

CAROLINA FERNANDES DE OLIVEIRA

Conservação de sementes de *Eugenia uniflora* Lam. e *Inga vera* Penn.: qualidade sanitária e taxas respiratórias

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

São Paulo
2011

CAROLINA FERNANDES DE OLIVEIRA

Conservação de sementes de *Eugenia uniflora* Lam. e *Inga vera* Penn.: qualidade sanitária e taxas respiratórias

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADOR: DR. CLAUDIO JOSÉ BARBEDO

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Oliveira, Carolina Fernandes de

O48c Conservação de sementes de *Eugenia uniflora* Lam. e *Inga vera* Penn: qualidade sanitária e taxas respiratórias / Carolina Fernandes de Oliveira -- São Paulo, 2011.
98 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2011

Bibliografia.

1. Semente. 2. Deterioração. 3. Fungos. I. Título

CDU: 631.53.01

*“O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso, existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”*

Fernando Pessoa

Agradecimentos

Agradeço a todos.

A todos que acompanharam e compartilharam comigo os momentos de vivência e trabalho aqui no Instituto de Botânica desde 2005. É isso. Desde 2005. Porque este trabalho que agora entrego, como parte dos requisitos para obtenção de Mestre, é resultado de todo este período. Período de muito crescimento pessoal e profissional. E que só foram possíveis, graças ao carinho e apoio de pessoas muito queridas daqui do Instituto e de outros núcleos de convivência, as quais, na maioria das vezes, nem eram capazes de imaginar o que eu fazia por aqui, mas estavam sempre incentivando e dando forças para que eu seguisse adiante. Gratidão. Gratidão por tudo o que fizeram por mim neste tempo todo e por me permitirem participar da vida de vocês. Mesmo assim, quero deixar alguns agradecimentos diretos:

Aos meus pais, Alvaro e Miriam, e minha irmã, Mariana, pelo apoio, incentivo, companheirismo, respeito, amizade e amor, sempre! Pessoas das quais tenho o maior orgulho e admiração!

Ao meu orientador, Cláudio, por aceitar sê-lo! E pela atenção, paciência, respeito, incentivo e cuidados despendidos.

Ao meu co-orientador, João, meu primeiro orientador de iniciação científica – ou não! -, pelos incentivos, atenção, amizade e carinho.

Aos pesquisadores, demais funcionários e estagiários e alunos do Núcleo de Pesquisa em Sementes, pelo carinho e atenção sempre.

Ao pessoal do Índex e agregados, Cláudio, Carmen, Rodrigo, Lamarca, Márcio, Talita, Fernanda, Marina, Paulo, Juliana, Tatiana, João, Denise, Thaís, Jaílma, Nestor, Débora, Cibele e Angélica, pelas amizades, risadas, aprendizados e ajudas!

Ao CNPQ, pela bolsa auxílio pesquisa concedida.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro aos Projetos “Flora aromática da Mata Atlântica no Estado de São Paulo: composição química dos óleos voláteis e análise da atividade biológica”, no Programa Biota, e “Carboidratos de espécies nativas brasileiras: diversidade, função e sinalização nos processos de desenvolvimento, defesa e nas respostas a estresses ambientais”.

Às pessoas e instituições que direta ou indiretamente também me auxiliaram, apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Introdução Geral	7
Capítulo 1 – Deterioração de sementes de espécies brasileiras de <i>Eugenia</i> em função da incidência e do controle de fungos	15
Resumo	16
Abstract	18
Introdução	19
Material e Métodos	20
Resultados e Discussão	23
Conclusões	28
Referências	30
Capítulo 2 – Tratamentos termo-osmóticos e avaliação das taxas respiratórias de sementes de <i>Eugenia uniflora</i> Lam.	39
Resumo	40
Abstract	41
Introdução	42
Material e Métodos	44
Resultados e Discussão	49
Conclusão	61
Referências Bibliográficas	62
Capítulo 3 – Tratamentos para controle da incidência fúngica e avaliação das taxas respiratórias de embriões de <i>Inga vera</i> Penn.	65
Resumo	66
Abstract	67
Introdução	68
Material e Métodos	70
Resultados e Discussão	75
Conclusão	85
Referências Bibliográficas	86
Discussão Geral	89
Conclusões Gerais	92
Referências Bibliográficas da Introdução e da Discussão Geral	93
Resumo	97
Abstract	98

INTRODUÇÃO GERAL

Os biomas brasileiros têm sofrido, ao longo dos anos, alterações biológicas e físicas, como regime de chuvas e temperatura, devido às mais diversas atividades socioeconômicas desenvolvidas e estabelecidas no país. De acordo com os dados divulgados por Hirota *et al.* (2003), a fragmentação das florestas e as alterações da paisagem no bioma Mata Atlântica intensificaram-se nos últimos 30 anos, provocadas pela exploração dos recursos florestais e da terra (pastos, agricultura, silvicultura), além dos subsídios governamentais para a expansão e superprodução agrícola e das áreas residenciais e de assentamentos. No Estado de São Paulo, no período de 1995-2000, mais de 50.000 hectares foram desmatados, encontrando-se apenas 14% da formação florestal deste bioma neste Estado.

Contudo, esses autores ainda constataram que o recorde mundial de diversidade botânica para plantas lenhosas foi para este bioma, registrando-se 454 espécies em um único hectare do sul da Bahia e cerca de 20 mil espécies de plantas vasculares, das quais, aproximadamente, seis mil estão restritas ao bioma. Diante da necessidade de conservação e exploração de maneira sustentável destas espécies devido à importância histórica, ecológica, econômica e cultural, diversos programas, projetos e investimentos emergem a partir de políticas públicas de conservação, criação e manejo de áreas protegidas (Tabarelli *et al.* 2005), bem como o estudo e a implantação de diversas tecnologias com o intuito de recuperação dos remanescentes florestais (Reis *et al.* 2003) e formação de bancos de germoplasma, como os bancos de sementes (Davide & Silva 2008).

Esses bancos são unidades conservadoras de material genético de uso imediato ou com potencial de uso futuro, podendo ser classificados em bancos de base, nos quais o germoplasma é conservado por longos períodos em câmaras frias, *in vitro* ou em criopreservação, ou em bancos ativos, por meio dos quais ocorre o intercâmbio de germoplasma e plantios frequentes para caracterização do material, visando à conservação apenas a curto e médio prazo. No mundo, registram-se 287 bancos de germoplasma, no Brasil 177 e no estado de São Paulo 89 (Veiga *et al.* 1999).

No Brasil, o plantio de mudas responde pela maioria absoluta dos reflorestamentos, cuja produção é realizada, basicamente, via propagação sexuada (sementes), o que permite manter ou ampliar a base genética das futuras populações regeneradas (Davide & Faria 2008). Portanto, a qualidade fisiológica das sementes e as técnicas silviculturais aplicadas durante o desenvolvimento das mudas favorecerão o sucesso na implantação e condução destes plantios.

Embora muito do interesse humano por sementes esteja associado, do ponto de vista nutricional, à sua composição, a finalidade biológica de uma semente é germinar e estabelecer uma nova planta. A formação dessa semente envolve eventos fisiológicos específicos relacionados às mudanças distintas nos pesos fresco e seco das sementes, no conteúdo de água destas e nos padrões distintos de expressão de genes representados pelo acúmulo de mRNAs específicos (Castro *et al.* 2004). Particularmente, durante a maturação das sementes, a água assume importante papel, distinguindo-se dois tipos de comportamento: nas sementes ortodoxas, há redução considerável do teor de água ao final e, nas recalcitrantes, mantém-se o elevado teor de água (Barbedo & Marcos-Filho 1998). Uma vez definidos, estes comportamentos implicam na adoção de diferentes procedimentos de colheita, secagem, beneficiamento, manuseio e armazenamento para controlar uma série de possíveis alterações fisiológicas, bioquímicas e físicas das sementes, determinadas por fatores genéticos, bióticos e abióticos (clima, insetos e microrganismos), com o intuito de assegurar a qualidade destas (Villela & Peres 2004).

De acordo com Barbedo & Bilia (1998), a diferença de comportamento das sementes pode ser uma consequência do processo de seleção natural. Provavelmente, plantas com sementes ortodoxas precisaram sobreviver às condições climáticas adversas e aquelas que não germinaram assim que dispersas, mas somente sob condições satisfatórias, foram selecionadas. O prolongamento da viabilidade destas foi devido ao baixo teor de água, o qual favoreceu a germinação limitada e o controle da deterioração por microrganismos. As sementes recalcitrantes provavelmente foram selecionadas em ambientes que permitiam o desenvolvimento das plântulas ao longo de todo o ano, favorecidas pela dispersão com elevado teor de água. Caso as sementes

apresentassem baixo teor de água, o fator limitante para a germinação seria a disponibilidade hídrica do ambiente.

A capacidade da semente em ser tolerante à dessecação não é apenas uma consequência da redução do teor de água durante o processo de maturação, pois demanda a presença de compostos e processos específicos, como o acúmulo de reservas insolúveis, a não-diferenciação intracelular, o desligamento metabólico, a presença de um eficiente sistema antioxidante, o acúmulo de proteínas, oligossacarídeos, outros açúcares e outros protetores, e a presença e operação de um sistema de reparo durante a reidratação (Pammenter & Berjak 2000). Portanto, a indução de tolerância à dessecação em sementes recalcitrantes mostra-se pouco viável, atualmente, para a conservação em armazenamento. Essa conservação deve ser estudada, também, com métodos alternativos, uma vez que há grandes diferenças, de químicas a estruturais, entre ortodoxas e recalcitrantes (Barbedo & Marcos Filho 1998). Mello *et al.* (2010), por exemplo, encontraram baixas concentrações de ciclitóis (0,3-0,5%), de oligossacarídeos da série da rafinose (0,05%) e de ácidos graxos insaturados (0-19%) nas sementes recalcitrantes das espécies *Inga vera* e *Eugenia uniflora*, enquanto maiores quantidades de ciclitóis (2-3%), de rafinose (4,6-13%) e ácidos graxos insaturados (53-71%) foram encontradas nas sementes ortodoxas de *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa*, sugerindo que os açúcares e os lipídios poderiam desempenhar papel importante no movimento de água, protegendo as membranas celulares embrionárias contra injúrias provocadas durante a dessecação.

Assim, as sementes ortodoxas podem ser armazenadas com um baixo teor de água e sob baixas temperaturas, mantendo sua viabilidade por um longo período, enquanto as sementes recalcitrantes apresentam alta suscetibilidade à perda de água, o que faz necessário o armazenamento com alto grau de umidade, favorecendo o ataque de microrganismos e a germinação indesejada das sementes. O uso de baixas temperaturas poderia inibir esses problemas, mas muitas sementes recalcitrantes sofrem danos por temperaturas próximas ou abaixo de zero (Vieira *et al.* 2001). O favorecimento do desenvolvimento de microrganismos, principalmente os

fungos de armazenamento, associados a outros fatores ambientais, pode acelerar, consideravelmente, a rapidez de deterioração das mesmas (Marcos Filho 2005).

A associação dos fungos com as sementes favorece a sobrevivência e disseminação desses devido ao maior potencial das sementes de manterem a viabilidade dos fungos ao longo do tempo em comparação com outros propágulos vegetais (Machado 1988). A associação desses patógenos pode ocorrer externamente, aderidos passivamente à superfície das sementes; em companhia da semente, junto a detritos vegetais e partículas de solo; e internamente, como patógeno da semente. Neste caso, os fungos podem estar presentes na casca e no endosperma, no embrião e sob o tegumento das sementes causando a destruição dos cotilédones. Por ficarem protegidos contra a maioria dos tratamentos que controlam com eficiência os patógenos de sementes transmitidos externamente, apresentam maiores chances de sobrevivência (Santos *et al.* 2000).

Em sementes de espécies florestais nativas do Brasil, os gêneros fúngicos *Botryodiplodia*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Pestalotia*, *Rhizoctonia*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Phoma*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, tem apresentado as maiores incidências (Netto & Faiad 1995; Santos *et al.* 2001a; Santos *et al.* 2001b; Mendes *et al.* 2005; Nascimento *et al.* 2006). Além de colonizarem as sementes e prejudicarem a pré e pós emergência, estes fungos podem infectar a planta sistematicamente, reduzindo o vigor e manifestando sintomas mais tarde. Em angico vermelho (*Anadenanthera macrocarpa*), os fungos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium lateritium*, *F. semitectum*, *Pestalotiopsis* sp. e *Phomopsis dalbergiae* foram identificados desde a formação dos frutos e ao longo da maturação das sementes, ocasionando a podridão de sementes e raízes, altura reduzida das plântulas e baixa sobrevivência de mudas (Dhingra *et al.* 2002).

A maioria dos fungos citados acima é considerada de campo, pois infectam a semente antes da colheita, necessitando para o seu crescimento de umidade relativa do ar alta (90 a 95 %), o que mantém o teor de água das sementes entre 20 e 25 %. Em umidades relativas do ar menores (65 a 90%), como as condições de armazenamento de sementes ortodoxas, estes fungos têm o

crescimento paralisado, enquanto que os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* aumentam (Berjak 1987). Nas sementes ortodoxas de *Chorisia speciosa*, o armazenamento favoreceu o aumento da incidência de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., enquanto os demais fungos, *Fusarium* sp. e *Alternaria* sp. não se alteraram (Silva *et al.* 2003). Porém, no armazenamento de sementes hidratadas, como as recalcitrantes, as espécies tradicionalmente classificadas de armazenamento, como *Aspergillus* spp., não tem ocorrido. Contudo, há a proliferação e o crescimento agressivo dos fungos considerados de campo, como os gêneros *Fusarium*, *Cladosporium* e *Alternaria* (Berjak 1995). Em sementes de *Avicennia marina*, o fungo *Fusarium* spp. foi dominante (Mycock & Berjak 1990).

Nessas circunstâncias, a presença de fungos ao longo do armazenamento pode depreciar a qualidade das sementes na forma de: perda do poder germinativo pela colonização do embrião; descoloração e apodrecimento, com reflexos tanto na viabilidade como no valor comercial e nutritivo das sementes; aumento da taxa de ácidos graxos provocando a rancificação de óleos; aquecimento da massa de sementes com o conseqüente aumento da taxa respiratória e com isso uma deterioração mais rápida das sementes (Machado 1988).

Em sementes de milho, Silva *et al.* (2000) constataram que a infecção das sementes com os fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp. promoveu alterações nos padrões eletroforéticos das isoenzimas malato-desidrogenase, esterase, fosfatase ácida, peroxidase e glutamato-oxalacetato-transaminase, sugerindo alterações metabólicas, como na atividade respiratória. Estudos que analisem os efeitos dessas alterações sobre a qualidade das sementes, contudo, são escassos na literatura.

A qualidade da semente é máxima por ocasião da maturidade fisiológica. A partir deste momento, tende a ocorrer queda progressiva na qualidade, em função do processo de deterioração (Carvalho & Nakagawa 2000). Os primeiros sinais da deterioração estão relacionados com a danificação ou perda da integridade dos sistemas de membranas, permitindo a perda mais acentuada de eletrólitos, açúcares, aminoácidos e muitas outras substâncias (Delouche & Baskin 1973;

Delouche 2002). Durante a deterioração, os mecanismos energéticos e de síntese também são afetados, reduzindo a taxa respiratória e a atividade de muitas enzimas (Delouche, 2002). Ocorre um declínio na tomada e consumo de oxigênio pelos tecidos embrionários e de reserva e um aumento na liberação de gás carbônico (Marcos Filho 2005).

A oxidação das reservas de carbono, como amido, lipídios e proteínas, acumuladas durante a maturação da semente, fornece a energia necessária para a germinação, emergência e desenvolvimento da muda até a transição para a fase autotrófica (Macherel & Avelange-Macherel 2010). Por meio da avaliação desse metabolismo respiratório, as taxas respiratórias podem indicar alterações fisiológicas, como quebra de dormência de sementes (Reis & Rena 1987), alterações morfológicas decorrentes de distúrbios fisiológicos (Steffens *et al.* 2006) e viabilidade de sementes (Crispim *et al.* 1994; Lamarca 2009).

O teor de água das sementes e a temperatura durante o armazenamento são fatores importantes para o controle do metabolismo celular, pois a intensa atividade respiratória e de consumo podem determinar a redução acentuada da disponibilidade de reservas e o metabolismo desordenado, com liberação e atividade de radicais livres (Barbedo & Marcos Filho, 1998). Portanto, as melhores condições de armazenamento das sementes, como meios de minimizar o processo de deterioração, são aquelas obtidas com a redução da atividade metabólica, com reflexos sobre os níveis de respiração do embrião (Carvalho & Nakagawa 2000), processos que são dependentes ou até modificados em função de variações hídricas e térmicas (Lamarca *et al.* 2009; Lamarca 2009).

No caso das sementes recalcitrantes, cujo metabolismo é muito ativo, são observadas elevadas taxas respiratórias quando comparadas às sementes ortodoxas, acompanhadas por características morfológicas de tecidos metabolicamente ativos, como mitocôndrias diferenciadas e aparentemente ativas, demonstrando que a sensibilidade à dessecação altera-se paralelamente à taxa metabólica (Pammenter & Berjak 2000).

Contudo, há dúvidas se a deterioração das sementes oferece condições para os fungos proliferarem, se a própria microflora fúngica pode intensificar a taxa de deterioração das sementes e, ainda, se ambos os processos podem ocorrer simultaneamente. Berjak (1995) considera que ambos os fatores estão simultaneamente envolvidos. De acordo com a autora, quando é realizada a remoção da principal fonte de inóculo, a longevidade das sementes é aumentada. Segundo Calistru *et al.* (2000), sementes de *Avicennia marina* recém-colhidas e inoculadas com *Fusarium moniliforme* foram extremamente suscetíveis a este fungo, mas a viabilidade foi estendida enquanto as sementes foram mantidas desinfestadas com o uso de fungicida.

Para controlar a incidência de fungos em sementes, o tratamento envolve a aplicação de diversos processos e substâncias às sementes com o objetivo de erradicar os patógenos associados a elas ou à proteção dessas contra patógenos (Menten 1991). De acordo com Santos & Parisi (2004), no Brasil não existe produto registrado para o tratamento de sementes de espécies florestais e nem resultados de pesquisa que dêem suporte a esta área. Portanto, o estudo da sanidade das sementes e de alternativas de controle preencherá importante lacuna na oferta de conhecimentos e tecnologias para o sistema de produção de sementes.

Considerando a intolerância à dessecação das sementes recalcitrantes, como as das espécies *Eugenia uniflora* e *Inga vera*, e a necessidade de manutenção do seu elevado teor de água durante o armazenamento, prejudicando a longevidade das sementes, é necessário que uma das possíveis causas da deterioração, a presença de fungos nestas sementes, seja controlada. Entretanto, analisar a influência destes microrganismos no processo de deterioração, por meio de alterações metabólicas, como as taxas respiratórias, auxiliará na compreensão desse processo e no comportamento das sementes quando expostas aos efeitos da deterioração. Como o tratamento químico tradicional não tem suficiente estudo para espécies florestais e os produtos aplicados podem produzir efeitos tóxicos e osmóticos, diferentes tipos de tratamentos de sementes (físicos, osmóticos, biológicos e químicos) também devem ser investigados.

No presente trabalho são apresentados os estudos realizados com três espécies de *Eugenia* (*Eugenia pyriformis*, *E. uniflora* e *E. brasiliensis*) quanto à caracterização fúngica destas, o comportamento dos fungos frente à redução do teor de água e métodos alternativos de controle destes, como a termoterapia e o osmocondicionamento, ao longo do armazenamento. Diante dos resultados diferenciados destes tratamentos em relação à germinação e à sanidade, testou-se a associação termo-osmótica na eficiência do controle dos fungos e na manutenção do potencial germinativo das sementes de *E. uniflora*. Diferentes tratamentos foram aplicados às sementes de maneira a determinar diferentes amostras: controle, constituído de sementes que não receberam nenhum tratamento; tratamento químico, ou seja, sementes tratadas com fungicida; tratamento alternativo, no qual as sementes foram tratadas termo-osmoticamente; congelamento, para produção de sementes mortas e inoculação de fungos com alta incidência e isolados das próprias sementes de *E. uniflora*. As sementes desses tratamentos foram analisadas quanto às taxas respiratórias, visando a analisar a influência dos fungos na deterioração das sementes. Devido à possível diferença de comportamento fisiológico entre famílias, gêneros e espécies, estudo semelhante foi conduzido com embriões de *Inga vera*.

CAPÍTULO 1

Deterioração de sementes de espécies brasileiras de *Eugenia* em função da incidência e do controle de fungos

Artigo submetido no periódico “Revista Brasileira de Sementes” em 25/08/2010 e aceito para publicação em 22/02/2011

(A formatação do texto a seguir está de acordo com as normas para publicação do periódico acima mencionado)

Título resumido: Deterioração de sementes de *Eugenia* portadoras de fungos

**DETERIORAÇÃO DE SEMENTES DE ESPÉCIES BRASILEIRAS DE
EUGENIA EM FUNÇÃO DA INCIDÊNCIA E DO CONTROLE DE FUNGOS¹**

CAROLINA FERNANDES DE OLIVEIRA², DENISE CARDOSO DE OLIVEIRA³, JOÃO JOSÉ
DIAS PARISI⁴, CLAUDIO JOSÉ BARBEDO⁵

RESUMO - A conservação de sementes intolerantes à dessecação como as do gênero *Eugenia* é realizada com alto grau de umidade, favorecendo o ataque de microrganismos. Essa interação da semente com fungos de armazenamento pode acelerar consideravelmente a velocidade de deterioração das mesmas. O tratamento com fungicidas pode contaminar o meio ambiente com resíduos tóxicos, tornando necessário o desenvolvimento de métodos alternativos como os tratamentos térmicos e osmóticos. No presente trabalho, objetivou-se analisar a influência da redução do teor de água e a eficiência de tratamentos térmicos (imersão das sementes em água, de 35 °C a 75 °C, por 30 a 150 min), osmóticos (imersão contínua em solução osmótica a -1,5 MPa a -4,0 MPa) e químicos (fungicidas carboxin+tiram, captan e carbendazim+tiram) na redução do

¹ Submetido em 25/08/2010. Aceito para publicação em 22/02/2011. Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica (IBt), SP. Apoio financeiro: CNPq (Processos 477640/2009-5 e 308045/2007-6) e FAPESP (Processo 2005/04139-7).

² Bióloga, Pós-Graduanda do Núcleo de Pesquisa em Sementes, IBt, Av. Miguel Stéfano 3687, 04301-012 São Paulo, SP, catu_fernandes@hotmail.com.

³ Bióloga, ex-estagiária de iniciação científica (PIBIC/CNPq) do Núcleo de Pesquisa em Sementes, IBt, denacardoso@uol.com.br.

⁴ Eng. Agr., MSc., Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade do Instituto Agronômico (IAC), Av. Barão de Itapura 1481,13020-433, Campinas, SP, jparisi@iac.sp.gov.br.

⁵ Eng. Agr., Dr, Núcleo de Pesquisa em Sementes, IBt, claudio.barbedo@pesquisador.cnpq.br, bolsista CNPq. Autor para correspondência.

potencial de inóculo inicial de fungos. Os resultados permitiram concluir que os tratamentos químicos foram os mais eficientes para o controle de *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Alternaria* sp., detectados com mais frequência em sementes de *Eugenia brasiliensis* (grumixameira), *E. pyriformis* (uvaieira) e *E. uniflora* (pitangueira). Tratamentos térmicos e osmóticos demonstraram grande potencial de controle, mas necessitam ajustes metodológicos, incluindo-se a associação de ambos e a reaplicação dos tratamentos durante o armazenamento.

