Colletotrichum* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. e *Trichoderma*

Os testes de sanidade realizados com meios agarizados (V8 e BDA) foram mais sensíveis na detecção de patógenos em sementes de *Ocotea puberula*, quando comparados com o método “Blotter test”.

A assepsia das sementes reduz a incidência de fungos infestantes em sementes de *Ocotea puberula*, sendo indicado quando se realiza teste de sanidades em sementes dessa espécie.

7.7 REFERENCIAL TEÓRICO

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1972. 241 p.

BOTELHO, L. S.; MORAES, M. H. D.; MENTEN, J .O. M. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeito na germinação e transmissão para as plântulas. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 4, p. 343-348, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pesca e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Brasília, 2009. 399p.

CARNEIRO, J.S. Testes de sanidade de sementes de essências florestais. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V. DA S. (Ed.) **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, cap.17, p.386-394. 1987.

CHEROBINI, E.A.I.; MUNIZ, M.F.B.; HOPPE, J.M.; ÁVILA, A.L.; CAMARGO, R.F. Qualidade sanitária de sementes de *Eugenia involucrata* DC, *Eugenia pyriformis* Cambessedes, *Feijoa sellowiana* Berg, *Psidium cattleianum* Sabine. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8., 2004, João Pessoa. **Palestras e Resumos**: João Pessoa, 2004. p.163.

FERNANDEZ, M.R. **Manual para laboratorio de fitopatologia**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNTF, 1993. 128p.

FERRAZ, I. D. K.; CALVI, D. P. Teste de Germinação. In: LIMA JUNIOR, M. J. V. (Ed.). **Manual de Procedimentos para Análise de Sementes Florestais**. Manaus: UFAM, 2010. p. 55-110.

FERREIRA, F.A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570 p.

GOVERNO DO ESTADO DE SANTA CATARINA. 2013. Disponível em: <<http://www.sc.gov.br>>. Acesso em: 16 janeiro 2014.

GRANDIS, A.; GODOI, S.; MORAES, M.H.D.; MENEGHETTI, C.S.B. Qualidade sanitária das sementes de *Astronium graveolens* (Guaritá). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8, 2004, João Pessoa. **Palestras e Resumos**: João Pessoa, 2004. p.177.

HENNING, A.A. **Patologia de sementes**. Londrina: EMBRAPA/CNPSo, 1994. 43p. Documentos nº 90.

KÖPPEN, W. Das geographische system der klimate. In: KÖPPEN, W.; GEIGER, R. (Ed.). **Handbuch der klimatologie**. Berlin: Gebruder Borntraeger, 1936. v. 1, p. 1-44. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Circular. **Técnica 62 – Ocotea puberula**. Colombo: EMBRAPA, 2002. 11p.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, A. F. Detecção, transmissão, patogenicidade e controle químico de fungos em sementes de paineira (*Ceiba speciosa*). **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 2, p. 134-139, 2010.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1988. 107p

MATHUR, S.B. Testing seeds of tropical species for seed-borne diseases. **Seed Science & Technology** 11:113-128. 1983.

MEDEIROS, A.C.S.; MENDES, M.A.S.; FERREIRA, M.A.S.V.; ARAGÃO, F.J.L. Avaliação quali-quantitativa de fungos associados a sementes de Aroeira (*Astronium urundeuva* (FR. ALL.) ENGL.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.14, n.1, p. 51-55, 1992.

MONTEMOR, C.L.B.; CASA, R.T.; OLIVEIRA, F.S.; JUNIOR, P. R.K.; BOGO, A.; CORRÊA, T.R. Detecção de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes do banco de germoplasma de feijão da Universidade do Estado de Santa Catarina. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages, v.11 n.1, p. 48-53, 2011.

MUNIZ, M. F. B.; SILVA, M. L.; BLUME, E. Influência da assepsia e do substrato na qualidade de sementes e mudas de espécies florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p. 140-146, 2007.

NASCIMENTO, L.C.; NERY, A.R.; ARAÚJO, E.; SOUTO, F.M.; ALVES, E.U.; ALMEIDA, F.A. Incidência de fungos em sementes de espécies nativas do Semi-árido Nordeste. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8., 2004, João Pessoa. **Palestras e Resumos**: João Pessoa, 2004. p.197.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. v.1. London: The Macmillan Press. 1983.

OLIVEIRA, J.D.; SILVA, J.B.; DAPONT, E.C. SOUZA, L.M.S.; RIBEIRO, S.A.L. métodos para detecção de fungos e assepsia de sementes de *Schizolobium amazonicum* (Caesalpinioideae). **Biosci. Journal**, v. 28, n. 6, p. 945-953, 2012.

PADULLA, T.L.; MORAES, M.H.D.; BARBEDO, C.J.; BORGES, I.F.; MENTEN, J.O.M.; PASCHOLATI, S.F. Detecção de fungos em sementes de pau-brasil (*Caesalpinia*

echinata) coletadas durante sua formação e dispersão. Nota Científica. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2, p. 154-159, 2010.

RAHALKAR, P.W.; NEERGAARD, P. Studies on aureofungin as seed treatment in controlling seed borne fungal diseases. **Hindustan Antibiotics Bulletin**, v. 11, n. 3, p. 163-165, 1969.

REGO, S.S; SANTOS, A.F.; MEDEIROS, A.C.S.; JACCOUD FILHO, D.S. Fungos associados a frutos e sementes de imbuia (*Ocotea porosa* Ness. L. Barroso). **Summa Phytopathol.** v. 34, n. 4, p. 378, 2008.

REGO, S. S.; SANTOS, A. F.; NOGUEIRA, A. C.; KUNIYISHI, Y. S. Detection, transmission and pathogenicity of fungi on *Blepharocalyx salicifolius* (H. B. K.) Berg. seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 1, p. 9-13, 2012.

REIS, A.C.; REIS, E.M.; CASA, R.T. et al. Erradicação de fungos patogênicos associados a sementes de milho e proteção de fungos de solo pelo tratamento com fungicida. **Fitopatologia Brasileira**, n. 20, p. 585-591. 1999.

SANTANA, D.G.; RANAL, M.A. **Análise da germinação: um enfoque estatístico**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2004. 248 p.

SANTOS, A.F.; PARISI, J.J.D.; MENTEN, J.O.M. (Ed. Técnicos). **Patologia de sementes florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2011. 236 p.

TEMPE, J.de. **Handbook on seed health testing:routine methods for determining the health condition of seed in the seed testing station**. Proceeding of the International Seed Testing Association. v. 35. n. 1. 1970.

TUITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess, 1969. 239 p

VECHIATO, M.H. **Importância da qualidade sanitária de sementes de florestais na produção de mudas**. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=136> . Acesso em: 06 de maio de 2014.

VILLELA, F.A.; PERES, W.B. Coleta, Beneficiamento e Armazenamento. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Ed.). **Germinação** – do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 17, p.266-281.

WETZEL, M. M.V.S. Fungos de armazenamento. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.) **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.260-275.

ZAUZA, E.A.V. ; ALFENAS, A.C. ; MAFIA, R.G. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (Eds.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. p. 23 – 51.