Termos para indexação: espécie nativa, sementes tropicais, tratamento de sementes.

INCIDENCE AND CONTROL OF FUNGI ASSOCIATED TO SEEDS OF BRAZILIAN
SPECIES OF *EUGENIA*

ABSTRACT - Seeds intolerant to desiccation like those from *Eugenia* species must be stored at high water content that can contribute for the development of microorganisms. This can lead to a rapid deterioration of the seeds and the usual chemical control is not suitable considering the utilization of these seeds in natural environment. Thermal (seeds in water at 35°C to 75°C/ 30 to 150 min) and osmotic (seeds stored in osmotic solution at -1,5MPa to -4,0 MPa) treatments as well as controlled drying could be used but there is little information about them which was the objective of the present study. Results showed that chemical treatments (carboxin+tiram, captan and carbendazin+tiram) were the most efficient for the control of the most frequent fungi *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp. and *Alternaria* sp. in seeds of *Eugenia brasiliensis* ("grumixameira"), *E. uniflora* ("pitangueira") and *E. priformis* ("uvaieira"). Thermal and osmotic treatments showed some efficiency in the control of those fungi but specific methodology must be developed mainly considering the association of both of them as long as the successive application during the storage of the seeds.

Index terms: native species, seed treatment, tropical seeds.

INTRODUÇÃO

A conservação de sementes tem utilizado como principal técnica de preservação da sua qualidade fisiológica a redução do metabolismo durante o armazenamento, por meio da remoção da água ou da diminuição da temperatura (Barbedo; Bilia, 1998; Angelovici et al., 2010). Contudo, essa técnica pode ser empregada apenas para as sementes denominadas ortodoxas, ou seja, aquelas que podem ser desidratadas a baixos teores de água (Roberts, 1973).

Para as sementes denominadas recalcitrantes, que não toleram desidratação e baixas temperaturas, perdendo a viabilidade rapidamente quando o teor de água é diminuído para valores inferiores a aproximadamente 30%, há necessidade do desenvolvimento de novas técnicas (Barbedo e Marcos Filho, 1998). Várias espécies tropicais, principalmente nativas do Brasil, produzem sementes intolerantes à dessecação aos níveis desejáveis para a conservação em armazenamento, como no caso das espécies com sementes recalcitrantes do gênero *Eugenia*, da família Myrtaceae (Kohama et al., 2006).

Eugenia contempla espécies com valor comercial, nutritivo, com potencial de aproveitamento na obtenção de fármacos (Donadio, 1997; Silva et al., 2003) e na recomposição vegetal, por meio do enriquecimento do habitat com a fauna para o equilíbrio biológico e ecológico, além de sua qualidade ornamental (Lorenzi, 1992). Grumixameira (*E. brasiliensis* Lam.), pitangueira (*E. uniflora* Lam.) e uvaieira (*E. pyriformis* Camb.) foram domesticadas e já vêm sendo cultivadas desde árvores isoladas em residências até pomares comerciais. As sementes dessas espécies apresentam limites de secagem bastante elevados (Delgado; Barbedo, 2007). Devido a essa alta suscetibilidade à perda de água, o armazenamento é realizado com sementes de elevado grau de umidade, favorecendo o ataque de microrganismos e a germinação indesejada das sementes ainda durante o armazenamento (Vieira et al., 2001). Essa interação da semente com fungos de armazenamento pode acelerar consideravelmente a velocidade de deterioração das mesmas (Marcos Filho, 2004). Fungos como *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., por exemplo, desenvolvem-se

rapidamente, levando à redução da viabilidade das sementes, como observado em amendoim bravo (Nascimento et al., 2006).

Uma das maneiras de controlar esses fungos é o tratamento de sementes com fungicidas, tais como carbendazin, carboxin, captan, thiabendazole e thiram (Krugner; Auer, 2005), mas pode ocorrer contaminação do ambiente com resíduos tóxicos e aumento na resistência dos microrganismos a esses compostos. Métodos alternativos, como o tratamento térmico, podem produzir bons resultados (Nameth, 1998), mas, isoladamente, podem não ser suficientemente eficientes. O tratamento térmico consiste em colocar as sementes em contato com o calor, para que os patógenos presentes sejam eliminados sem perda da germinação e vigor e podem ser baseados em imersão em água quente, ar quente e seco, vapor arejado e energia solar (Menten, 1991).

O condicionamento osmótico, mantendo-se as sementes em soluções osmóticas com potencial hídrico previamente estabelecido, poderia constituir outro método alternativo, mas pouco foi estudado. Esse condicionamento mostrou potencial para ampliar a capacidade de armazenamento das sementes recalcitrantes, provavelmente reduzindo o metabolismo intenso e desordenado das sementes como resultado da regulação da mobilização da água na semente (Andréo et al., 2006). Esse condicionamento poderia ser utilizado, também, para diminuir a disponibilidade hídrica para os fungos, limitando o desenvolvimento dos mesmos antes de causar prejuízos às sementes.

No presente trabalho objetivou-se analisar a incidência fúngica e a influência do teor de água das sementes de grumixameira, pitangueira e uvaieira, bem como a eficiência de tratamentos térmicos, osmóticos e químicos, na redução do potencial de inóculo inicial desses fungos, visando à ampliação da capacidade de conservação da viabilidade dessas sementes durante o armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de uvaieira, pitangueira e grumixameira foram coletados em matrizes plantadas no Jardim Botânico de São Paulo, em São Paulo, SP (23°38'S e 46°37'W). O processo de extração e beneficiamento de sementes consistiu da retirada manual da polpa, eliminação de sementes

danificadas por insetos ou imaturas e armazenamento em sacos de polietileno, em câmara fria (8 °C, conforme indicado por Kohama et al., 2006), até a instalação dos experimentos, não ultrapassando 15 dias.

As sementes das três espécies foram submetidas à secagem e aos tratamentos térmico, osmótico e químico, conforme descrito adiante. Após a aplicação dos tratamentos, as sementes foram analisadas quanto ao teor de água, gravimetricamente (103 °C por 17 h - Ista, 1985), ao comportamento germinativo e à qualidade sanitária. O teste de germinação foi conduzido em rolos de papel Germitest, previamente umedecidos (Brasil, 1992), mantidos em germinadores Marconi MA400, regulados para 25 °C, com luz contínua e 100% de umidade relativa do ar, garantida pela circulação interna de água no sistema de cortina. As avaliações foram realizadas a cada 7 dias durante 60 dias (Silva et al., 2003; Kohama et al., 2006; Delgado; Barbedo, 2007).

A avaliação da microflora das sementes foi realizada através do método de incubação em papel de filtro (Brasil, 1992). As sementes foram distribuídas equidistantemente em placas de Petri, contendo três folhas de papel de filtro umedecidas com água destilada, incubadas por sete dias a 20 ± 2 °C e luz direta. A identificação e contagem dos fungos foram realizadas examinando-se as colônias fúngicas desenvolvidas nas sementes com auxílio de microscópio estereoscópico. Em alguns casos, a identificação foi complementada pela visualização das características morfológicas dos fungos em microscópio óptico (Barnett; Hunter, 1999).

Secagem, tratamento com fungicida e armazenamento das sementes:

Para analisar a influência da redução do teor de água das sementes na viabilidade ao longo do armazenamento e no controle dos fungos incidentes, as sementes foram submetidas à secagem intermitente em estufa com circulação forçada de ar, regulada para 40 °C, até atingirem os níveis pré-crítico (abaixo do qual se inicia a redução do vigor da semente) e pré-letal (abaixo do qual a semente perde completamente a viabilidade), baseando-se em informações de Delgado e Barbedo (2007). Foram realizados ciclos de oito horas de secagem por 16 horas de repouso, este último em sacos plásticos de polietileno (8 °C). Dessa maneira, foram determinados três tratamentos de

secagem: sementes sem secagem (ou seja, com o teor de água original), secagem pré-crítica e secagem pré-letal.

Após as secagens, as sementes de cada um desses três tratamentos foram divididas em dois grupos, um dos quais recebeu tratamento com o fungicida carboxin + tiram (Vitavax-Thiram 200SC), de ação sistêmica e de contato, na proporção de 300 ml de fungicida para cada 100 kg de semente, segundo recomendações do fabricante para o tratamento de sementes de espécies cultivadas. Assim que tratadas e após 90 e 180 dias de armazenamento em sacos de polietileno, em câmara fria (8 °C), essas sementes foram avaliadas novamente quanto ao teor de água, germinação e sanidade, conforme descrito anteriormente. Constituiu-se, dessa forma, um experimento fatorial entre secagens x tratamento fungicida x período de armazenamento, com 3x2x3, para sementes de uvaieira e de pitangueira. Em função da baixa disponibilidade de sementes, para grumixameira foram analisados seis tratamentos pela combinação de secagem (sem secagem e secagem pré-crítica), armazenamento (90 dias) e tratamento fungicida. O delineamento, para todos os experimentos, foi inteiramente casualizado, com posterior análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey, aos 5% (Santana; Ranal, 2004).

Tratamentos térmico, osmótico e químico e armazenamento das sementes:

Para o tratamento térmico, amostras de sementes foram imersas em água, em béquer de vidro, em estufas reguladas para diferentes temperaturas, por diferentes períodos, nas seguintes associações: (a) para grumixameira: 55 °C/30', 55 °C/150', 65 °C/30', 65 °C/150', 75 °C/30' e 75 °C/150'; (b) para pitangueira: 55 °C/90', 55 °C/120' e 65 °C/30'; (c) para uvaieira: 35 °C/30', 35 °C/90', 45 °C/30', 45 °C/90', 55 °C/30' e 55 °C/90'. Ao término de cada período de exposição aos tratamentos, as sementes foram depositadas sobre papel de filtro, à temperatura ambiente, para retirada do excesso de água superficial.

Para o tratamento osmótico, amostras de sementes foram armazenadas em caixas tipo gerbox, com uma folha de papel de filtro grosso na base e uma para cobertura, contendo soluções de

polietilenoglicol (PEG 6000) com os seguintes potenciais hídricos: (a) para grumixameira e pitangueira: -4,0 MPa; (b) para uvaieira: -1,5 MPa e -2,5 MPa.

As soluções foram preparadas baseando-se em concentrações e temperaturas descritas por Michel e Kauffmann (1973), aferidas em equipamento WP4, Decagon (Pullmann, USA), com base na temperatura do ponto de orvalho (Decagon, 2001). Os potenciais hídricos foram selecionados baseando-se nos níveis de tolerância à dessecação dessas sementes (Delgado; Barbedo, 2007).

Para o tratamento químico, foram utilizados dois fungicidas, nas doses recomendadas pelos fabricantes para sementes de espécies cultivadas: captan (Captan 750 TS, na dose de 200 g/100 kg de sementes), com ação apenas de contato e carbendazin + tiram (Derosal Plus, na dose de 300 ml/100 kg de sementes), com ação de contato e sistêmica.

Assim que tratadas e após 60 e 120 dias de armazenamento, as sementes foram avaliadas quanto ao teor de água, germinação e sanidade, conforme descrito anteriormente. Constituiu-se, dessa forma, um experimento fatorial entre tratamentos x períodos de armazenamento, com 10x2 (grumixameira), 7x3 (pitangueira) e 11x3 (uvaieira), em delineamento inteiramente casualizado, com posterior análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey, aos 5% (Santana; Ranal, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Secagem, tratamento com fungicida e armazenamento das sementes:

A redução do teor de água das sementes de grumixameira de, aproximadamente, 50% para 35% (secagem pré-crítica) causou queda na porcentagem de germinação tanto inicialmente quanto após armazenamento por 90 dias (Figura 1A). A redução desses índices foi ainda maior quando o teor de água atingiu aproximadamente 25% (secagem pré-letal). O tratamento com fungicida praticamente não alterou esse comportamento (Figura 1B), apesar da redução da incidência de alguns fungos como *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Cladosporium* sp. (Tabela 1). Curiosamente, porém, *Cladosporium* sp. e *Botrytis* sp. apresentaram elevada incidência após 90 dias

de armazenamento apenas nas sementes tratadas com o fungicida. Já a incidência de *Penicillium* sp., nas sementes tratadas com fungicida, teve grande redução após esse período.

A redução do teor de água das sementes de pitangueira de 54% (sem secagem) para aproximadamente 40% (secagem pré-crítica) não reduziu a capacidade germinativa inicialmente. Contudo, após 3 e 6 meses de armazenamento a germinação foi reduzida em mais da metade da porcentagem inicial, enquanto as não submetidas à secagem praticamente não sofreram alteração durante o armazenamento (Figura 1C). A redução desse teor para valores próximos aos 27% (pré-letal) praticamente eliminou a capacidade germinativa já antes do armazenamento. Marcos Filho (2005) relata que há uma faixa de hidratação na qual há metabolismo desordenado, acarretando danos mais acentuados do que os que ocorrem em sementes com teores de água mais elevados. Dessa forma, há limites críticos de hidratação, superiores e inferiores, dentro dos quais as sementes recalcitrantes têm sua longevidade aumentada (Bilia et al, 1999). Portanto, as sementes de pitangueira com teor de água pré-crítico provavelmente atingiram aquela faixa de metabolismo desordenado, reduzindo seu potencial de armazenamento. A ação do fungicida não alterou esse comportamento (Figura 1D) e, embora tenha sido observada redução inicial na incidência da maioria dos fungos detectados, o melhor controle ocorreu associado com a secagem até os níveis pré-letal e pré-crítico (Tabela 2).

Castellani et al. (1996) relataram que a presença de fungos pode reduzir a capacidade germinativa de um lote de sementes e apresentar problemas, por exemplo, na interpretação dos resultados dos testes de germinação conduzidos em condições de laboratório. De fato, no presente trabalho, notou-se elevada incidência de fungos nas sementes de pitangueira não tratadas, dificultando a avaliação da qualidade fisiológica dos lotes.

Nas sementes de uvaieira (Figura 1E) observou-se mesmo comportamento das sementes das espécies anteriores, com relação à germinação, exceto para sementes submetidas à secagem pré-crítica (50% de água) e armazenadas por até 180 dias, que mantiveram elevada porcentagem de germinação. Além disso, o tratamento com fungicida (Figura 1F) permitiu melhor conservação das

sementes não submetidas à secagem (65% de água), mantendo elevados valores de germinação até os 180 dias de armazenamento. Esse resultado pode estar relacionado ao fato de que, diferentemente das espécies anteriores, em uvaieira não se observou o aumento da incidência de *Pestalotiopsis* sp. e *Cladosporium* sp. após o armazenamento das sementes tratadas (Tabela 3).

Considerando os dados apresentados é possível constatar que nas sementes recalcitrantes das espécies estudadas o fungo que apresentou inicialmente maior incidência foi *Penicillium* sp., diferindo do que ocorre nas sementes da maioria das espécies cultivadas (ortodoxas), para as quais esse fungo ocorre mais frequentemente no final do período de armazenamento. A incidência da maioria dos fungos associados a sementes das três espécies de *Eugenia* diminuiu com o tratamento fungicida, mas a redução foi mais sutil para *Penicillium* sp. Para *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Cladosporium* sp. a incidência diminuiu mais acentuadamente quando submetidas à secagem. O efeito do controle inicial dos fungos sobre a capacidade de armazenamento das sementes somente ocorreu para uvaieira, a única das espécies estudadas que apresentou redução na germinação após o maior período de armazenamento (Figura 1E). Essa melhora na armazenabilidade ocorreu, também, com a secagem pré-crítica. Contudo, a associação dos dois tratamentos (secagem + fungicida) não foi eficiente, possivelmente devido a um efeito fitotóxico (Figura 1F) que tem ocorrido principalmente com o tempo de secagem e armazenabilidade das sementes tratadas.

Tratamentos térmico, osmótico e químico e armazenamento das sementes:

O teor de água das sementes das espécies estudadas foi bastante elevado, entre 48% e 69%. Essa elevada umidade poderia favorecer a presença de patógenos (Netto; Faiad, 1995) e, conseqüentemente, prejudicar a germinação, como foi observado por Andrade e Ferreira (2000) em relação a *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. em sementes de uvaia. As porcentagens de germinação das sementes de grumixameira, contudo, foram muito elevadas mesmo após o armazenamento por 60 dias (Figura 2A), ocorrendo um aumento expressivo na incidência de *Cladosporium* sp. após 120 dias, enquanto os demais fungos, *Penicillium* sp. e *Pestalotiopsis* sp., mantiveram incidências próximas às iniciais (Tabela 4). A imersão dessas sementes em água em 65 °C durante 150 minutos

promoveu decréscimo na germinação e, em 75 °C, eliminou a capacidade germinativa (Figura 2A), permitindo maior crescimento de *Penicillium* sp. (Tabela 4). O tratamento térmico aos 65 °C durante 30 minutos não afetou a germinação (Figura 2A), mas apresentou baixa eficiência no controle de *Cladosporium* sp. e de *Pestalotiopsis* sp. e aumento na incidência de *Penicillium* sp. (Tabela 4). Esses tratamentos permitem supor que é possível utilizar o tratamento térmico para essa espécie até a temperatura de 65 °C, mas períodos mais extensos de exposição devem ser explorados. Os aumentos na incidência de *Cladosporium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. após o armazenamento, principalmente nos tratamentos em 75 °C, provavelmente deveram-se ao fato das sementes estarem mortas.

A germinação inicial de sementes de pitangueira foi mais baixa que a observada após 60 dias de armazenamento (Figura 2B). Curiosamente, esse aumento coincidiu com a redução na incidência de *Penicillium* sp. (Tabela 5), sugerindo alguma interferência desse fungo no próprio teste de germinação. De acordo com Machado (1988), este fungo pode ocasionar a perda do poder germinativo e, durante o armazenamento, promover o aquecimento da massa de sementes com consequente aumento da taxa respiratória, provocando a deterioração mais rápida das sementes. Os tratamentos térmicos pouco alteraram os valores de germinação (Figura 2B), mas aumentaram a incidência de *Penicillium* sp. nas sementes; diferentemente da testemunha, porém, essa incidência permaneceu elevada durante o armazenamento (Tabela 5). Dentre os fungos identificados colonizando as sementes de pitangueira, destacaram-se *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp. (Tabela 5). No caso do *Alternaria* sp., todos os tratamentos foram eficazes na sua erradicação das sementes, tendo apenas as sementes do tratamento controle sido colonizadas no início e ao longo do armazenamento. Em relação a *Cladosporium* sp., sua incidência aumentou ao longo do armazenamento, sendo os tratamentos químicos e osmóticos os únicos eficientes em seu controle. Contudo, de acordo com von Bülow et al. (1994), a alta incidência de fungos saprófitas encontrados nas sementes de pitanga-vermelha-do-cerrado (espécie pertencente ao mesmo gênero das estudadas no presente trabalho) não prejudicou a germinação. Esses resultados demonstram a

potencialidade do tratamento osmótico. Um melhor ajuste no potencial hídrico da solução do tratamento osmótico, contudo, ainda é necessária, uma vez que houve redução nos valores de germinação, para esse tratamento, ao longo do armazenamento (Figura 2B).

Os tratamentos osmóticos, por outro lado, reduziram substancialmente a germinação das sementes de uvaieira (Figura 2C). Em todos os demais tratamentos, a germinação permaneceu elevada mesmo após 120 dias de armazenamento. Os tratamentos osmóticos, principalmente a -2,5 MPa, que promoveram baixas porcentagens de germinação após 120 dias de armazenamento, corroboraram Delgado (2006), que descreveu prejuízos às sementes dessa espécie com pequenas reduções do potencial hídrico. As sementes de uvaieira foram as que apresentaram o maior número de gêneros fúngicos, destacando-se *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. (Tabela 6). O tratamento osmótico a -2,5 MPa, além dos químicos, reduziu eficientemente a incidência de *Fusarium* sp. mesmo após o armazenamento das sementes de uvaieira, enquanto os demais tratamentos pouco controlaram esse fungo (Tabela 6). Segundo Marcos Filho (2005), pesquisas com hidratação controlada ressaltam a redução da liberação de exsudados durante a embebição e, conseqüentemente, a menor ocorrência de microrganismos associados às sementes. Dentre os demais tratamentos empregados, a imersão em água aos 55 °C durante 90 minutos só não foi eficiente no controle de *Penicillium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. (Tabela 6). A eficiência do tratamento térmico mostrou-se dependente da relação tempo x temperatura para cada espécie, ora para se evitarem danos à germinação, ora para efetivamente controlar os fungos associados às sementes de *Eugenia*. Tal fato também é verificado para outras espécies, como em sementes de sorgo, para as quais o tratamento térmico em água quente aos 55°C durante 10 minutos reduziu em mais de 90% os fungos *Alternaria tenuis*, *Botrytis sorghicola*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum graminicola*, *Curvularia lunata*, com exceção de *Fusarium moniliforme* (Masum et al. 2009). Já Mendes et al.(2001) conseguiram reduzir significativamente a incidência de *Fusarium oxysporum* sem prejudicar a germinação das sementes ao aplicar o tratamento térmico de calor seco aos 60 °C por 20 e 30 minutos.

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que o fungicida carbendazin + tiram, apesar de não apresentar registro para espécies florestais, foi o mais eficiente no controle dos fungos, mas tratamentos não químicos, menos prejudiciais ao ambiente, como os térmicos e osmóticos estudados no presente trabalho, demonstraram grande potencial de controle. Deve-se salientar que a redução do teor de água das sementes de *Eugenia* spp. visando a prolongar o armazenamento não tem se mostrado eficiente (Kohama et al., 2006; Delgado; Barbedo, 2007), o que foi verificado também neste trabalho. Entretanto, o armazenamento de sementes com teor de água elevado favorece a proliferação de fungos que podem reduzir o vigor das sementes, principalmente em longo prazo. A redução e controle dessa incidência fúngica por meio de fungicidas, embora eficiente pode não ser aplicável a espécies utilizadas para restauração vegetal. Os tratamentos térmicos e osmóticos mostraram-se potencialmente interessantes, mas necessitam maiores estudos pois, como verificado no presente trabalho, alguns fungos foram controlados mas não se verificou constância na eficiência dos tratamentos, já que esses não persistem nas sementes como os químicos, pois não apresentam efeito residual. Além disso, o comportamento germinativo e a sanidade das sementes tratadas térmico e osmoticamente foram diferentes, sugerindo que a associação destes tratamentos pode ser favorável, bem como a redução do período de exposição das sementes nas soluções osmóticas e a reaplicação dos tratamentos ao longo do período de armazenamento. Os tratamentos osmóticos utilizados no presente trabalho basearam-se na manutenção das sementes em solução de PEG durante todo o armazenamento, o que prejudicou a manutenção da capacidade germinativa. No entanto, é possível que o controle exercido pelos tratamentos osmóticos sobre a incidência dos fungos não necessite exposição tão prolongada. Assim, tratamentos osmóticos por curtos períodos e repetidos ao longo do armazenamento das sementes podem trazer importante contribuição à conservação desse patrimônio nativo.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que a redução do teor de água de sementes de grumixameira, pitangueira e uvaieira, principalmente quando associada à aplicação

inicial de fungicidas, pode controlar o desenvolvimento de alguns fungos associados a essas sementes; contudo, esse controle não garante ampliação do período de viabilidade das sementes em armazenamento. Além disso, tratamentos alternativos ao químico, como térmicos e osmóticos, podem controlar fungos associados àquelas sementes e, conseqüentemente, ampliar a capacidade de armazenamento, mas há necessidade de estudos mais específicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelas bolsas de iniciação científica, concedidas a D.C. Oliveira e C.F. Oliveira e de produtividade, concedida a C.J. Barbedo e pelo auxílio financeiro ao projeto (Proc. 477640/2009-5 e 308045/2007-6), à FAPESP, pelo auxílio financeiro ao projeto (Proc. 2005/04139-7) e ao Jardim Botânico de São Paulo, pela permissão para as coletas das sementes.

REFERÊNCIAS

- ANDRÉO, Y.; NAKAGAWA, J.; BARBEDO, C.J. Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Pennington). **Revista Brasileira de Botânica**, v.29, p.309-318, 2006. <http://www.scielo.br/pdf/rbb/v29n2/a12v29n2.pdf>
- ANDRADE, R.N.B.; FERREIRA, A.G. Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) – Myrtaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, p.118-125, 2000. <http://www.abrates.org.br/revista/artigos/2000/v22n2/artigo16.pdf>
- ANGELOVICI, R.; GALILI, G.; FERNIER, A.R.; FAIT, A. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends in Plant Science**, v.15, p.211-218, 2010.
- BARBEDO, C.J.; BILIA, D.A.C. Evolution of research on recalcitrant seeds. **Scientia Agricola**, v.55, p.121-125, 1998. <http://www.scielo.br/pdf/sa/v55nspe/3161.pdf>
- BARBEDO, C.J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação de sementes. **Acta Botanica Brasilica**, v.12, p.145-164, 1998.
- BILIA, D.A.C.; MARCOS FILHO, J.; NOVEMBRE, A.D.C.L. Desiccation tolerance and seed storability of *Inga uruguensis* (Hook. et Arn.). **Seed Science and Technology**, v.27, p.77-89, 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Produção Vegetal. Coordenação de Laboratório Vegetal. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 1992. 365p.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4.ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1999. 218p.
- CASTELLANI, E.D.; SILVA, A.; BARRETO, M.; AGUIAR, I.B. Influência do tratamento químico na população de fungos e na germinação de *Bauhinia variegata* L. var. *variegata*. **Revista Brasileira de Sementes**, v.18, p.41-44, 1996. <http://www.abrates.org.br/revista/artigos/1996/v18n1/artigo07.pdf>
- DECAGON. **WP4 Dewpoint PotentaMeter Operator's Manual**. Pullman: Decagon Devices, Inc., 2001.
- DELGADO, L.F. **Tolerância à dessecação em sementes de espécies brasileiras de Eugenia**. 2006. 106f. Dissertação (Mestrado, em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.
- DELGADO, L.F.; BARBEDO, C.J. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.265-272, 2007. <http://www.scielo.br/pdf/pab/v42n2/16.pdf>
- DONADIO, L.C. Study of some Brazilian Myrtaceae in Jaboticabal, SP. **Acta Horticulturae**, v.452, p.181-183, 1997.
- ISTA. International Seed Testing Association. International rules for seed testing. **Seed Science and Technology**, v.13, p.356-513, 1985.
- KOHAMA, S.; MALUF, A.M.; BILIA, D.A.C.; BARBEDO, C.J. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixameira). **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, p.72-78, 2006. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v28n1/a10v28n1.pdf>

- KRUGNER, T.L.; AUER, C.G. Doenças dos Eucaliptos. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN, A.F.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. v.2. Piracicaba: Ceres, 2005. p.319-332.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.
- MACHADO, J.C. **Patologia de sementes**: fundamentos e aplicações. Brasília: MEC/ESALFAEPE, 1988. 106p.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.
- MASUM, M.M.I.; ISLAM, S.M.M.; FAKIR, M.G.A. Effect of seed treatment practices in controlling of seed-borne fungi in sorghum. **Scientific Research and Essay**, v.4, p.22-27, 2009.
- MENDES, M.A.S.; LIMA, P.M.M.P.; FONSECA, J.N.L.; SANTOS, M.F. Erradicação de *Fusarium oxysporum* em sementes de alfafa utilizando termo e quimioterapia. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.148-152, 2001. <http://www.scielo.br/pdf/fb/v26n2/a05v26n2.pdf>
- MENTEN, J.O.M. **Patógenos em sementes**: detecção, danos e controle químico. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1991.
- MICHEL, B.E. e KAUFMANN, M.R. The osmotic potential of polyethylene glicol 6000. **Plant Physiology**, v.51, p.914-916, 1973.
- NASCIMENTO, W.M.O.; CRUZ, E.D.; MORAES, M.H.D.; MENTEN, J.O.M. Qualidade sanitária e germinação de sementes de *Pterogyne nitens* Tull. (Leguminosae – Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, p.149-153, 2006. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v28n1/a21v28n1.pdf>
- NAMETH, S.T. Priorities in seed pathology research. **Scientia Agricola**, v.55, p.94-97, 1998. <http://www.scielo.br/pdf/sa/v55nspe/3156.pdf>
- NETTO, D.A.M.; FAIAD, M.G.R. Viabilidade e sanidade de sementes de espécies florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, v.17, p.75-80, 1995. <http://www.abrates.org.br/revista/artigos/1995/v17n1/artigo13.pdf>
- ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seed. **Seed Science and Tecnology**, v.1, p.499-514, 1973.
- SANTANA, D.G.; RANAL, M.A. **Análise da germinação**: um enfoque estatístico. Brasília: UnB, 2004. 248p.
- SILVA, C.V.; BILIA, D.A.C.; MALUF, A.M.; BARBEDO, C.J. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.- Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, p.213-221, 2003. <http://www.scielo.br/pdf/rbb/v26n2/a09v26n2.pdf>
- VIEIRA, A.H.; MARTINS, E.P.; PEQUENO, P.L.L.; LOCATELLI, M.; SOUZA, M.G. **Técnicas de produção de sementes florestais**. CT/205, EMBRAPA-CPAF, Rondônia. p.2-4, 2001.
- VON BÜLOW, J.F.W.; CARMONA, R.; PARENTE, T.V. Armazenamento e tratamento de sementes de pitanga-vermelha-do-cerrado (*Eugenia calycina*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, p.961-970, 1994. <http://webnotes.sct.embrapa.br/pab/pab.nsf/FrAnual>

TABELA 1. Fungos associados a sementes de grumixameira (*Eugenia brasiliensis*) com ou sem secagem (Sec) até o nível pré-crítico, com ou sem tratamento prévio (Fung) com fungicida (Vitavax+Thiram) e antes ou após armazenamento (Armaz) por 90 dias aos 8 °C. Dados em porcentagem.

Sec	Fung	Armaz	Pnc	Pst	Cld	Fsr	Alt	Btr
%								
Não	Não	Não	95 a	33 a	40 a	8 a	3 a	0 b
Não	Não	Sim	72 ab	7 b	0 b	15 a	0 a	0 b
Não	Sim	Não	45 bc	5 b	0 b	2 a	0 a	0 b
Não	Sim	Sim	25 c	23 ab	53 a	21 a	3 a	23 a
Sim	Não	Não	95 a	33 a	40 a	8 a	3 a	0 b
Sim	Não	Sim	75 ab	7 b	0 b	15 a	0 a	0 b

Pnc: *Penicillium* sp.; Pst: *Pestalotiopsis* sp.; Cld: *Cladosporium* sp.; Fsr: *Fusarium* sp.; Alt: *Alternaria* sp.; Btr: *Botrytis* sp. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%)

TABELA 2. Fungos associados a sementes de pitangueira (*Eugenia uniflora*) após diferentes níveis de secagem e armazenadas por 90 e 180 dias (8 °C), com ou sem tratamento prévio com Vitavax+Thiram. Dados em porcentagem.

Nível De secagem	Armazenamento (dias) sem tratamento fungicida			Armazenamento (dias) com tratamento fungicida		
	Inicial	90	180	Inicial	90	180
<i>Penicillium</i> sp.						
Sem secagem	88 aA	85 aA	63 aB	65 aA	100 aA	93 aA
Pré-crítico	65 aA	90 aA	90 aA	42 aB	30 bB	17 bB
Pré-letal	98 aA	100 aA	78 aA	57 aB	7 bB	3 bB
<i>Pestalotiopsis</i> sp.						
Sem secagem	32 aAa	30 aBa	43 aAa	2 aBc	75 aAa	53 aAb
Pré-crítico	10 bAa	3 bAa	0 bAa	0 aAa	0 bAa	0 bAa
Pré-letal	3 bAa	12 bAa	0 bAa	2 aAa	0 bAa	0 bAa
<i>Cladosporium</i> sp.						
Sem secagem	47 bAb	17 bAc	75 aAa	2 aBb	22 aAa	0 aBb
Pré-crítico	92 aAa	67 aAb	65 aAb	0 aBa	0 bBa	0 aBa
Pré-letal	20 cAab	30 bAa	7 aAb	2 aBa	0 bBa	0 aAa
<i>Fusarium</i> sp.						
Sem secagem	3 aBb	18 bAa	17 bBa	47 aAa	7 aBc	28 aAb
Pré-crítico	0 aAb	13 bAa	0 aAb	0 bAa	0 aBa	2 bAa
Pré-letal	17 bAab	30 aAa	3 aAb	2 bBa	0 aBa	0 bAa
<i>Botrytis</i> sp.						
Sem secagem	0 bAc	55 aAa	32 aAb	0 aAa	18 aBa	5 aBa
Pré-crítico	47 aAa	37 aAa	35 aAa	0 aBa	0 bBa	0 aBa
Pré-letal	50 aAa	7 bAb	0 bAb	0 aBa	0 bAa	0 aAa

Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas para comparação entre secagens, maiúsculas entre tratamentos fungicidas e itálicos entre períodos de armazenamento) não diferem entre si (Tukey, 5%).

TABELA 3. Fungos associados a sementes de uvaieira (*Eugenia pyriformis*) após diferentes níveis de secagem e armazenadas por 90 e 180 dias (8°C), com ou sem tratamento prévio com Vitavax+Thiram. Dados em porcentagem.

Nível De secagem	Armazenamento (dias) sem tratamento fungicida			Armazenamento (dias) com tratamento fungicida		
	Inicial	90	180	Inicial	90	180
	<i>Penicillium</i> sp.					
Sem secagem	100 aAa	100 aAa	65 abBb	83 bBa	60 bBa	85 bAa
Pré-crítico	98 aAa	100 aAa	58 bBb	97 aAa	98 aAa	98 aAa
Pré-letal	98 aAa	100 aAa	99 aAa	87 bBa	72 bBa	83 bBa
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.					
Sem secagem	52 aAa	53 aAa	65 aAa	0 bBa	0 aBa	12 aBa
Pré-crítico	28 bAa	13 bAb	2 bAb	22 aAa	3 aAb	0 aAb
Pré-letal	25 bAa	13 bAab	3 bAb	5 bBa	2 aAa	0 aAa
	<i>Cladosporium</i> sp.					
Sem secagem	27 bAb	20 bAb	67 aAa	10 bAa	3 aAa	0 aBa
Pré-crítico	87 aAa	42 bAb	43 bAb	63 aBa	0 aBb	0 aBb
Pré-letal	83 aAa	73 aAa	70 aAa	8 bBa	3 aBa	0 aBa
	<i>Fusarium</i> sp.					
Sem secagem	3 bAc	32 aAb	68 aAa	0 bAb	10 cBb	48 bBa
Pré-crítico	2 aBc	35 aBb	80 aAa	0 bAb	73 aAa	92 aAa
Pré-letal	37 aBab	50 aAa	25 bAb	73 aAa	35 bAb	3 cBc

Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas para comparação entre secagens, maiúsculas entre tratamentos fungicidas e itálicos entre períodos de armazenamento) não diferem entre si (Tukey, 5%).

Tabela 4. Valores correspondentes a incidência de *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. em sementes de grumixameira em função do tratamento e do período de armazenamento. Dados em porcentagem.

Tratamentos	Armazenamento (dias)		
	0	60	120
<i>Cladosporium</i> sp.			
Testemunha	2 aB	16 abcB	31 bcA
55 °C/30 min	0 aA	2 bcA	11 deA
55 °C/150 min	0 aB	15 abcA	7 deAB
65 °C/30 min	2 aB	9 bcB	49 bA
65 °C/150 min	0 aB	31 aA	21 cdA
75 °C/30 min	2 aC	20 abB	71 aA
75 °C/150 min	0 aB	0 cB	38 bcA
-4,0 MPa	2 aA	0 cA	0 eA
Captan	0 aA	0 cA	0 eA
Derosal	2 aA	0 cA	0 eA
<i>Penicillium</i> sp.			
Testemunha	11 dA	4 bA	2 dA
55 °C/30 min	4 dA	9 bA	2 dA
55 °C/150 min	51 bcA	56 aA	22 cdB
65 °C/30 min	42 cB	71 aA	58 abAB
65 °C/150 min	89 aA	49 aB	56 abB
75 °C/30 min	49 bcB	73 aA	40 bcB
75 °C/150 min	75 abA	76 aA	20 cdB
-4,0 MPa	2 dB	0 bB	78 aA
Captan	0 dA	0 bA	0 dA
Derosal	0 dA	0 bA	0 dA
<i>Pestalotiopsis</i> sp.			
Testemunha	12 aA	19 bA	26 abcA
55 °C/30 min	0 aB	27 bA	23 abcA
55 °C/150 min	0 aB	9 bcA	19 abcAB
65 °C/30 min	0 aB	16 bcAB	28 abA
65 °C/150 min	0 aB	21 bcA	10 bcAB
75 °C/30 min	0 aC	80 aA	43 aB
75 °C/150 min	0 aB	5 bcB	36 aA
-4,0 MPa	0 aA	0 cA	0 cA
Captan	0 aA	0 cA	0 cA
Derosal	0 aA	0 cA	0 cA

Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas nas colunas, maiúsculas nas linhas) não diferem entre si (Tukey, 5%).

Tabela 5. Valores correspondentes a incidência de *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp. em sementes de pitangueira em função do tratamento e do período de armazenamento. Dados em porcentagem.

Tratamentos	Armazenamento (dias)		
	0	60	120
<i>Alternaria</i> sp.			
Testemunha	17 aB	35 aA	44 aA
55 °C/90 min	0 bA	0 bA	5 bcA
55 °C/120 min	0 bA	0 bA	0 cA
65 °C/30 min	0 bB	7 bAB	14 bA
-4,0 MPa	0 bA	0 bA	0 cA
Captan	0 bA	0 bA	0 cA
Derosal	0 bA	0 bA	5 bcA
<i>Cladosporium</i> sp.			
Testemunha	100 aA	98 aA	93 aA
55 °C/90 min	21 bB	81 abA	81 aA
55 °C/120 min	14 bB	64 bA	69 aA
65 °C/30 min	81 aA	95 aA	83 aA
-4,0 MPa	93 aA	0 cB	0 bB
Captan	16 bA	5 cA	0 bA
Derosal	2 bA	5 cA	0 bA
<i>Penicillium</i> sp.			
Testemunha	33 bA	2 bB	0 dB
55 °C/90 min	100 aA	88 bAB	67 bB
55 °C/120 min	100 aA	91 aA	45 bcB
65 °C/30 min	93 aA	64 aB	21 cdC
-4,0 MPa	72 aB	88 aAB	100 aA
Captan	0 cA	0 bA	0 dA
Derosal	0 cA	0 bA	14 cdA

Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas nas colunas, maiúsculas nas linhas) não diferem entre si (Tukey, 5%).

Tabela 6. Valores correspondentes a incidência de *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. em sementes de uvaieira em função do tratamento e do período de armazenamento. Dados em porcentagem.

Tratamentos	Período de armazenamento (dias)			Médias*
	0 (inicial)	60	120	
		<i>Alternaria</i> sp.		<i>Fusarium</i> sp.
Testemunha	0 aB	41 aA	55 aA	22 a
35 °C/30 min	10 aB	31 abA	38 abA	22 a
35 °C/90 min	9 aB	34 abA	30 abcAB	16 abc
45 °C/30 min	7 aB	39 aA	27 abcAB	19 a
45°C/90 min	5 aA	21 abcA	23 bcA	19 ab
55 °C/30 min	5 aA	22 abcA	23 bcA	20 a
55 °C/90 min	0 aA	5 bcA	0 cA	7 abc
-1,5 MPa	9 aA	0 cA	0 cA	10 abc
-2,5 MPa	0 aA	0 cA	0 cA	2 bc
Captan	0 aB	33 abA	27 abcAB	0 c
Derosal	0 aA	17 abcA	14 bcA	0 c
		<i>Cladosporium</i> sp.		<i>Penicillium</i> sp.
Testemunha	98 aA	98 aA	62 abB	50 bc
35 °C/30 min	93 abA	98 aA	89 aA	38 c
35 °C/90 min	89 abA	98 aA	89 aA	41 c
45 °C/30 min	89 abA	93 aA	85 aA	33 c
45 °C/90 min	58 bcA	44 bcAB	25 bcB	39 c
55 °C/30 min	49 cAB	64 abA	33 bcB	44 c
55 °C/90 min	0 dA	0 dA	0 cA	88 a
-1,5 MPa	98 aA	11 cdB	0 cB	50 bc
-2,5 MPa	100 aA	4 dB	0 cB	72 ab
Captan	0 dA	0 dA	4 cA	6 d
Derosal	0 dA	4 dA	7 cA	5 d
		<i>Pestalotiopsis</i> sp.		
Testemunha	38 abA	57 aA	54 abcA	-
35 °C/30 min	30 abcB	58 aA	35 cdAB	-
35 °C/90 min	34 abcA	58 aA	42 bcA	-
45 °C/30 min	35 abB	70 aA	47 abcAB	-
45 °C/90 min	55 aA	71 aA	63 abcA	-
55 °C/30 min	39 abB	66 aA	71 abA	-
55 °C/90 min	24 abcB	71 aA	78 aA	-
-1,5 MPa	19 bcA	0 bA	0 eA	-
-2,5 MPa	21 abcA	0 bA	5 deA	-
Captan	12 bcA	10 bA	0 eA	-
Derosal	0 cA	0 bA	0 eA	-

Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas nas colunas, maiúsculas nas linhas) não diferem entre si (Tukey, 5%). **Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. não apresentaram interação entre tratamentos e períodos de armazenamento.

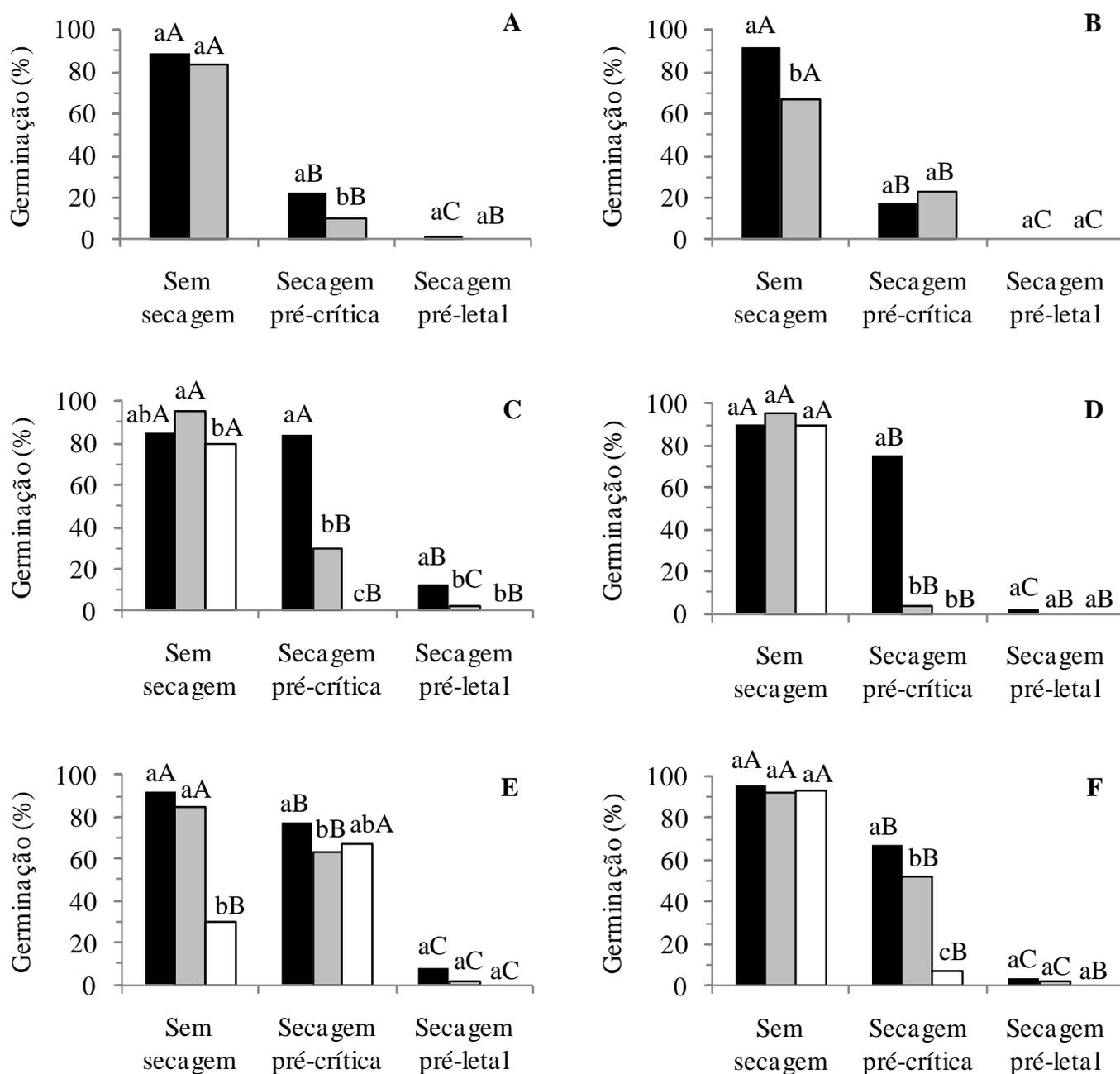


FIGURA 1. Germinação de sementes de grumixameira (A e B), pitangueira (C e D) e uvaieira (E e F), sem (A, C e E) ou com (B, D e F) tratamento fungicida (Vitavax-Thiram 200SC), sem secagem ou submetidas a dois níveis de secagem (pré-crítica e pré-letal) e antes (colunas pretas) ou após armazenamento por 90 (colunas em cinza) e por 180 dias (colunas brancas). Colunas com mesma letra (minúscula para comparações entre períodos de armazenamento, maiúsculas para comparação entre níveis de secagem) não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

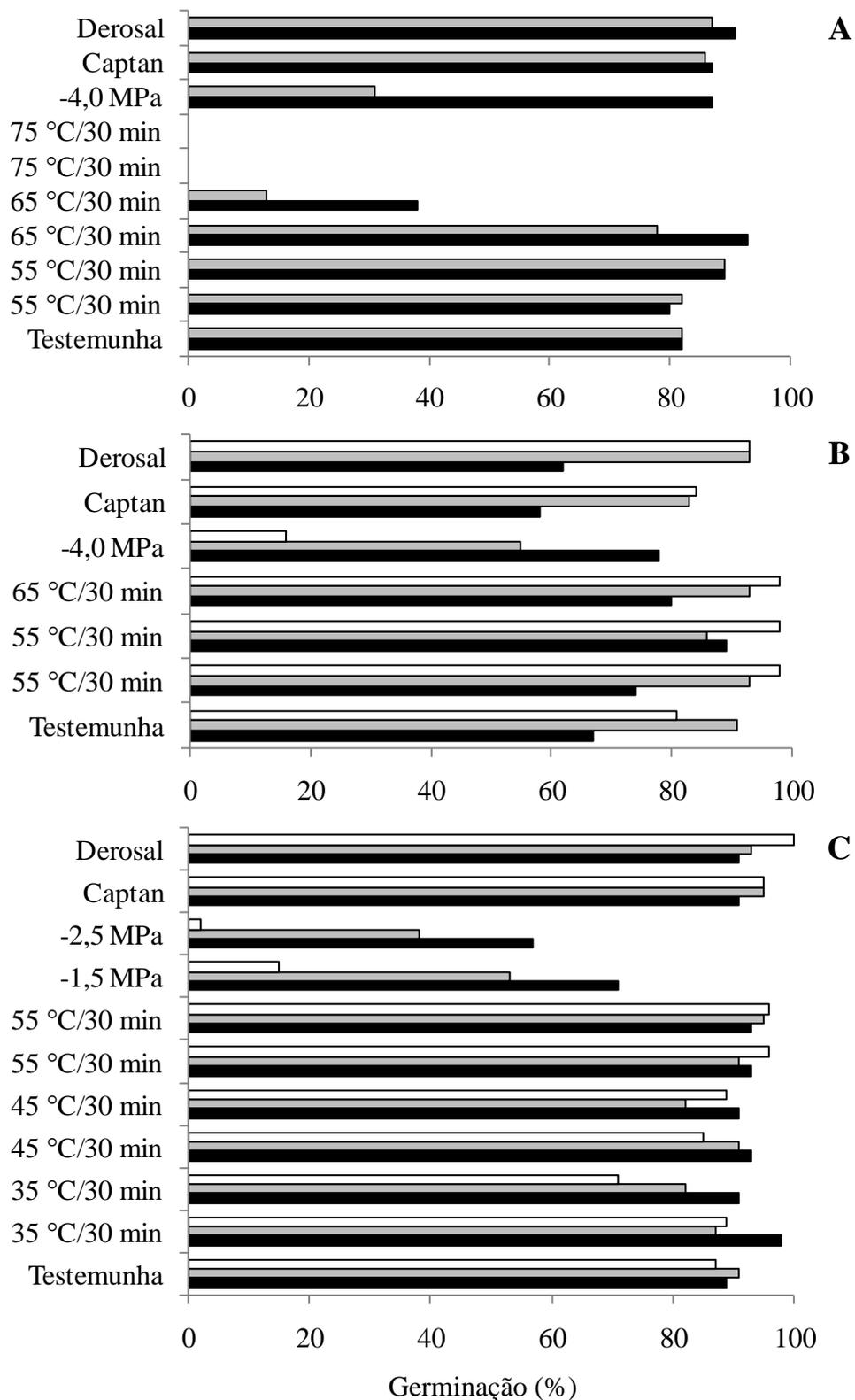


FIGURA 2. Germinação de sementes de grumixameira (A), pitangueira (B) e uvaieira (C) submetidas a tratamentos térmicos, osmóticos e com fungicidas, antes (colunas pretas) ou após armazenamento por 60 (colunas em cinza) e por 120 dias (colunas brancas).

CAPÍTULO 2

**Tratamentos termo-osmóticos e avaliação das taxas respiratórias
de sementes de *Eugenia uniflora* Lam.**

RESUMO – Baseando-se em resultados de diferentes tratamentos de sementes para controle de microrganismos associados a elas, bem como na influência destes no armazenamento e viabilidade das sementes, principalmente para as recalcitrantes, para as quais a redução do teor de água e da temperatura de armazenamento podem prejudicar a conservação, este trabalho se propôs a verificar o potencial de controle desses fungos e as taxas respiratórias das sementes de *Eugenia uniflora* na presença dos fungos. Para tanto, foram aplicados diferentes tratamentos térmicos em associação com tratamentos osmóticos e avaliadas as taxas respiratórias de amostras controle, tratadas com fungicida, tratadas termo-osmoticamente, congeladas e inoculadas com fungos de maior ocorrência nestas sementes. As maiores incidências fúngicas foram de *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Phoma* sp., que foram controlados pelos tratamentos termo-osmóticos após sete dias de armazenamento. Entretanto, os valores de germinação foram inferiores aos apresentados pelos tratamentos controle, principalmente após os períodos de 60 e 120 dias de armazenamento. Paralelamente, ocorreu a elevação da incidência de *Penicillium* sp. Porém, quando o tratamento termo-osmótico a 55 °C/120' -3,7MPa foi aplicado por sete dias e armazenado em sacos plásticos de polietileno como os tratamentos controle, a incidência fúngica se manteve baixa e a germinação alta. Quando analisadas as taxas respiratórias das diferentes amostras de sementes, constatou-se que estes não interferiram na respiração das sementes de *Eugenia uniflora*, sugerindo a existência de compostos ou mecanismos de ativação de respostas contra a ação desses microrganismos.

ABSTRACT - Based on the results of different seed treatments for control of microorganisms associated with them, as well as their influence on seed viability and storage, especially for recalcitrant, for which the reduction of water content and temperature of storage can undermine conservation, this study proposes to investigate the potential for controlling these fungi and the respiration rate of seeds of *Eugenia uniflora* in the presence of fungi. For this purpose, different heat treatments were applied in combination with osmotic treatments and evaluated the respiration rate of control samples treated with fungicide, heat-treated osmotically frozen and inoculated with fungi of higher occurrence of these seeds. The highest incidences of fungal infections were *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. *Pestalotiopsis* sp. and *Phoma* sp., which were controlled by thermal-osmotic treatments after seven days of storage. However, germination values were higher than those by other treatments, especially after periods of 60 and 120 days of storage. In parallel, there was a higher incidence of *Penicillium* sp. However, when the thermal-osmotic treatment at 55 ° C/120 '-3.7 MPa was applied for seven days and stored in polyethylene bags as the control treatments, the incidence of fungal infection remained low and high germination. When analyzing the respiration rates of different seed samples, we found that these did not affect the respiration of seeds of *Eugenia uniflora*, suggesting the existence of compounds or mechanisms of activation of responses against the action of these microorganisms.

INTRODUÇÃO

A tolerância à dessecação é uma das mais importantes propriedades da semente. É um fenômeno necessário ao ciclo de vida da planta, como uma estratégia de adaptação que permite a sobrevivência da semente durante o armazenamento, sob condições estressantes do ambiente e assegura a disseminação da espécie (Medeiros & Eira 2006). No gênero *Eugenia*, há limites de tolerância à dessecação das sementes das diferentes espécies, porém a redução do teor de água para valores inferiores a 45% sempre prejudicou a germinação dessas sementes, que perderam a capacidade germinativa quando o teor de água foi inferior a 15%. Para as sementes de *E. uniflora*, o início de perda da viabilidade está no teor de água entre 45 e 50%, enquadrando-se em posição intermediária quanto à sensibilidade à dessecação em relação às demais espécies de *Eugenia*, também recalcitrantes (Delgado & Barbedo 2007).

A redução do teor de água das sementes recalcitrantes, bem como da temperatura de armazenamento, até valores próximos ao teor de água considerado crítico, como determinado por Delgado & Barbedo (2007), são meios de paralisar ou reduzir o crescimento do embrião, evitando a ocorrência de muitas reações metabólicas e o desenvolvimento de microrganismos (Barbedo & Bilia 1998), causas e conseqüências do processo de deterioração. De acordo com Delouche (2002), os mecanismos energéticos e de síntese quando afetados, reduzem a taxa respiratória e a atividade de muitas enzimas.

Em sementes de *Eugenia pyriformis*, Andrade & Ferreira (2000) constataram que os dados de condutividade elétrica evidenciaram o aumento dos valores com a progressão da secagem no decorrer do armazenamento, ocorrendo uma maior liberação de exsudatos pelas sementes com teor de água reduzido a 14%. Em sementes de milho, o tempo de exposição ao tratamento térmico ocasionou aumento dos valores de condutividade elétrica e redução significativa da primeira contagem e germinação das sementes, além de alterações nos padrões eletroforéticos das enzimas esterase e malato desidrogenase (Coutinho *et al.* 2007), a qual está associada ao processo de respiração celular. Lamarca (2009) observou que em semente de *Caesalpineia echinata* Lam.

ocorreu uma alta incidência de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Fusarium* quando estas apresentavam o nível mais elevado de hidratação (26%) e altas taxas respiratórias.

Apesar das alterações metabólicas ocasionadas pelo alto teor de água das sementes recalcitrantes e aumento da incidência de microrganismos, e que ambos podem interferir no processo de respiração celular, não há registro na literatura quanto à avaliação das taxas respiratórias de sementes de florestais e a influência dos microrganismos nestas.

O acesso de patógenos às sementes pode ser influenciado por inúmeros fatores, entre os quais a própria natureza do parasitismo de cada organismo. Entre os agentes patogênicos, os fungos são os mais ativos, tendo uma maior habilidade de penetrar diretamente nos tecidos vegetais e destes estenderem-se mais facilmente (Machado 1988). Os tratamentos de sementes, como químico (consiste na incorporação de produtos químicos sintéticos às sementes), físico (consiste em expor as sementes à ação do calor ou de outro agente físico controlado) e biológico (baseado na incorporação de organismos antagonistas) (Menten 1991), são uma das maneiras de manter ou melhorar a qualidade sanitária das sementes.

Dentre estes, os tratamentos físicos, como a termoterapia em água quente e o condicionamento osmótico, podem conferir grande eficiência quanto à erradicação do patógeno e à germinação das sementes, mas dependem da sensibilidade diferencial ao estresse hídrico entre a semente e o patógeno proporcionado pelo binômio tempo-temperatura e dos potenciais hídricos da solução. O tratamento térmico de sementes da espécie florestal de *Lafoensia pacari* em água a temperatura de 60 °C durante 10 minutos, reduziu a incidência de patógenos como *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp. e aumentou o poder germinativo das sementes (Piveta *et al.* 2009). Entretanto, o tratamento térmico de sementes de alfafa a 50 °C durante 30 minutos foi eficiente na erradicação de fungos, mas afetou a germinação (Mendes *et al.* 2001).

Em estudos realizados até o presente momento, foi possível verificar o potencial de controle desses patógenos pela utilização dos métodos térmicos e osmóticos. Contudo, o melhor potencial

osmótico, a melhor associação tempo x temperatura e, principalmente, a associação desses dois métodos ainda precisam ser mais bem estudados.

Considerando o controle diferenciado dos patógenos pelos diferentes métodos, este trabalho teve como objetivo associar os tratamentos térmicos aos osmóticos visando à erradicação dos fungos presentes nas sementes de *Eugenia uniflora* e analisar as alterações metabólicas nas sementes, por meio das taxas respiratórias, sob diferentes tratamentos de controle de fungos e na presença destes ao longo do armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e caracterização do material vegetal

Os frutos de *Eugenia uniflora* foram colhidos em matrizes plantadas no Jardim Botânico de São Paulo (JBSP), em São Paulo, SP (23°38'S e 46°37'W), nos meses de outubro/novembro de 2008, e no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em Campinas, SP (22°87'S e 47°07'W), nos meses de setembro/outubro de 2009. O processo de extração e beneficiamento de sementes consistiu da retirada da polpa, seleção de sementes não danificadas por insetos ou imaturas e armazenamento em sacos de polietileno, a 8°C, até a instalação dos experimentos.

As sementes foram analisadas quanto ao teor de água, gravimetricamente a 103 °C por 17 h (Ista 1985) e quanto ao potencial hídrico em equipamento específico para essa análise (WP4, Decagon, Pullmann, USA), que trabalha com célula fotossensível na temperatura do ponto de orvalho (Decagon 2001).

A capacidade germinativa foi avaliada por meio de teste de germinação, conduzido em rolos de papel Germitest, previamente umedecidos (Brasil 1992), mantidos em câmaras de germinação com 100% de umidade relativa do ar, garantida pela presença de água na porção inferior do equipamento, locadas em sala de germinação regulada para 25 °C e luz contínua, utilizando-se três repetições de 15 sementes. As avaliações foram realizadas a cada sete dias durante 45 dias,

registrando-se a germinação, considerando como plântulas normais as que possuíam parte aérea e sistema radicular desenvolvidos e sem defeitos aparentes.

A avaliação da microflora dos embriões foi realizada através do método de incubação em papel de filtro (Brasil 1992). Os embriões foram distribuídos equidistantemente em placas de Petri, contendo três folhas de papel de filtro umedecidas com água destilada, incubadas por sete dias a 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, utilizando-se três repetições de 15 sementes. A identificação e contagem dos fungos foram realizadas examinando-se as colônias fúngicas desenvolvidas nos embriões com auxílio de microscópio estereoscópico. Em alguns casos, a identificação foi complementada pela visualização das características morfológicas dos fungos em microscópio óptico.

Tratamentos de controle da incidência fúngica

Considerando os resultados obtidos pelos métodos alternativos aplicados anteriormente (capítulo 1), as sementes de *Eugenia uniflora* (JBSP) foram submetidas a tratamentos térmicos e osmóticos em associação. Para tanto, as sementes foram imersas em água destilada, contida em béquer de vidro, e estes colocados em estufa com circulação de ar regulada para as determinadas temperaturas e por diferentes períodos: $55^{\circ}\text{C}/120'$, $55^{\circ}\text{C}/180'$ e $60^{\circ}\text{C}/120'$. Ao término do período de exposição ao calor úmido, as sementes foram depositadas sobre papel de filtro, à temperatura ambiente, para retirada do excesso de água superficial. Amostras de sementes de cada um desses tratamentos foram armazenadas durante sete, 60 e 120 dias, a 8 °C, em caixas tipo gerbox, com uma folha de papel de filtro grosso na base e uma para cobertura, contendo soluções de polietilenoglicol (PEG 6000) nos potenciais hídricos de -3,7 MPa e -4,0 MPa.

Os tratamentos controles foram representados por sementes tratadas ou não com o fungicida de ação sistêmica Derosal Plus (carbendazin + tiram, 300 ml/100 kg de sementes), cuja dose estava de acordo com a recomendação do fabricante e de testes realizados anteriormente, uma vez que sua eficiência em relação à incidência de fungos nas espécies trabalhadas tem sido próxima a 100%.

Dessa maneira, este trabalho constituiu-se de um experimento fatorial entre tratamentos (8) x períodos de armazenamento (2), em delineamento inteiramente casualizado, com posterior análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey, a 5% (Santana e Ranal, 2004).

Alterações nas taxas respiratórias dos embriões influenciadas pela micoflora

Após quatro meses de armazenamento a 7 °C, as sementes (IAC) foram submetidas aos seguintes processos: controle – sementes que não receberam nenhum tratamento; tratamento químico – tratamento com o fungicida sistêmico Derosal Plus; tratamento alternativo – sementes submetidas a tratamento termo-osmótico; congelamento – sementes congeladas a -18 °C por 24 horas, visando a produzir sementes mortas; inoculação – sementes inoculadas com *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp., isolados de sementes desse lote.

Para tanto, a escolha do fungicida e do tratamento alternativo foi baseada nos resultados alcançados a partir dos tratamentos descritos anteriormente. Assim, o tratamento termo-osmótico consistiu na imersão das sementes em água destilada e, o conjunto, em estufa com circulação de ar regulada a 55°C, na qual permaneceram por 120 minutos. Após este período, as sementes foram depositadas sobre papel de filtro, à temperatura ambiente, para retirada do excesso de água superficial e, em seguida, armazenadas em soluções de polietilenoglicol (PEG 6000) com potencial hídrico de -3,7 MPa, em caixas tipo gerbox, com uma folha de papel de filtro grosso na base e uma para cobertura, a 7 °C durante sete dias. No término deste período, as sementes foram lavadas duas vezes com água esterilizada e acondicionadas em sacos plásticos a 7 °C.

O congelamento consistiu em submeter os embriões à temperatura de -18±2°C por 24 horas. Visando à confirmação do sucesso do tratamento, teste de tetrazólio foi aplicado a estas sementes. Baseando-se em resultados prévios (dados não apresentados), o teste de tetrazólio consistiu na incubação das sementes seccionadas ao meio e imersas na solução a 0,125% por duas horas a 35°C sob ausência de luz em solução de cloreto 2,3,5-trifenil-tetrazólio. Após este período, foram avaliados os tecidos inviáveis por meio da ausência de coloração do eixo embrionário dos embriões.

As inoculadas com os fungos *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp. consistiram de sementes desinfestadas com uma solução comercial de hipoclorito de sódio a 2% (Candida®), na qual ficaram imersas durante cinco minutos, sendo o excesso de água após esse período retirado com papel de filtro tipo germitest. Em seguida, foram distribuídas em placas de Petri de vidro contendo meio de cultura BDA e colônias destes fungos desenvolvidas por toda a área da placa, de maneira que todas as sementes estivessem em contato com o micélio fúngico. As placas foram agitadas por dois minutos e deixadas em repouso sob temperatura ambiente por 24 horas. Após este período, as sementes foram retiradas das placas e deixadas em repouso, nas mesmas condições ambientais e período, sobre papel de filtro tipo germitest. Após este período, as sementes foram acondicionadas em sacos plásticos a 7 °C.

Após a realização de todos os tratamentos necessários para a caracterização das diferentes amostras definidas anteriormente, os embriões foram incubados a 25 °C e 7 °C em frascos de vidros com fechamento hermético, cujas concentrações de O₂ e CO₂ do ar interno foram medidas por meio de equipamento específico ILL6600 (Illinois). Os frascos dos embriões incubados a 7°C foram analisados diariamente durante dez dias e a cada três dias durante oito dias, e os incubados a 25 °C diariamente durante doze dias. As mesmas avaliações foram repetidas após 120 dias de armazenamento, mas o tempo de incubação a 7 °C foi de 29 dias. Para as medições, as tampas dos vidros eram perfuradas, formando orifícios que foram recobertos por um septo de borracha. Por este septo foram inseridos os eletrodos do equipamento por onde foi tomada a amostra do ar da embalagem. O volume total do ar das embalagens foi determinado segundo o princípio da hidrostática para que se calculasse o volume resultante de ar depois de descontado o volume ocupado pelos embriões.

O consumo de O₂ e a produção de CO₂ pelos embriões foram estimados pela diferença entre os valores medidos e os da atmosfera normal. Após cada medida, as embalagens eram abertas por alguns minutos para re-equilíbrio com a atmosfera normal sendo, em seguida, novamente fechadas para a continuidade do experimento. Considerando-se a pressão atmosférica local como 0,90 atm

(A. B. Pereira, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2007, comunicação pessoal), os valores obtidos em porcentagem de O₂ ou de CO₂ foram convertidos para pressão parcial do gás, segundo a fórmula $p_1/P=v_1\%/V\%$ (Feltre 1982), onde:

p_1 = pressão parcial do gás (em atm);

P = pressão atmosférica local (=0,90 atm);

$v_1\%$ = volume do gás, em porcentagem;

$V\%$ = volume total (=100%).

A seguir, baseando-se no volume das embalagens e na temperatura registrada em cada avaliação, os valores foram convertidos para μmol de O₂ e de CO₂, pela equação de Clapeyron, $p_1V=nRT$, onde:

V = volume total de ar do frasco (em L)

n = número de moles do gás

R = constante universal dos gases perfeitos (0,082 atm.L.mol⁻¹.K⁻¹)

T = temperatura (em Kelvin)

Os valores obtidos nas avaliações foram somados e divididos pela massa seca total da amostra das sementes e pelo número de dias em estes permaneceram nas embalagens, obtendo-se o valor expresso em micromol por grama de massa seca por dia ($\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$). Foi calculado, também, o quociente respiratório (QR), dividindo-se o valor obtido para produção de CO₂ pelo obtido para consumo de O₂ ($\text{QR}=\text{CO}_2.\text{O}_2^{-1}$), ambos em $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$, segundo descrito por Kader & Saltveit (2002).

Transcorridos estes períodos, as sementes foram caracterizadas quanto ao teor de água e potencial hídrico e avaliadas quanto à porcentagem de germinação e incidência fúngica. O mesmo foi efetuado para as sementes incubadas nas diferentes temperaturas após 120 dias de armazenamento a 7 °C.

O delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial tratamento de sementes (6) x temperatura de incubação (2) x armazenamento (2). Os resultados

foram submetidos à análise de variância (F, a 5% de probabilidade), com comparação das médias pelo teste de Tukey (Santana & Ranal 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tratamentos de controle da incidência fúngica

O teor de água inicial das sementes de *Eugenia uniflora*, em relação ao tratamento controle representado pela testemunha, foi de 55,2%, muito próximo ao encontrado por Delgado & Barbedo (2007), de 52,0%, bem como os valores de germinação (tabela 1). O teor de água se manteve constante ao longo do armazenamento. Entretanto, o potencial hídrico das sementes foi alterado ao longo do armazenamento para alguns tratamentos (tabela 1), atingindo valores mais negativos nos tratamentos controle e nos associados 55 °C/120'- 3,7 MPa e 55 °C/120'- 4,0 MPa. Apesar das sementes não terem atingido os valores das soluções osmóticas, tendendo à estabilidade num determinado potencial hídrico, como constatado também por Delgado (2006), a temperatura e o período de exposição de 55 °C durante 120 minutos proporcionou a desidratação por meio da solução osmótica ao longo do armazenamento. A redução dos valores de potencial hídrico das sementes dos tratamentos controle sugere possíveis alterações fisiológicas ou físicas nestas, as quais podem ser intensificadas quando em períodos mais extensos de armazenamento. De acordo com Villela & Marcos Filho (1998), a disponibilidade hídrica ou o estado energético da água afeta a natureza e a cinética das reações metabólicas, de maneira que os mecanismos da deterioração de sementes diferem para cada nível de hidratação da semente durante o armazenamento, além de influenciar o desenvolvimento de fungos (Machado *et al.* 2008).

Nas sementes de *E. uniflora* do tratamento controle sem aplicação de fungicida, os fungos *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *Phoma* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. foram encontrados colonizando-as, cujas incidências aumentaram ao longo do armazenamento para *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *Phoma* sp. (tabela 2). Avila *et al.* (2009) também encontraram *Cladosporium* sp. e

Alternaria sp. com altas incidências ao longo da maturação dos frutos e sementes de *E. uniflora*, e baixas incidências de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.

Tabela 1. Potencial hídrico (MPa), teor de água (%) e germinação (%) de sementes de *Eugenia uniflora* Lam. sem tratamento (testemunha), tratadas com fungicida (Derosal Plus) e submetidas a tratamentos termo-osmóticos, antes e após 60 e 120 dias de armazenamento a 8 °C. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas nas linhas, maiúsculas nas colunas) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamentos de sementes	Armazenamento			
	Inicial	60 dias	120 dias	
<i>Potencial hídrico</i>				
Testemunha	-1,3 cB	-2,0 bB	-2,7 aBC	
Derosal Plus	-1,5 bB	-2,1 aB	-2,4 aC	
55 °C/120' -3,7 MPa	-2,4 bA	-3,4 aA	-3,0 aABC	
55 °C/120' -4,0 MPa	-2,6 bA	-2,9 bA	-3,5 aA	
55 °C/180' -3,7 MPa	-2,6 aA	-2,9 aA	-3,1 aAB	
55 °C/180' -4,0 MPa	-2,5 bA	-3,3 aA	-3,1 aAB	
60 °C/120' -3,7 MPa	-2,5 bA	-3,2 aA	-2,8 abBC	
60 °C/120' -4,0 MPa	-2,8 aA	-3,1 aA	-2,9 aABC	
Coef. var.	9,37%			
<i>Teor de Água</i>				
Testemunha	55,2	53,4	54,8	54,5 a
Derosal Plus	51,2	54,9	55,0	53,7 ab
55 °C/120' -3,7 MPa	52,2	50,1	57,1	53,2 ab
55 °C/120' -4,0 MPa	50,1	50,3	50,3	50,2 abc
55 °C/180' -3,7 MPa	50,5	48,7	50,7	50,0 bc
55 °C/180' -4,0 MPa	52,4	50,3	49,9	50,5 abc
60 °C/120' -3,7 MPa	54,3	49,6	50,3	51,4 abc
60 °C/120' -4,0 MPa	49,6	43,9	50,8	48,1 c
Coef. var.	5,78%			
Médias	51,8 AB	50,1 B	52,4 A	
<i>Germinação</i>				
Testemunha	92 aA	100 aA	100 aA	
Derosal Plus	97 aA	92 aA	100 aA	
55 °C/120' -3,7 MPa	75 aAB	31 bB	11 bB	
55 °C/120' -4,0 MPa	53 aBC	19 bBC	8 bB	
55 °C/180' -3,7 MPa	53 aBC	19 bBC	0 bB	
55 °C/180' -4,0 MPa	61 aBC	14 bBC	0 bB	
60 °C/120' -3,7 MPa	61 aBC	6 bBC	0 bB	
60 °C/120' -4,0 MPa	43 aC	0 bC	0 bB	
Coef. var.	23,80%			

Tabela 2. Incidência fúngica (%) de sementes de *Eugenia uniflora* Lam. sem tratamento (Teste), tratadas com o fungicida Derosal Plus (Fung) e submetidas a tratamentos termo-osmóticos(1: 55 °C/120'-3,7 MPa; 2: 55 °C/120'-4,0 MPa; 3: 55 °C/180'-3,7 MPa; 4: 55 °C/180'-4,0 MPa; 5: 60 °C/120'-3,7 MPa; 6: 60 °C/120'-4,0 MP), antes e após 60 e 120 dias de armazenamento a 8 °C.

Armazenamento	Tratamentos							
	Teste	Fung	1	2	3	4	5	6
<i>Cladosporium</i> sp.								
Inicial	60	0	2	0	2	0	0	0
60 dias	87	0	2	0	5	6	9	0
120 dias	82	0	0	0	0	0	0	0
<i>Alternaria</i> sp.								
Inicial	13	0	0	0	0	0	0	0
60 dias	89	0	0	13	0	0	0	0
120 dias	98	0	2	78	24	0	2	0
<i>Phoma</i> sp.								
Inicial	18	0	0	0	0	0	0	0
60 dias	82	0	0	0	0	0	0	0
120 dias	69	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fusarium</i> sp.								
Inicial	9	0	5	2	2	0	0	0
60 dias	18	0	2	0	0	5	0	38
120 dias	11	0	44	2	0	49	2	2
<i>Penicillium</i> sp.								
Inicial	9	0	5	2	2	0	0	0
60 dias	2	8	87	95	100	89	98	100
120 dias	0	5	98	100	100	91	100	100

Os fungos *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *Phoma* sp. foram controlados por meio do tratamento das sementes com o fungicida e com a associação da termoterapia ao osmocondicionamento. Entretanto, os tratamentos termo-osmóticos favoreceram o desenvolvimento de *Penicillium* sp. nos períodos posteriores ao armazenamento de sete dias. O aumento da incidência deste fungo ocorreu à medida que a germinação das sementes diminuiu. Contudo, as condições propiciadas pelo armazenamento nas soluções osmóticas podem prejudicar a germinação destas sementes. O polietilenoglicol apresenta vantagens sobre os outros agentes osmóticos por ser mais inerte, não ser absorvido pelas sementes devido seu peso molecular (>4000) e, geralmente, não ser tóxico, mas apresenta um efeito negativo sobre a disponibilidade de oxigênio para as sementes devido à alta viscosidade que leva à baixa taxa de difusão do oxigênio nas soluções (Santos *et al.* 2008). Além disso, assim como observado em armazenamento modificado, no qual a atmosfera saturada de CO₂ e deficiente em O₂ pode favorecer a proliferação de agentes patogênicos tolerantes a estas atmosferas (Santos *et al.* 2006), nestas soluções osmóticas *Penicillium* sp. pode ter sido favorecido.

As sementes com altas incidências de *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. e *Phoma* sp., caracterizadas como testemunha, e as sem incidências de fungos, tratadas com fungicida, não apresentaram reduções nos valores de germinação ao longo do armazenamento (tabela 1). Para os tratamentos termo-osmóticos, a diminuição destes valores foi maior após os períodos de armazenamento por 60 e 120 dias, principalmente para o de 60 °C/120' -4,0 MPa. De acordo com Delgado (2006), o valor de teor de água crítico para pitanga foi de 42,6%, o qual está muito próximo ao encontrado neste tratamento, podendo ter influenciado ainda mais na redução da capacidade germinativa destas sementes.

Como estes tratamentos termo-osmóticos estão baseados na sensibilidade diferenciada da semente e do microrganismo em relação ao estresse condicionado pela exposição destes às temperaturas e aos potenciais hídricos, a proliferação de *Penicillium* sp. pode ter sido favorecida pela diminuição da germinabilidade e morte das sementes, ocasionando a diminuição da resistência

destas ao estresse hídrico e alteração do potencial hídrico das soluções e liberação de exsudatos que propiciaram o desenvolvimento deste fungo. Segundo Nunes *et al.* (2000), no condicionamento de sementes o desenvolvimento de microorganismos é estimulado pelo uso da solução osmótica, tanto que sementes de cebola submetidas ao condicionamento osmótico sem aplicação de fungicida apresentaram maior desenvolvimento de fungos, o que proporcionou maior número de plantas anormais infeccionadas e redução da porcentagem de germinação, quando comparados com o tratamento controle.

Coutinho *et al.* (1999) observaram que a efetividade de um produto, eliminando ou reduzindo uma espécie fúngica, pode favorecer outra espécie devido à ausência de competição, como notado em relação ao *Cladosporium* sp. e ao *Penicillium* sp., cujas incidências do primeiro foi maior na testemunha e menor nos diferentes tratamentos, enquanto que as incidências de *Penicillium* sp. aumentaram ao longo dos tratamentos termo-osmóticos. Entretanto, essas diferenças na ocorrência desses fungos podem ser decorrentes do comportamento de *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp. em ambientes com estresse hídrico. Variedades morfológicas identificadas como *Cladosporium sphaerospermum* são hábeis em desenvolver-se em baixas atividades de água, enquanto outras espécies de *Cladosporium* preferem altas (Zalar *et al.* 2007). Já as espécies de *Penicillium*, como *P. italicum*, estão adaptadas às baixas condições de temperatura e atividade de água (Plaza *et al.* 2003).

Alterações nas taxas respiratórias dos embriões influenciadas pela micoflora

As sementes de *Eugenia uniflora* da amostra controle apresentaram taxas respiratórias quase três vezes menores quando incubadas a 7 °C em relação à 25 °C (tabela 3), tanto quando submetidas às temperaturas assim que tratadas quanto após o armazenamento de quatro meses após os tratamentos. Este comportamento também foi observado nas demais amostras de sementes: tratadas com fungicida, termo-osmoticamente, inoculadas e congeladas. Apesar das diferenças das taxas respiratórias das sementes nas diferentes temperaturas, a germinação permaneceu acima de 60%

para todas as amostras (figura 1), apresentando uma pequena redução quando analisadas as médias dessas ao longo do armazenamento. As sementes incubadas a 25 °C apresentaram redução no potencial hídrico (tabela 4), que pode ser resultado do alto metabolismo, como mostram as elevadas taxas respiratórias e de germinação.

Entretanto, na amostra de congelamento foram obtidas taxas respiratórias muito mais elevadas, principalmente quando as sementes foram incubadas a 25 °C. Considerando que nesta amostra só havia a respiração celular de microrganismos, uma vez que as sementes estavam mortas, sugere-se que há um mecanismo de defesa das sementes contra a ação desses, de maneira que nos demais tratamentos a presença dos microrganismos pouco interferiu na respiração das sementes. Em frutos de *Eugenia uniflora* armazenados a 10 °C, a baixa incidência de fungos como *Cladoporium cladosporioides*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotia* sp. e *Nigrospora* sp., foi sugerida como resultante da presença de substâncias de defesa, tais como alcalóides e fenólicos, que tornam os frutos mais resistentes, e da possibilidade dessa temperatura ter inibido a germinação dos esporos presentes (Santos *et al.* 2006). Em relação às sementes, extratos apresentaram uma excelente capacidade antioxidante, que foi parcialmente correlacionada com o alto teor de fenólicos e apresentou alguma variação de acordo com a coloração da polpa das pitangas (Bagetti *et al.* 2009).

O tratamento alternativo, com armazenamento na solução osmótica por apenas sete dias, diferente do modo como vinha sendo utilizado, no qual as sementes ficavam imersas durante todo o período de armazenamento do estudo, mostrou-se viável no controle dos fungos e na manutenção da

Tabela 3. Consumo de O₂ (μmol.gMS⁻¹.d⁻¹), produção de CO₂ (μmol.gMS⁻¹.d⁻¹) e quociente respiratório (QR) de sementes de *Eugenia uniflora* Lam. sem tratamento (testemunha), tratadas com fungicida (Derosal Plus), submetidas a tratamento termo-osmóticos, congelamento e inoculação de *Penicillium* sp. e *Cladosporium* sp., após incubação a 7 °C e 25 °C, assim que tratados e após 120 dias de armazenamento a 7 °C. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas nas linhas, maiúsculas nas colunas) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamentos de sementes	Armazenamento		Temperatura de incubação	
	Inicial	120 dias	7 °C	25 °C
<i>Consumo de O₂</i>				
Testemunha	55,6 aBC	46,1 bB	26,2 bB	75,6 aBC
Derosal Plus	59,3 aBC	29,1 bD	25,7 bB	62,7 aCD
55 °C/120' -3,7 MPa	68,5 aB	50,0 bB	31,9 bB	86,3 aB
Congelamento	131,5 aA	101,2 bA	56,6 bA	176,1 aA
Inoculação/ <i>Penicillium</i> sp.	55,8 aBC	37,1 bBC	26,3 bB	66,5 aCD
Inoculação/ <i>Cladosporium</i> sp.	48,6 aC	29,3 bC	20,2 bB	57,7 aD
Coef. var.	13,05%			
<i>Produção de CO₂</i>				
Testemunha	53,5 aB	40,6 bB	25,7 bB	68,4 aB
Derosal Plus	55,1 aB	23,7 bC	24,5 bB	53,8 aC
55 °C/120' -3,7 MPa	48,2 aB	43,0 aB	21,4 bB	69,9 aB
Congelamento	136,3 aA	95,6 bA	56,7 bA	175,2 aA
Inoculação/ <i>Penicillium</i> sp.	51,0 aB	32,8 bBC	24,1 bB	59,8 aBC
Inoculação/ <i>Cladosporium</i> sp.	45,9 aB	26,8 bC	19,8 bB	53,1 aC
Coef. var.	12,75%			
7 °C	37,44 aB	19,87 bB		
25 °C	92,56 aA	67,49 bA		
<i>Quociente respiratório</i>				
Testemunha	0,97 aA	0,88 aA		
Derosal Plus	0,94 aA	0,81 bA		
55 °C/120' -3,7 MPa	0,84 aB	0,68 bA		
Congelamento	1,02 aA	0,91 bA		
Inoculação/ <i>Penicillium</i> sp.	0,91 aA	0,89 aA		
Inoculação/ <i>Cladosporium</i> sp.	0,95 aA	0,92 aA		
Coef. var.	9,17%			

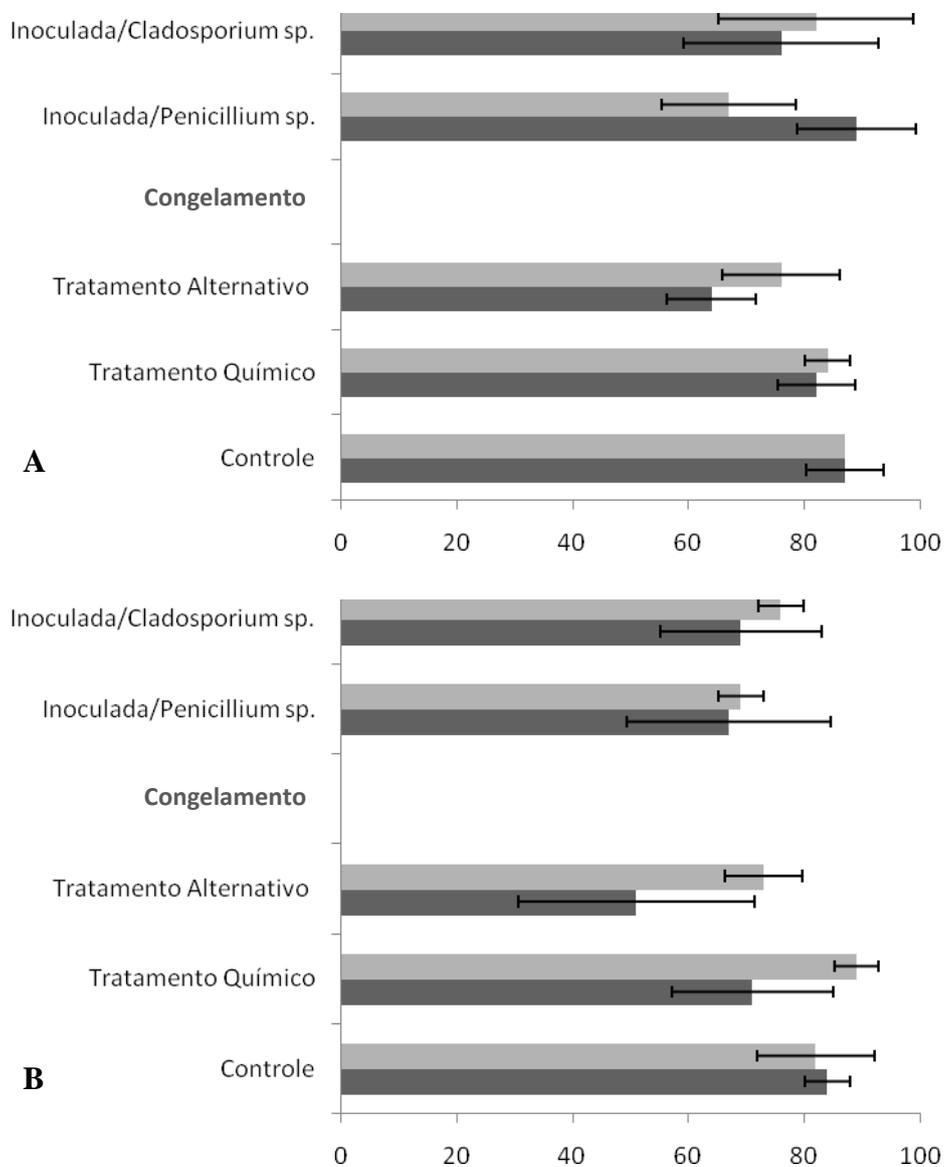


Figura 1. Germinação (%) de sementes de *Eugenia uniflora* Lam. sem tratamento (Controle), com tratamento químico, submetidas a tratamento alternativo (55 °C/120' -3,7 MPa), congelamento (inviável) e inoculação de *Penicillium* sp. e *Cladosporium* sp., após incubação a 7 °C (barras escuras) e 25 °C (barras claras), assim que tratados (A) e após 120 dias de armazenamento (B) a 7 °C.

Tabela 4. Potencial hídrico (MPa), teor de água (%) e massa seca (%) de sementes de *Eugenia uniflora* Lam. sem tratamento (testemunha), tratadas com fungicida (Derosal Plus), submetidas a tratamento termo-osmóticos, congelamento e inoculação de *Penicillium* sp. e *Cladosporium* sp., após incubação a 7 °C e 25 °C, assim que tratados e após 120 dias de armazenamento a 7 °C. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas nas linhas, maiúsculas nas colunas) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamentos de sementes	Armazenamento		Temperatura de incubação	
	Inicial	120 dias	7 °C	25 °C
<i>Potencial hídrico</i>				
Testemunha	-2,7 aCD	-1,5 bC	-1,4 bC	-2,3 aB
Derosal Plus	-2,1 aCD	-2,3 aB	-1,8 bBC	-2,6 aB
55 °C/120' -3,7 MPa	-2,6 aBC	-2,1 bB	-2,0 bB	-2,6 aB
Congelamento	-1,6 aD	-0,8 bD	-1,3 aC	-1,2 aC
Inoculação/ <i>Penicillium</i> sp.	-3,1 aB	-3,2 aA	-3,0 aA	-3,3 aA
Inoculação/ <i>Cladosporium</i> sp.	-3,8 aA	-3,0 bA	-3,1 bA	-3,7 aA
Coef. var.	14,22%			
<i>Teor de Água</i>				
Testemunha	58,2 aAB	55,6 aAB		
Derosal Plus	59,6 aAB	51,4 bBCD		
55 °C/120' -3,7 MPa	55,7 aB	55,1 aABC		
Congelamento	61,2 aA	59,4 aA		
Inoculação/ <i>Penicillium</i> sp.	55,7 aB	50,4 cD		
Inoculação/ <i>Cladosporium</i> sp.	56,0 aB	49,6 D		
Coef. var.	5,11%			
<i>Massa seca</i>				
Testemunha	41,8	44,4		
Derosal Plus	40,4	48,6		
55 °C/120' -3,7 MPa	44,3	44,9		
Congelamento	38,8	40,1		
Inoculação/ <i>Penicillium</i> sp.	44,3	41,8		
Inoculação/ <i>Cladosporium</i> sp.	44,0	50,4		
Média	42,3 a	45,0 a		
Coef. var.	13,27%			

viabilidade das sementes (tabela 5 e figura 1). Apesar da alta incidência de *Penicillium* sp. inicialmente, após o armazenamento observa-se a redução deste e o crescimento de *Cladosporium* sp., corroborando ao exposto anteriormente de que este gênero possa ser mais sensível ao estresse hídrico do que *Penicillium* sp., sendo favorecido em condições de armazenamento com sementes hidratadas, como na amostra controle. Observa-se que a incidência de *Penicillium* sp., em geral, diminui ao longo do armazenamento, enquanto a de *Cladosporium* sp. aumenta, sugerindo que se há um fungo que demanda maior a atenção no tratamento de sementes para controle de microrganismos é este. De acordo com Padulla (2006), a presença de *Cladosporium cladosporioides* nas sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. possibilitou a transmissão para as plântulas formadas a partir delas e ocasionou lesões nos cotilédones e hipocótilos, enquanto que em sementes de *Schinus terebenthifolius* Raddi. ele apenas foi transmitido da semente para a plântula, sem causar sintomas.

A incidência fúngica de *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. e *Phoma* sp. em sementes de *Eugenia uniflora* (tabela 6), sem nenhum tratamento, não interferiu na viabilidade destas ao longo do armazenamento no estudo quanto aos diferentes tratamentos termo-osmóticos, sendo demonstrado pelas avaliações das taxas respiratórias de que estes não influenciam no metabolismo respiratório destas. *Penicillium* sp. com altos valores de incidência, principalmente nos tratamentos térmicos e osmóticos, parece não interferir na respiração destas sementes, pois tanto nas sementes tratadas osmoticamente quanto nas sementes em que este fungo foi inoculado, as taxas não aumentaram, podendo ser a redução da capacidade germinativa observada no primeiro estudo ocasionada pelas condições de armazenamento propiciadas pelas soluções osmóticas. Assim, o tratamento térmico proporcionado pela temperatura do ar a 55 °C durante 120 minutos seguido do armazenamento em solução osmótica -3,7MPa por sete dias pode ser uma alternativa para o tratamento de sementes. Mas como a incidência fúngica aumentou após os 120 dias de armazenamento em saco plástico, estudos que avaliem a reaplicação deste tratamento em diferentes períodos ao longo do armazenamento são necessários para possibilitar uma melhor eficácia.

Tabela 5. Incidência fúngica (%) de sementes de *Eugenia uniflora* Lam. sem tratamento (testemunha), tratadas com fungicida (Derosal Plus), submetidas a tratamento termo-osmóticos, congelamento e inoculação de *Penicillium* sp. e *Cladosporium* sp., após incubação a 7 °C e 25 °C, assim que tratados e após 120 dias de armazenamento a 7 °C. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas nas linhas, maiúsculas nas colunas) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamentos de sementes	Armazenamento		Temperatura de incubação	
	Inicial	120 dias	7 °C	25 °C
<i>Penicillium</i> sp.				
Testemunha	23 aC	3 bC	17 aC	10 aD
Derosal Plus	14 aC	17 aC	8 aC	22 aD
55 °C/120' -3,7 MPa	100 aA	56 bB	80 aA	76 aB
Congelamento	88 aA	8 bC	50 aB	46 aC
Inoculação/ <i>Penicillium</i> sp.	100 aA	100 aA	100 aA	100 aA
Inoculação/ <i>Cladosporium</i> sp.	66 aB	60 aB	47 bB	79 aAB
Coef. var.	23,95%			
<i>Cladosporium</i> sp.				
Testemunha	43 bB	73 aC	60 aB	57 aA
Derosal Plus	0 aC	0 aC	0 aD	0 aC
55 °C/120' -3,7 MPa	0 bC	48 aB	26 aC	22 aB
Congelamento	10 bC	55 aAB	45 aBC	20 bBC
Inoculação/ <i>Penicillium</i> sp.	0 aC	0 aC	0 aD	0 aC
Inoculação/ <i>Cladosporium</i> sp.	86 aA	74 aA	91 aA	69 bA
Coef. var.	36,58%			

Tabela 6. Incidência fúngica (%) de sementes de *Eugenia uniflora* Lam. sem tratamento (testemunha), tratadas com fungicida (Derosal Plus), submetidas a tratamento termo-osmóticos, congelamento e inoculação de *Penicillium* sp. e *Cladosporium* sp., após incubação a 7 °C e 25 °C, assim que tratados e após 120 dias de armazenamento a 7 °C. (Pnc: *Penicillium* sp.; Cld: *Cladosporium* sp.; Fsr: *Fusarium* sp.; Alt: *Alternaria* sp.; Coll: *Colletotrichum* sp.; Pha: *Phoma* sp.; Phm: *Phomopsis* sp.; Tri: *Trichoderma* sp.)

Tratamentos	Fungos							
	Pnc	Cld	Fsr	Alt	Coll	Pha	Phm	Tri
<i>7 °C sem armazenamento</i>								
Testemunha	27	27	0	22	18	7	0	0
Derosal Plus	7	0	0	0	2	0	0	0
55 °C/120' -3,7 MPa	67	0	0	0	5	0	0	2
Congelamento	67	40	0	20	36	2	0	0
Inoculação/ <i>Penicillium</i> sp.	67	0	0	0	0	0	0	0
Inoculação/ <i>Cladosporium</i> sp.	29	67	0	0	2	0	0	2
<i>7 °C com armazenamento</i>								
Testemunha	0	56	0	0	0	2	0	0
Derosal Plus	7	0	0	0	2	0	0	0
55 °C/120' -3,7 MPa	49	25	0	9	0	0	0	0
Congelamento	2	58	0	0	0	0	7	2
Inoculação/ <i>Penicillium</i> sp.	67	0	0	0	0	0	0	0
Inoculação/ <i>Cladosporium</i> sp.	22	58	0	0	0	0	0	0
<i>25°C sem armazenamento</i>								
Testemunha	7	29	2	24	7	4	2	0
Derosal Plus	18	0	0	0	0	0	0	0
55 °C/120' -3,7 MPa	67	0	0	0	2	0	0	0
Congelamento	47	2	2	22	20	0	0	42
Inoculação/ <i>Penicillium</i> sp.	67	0	0	0	0	0	0	0
Inoculação/ <i>Cladosporium</i> sp.	56	44	0	16	0	0	0	0
<i>25 °C com armazenamento</i>								
Testemunha	4	49	22	2	2	0	0	0
Derosal Plus	18	0	2	0	7	0	0	0
55 °C/120' -3,7 MPa	33	36	2	0	0	0	0	0
Congelamento	4	18	0	0	0	0	0	24
Inoculação/ <i>Penicillium</i> sp.	67	0	0	2	0	0	0	0
Inoculação/ <i>Cladosporium</i> sp.	36	49	0	0	2	0	0	4

CONCLUSÃO

Tratamentos termo-osmóticos podem ser aplicados às sementes de *Eugenia uniflora* de maneira a controlar as incidências fúngicas, com exceção de *Penicillium* sp., o qual é favorecido nas condições do tratamento. Entretanto, as avaliações das taxas respiratórias mostram que a presença desses fungos nas sementes não interfere na respiração destas, sugerindo a existência de compostos ou mecanismos de ativação de respostas contra a ação desses microrganismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, R.N.B.; Ferreira, A.G.** 2000. Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) – Myrtaceae. *Revista Brasileira de Sementes*, 22 (2): 118-125.
- Avila, A. L.; Argenta, M. S.; Muniz, M. F B.; Poletto, I.; Blume, E.** 2009. Maturação fisiológica e coleta de sementes de *Eugenia uniflora* L. (PITANGA), SANTA MARIA, RS. *Ciência Florestal*, 19 (1): 61-68.
- Bagetti, M.; Facco, E. M. P.; Rodrigues, D. B.; Vizzotto, M.; Emanuelli, T.** 2009. Antioxidant capacity and composition of pitanga seeds. *Ciência Rural*, 39: 2504-2510.
- Barbedo, C.J. & Bilia, D.A.C.** 1998. Evolution of research on recalcitrant seeds. *Scientia Agricola*, 55(especial):121-125.
- Brasil.** 1992. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Produção Vegetal. Coordenação de Laboratório Vegetal. Regras para análise de sementes. Brasília, DF, 365p.
- Coutinho, W. M.; SILVA-MANN, R.; Vieira, M. G. G. C.; Machado, C. F.; Machado, J. C.** 2007. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho submetidas a termoterapia e condicionamento fisiológico. *Fitopatologia Brasileira*, 32:458- 464.
- Coutinho, W. M.; Araújo, E.; Magalhães, F. H. L.** 1999. Efeitos de extratos de plantas anacardiáceas e dos fungicidas químicos benomyl e captan sobre a micoflora e qualidade fisiológica de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, 23 (3): 560-568.
- Decagon.** 2001. WP4 Dewpoint PotentaMeter Operator´s Manual. Pullman: Decagon Devices, Inc..
- Delgado, L. F.; Barbedo, C. J.** 2007. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. *Pesq. agropec. bras.*, 42 (2): 265-272.
- Delgado, L.F.** 2006. Tolerância à dessecação em sementes de espécies brasileiras de *Eugenia*. Dissertação (Mestrado) Instituto de Botânica, São Paulo. 106f.
- Delouche, J.C.** 2002. Germinação, deterioração e vigor da semente. *Seed News*, v.6, p.1-7.
- Feltre, R.** 1982. Química geral. 2.ed. Moderna. São Paulo 1: 364p.

- ISTA.** 1985. International Seed Testing Association. International rules for seed testing. Seed Science and Technology, v.13, p.356-513.
- Kader, A.A. & Saltveit, M.E.** 2002. Respiration and gas exchange. In: J.A. Bartz, J.K. Brecht & J. Weichmann. Postharvest physiology and pathology of vegetables. Marcel Dekker, New York, pp.7-29.
- Lamarca, E. V.** 2009. Taxas respiratórias e velocidade de deterioração de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. em função de variações hídricas e térmicas. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente), Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo. 98p.
- Machado, J. C.; Coutinho, W. M.; Guimarães, R. M.; Vieira, M. G. G. C.; Ferreira, D. F.** 2008. Use of osmotic solutes to control seed germination of rice and common bean in seed health blotter tests. Seed Science & Technology, 36: 66-75.
- Machado, J.C.** 1988. Patologia de sementes: fundamentos e aplicações. Brasília, MEC ESAL-FAEPE.
- Medeiros, A. C. S.; Eira, M. T. S.** 2006. Comportamento fisiológico, secagem e armazenamento de sementes florestais nativas. Circular Técnica, Embrapa, 127: 1-13.
- Mendes, M. A. S.; Lima, P. M. M. P.; Fonseca, J. N. L.; Santos, M. F.** 2001. Erradicação de *Fusarium oxysporum* em sementes de alfafa utilizando termo e quimioterapia. Fitopatologia Brasileira, 26: 148-152.
- Menten, J. O. M.** 1991. Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. Piracicaba: ESALQ/FEALQ. 312p.
- Nunes, U. R.; Santos, M. R.; Alvarenga, E. M.; Dias, D. C. F. S.** 2000. Efeito do condicionamento osmótico e do tratamento com fungicida na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de cebola (*Allium cepa* L.), Revista Brasileira de Sementes, 22 (1): 239-246.
- Padulla, T.L.** 2006. Fungos associados a sementes de pau-brasil: efeito de local, colheita e armazenamento, prejuízos e controle com fungicidas. Dissertação (Mestrado), Escola Superior Luiz de Queiroz, Piracicaba.

- Piveta, G.; Lazzaroto, M.; Mezzomo, R.; Santos, R. F.; Webwe, M. N.; Muniz, M. B.** 2009. Efeito do tratamento térmico na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de *Lafoensia pacari* St. Hil. Revista Brasileira e Agroecologia, 4 (2): 1653-1657.
- Plaza, P.; Usall, J.; Teixido, N.; Viñas, I.** 2003. Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. Journal of Applied Microbiology, 94: 549–554.
- Santana, D.G.; Ranal, M.A.** 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. Brasília: UnB.
- Santos, M. C. A.; Aroucha, E. M. M.; Souza, M. S.; Silva, R. F.; Sousa, P. A.** 2008. Condicionamento osmótico de sementes - Revisão de Literatura. Caatinga, 21 (2): 01-06.
- Santos, A. F.; Silva, S. M.; Mendonça, R. M. N.; Filgueiras, H. A. C.** 2006. Armazenamento de pitangas sob atmosfera modificada e refrigeração: II – qualidade e conservação pós-colheita. Rev. Bras. Frutic., 28 (1): 42-45.
- Vilella, F. A.; Marcos Filho, J.** 1998. Estados energéticos e tipos de água na semente. Revista Brasileira de Sementes, 20 (2): 317-321.
- Zalar, P.; Hoog, G.S.; Schroers, H.J.; Crous, P.W.; Groenewald, J.Z.; Gunde-Cimerman, N.** 2007. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. Studies in Mycology, 58: 157–183.

CAPÍTULO 3

Tratamentos para controle da incidência fúngica e avaliação das taxas respiratórias de embriões de *Inga vera* Penn.

RESUMO – O armazenamento com hidratação controlada de sementes recalcitrantes, as quais não toleram desidratação e baixas temperaturas, tem conseguido manter e ampliar o período de viabilidade destas, importante para disponibilizá-las no mercado de sementes e mudas por um período maior do que a época de colheita. Porém, o período de viabilidade dessas sementes em condições hidratadas de armazenamento ainda é curto, muitas vezes devido à proliferação de um largo espectro de fungos. No presente trabalho, objetivou-se investigar a incidência fúngica em embriões de *Inga vera* ao longo do armazenamento, a eficiência de diferentes tratamentos térmicos, osmóticos, químico e a associação de tratamentos térmicos aos osmóticos e a influência dos fungos nas taxas respiratórias dos embriões. Para a avaliação das taxas respiratórias, os embriões foram submetidos a diferentes processos para obtenção de amostras controle, tratadas com fungicida, tratadas termo-osmoticamente, congeladas e inoculadas com fungos de maior ocorrência nestes embriões. Os resultados permitiram concluir que os fungos detectados nos embriões de *Inga vera* foram *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. e *Phomopsis* sp. Apenas o tratamento químico controlou todos os fungos e manteve a germinação dos embriões próxima dos 50% após 50 dias de armazenamento. Os tratamentos associados só não controlaram *Penicillium* sp., assim como os tratamentos osmóticos, mas ao contrário destes, mantiveram a germinação acima dos 50% após 30 dias de armazenamento. A importância desse tratamento residiu no controle do metabolismo dos embriões, de maneira que mesmo na presença de fungos, as taxas respiratórias foram baixas e a capacidade germinativa prolongada. Tais resultados sugerem que a presença de microrganismos e o elevado metabolismo dos embriões influenciam na deterioração destes.

ABSTRACT - The storage of controlled hydration with recalcitrant seeds, which do not tolerate dehydration and low temperatures, has managed to maintain and extend the period of viability of these. This is important to make them available on the market of seeds and seedlings for a longer period than the harvest season . However, the period of viability of seeds in hydrated storage conditions is still short, often due to the proliferation of a broad spectrum of fungi. In the present study aimed to investigate the incidence of fungal *Inga vera* during the storage, the effectiveness of various thermal treatments, osmotic, chemical, thermal treatments and the association of the osmotic influence of fungi and respiration rates of embryos. For the evaluation of respiratory rates, the embryos were subjected to different processes: control samples, treated with fungicide, thermal-treated osmotically, frozen and inoculated with fungi of greatest occurrence to this specie . The results showed that the fungi in *Inga vera* were *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. and *Phomopsis* sp. Only the chemical controlled all fungi and germination of embryos remained near 50% after 50 days of storage. Treatments associated not only managed to *Penicillium* sp. As well as the osmotic treatments, but unlike these, maintained germination above 50% after 30 days of storage. The importance of this treatment resided in controlling the metabolism of the embryos, so that even in the presence of fungi, respiration rates were low and prolonged germination. These results suggest that the presence of microorganisms and the high metabolism of embryos influence the deterioration of these.

INTRODUÇÃO

Estudos com sementes recalcitrantes, as quais não toleram desidratação e baixas temperaturas, perdendo a viabilidade rapidamente quando o teor de água é diminuído para valores inferiores a aproximadamente 30% (Barbedo & Marcos Filho 1998), têm apresentado resultados interessantes quanto ao armazenamento com hidratação controlada. Andréo *et al.* (2006) obtiveram sucesso quando utilizaram o condicionamento osmótico (-1,6 e -2,4 MPa) em sementes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn., considerada entre as de maior intolerância à dessecação e de mais curta longevidade natural (Bilia & Barbedo 1997). Sershen *et al.* (2008), estudando sementes de *Amaryllis* spp., constataram que o armazenamento hidratado prolongou a viabilidade das sementes quando comparado ao seco (saco de papel).

O controle do metabolismo proporcionado pelo armazenamento hidratado, mas em condição de osmocondicionamento, permite apenas os processos respiratórios essenciais à germinação, sem a protrusão da radícula (Santos *et al.* 2008). Este controle poderia, também, ser alcançado pela redução da temperatura, apesar de muitas das espécies recalcitrantes serem sensíveis a isso (Medeiros & Eira 2006). Entretanto, a secagem de embriões maduros de *Inga vera* até potencial hídrico de -4 MPa permitiu uma maior tolerância à redução de temperatura até níveis de congelamento da água (-2 °C) (Bonjovani & Barbedo 2008).

Tais resultados são importantes porque a respiração de sementes e a deterioração estão estreitamente relacionadas (Lamarca 2009). Quando armazenadas com respiração ativa, as sementes têm a sua deterioração intensificada, causando perda do vigor e eventuais quedas na germinação (Carvalho & Nakagawa 1983).

Entretanto, a extensão do período de viabilidade em condições hidratadas de armazenamento dessas sementes é muitas vezes reduzida devido à proliferação de um largo espectro de fungos (Mycock & Berjak 1990). Essa interação da semente com fungos de armazenamento pode acelerar consideravelmente a velocidade de deterioração das mesmas (Marcos Filho 2005). De acordo com os primeiros autores, esta interação caracteriza-se como um ciclo vicioso, pois o processo inerente

de deterioração é inevitável, bem como o fato de todas as espécies e suas sementes serem inicialmente contaminadas por bactérias e fungos. Assim, o armazenamento hidratado necessário para manter a viabilidade das sementes favorece a sobrevivência dos microrganismos, mesmo que ocorra alteração da microflora, de maneira que o efeito contínuo dos fungos no meio saturado do armazenamento deve acelerar a deterioração e reduzir a longevidade.

Segundo Menten (1991), os patógenos podem causar a morte das sementes, afetar a pré e pós emergência das plântulas e o vigor das futuras plantas por meio da ação de poderosas enzimas e toxinas, as quais podem agir sobre a podridão radicular, o bloqueio no transporte de água e nutrientes e promoverem a colonização sistêmica, resultando em desenvolvimento reduzido das plantas, porte inadequado e sintomas de deficiência, tornando-as mais suscetíveis a qualquer tipo de estresse. Para erradicá-los e/ou proteger as sementes dos patógenos no solo por ocasião da germinação, patógenos da parte aérea nos primeiros estádios de crescimento e assegurar a qualidade das sementes durante o período de armazenamento, diversos processos e substâncias podem ser aplicados às sementes (Machado 1988).

A conscientização sobre o uso abusivo e indiscriminado de defensivos agrícolas no meio ambiente, causando perdas irreparáveis no ecossistema, tem propiciado o desenvolvimento de métodos e produtos alternativos no controle de microrganismos fitopatogênicos (Castro *et al.* 2005), os quais devem considerar a sensibilidade diferenciada das sementes e dos microrganismos às condições expostas. Em sementes de *Eugenia* spp., por exemplo, tratamentos térmicos e osmóticos demonstraram grande potencial de controle dos fungos associados a elas, com exceção de *Penicillium* sp. Contudo, ao contrário dos tratamentos térmicos que mantiveram a germinação das sementes ao longo do armazenamento, os tratamentos osmóticos reduziram a viabilidade destas, demandando novos estudos como a associação de tratamentos térmicos e osmóticos (capítulo 1).

Visando investigar a incidência fúngica em sementes de ingá ao longo do armazenamento, este trabalho objetivou analisar a eficiência do osmocondicionamento como um possível tratamento de sementes, bem como dos diferentes tratamentos térmicos e químicos aplicados a estas, além da

associação ou não do tratamento térmico ao tratamento osmótico. Quanto à influência destes microrganismos sobre o metabolismo das sementes, foram analisadas as taxas respiratórias destas sob diferentes tratamentos de controle de fungos e na presença destes ao longo do armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e caracterização do material vegetal

Frutos de *Inga vera* Penn. foram coletados em matrizes do município de Ribeirão Vermelho, em Minas Gerais (RVMG) (21° 11'S e 45° 3'W), e em matrizes plantadas no município de São Roque, São Paulo (SRSP) (23° 31'S e 47° 8'W), e levados ao laboratório do Núcleo de Pesquisa em Sementes do Instituto de Botânica (São Paulo, SP). O beneficiamento manual consistiu da retirada das sementes das vagens e da sarcotesta (tegumento) que a reveste (Oliveira & Beltrati 1992), obtendo-se os embriões excisados utilizados nos experimentos. Estes foram armazenados em sacos de polietileno, em câmara fria a 7 °C até a instalação dos experimentos, não ultrapassando 10 dias.

Os embriões foram analisados quanto ao teor de água, gravimetricamente a 103 °C por 17 h (Ista 1985) e quanto ao potencial hídrico em equipamento específico para essa análise (WP4, Decagon, Pullmann, USA), que trabalha com célula fotossensível na temperatura do ponto de orvalho (Decagon 2001).

A capacidade germinativa foi avaliada por meio de teste de germinação, conduzido em rolos de papel Germitest, previamente umedecidos (Brasil 1992), mantidos em câmaras de germinação com 100% de umidade relativa do ar, garantida pela presença de água na porção inferior do equipamento, locadas em sala de germinação regulada para 25 °C e luz contínua, utilizando-se quatro repetições de 10 sementes. As avaliações foram realizadas a cada quatro dias durante 21 dias, registrando-se a germinação, considerando como plântulas normais as que possuíam parte aérea e sistema radicular proporcional e desenvolvido, utilizando-se o mesmo critério para sementes poliembriônicas, para pelo menos umas das plântulas (Bilia & Barbedo 1997).

A avaliação da microflora dos embriões foi realizada através do método de incubação em papel de filtro, após técnica de congelamento para inibir a germinação (Brasil 1992), na qual os embriões permaneceram durante 24 horas sob 20 ± 2 °C, seguidas por 24 horas -18 ± 2 °C. Para a instalação do teste, os embriões foram distribuídos equidistantemente em placas de Petri, contendo três folhas de papel de filtro umedecidas com água destilada, incubadas por sete dias a 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, utilizando-se quatro repetições com 10 sementes. A identificação e contagem dos fungos foram realizadas examinando-se as colônias fúngicas desenvolvidas nos embriões com auxílio de microscópio estereoscópico. Em alguns casos, a identificação foi complementada pela visualização das características morfológicas dos fungos em microscópio óptico.

Tratamentos de controle da incidência fúngica

Para o tratamento térmico, amostras de embriões (RVMG) foram submetidas ao calor úmido, consistindo na imersão em água a diferentes temperaturas, em béquer de vidro, e estes em estufa com circulação de ar regulada para as temperaturas e períodos de: 45 °C/30', 45 °C/60' e 55 °C/30'. Ao término de cada período de exposição aos tratamentos, os embriões foram depositados sobre papel de filtro, à temperatura ambiente, para retirada do excesso de água superficial. Ao final dos tratamentos, os embriões foram armazenados, por 30 e 50 dias, em sacos de polietilenos a 7 °C.

Para o tratamento osmótico, amostras de embriões foram armazenadas a 7 °C durante 30 e 50 dias, em caixas tipo gerbox, com uma folha de papel de filtro grosso na base e uma para cobertura, contendo soluções de polietilenoglicol (PEG 6000) nos potenciais hídricos de -0,0 MPa, -1,6 MPa e -2,4 MPa (Andréo *et al* 2006). As soluções foram preparadas baseando-se em concentrações e temperaturas descritas por Michel e Kauffmann (1973), aferidas em equipamento WP4 (Decagon, 2001).

Visando a analisar efeitos aditivos, dois tratamentos foram instalados associando-se o térmico e o osmótico: 55 °C/30' seguido de armazenamento a -1,6 MPa e 55 °C/30' com o armazenamento a -2,4 MPa.

Os tratamentos controles foram representados por sementes tratadas ou não com o fungicida de ação sistêmica Derosal Plus (carbendazin + tiram, 300 ml/100 kg de sementes), cuja dose estava de acordo com a recomendação do fabricante e de testes realizados anteriormente, uma vez que sua eficiência em relação à incidência de fungos nas espécies trabalhadas tem sido próxima a 100%.

Dessa maneira, este trabalho constituiu-se de um experimento fatorial entre tratamentos (10) x períodos de armazenamento (2), em delineamento inteiramente casualizado, com posterior análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey, a 5% (Santana e Ranal, 2004).

Alterações nas taxas respiratórias dos embriões influenciadas pela micoflora

Os embriões (SRSP) foram submetidos aos seguintes processos: controle – embriões que não receberam nenhum tratamento; tratamento químico – tratamento com o fungicida sistêmico Derosal Plus; tratamento alternativo – embriões submetidos a tratamento termo-osmótico; congelamento – embriões congelados a -18 °C por 24 horas, visando a produzir embriões mortos; inoculação – embriões inoculados com *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. Estes fungos foram isolados de amostras de embriões de frutos coletados em matrizes plantadas na área pertencente ao Centro de Exposições Imigrantes, São Paulo/SP e em matrizes no município de Ribeirão Vermelho, em Minas Gerais, respectivamente. O período de frutificação dessas matrizes foi anterior ao das matrizes de São Roque, possibilitando que o tempo necessário para efetuar os procedimentos para isolamento desses inóculos não interferisse na viabilidade dos embriões estudados, ao estender o período de armazenamento destes até a instalação dos experimentos.

A escolha do fungicida e do tratamento alternativo foi baseada nos resultados alcançados a partir dos tratamentos descritos anteriormente. Assim, o tratamento termo-osmótico consistiu na imersão dos embriões em água destilada e, o conjunto, em estufa com circulação de ar regulada a 55°C durante 30 minutos. Após este período, os embriões foram depositados sobre papel de filtro, à temperatura ambiente, para retirada do excesso de água superficial e, em seguida, armazenados em soluções de polietilenoglicol (PEG 6000) com potencial hídrico de -1,6 MPa, em caixas plásticas a 7 °C durante 10 e 30 dias.

O congelamento consistiu em submeter os embriões à temperatura de $-18\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Visando à confirmação do sucesso do tratamento, teste de tetrazólio foi aplicado a estas sementes. Baseando-se em resultados prévios (dados não apresentados), o teste de tetrazólio consistiu na incubação das sementes seccionadas ao meio e imersas na solução a 0,075% por duas horas a 35°C sob ausência de luz em solução de cloreto 2,3,5-trifenil-tetrazólio. Após este período, foram avaliados os tecidos inviáveis por meio da ausência de coloração do eixo embrionário dos embriões.

Quanto aos embriões inoculados com os fungos *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp., o tratamento consistiu da desinfestação de embriões com uma solução comercial de hipoclorito de sódio a 2% (Candida®), na qual os embriões ficaram imersos durante cinco minutos, sendo o excesso de água após esse período retirado com papel de filtro tipo germitest. Em seguida, foram distribuídos em placas de Petri de vidro contendo meio de cultura BDA e colônias destes fungos desenvolvidas por toda a área da placa, de maneira que todos os embriões estivessem em contato com o micélio fúngico. As placas foram agitadas por dois minutos e deixadas em repouso a 7°C durante 48 horas. Após este período, os embriões foram retirados das placas e acondicionados em sacos plásticos nas mesmas condições.

Após a realização de todos os tratamentos necessários para a caracterização das diferentes amostras definidas anteriormente, os embriões foram incubados a 25°C e 7°C em frascos de vidros com fechamento hermético, cujas concentrações de O_2 e CO_2 do ar interno foram medidas por meio de equipamento específico ILL6600 (Illinois). Os frascos dos embriões incubados a 7°C foram analisados a cada dois dias durante nove dias e os incubados a 25°C diariamente durante seis dias. As mesmas avaliações foram repetidas após 20 dias de armazenamento. Entretanto, o tempo de incubação a 7°C foi de sete dias e, a 25°C , de quatro dias. Para as medições, as tampas dos vidros eram perfuradas, formando orifícios que foram recobertos por um septo de borracha. Por este septo foram inseridos os eletrodos do equipamento por onde foi tomada a amostra do ar da embalagem. O volume total do ar das embalagens foi determinado segundo o princípio da hidrostática para que se calculasse o volume resultante de ar depois de descontado o volume ocupado pelos embriões.

O consumo de O₂ e a produção de CO₂ pelos embriões foram estimados pela diferença entre os valores medidos e os da atmosfera normal. Após cada medida, as embalagens eram abertas por alguns minutos para re-equilíbrio com a atmosfera normal sendo, em seguida, novamente fechadas para a continuidade do experimento. Considerando-se a pressão atmosférica local como 0,90 atm (A. B. Pereira, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2007, comunicação pessoal), os valores obtidos em porcentagem de O₂ ou de CO₂ foram convertidos para pressão parcial do gás, segundo a fórmula $p_1/P=v_1\%/V\%$ (Feltre 1982), onde:

p_1 = pressão parcial do gás (em atm);

P = pressão atmosférica local (=0,90 atm);

$v_1\%$ = volume do gás, em porcentagem;

$V\%$ = volume total (=100%).

A seguir, baseando-se no volume das embalagens e na temperatura registrada em cada avaliação, os valores foram convertidos para μmol de O₂ e de CO₂, pela equação de Clapeyron, $p_1V=nRT$, onde:

V = volume total de ar do frasco (em L)

n = número de moles do gás

R = constante universal dos gases perfeitos (0,082 atm.L.mol⁻¹.K⁻¹)

T = temperatura (em Kelvin)

Os valores obtidos nas avaliações foram somados e divididos pela massa seca total da amostra dos embriões e pelo número de dias em estes permaneceram nas embalagens, obtendo-se o valor expresso em micromol por grama de massa seca por dia ($\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$). Foi calculado, também, o quociente respiratório (QR), dividindo-se o valor obtido para produção de CO₂ pelo obtido para consumo de O₂ ($\text{QR}=\text{CO}_2.\text{O}_2^{-1}$), ambos em $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$, segundo descrito por Kader & Saltveit (2002).

Transcorridos estes períodos, os embriões foram caracterizados quanto ao teor de água e potencial hídrico e avaliados quanto à porcentagem de germinação e incidência fúngica. O mesmo

foi efetuado para os embriões incubados nas diferentes temperaturas após 20 dias de armazenamento a 7 °C. Para a amostra com inoculação de *Fusarium* sp., estas avaliações foram realizadas apenas após o período de armazenamento.

O delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial tratamento de sementes (6) x temperatura de incubação (2) x armazenamento (2). Os resultados foram submetidos à análise de variância (F, a 5% de probabilidade), com comparação das médias pelo teste de Tukey (Santana & Ranal 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tratamentos de controle da incidência fúngica

Inicialmente, os fungos encontrados nos embriões de *Inga vera* não tratados (testemunha) foram *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Phomopsis* sp. e *Cladosporium* sp. (tabela 1). Após os períodos de 30 e 50 dias de armazenamento (tabela 2), apenas *Penicillium* sp. incidiu sobre estes embriões, apresentando um aumento nos valores de incidência aos 30 dias e uma redução drástica após 50 dias. Apesar do elevado teor de água destes embriões principalmente no armazenamento (59%-63%) (tabela 3), também constatado por Bilia & Barbedo (1997) em embriões armazenados em sacos plásticos, não houve germinação após o armazenamento, apresentando os embriões uma coloração marrom escura e textura gelatinosa. Valores nulos de germinação também foram observadas por Bilia *et al.* (1998) após 30 dias de armazenamento e Faria *et al.* (2006) após 18 dias de armazenamento.

Tabela 1. Médias de teor de água (% , base úmida), potencial hídrico (-MPa), germinação (%) e incidência de gêneros fúngicos (%) de embriões de *Inga vera* sem armazenamento.

	U (%)	Ψ (-MPa)	G (%)	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Phomopsis</i>	<i>Cladosporium</i>
Testemunha	59	1,2	93	18	10	15	5

Tabela 2. Incidência fúngica (%) em embriões de *Inga vera* Penn. sem tratamento (testemunha), tratados com fungicida (Derosal Plus) e submetidos a tratamentos térmicos, osmóticos e termo-osmóticos, após 30 e 50 dias de armazenamento a 7 °C. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas nas linhas, maiúsculas nas colunas) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamentos de sementes	Armazenamento							
	30 dias		50 dias		30 dias		50 dias	
	<i>Penicillium</i> sp.		<i>Fusarium</i> sp.		<i>Phomopsis</i> sp.			
Testemunha	38 aAB	3 bB	0	0	0	0	0	0
Derosal Plus	0 aB	18 aAB	0	0	0	0	0	0
45 °C/30'	50 aAB	38 aAB	68	70	5	10		
45 °C/60'	80 aA	33bAB	93	78	10	5		
55 °C/30'	88 aA	40bAB	78	89	13	28		
-0,0 MPa	73 aA	60 aA	35	4	0	0		
-1,6 MPa	35 aAB	3 aB	3	0	0	0		
-2,4 MPa	10 bB	65 aA	5	20	3	0		
55 °C/30' -1,6 MPa	83 aA	25bAB	5	1	0	0		
55 °C/30' -2,4 MPa	53 aA	20 aAB	0	3	0	0		
Coef. var.	60,18%							

O aumento dos valores de teor de água ao longo do armazenamento dos embriões tratados com o fungicida Derosal Plus e os submetidos aos tratamentos térmicos, também não resultou em melhoria da capacidade germinativa dos embriões. Bilia *et al.* (1998) observaram que apesar do aumento de teor de água dos embriões ao longo do armazenamento, o qual poderia indicar a reorganização do sistema de membranas, houve um progresso real da deterioração destes embriões, reforçada pelos elevados valores do teste de condutividade elétrica. Além disso, alterações estruturais e bioquímicas nas células promovidas pelos fungos, principalmente na parede e na membrana celular, sugerem que o aumento do conteúdo de água nas sementes, durante o armazenamento, seja resultante do metabolismo dos fungos (Berjak 1987). O tratamento químico controlou as incidências fúngicas e paralelamente possibilitou a manutenção da germinação acima de 50% mesmo após 50 dias de armazenamento.

Tabela 3. Potencial hídrico (MPa) e teor de água (%) de embriões de *Inga vera* Penn. sem tratamento (testemunha), tratados com fungicida (Derosal Plus) e submetidos a tratamentos térmicos, osmóticos e termo-osmóticos, após 30 e 50 dias de armazenamento a 7 °C. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas nas linhas, maiúsculas nas colunas) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamentos de sementes	Armazenamento			
	Inicial	50 dias	Inicial	50 dias
	<i>Potencial hídrico</i>		<i>Teor de Água</i>	
Testemunha	-1,6 aAB	-1,0 bBCD	64,3 aA	62,7 aBC
Derosal Plus	-1,1 aB	-0,8 bDE	61,4 aAB	65,9 aAB
45 °C/30'	-1,3 aAB	-0,8 bDE	61,1 bAB	66,2 aAB
45 °C/60'	-1,4 aAB	-0,9 bCDE	62,6 aAB	63,9 aAB
55 °C/30'	-1,3 aAB	-0,7 bDE	63,4 aAB	65,5 aAB
-0,0 MPa	-0,5 aC	-0,4 aE	64,3 bA	72,1 aA
-1,6 MPa	-1,5 aAB	-1,5 aAB	56,4 aB	55,1 aCD
-2,4 MPa	-1,4 aAB	-1,3 aABC	56,3 aB	54,2 aD
55 °C/30' -1,6 MPa	-1,6 aAB	-1,4 aAB	55,7 aB	55,6 aCD
55 °C/30' -2,4 MPa	-1,4 aAB	-1,5 aA	58,4 aAB	49,9 bD
Coef. var.	17,52%		5,50%	

Os tratamentos térmicos e osmóticos aplicados isoladamente ou em conjunto, favoreceram o desenvolvimento de microrganismos nos embriões. Entretanto, nas soluções osmóticas, apenas o gênero *Penicillium* ocorreu, enquanto os tratamentos térmicos e o armazenamento em água pura possibilitaram a ocorrência de *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. e *Phomopsis* sp. O tratamento térmico por meio do calor úmido em sementes de sorgo reduziu mais de 90% dos fungos associados a elas, com exceção de *Fusarium moniliforme* (Masum *et al.* 2009). Este fungo também não foi controlado em sementes de *Quercus robur* L., de comportamento recalcitrante, após calor úmido a 41 °C e aplicado por duas, três e quatro horas (Mukherjee *et al.* 2006) e em sementes de *Erythrina mulungu* Mart. Ex Benth. a termoterapia ocasionou o aumento da incidência fúngica em relação às sementes que não foram tratadas (Oliveira *et al.* 2009).

Apesar das elevadas taxas de incidências desses fungos, os embriões germinaram após o período de armazenamento de 30 dias (figura 1), mas sofreram grandes baixas destes valores e até valores nulos transcorridos os 50 dias, como observado por Faria *et al.* (2006).

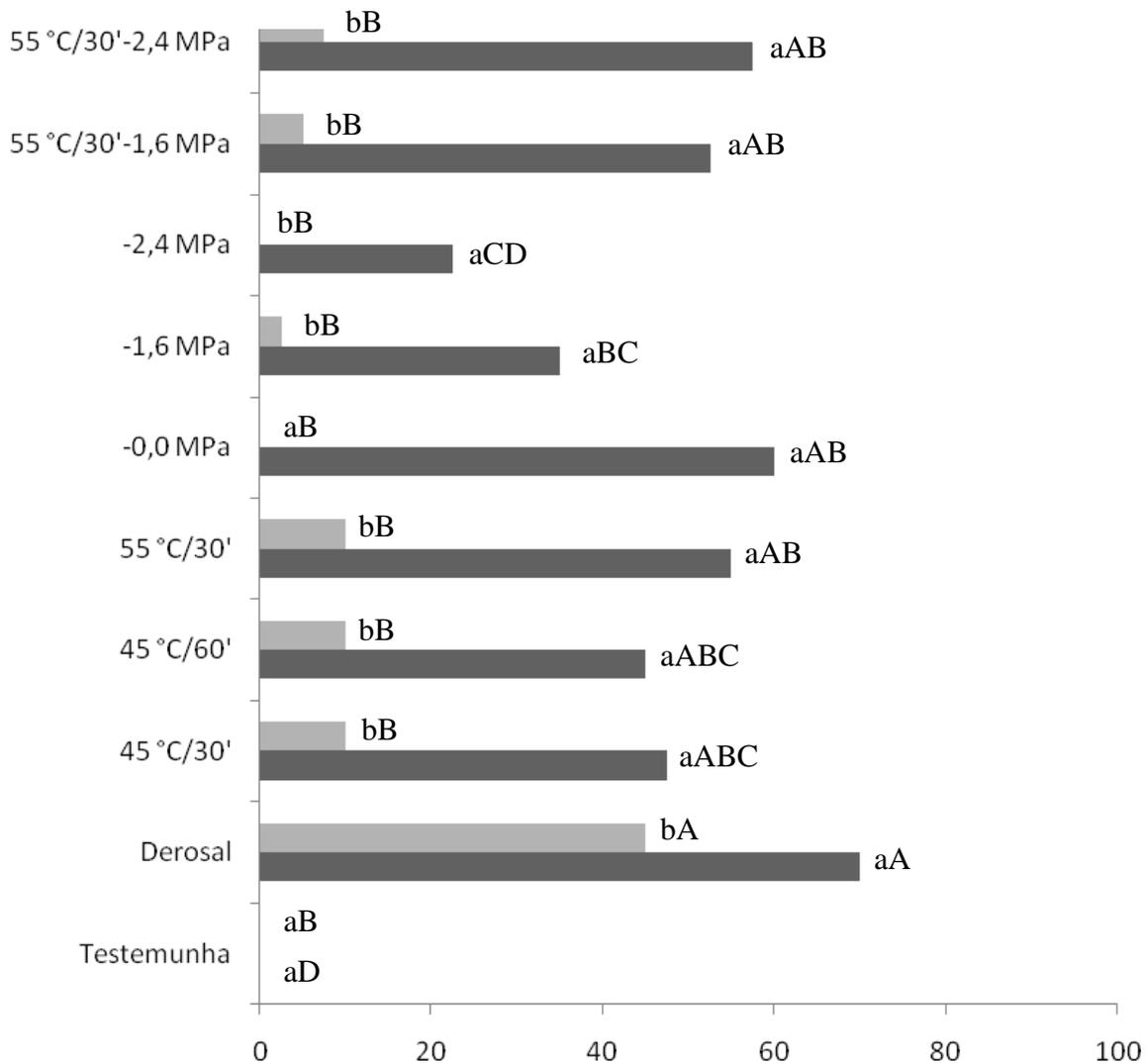


Figura 1. Germinação (%) de embriões de *Inga vera* Penn. sem tratamento (testemunha), tratados com fungicida (Derosal Plus) e submetidos a tratamentos térmicos, osmóticos e termo-osmóticos, após 30 e 50 dias de armazenamento a 7 °C. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas comparam os armazenamentos dentro de cada tratamento, maiúsculas comparam os tratamentos) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

As condições do armazenamento podem ter influenciado na longevidade dos embriões, assim como demonstrou Okamoto & Joly (2000) ao manterem embriões de *Inga sessilis* (Vell.) Mart. submersos em água. Apesar de ser uma espécie típica de ambientes bem drenados, apenas

40% dos embriões germinaram sob hipoxia, sendo que 30% já haviam perdido a viabilidade após cinco dias nestas condições.

Paralelamente a esse comportamento germinativo, ocorreu a diminuição da incidência de *Penicillium* sp., sugerindo que o desenvolvimento deste fungo é favorecido ou não de acordo com as alterações fisiológicas dos embriões. Bilia *et al.* (1998) detectaram a infecção dos embriões de *Inga uruguensis* Hook. & Arn. por *Geotrichum* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., observando que os embriões que iniciaram rapidamente o processo germinativo não se mostraram contaminadas, enquanto os demais, de vigor mais baixo, foram recobertos por microrganismos.

De acordo com Andréo *et al.* (2006), os embriões mantidos em substrato com água pura embeberam até 90 dias de armazenamento, atingindo teores de água de aproximadamente 70% a 80%, sugerindo que houve metabolismo e consumo de reservas no período, diminuindo a capacidade de manutenção da viabilidade desses embriões, como observado neste trabalho.

Alterações nas taxas respiratórias dos embriões influenciadas pela micoflora

As taxas respiratórias dos embriões de *Inga vera* da amostra controle indicam o elevado metabolismo destes, atingindo o valor de $125 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{gMS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (tabela 4). Mesmo quando a 7 °C, temperatura de refrigeração favorável para a conservação destes embriões (Bilia & Barbedo 1997; Bilia *et al.* 1998; Andréo *et al.* 2006; Faria *et al.* 2006; Bonjovani & Barbedo 2008), há uma redução mas o valor ainda é alto ($80 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{gMS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Este comportamento não foi alterado após o armazenamento nesta temperatura e quando incubados a 25 °C os embriões submetidos ao tratamento químico, congelamento e inoculação de fungos, mas apresentou uma redução de $\frac{1}{3}$ quando tratadas termo-osmoticamente. Após o armazenamento a 7 °C e incubação a 25 °C, observa-se que os valores das taxas respiratórias atingiram valores duas vezes maior do que os iniciais, mas o comportamento em relação às diferentes amostras dos embriões não foi alterado.

A não ocorrência de diferenças entre as amostras pode estar relacionada ao comportamento dos fungos associados aos embriões. Os embriões apresentaram elevadas incidências de *Fusarium*

sp. e *Penicillium* sp. (tabelas 5 e 6), mas este ocorreu apenas nos tratamentos termo-osmóticos e no que consistiu na inoculação deste nos embriões. Nota-se que *Fusarium* sp. teve seu crescimento controlado por meio do tratamento alternativo, mas apenas quando as sementes permaneceram a 7 °C. Contudo, as taxas respiratórias permaneceram próximas nas duas temperaturas de incubação e nos dois períodos de avaliação, sugerindo que o estresse hídrico minimizou o metabolismo destes embriões e a baixa taxa respiratória medida seja resultado do metabolismo respiratório dos fungos. A incidência mais elevada de *Fusarium* sp. durante o armazenamento difere do comportamento sucessional das sementes ortodoxas, descrito por Berjak (1987), no qual os fungos considerados de campo, como *Fusarium* sp., perdem a competição com os fungos de armazenamento, xerotolerantes, como *Penicillium* sp. Porém, a autora ressalta que independente da influência das condições de armazenamento e do teor de água das sementes na sucessão dos fungos, a interação e competição entre os fungos pode ser um dos maiores e significativos fatores neste processo, principalmente quando os inóculos estão presentes nos tecidos das sementes desde o início.

Tabela 4. Consumo de O₂ (μmol.gMS⁻¹.d⁻¹), produção de CO₂ (μmol.gMS⁻¹.d⁻¹) e quociente respiratório (QR) de embriões de *Inga vera* Penn. sem tratamento (testemunha), tratados com fungicida (Derosal Plus), submetidos a tratamento termo-osmóticos, congelamento e inoculação de *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp., após incubação a 7 °C e 25 °C, assim que tratados e após 20 dias de armazenamento a 7 °C. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas nas linhas, maiúsculas nas colunas) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamentos de sementes	Inicial		20 dias	
	7 °C	25 °C	7 °C	25 °C
<i>Consumo de O₂</i>				
Testemunha	81,24 bBb	132,03 bAc	127,76 aBab	326,08 aAa
Derosal Plus	77,98 bBb	128,18 bAc	109,72 aBab	294,66 aAbc
55 °C/30' -1,6 MPa	48,23 aBc	77,06 bAd	32,34 aBc	144,74 aAd
Congelamento	129,48 aBa	214,28 bAa	103,95 bBb	276,56 aAc
Inoculação/ <i>Penicillium</i> sp.	85,15 bBb	164,85 bAb	133,34 aBa	322,49 aAab
Inoculação/ <i>Fusarium</i> sp.			113,12	312,39
Coef. var.	9,42%			
<i>Produção de CO₂</i>				
Testemunha	79,96 bBb	125,42 bAc	122,36 aBa	368,92 aAa
Derosal Plus	74,91 bBb	120,65 bAc	106,57 aBab	343,78 aAb
55 °C/30' -1,6 MPa	30,36 aBc	64,10 bAd	20,87 aBc	107,54 aAe
Congelamento	131,86 aBa	211,21 bAa	86,63 bBb	232,71 aAd
Inoculação/ <i>Penicillium</i> sp.	84,79 aBb	158,60 bAb	97,40 aBb	321,38 aAc
Inoculação/ <i>Fusarium</i> sp.			103,31	307,51
Coef. var.	6,99%			
<i>Quociente respiratório</i>				
Testemunha	0,98 aAa	0,94 bAa	0,95 aBa	1,12 aAa
Derosal Plus	0,95 aAa	0,94 bAa	0,99 aBa	1,18 aAa
55 °C/30' -1,6 MPa	0,62 aBb	0,82 aAb	0,64 aBd	0,74 bAd
Congelamento	1,0 aAa	0,98 aAa	0,82 bAb	0,83 bAc
Inoculação/ <i>Penicillium</i> sp.	0,98 aAa	0,96 aAa	0,72 bBc	0,99 aAb
Inoculação/ <i>Fusarium</i> sp.			0,91	0,98
Coef. var.	4,18%			

Tabela 5. Incidência de *Fusarium* sp. (%) de embriões de *Inga vera* Penn. sem tratamento (testemunha), tratados com fungicida (Derosal Plus), submetidos a tratamento termo-osmótico, congelamento e inoculação de *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp., após incubação a 7 °C e 25 °C, assim que tratados e após 20 dias de armazenamento a 7 °C. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas nas linhas, maiúsculas nas colunas) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamentos de sementes	Temperatura de incubação	
	7 °C	25 °C
Testemunha	100 aA	94 aA
Derosal Plus	95 aA	79 aA
55 °C/30' -1,6 MPa	21 bB	86 aA
Congelamento	85 aA	86 aA
Inoculação/ <i>Penicillium</i> sp.	90 aA	99 aA
Inoculação/ <i>Fusarium</i> sp.	100 aA	100 aA
Coef. var.	21,89%	

Tabela 6. Incidência de *Penicillium* sp. (%) de embriões de *Inga vera* Penn. sem tratamento (testemunha), tratados com fungicida (Derosal Plus), submetidos a tratamento termo-osmótico, congelamento e inoculação de *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp., após incubação a 7 °C e 25 °C, assim que tratados e após 20 dias de armazenamento a 7 °C. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas nas linhas, maiúsculas nas colunas) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamentos de sementes	Inicial		20 dias	
	7 °C	25 °C	7 °C	25 °C
Testemunha	0 aBb	20 aAb	0 aAc	0 bAb
Derosal Plus	0 aAb	0 aAc	0 aAc	0 aAb
55 °C/30' -1,6 MPa	90 aAa	78 bAa	100 aAa	100 aAd
Congelamento	0 aAb	0 aAb	0 aAc	0 aAa
Inoculação/ <i>Penicillium</i> sp.	96 aAa	83 aAa	73 bAb	10 aAb
Inoculação/ <i>Fusarium</i> sp.			8	0
Coef. var.	9,42%			

Inicialmente, os valores de germinação dos embriões foram elevados (tabela 7), acima de 60%, independente das amostras e das temperaturas de incubação, reforçando que a redução do metabolismo no tratamento termo-osmótico não foi devido à perda de viabilidade. Entretanto, a germinação foi muito reduzida após os 20 dias de armazenamento, principalmente as que permaneceram incubadas a 7 °C. De acordo com Faria *et al.* (2006), a análise de alterações celulares durante o armazenamento dos embriões mostrou o desaparecimento de grânulos de amido e vários danos às células, como dobras na parede celular e fragmentação do citoplasma, o que pode explicar a redução da massa seca dos embriões e a elevação das taxas respiratórias. A presença contínua dos fungos nos embriões desse estudo somada às alterações bioquímicas e estruturais propiciou a redução da viabilidade destes. Calistru *et al.* (2000) observaram que sementes de *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. ao longo do armazenamento apresentam queda na viabilidade e suscetibilidade aos efeitos de *Fusarium moniliforme* em comparação às recém-colhidas.

É interessante ressaltar que a associação do tratamento térmico ao osmótico possibilitou que os resultados mais favoráveis obtidos quando aplicados isoladamente fossem replicados, notando-se que na associação destes tratamentos os embriões atingiram taxas de germinação próximas aquelas apresentadas com o uso dos tratamentos térmicos e incidência fúngica de *Penicillium* sp. mais baixa, como propõem os tratamentos osmóticos.

Tabela 7. Teor de água (%), massa seca (%) e germinação (%) de embriões de *Inga vera* Penn. sem tratamento (testemunha), tratados com fungicida (Derosal Plus), submetidos a tratamento termooσμótico, congelamento e inoculação de *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp., após incubação a 7 °C e 25 °C, assim que tratados e após 20 dias de armazenamento a 7 °C. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas nas linhas, maiúsculas nas colunas) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamentos de sementes	Armazenamento		Temperatura de incubação	
	Inicial	20 dias	7 °C	25 °C
<i>Teor de Água</i>				
Testemunha	61,8 bB	63,8 aA	61,5 bA	64,0 aAB
Derosal Plus	61,5 bB	63,8 aA	61,8 bA	63,6 aAB
55 °C/30' -1,6 MPa	57,4 aC	50,2 bB	53,9 aB	53,7 aC
Congelamento	60,3 bB	62,8 aA	60,8 aA	62,4 aB
Inoculação/ <i>Penicillium</i> sp.	64,3 aA	62,8 aA	61,6 bA	65,5 aA
Inoculação/ <i>Fusarium</i> sp.		63,5	63,5	63,5
Coef. var.	2,87%			
<i>Massa Seca</i>				
Testemunha	38,2 aB	36,2 bB	38,5 aB	36,0 bBC
Derosal Plus	38,5 aB	36,0 bB	38,1 aB	36,4 bBC
55 °C/30' -1,6 MPa	43,6 bA	49,8 aA	43,1 aA	46,9 aA
Congelamento	39,7 aB	37,2 bB	39,2 aB	37,7 aB
Inoculação/ <i>Penicillium</i> sp.	35,7 aC	37,2 aB	38,4 aB	34,5 bC
Inoculação/ <i>Fusarium</i> sp.		36,5	36,5	36,5
Coef. var.	4,44%			
<i>Germinação</i>				
Testemunha	84 aAB	26 bBC	39 bB	71 aA
Derosal Plus	79 aB	18 bC	36 bB	60 aA
55 °C/30' -1,6 MPa	95 aA	41 bA	65 aA	71 aA
Congelamento	0 aC	0 aD	0 aC	0 aB
Inoculação/ <i>Penicillium</i> sp.	78 aB	39bAB	46 bB	70 aA
Inoculação/ <i>Fusarium</i> sp.		36,2	30	68
Coef. var.	21,29%			
<i>Potencial hídrico</i>				
7 °C	-1,5 aA	-1,2 bA		
25 °C	-1,2 aA	-1,3 aB		
Coef. var.	21,64%			

A alta incidência de *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. nos embriões de *Inga vera* provavelmente intensificou a redução da qualidade fisiológica destes, uma vez que os tratamentos térmicos apresentaram baixos valores de germinação após 50 dias de armazenamento, ao contrário dos embriões tratados com fungicida, que controlou as incidências e manteve ainda 45% de germinação. A influência desses fungos na viabilidade dos embriões pode ser constatada com a análise das taxas respiratórias. A única amostra de embriões em que o consumo de O₂ e produção de CO₂ foram mais baixos, independente da temperatura de incubação e do tempo de armazenamento foi a do tratamento alternativo. Apesar de não ter controlado a incidência fúngica, pois além de *Penicillium* sp., como no estudo anterior, incidiu também *Fusarium* sp., o controle do metabolismo propiciado pelos dois tipos de estresse, térmico e osmótico, favoreceu a redução da respiração e manutenção da viabilidade dos embriões. A redução do metabolismo desses embriões fica mais evidente quando observa-se que a quantidade de massa seca continuou maior do que nos demais tratamentos.

CONCLUSÃO

Tratamentos térmicos e termo-osmóticos não controlaram a incidência fúngica dos embriões de *Inga vera*, ao contrário dos tratamentos osmóticos, que não foram eficientes apenas no controle de *Penicillium* sp. O mesmo ocorreu quando estes tratamentos foram associados. Porém, quando o período de armazenamento foi, no máximo, 30 dias, essa associação de tratamentos propiciou a manutenção da germinação desses embriões e baixas taxas respiratórias, mesmo na presença de fungos. Tais resultados sugerem que a presença de microrganismos e o elevado metabolismo dos embriões influenciam na deterioração destes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andréo, Y., Nakagawa, J. & Barbedo, C.J.** 2006. Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Will. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Pennington). *Revista Brasileira de Botânica*, 29:309-318.
- Barbedo, C.J. & Marcos-Filho, J.** 1998. Tolerância à dessecação de sementes. *Acta Botanica Brasilica*, São Paulo, 12 (2): 145-164.
- Berjak, P.** 1987. Stored seeds: the problems caused by micro-organisms. In: Nasser, L. C.; Wetzel, M. M.; Fernandes, J. M. (Ed.). *Proceedings; Seed Pathology, International advanced course*. Brasília, DF, ABRATES, p. 38-50.
- Bilia, D.A.C. & Barbedo, C.J.** 1997. Estudos de germinação e armazenamento de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. *Científica*, 25:379-391.
- Bilia, D.A.C.; Marcos Filho, J.; Novembre, A.D.C.L.** 1998. Conservação da qualidade fisiológica de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. *Revista Brasileira de Sementes*, 20 (1): 48-54.
- Bonjovani, M. R.; Barbedo, C. J.** 2008. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. toleram temperatura sub-zero. *Revista Brasileira de Botânica*, 31 (2): 345-356.
- Brasil.** 1992. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Produção Vegetal. Coordenação de Laboratório Vegetal. Regras para análise de sementes. Brasília, DF, 365p.
- Calistru, C; Mclean, M; Pammenter, N.W.; Berjak, P.** 2000. The effects of mycofloral infection on the viability and ultrastructure of wet-stored recalcitrant seeds of *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. *Seed Science Research*, 10: 341–353.
- Carvalho, N. M; Nakagawa, J.** 1983. Sementes: ciência, tecnologia e produção. Campinas: Fundação Cargill.
- Castro, R. A.; Mendes-Costa, M. C.; Castro, A. H. F.; Neto, P. C.; Fraga, A. C.; Guimarães, I.; Neves, N. G.** 2005. Avaliação biológica e atividade fungitóxica do óleo fixo e de extratos de

Ricinus communis L. em *Colletotrichum lindemuthianum*. In: Congresso Brasileiro de plantas oleaginosas, óleos, gorduras e biodiesel, 2., 2005, Varginha. Anais... Universidade Federal de Lavras: 650-654.

Decagon. 2001. WP4 Dewpoint PotentaMeter Operator's Manual. Pullman: Decagon Devices, Inc..

Faria, J. M. R.; Davide, L. C.; Silva, E. A. A.; Davide, A. C.; Pereira, R. C.; Van Lammeren, A. A. M.; Hilhorst, H. W. M. 2006. Physiological and cytological aspects of *Inga vera* subsp. *affinis* embryos during storage. Brazilian Journal Plant Physiology, 18 (4): 503-513.

Feltre, R. 1982. Química geral. 2.ed. Moderna. São Paulo 1: 364p.

Ista. 1985. International Seed Testing Association. International rules for seed testing. Seed Science and Technology, v.13, p.356-513.

Kader, A.A. & Saltveit, M.E. 2002. Respiration and gas exchange. In: J.A. Bartz, J.K. Brecht & J. Weichmann. Postharvest physiology and pathology of vegetables. Marcel Dekker, New York, pp.7-29.

Lamarca, E. V. 2009. Taxas respiratórias e velocidade de deterioração de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. em função de variações hídricas e térmicas. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente), Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo. 98p.

Machado, J.C. 1988. Patologia de sementes: fundamentos e aplicações. Brasília, MEC ESAL-FAEPE.

Marcos Filho, J. 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: Feal. 485p.

Masum, M. M. I.; Islam, S. M. M.; Fakir, M. G. A. 2009. Effect of seed treatment practices in controlling of seed-borne fungi in sorghum. Scientific Research and Essay, 4 (1): 022-027.

Medeiros, A. C. S.; Eira, M. T. S. 2006. Comportamento fisiológico, secagem e armazenamento de sementes florestais nativas. Circular Técnica, Embrapa, 127: 1-13.

Menten, J. O. M. 1991. Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. Piracicaba: ESALQ/FEALQ. 312p.

- Michel, B.E. e Kaufmann, M.R.** 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology*, v.51, p.914-916.
- Mukherjee, M.; Watt, D. A.; Berjak, P.** 2006. Molecular detection and diagnosis of fungal contaminants of recalcitrant seeds: *Quercus robur* L. acorns as a model system. *Seed Science and Technology*, 34: 415-427.
- Mycock, D. J.; Berjak, P.** 1990. Fungal contaminants associated with several homoiohydrous (recalcitrant) seed species. *Phytophylactica*, 22: 413-418.
- Okamoto, J.M. & Joly, C.A.** 2000 Ecophysiology and respiratory metabolism during the germination of *Inga sessilis* (Vell.) Mart. (Mimosaceae) seeds subjected to hypoxia and anoxia. *Revista Brasileira de Botânica* 23(1): 51-57.
- Oliveira, D.M.T.; Beltrati, C.M.** 1992. Morfologia e desenvolvimento das plântulas de *Inga fagifolia* e *I. uruguensis*. *Turrialba*, v.42, n.3, p.306-313.
- Oliveira, M. D. M.; Nascimento, L. C.; Alves, E. U.; Gonçalves, E. P.; Guedes, R. S.** 2009. Tratamentos térmico e químico em sementes de mulungu e efeitos sobre a qualidade sanitária e fisiológica. *Caatinga*, 22 (3): 150-155.
- Santana, D.G.; Ranal, M.A.** 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. Brasília: UnB.
- Santos, M. C. A.; Aroucha, E. M. M.; Souza, M. S.; Silva, R. F.; Sousa, P. A.** 2008. Condicionamento osmótico de sementes - Revisão de Literatura. *Caatinga*, 21 (2): 01-06.
- Sershen, N.; Berjak, P.; Pammenter, W.** 2008. Dessiccation sensitivity of excised embryonic axes of selected amaryllid species. *Seed Science Research*, 18: 1-11.

DISCUSSÃO GERAL

O tratamento químico de sementes de *Eugenia uniflora* e de embriões de *Inga vera* foram os que apresentaram melhores resultados quanto ao controle da incidência fúngica. Entretanto, formulações e doses devem ser estudadas para as espécies florestais, uma vez que as sementes têm características morfológicas e fisiológicas bem variadas. Para as sementes de *Eugenia pyriformis*, cujo teor de água e sensibilidade à dessecação é maior dentre as sementes das demais espécies desse gênero (Delgado & Barbedo 2007), o fungicida vitavax-thiram causou fitotoxicidade, reduzindo os valores de germinação. Em relação ao Derosal Plus, fungicida que apresentou os resultados mais satisfatórios no controle e erradicação de fungos associados às sementes e embriões dessas espécies florestais, não foi eficaz no controle de *Fusarium* sp. dos embriões de *Inga vera*. Assim, a dose aplicada do produto e sua formulação, a carga de inóculo no lote (Dhingra 2005) e o elevado teor de água dos embriões, dificultando a adesão do produto, podem ser motivos para a ineficiência de tratamentos químicos.

Quando analisada a viabilidade de tratamentos de sementes por meio de métodos físicos e osmóticos, observaram-se os mesmos resultados para as duas espécies. Os tratamentos térmicos por meio do calor úmido reduziram as incidências dos gêneros fúngicos em relação às sementes do tratamento controle, aquelas que não receberam nenhum tratamento, mas aumentaram a incidência de *Penicillium* sp., apesar dos valores da germinação permanecerem elevados ao longo do armazenamento de 120 dias para as sementes de *Eugenia* spp. e durante os 30 dias para os embriões de *Inga vera*. Destes tratamentos térmicos, a temperatura de 55 °C do ar da estufa durante, pelo menos, 30 minutos, propiciou os melhores resultados. Estudos com termoterapia têm utilizado esta temperatura para tratar as sementes, mas expondo estas à água nesta temperatura. Em alguns casos há o controle de parte dos gêneros associados às sementes, com exceção de *Fusarium* spp. (Masum *et al.* 2009; Mukherjee *et al.* 2006), e em outros a eficiência no controle fúngico, mas reduções nos valores de germinação das sementes (Mendes *et al.* 2001).

Diferindo-se dos tratamentos térmicos, os osmóticos foram mais eficientes no controle dos fungos, principalmente em períodos curtos de armazenamento nas soluções osmóticas. Mas ao prolongá-los, foi *Penicillium* sp. o gênero também favorecido por este tratamento. A desvantagem deste tratamento é a queda acentuada da capacidade germinativa das sementes de *Eugenia* spp. e dos embriões de *Inga vera*. Esta pode ter sido ocasionada pela proliferação desse fungo e pelas condições do armazenamento. O polietilenoglicol causa um efeito negativo sobre a disponibilidade de oxigênio para as sementes devido à alta viscosidade que leva à baixa taxa de difusão do oxigênio nas soluções (Santos *et al.* 2008).

Entretanto, a associação dos tratamentos térmicos e osmóticos nos estudos com sementes e embriões das duas espécies arbóreas, também em períodos curtos de armazenamento nas soluções osmóticas, possibilitou que os resultados mais favoráveis obtidos quando aplicados isoladamente ocorressem, notando-se que na associação destes tratamentos os embriões atingiram taxas de germinação próximas aquelas apresentadas com o uso dos tratamentos térmicos e incidência fúngica de *Penicillium* sp. mais baixa, como propõem os tratamentos osmóticos. Para as sementes de *Eugenia uniflora*, esta associação foi testada também aplicando o tratamento osmótico por apenas sete dias, seguido do armazenamento em saco de polietileno por mais 120 dias. Apesar da incidência de *Penicillium* sp. logo após o armazenamento na solução osmótica, e de *Cladosporium* sp. no período 120 dias, os valores de germinação permaneceram elevados.

A avaliação das taxas respiratórias das sementes de *Eugenia uniflora* e dos embriões de *Inga vera* demonstrou diferenças no metabolismo destes, o que pode vir a explicar o seu comportamento quanto à intolerância à dessecação e à longevidade, uma vez que a sensibilidade à dessecação altera-se paralelamente à taxa metabólica (Pammenter & Berjak 2000). Para as sementes de *Eugenia uniflora*, as taxas respiratórias foram de 25,67 $\mu\text{mol CO}_2.\text{gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$ a 7 °C e de 68,43 $\mu\text{mol CO}_2.\text{gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$ a 25 °C, enquanto que para os embriões de *Inga vera*, estas taxas foram de 79,96 $\mu\text{mol CO}_2.\text{gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e 125,42 $\mu\text{mol CO}_2.\text{gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente, constatando-se o elevado metabolismo dos embriões desta espécie. Quando comparado à sensibilidade à dessecação, nota-se

que estes embriões são mais sensíveis à redução do teor de água, sendo a viabilidade destes prolongada por até 60 dias quando o teor de água foi reduzido até 50% (Bilia *et al.* 1998), enquanto que, as sementes de *Eugenia uniflora* apresentaram, aproximadamente, 40% de germinação após 90 dias de armazenamento quando o teor de água foi reduzido até 40% (capítulo 1).

A incidência fúngica de *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. e *Phoma* sp. em sementes de *Eugenia uniflora*, sem nenhum tratamento, bem como a elevada incidência de *Penicillium* sp. no tratamento termo-osmóticos, não interferiram nas taxas respiratórias das sementes e na viabilidade destas ao longo do armazenamento. Já para os embriões de *Inga vera*, a alta incidência de *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. elevaram as taxas respiratórias destes, pois estas só foram menores nas sementes submetidas ao tratamento termo-osmótico, independente da temperatura de incubação e do tempo de armazenamento, no qual o controle do metabolismo propiciado pelos dois tipos de estresse, térmico e osmótico, favoreceu a redução da respiração e manutenção da viabilidade dos embriões, mesmo com elevada incidência desses gêneros fúngicos. A redução do metabolismo neste tratamento também é observada pela maior porcentagem de matéria seca em relação aos demais tratamentos. De acordo com Machado (1988), os fungos podem provocar o aquecimento da massa de sementes com o conseqüente aumento da taxa respiratória e com isso uma deterioração mais rápida dessas. Além disso, a diminuição da viabilidade das sementes pode favorecer o desenvolvimento desses fungos e a influência desses intensificar a deterioração das sementes (Calistru *et al.* 2000).

CONCLUSÕES GERAIS

Os tratamentos térmicos e osmóticos mostraram-se potencialmente interessantes, principalmente quando associados ao armazenamento nas soluções osmóticas por um curto período, notando-se que o controle exercido pelos tratamentos osmóticos sobre a incidência dos fungos não necessita de exposição tão prolongada. O controle de alguns fungos, mas não a eficiência ao longo do armazenamento, sugere que estudos que avaliem a possibilidade da reaplicação dos tratamentos termo-osmóticos após algum período de armazenamento em saco de polietileno, possam trazer importante contribuição à conservação desse patrimônio nativo.

Quanto à influência desses microrganismos na respiração de sementes, constatou-se que para as de *Eugenia uniflora* a presença deles não interferiram nas taxas respiratórias, observando-se a manutenção da viabilidade das sementes ao longo do armazenamento mesmo com altas incidências fúngicas. Entretanto, as elevadas taxas respiratórias de embriões de *Inga vera*, em comparação às de *Eugenia uniflora*, foram intensificadas pela presença dos fungos, ocorrendo reduções na capacidade germinativa dos embriões, sugerindo que a presença de microrganismos e o elevado metabolismo dos embriões influenciam na deterioração destes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO E DA DISCUSSÃO GERAL

- Barbedo, C.J. & Bilia, D.A.C.** 1998. Evolution of research on recalcitrant seeds. *Scientia Agricola*, 55(especial):121-125.
- Barbedo, C.J. & Marcos-Filho, J.** 1998. Tolerância à dessecação de sementes. *Acta Botanica Brasilica*, São Paulo, 12 (2): 145-164.
- Berjak, P.** 1995. The role of microorganisms in deterioration during storage of recalcitrant and intermediate seeds. In: Ouédraogo, A.S.; Poulsen, K.; Stubsgaard, F. Intermediate/ recalcitrant tropical forest tree seeds: proceedings of a working on improved methods for handling and storage of intermediate/recalcitrant tropical forest tree seeds. Rome: IPGRI; Denmark: DANIDA, p.121-126.
- Berjak, P.** 1987. Stored seeds: the problems caused by micro-organisms. In: Nasser, L. C.; Wetzell, M. M.; Fernandes, J. M. (Ed.). Proceedings; Seed Pathology, International advanced course. Brasília, DF, ABRATES, p. 38-50.
- Calistru, C; Mclean, M; Pammenter, N.W.; Berjak, P.** 2000. The effects of mycofloral infection on the viability and ultrastructure of wet-stored recalcitrant seeds of *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. *Seed Science Research*, 10: 341–353.
- Carvalho, N.M.; Nakagawa, J.** 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4ed. Jaboticabal: Funep.
- Castro, R. D.; Bradford, K. J.; Hilhorst, H. W. M.** 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: Ferreira, A.G. & Borghetti, F. (orgs.) Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre, Artemed. p. 265-275.
- Crispim, J. E.; Martins, J. C.; Pores, J. C.; Rosolem, C. A.; Cavariani, C.** 1994. Determinação da taxa de respiração em sementes de soja pelo método da titulação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 29 (10): 1517-1521.
- Davide, A. C.; Faria, J. M. R.** 2008. Viveiros Florestais. In: Davide, A. C.; Silva, Silva, E. A. A.(Ed.) Produção de sementes e mudas de espécies florestais. Lavras, UFLA. p. 83-124.

- Davide, A. C.; Silva, E. A. A.** 2008. Sementes Florestais. In: Davide, A. C.; Silva, Silva, E. A. A.(Ed.) Produção de sementes e mudas de espécies florestais. Lavras, UFLA. p. 11-81.
- Delouche, J.C.** 2002. Germinação, deterioração e vigor da semente. Seed News, v.6, p.1-7.
- Delouche, J.C. & Baskin, C.C.** 1973. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seeds lots. Seed Science and Technology, 1: 427-452.
- Dhingra, O. D.** 2005. Teoria da transmissão de patógenos fúngicos por sementes. In: Zambolim, L. (Ed.) Sementes: qualidade fitossanitária. Viçosa, UFV, DFP, p. 75-112.
- Dhingra, O.D.; Maia, C.B.; Lustosa, D.C.; Mesquita, J.B.** 2002. Seedborne pathogenic fungi affect seedling quality of red angico (*Anadenanthera macrocarpa*) trees in Brazil. Phytopathology, 150: 451-455.
- Hirota, M. M.; Neto, G. C.; Ponzoni, F. J.** (coord.). 2003. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica (1995-2000). INPE, São José dos Campos, 45p.
- Lamarca, E. V.; Leduc, S. N. M.; Barbedo, C. J.** 2009. Viabilidade e vigor de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil - Leguminosae) pelo teste de tetrazólio. Revista Brasileira de Botânica, 32 (4): 793-803.
- Lamarca, E. V.** 2009. Taxas respiratórias e velocidade de deterioração de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. em função de variações hídricas e térmicas. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente), Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo. 98p.
- Machado, J. C.** 1988. Patologia de sementes fundamentos e aplicações. MEC/ESAL/FAEPE. Brasília. 106p.
- Macherel, D.; Avelange-Macherel, M. H.** 2010. Seed mitochondria and stress tolerance. In: Taiz, L.; Zeiger, E. Plant Physiology. <http://www.sinauer.com> (acesso em 06.12.2010).
- Marcos Filho, J.** 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: Fealp. 485p.
- Mello, J. I. O.; Barbedo, C. J.; Salatino, A.; Figueiredo-Ribeiro, C. L.** 2010. Reserve carbohydrates and lipids from the seeds of four tropical tree species with different sensitivity to desiccation. Brazilian Archives Biology and Technology, 53 (4): 889-899.

- Mendes, S. S.; Santos, P. R.; Santana, G. C.; Ribeiro, G. T.; Mesquita, J. B.** 2005. Levantamento, patogenicidade e transmissão de fungos associados às sementes de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth). Revista Ciência Agronômica, 36 (1): 118 – 122.
- Menten, J. O. M.** 1991. Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. Piracicaba: ESALQ/FEALQ. 312p.
- Mycock, D. J.; Berjak, P.** 1990. Fungal contaminants associated with several homoiohydrous (recalcitrant) seed species. Phytophylactica, 22: 413-418.
- Nascimento, W. M. O.; Cruz, E. D.; Moraes, M. H. D.; Menten, J. O. M.** 2006. Qualidade sanitária e germinação de sementes de *Pterogyne nitens* Tull. (Leguminosae – Caesalpinioideae). Revista Brasileira de Sementes, 28 (1): 149-153.
- Netto, D. A. M.; Faiad, M. G. R.** Viabilidade e sanidade de sementes de espécies florestais. 1995. Revista Brasileira de Sementes, 17 (1): 75-80.
- Pammenter, N. W.; Berjak, P.** 2000. Aspects of recalcitrant seed physiology. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 12(Edição Especial): 56-69.
- Reis, A.; Bechara, F. C.; Espindola, M. B.; Vieira, N. K.; Souza, L. L.** 2003. Restauração de áreas degradadas: a nucleação como base para incrementar os processos sucessionais. Natureza & Conservação, 1 (1): 28-36.
- Reis, G. G.; Rena, A. B.** 1987. Estudo sobre a dormência de sementes de sucupira (*Pterodon pubescens* Beth): viabilidade, perda e absorção de água, respiração e presença de inibidores. Revista Árvore, 11 (2): 105-118.
- Santos, A. F.; Grigoletti Júnior, A.; Auer, C. G.** 2000. Transmissão de fungos por sementes de espécies florestais. Floresta, 30 (1/2): 119-128.
- Santos, A. F.; Medeiros, A. C. S.; Santana, D. L. Q.** 2001a. Fungos associados às sementes de espécies arbóreas da Mata Atlântica. Boletim Pesquisa Florestal, 42: 57-70.
- Santos, A. F.; Parisi, J. J. D.** 2004. Arte e perspectivas da patologia de sementes florestais no Brasil. In: Anais do 8º Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, João Pessoa. pp. 43-47.

- Santos, F.E.M.; Sobrosa, R.C.; Costa, I.F.D.; Corder, M. P. M.** 2001b. Detecção de fungos patogênicos em sementes de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild). *Ciência Florestal*, 11 (1): 13-20.
- Silva, R. T. V.; Homechin, M.; Fonseca, É. P.; Santiago, D. C.** 2003. Tratamento de sementes e armazenamento na sanidade de sementes de paineira (*Chorisia speciosa* St. Hil). *Ciências Agrárias*, 24 (2): 255-260.
- Silva, E. A. A.; Von Pinho, E. V. R.; Vieira, M. G. G. C.; Carvalho, M. L. M.; Machado, J. C.** 2000. Alterações dos padrões de isoenzimas em sementes de milho infectadas por fungos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35 (9): 1725-1732.
- Steffens, C. A.; Brackmann, A.; Pinto, J. A. V.; Eisermann, A. C.** 2006. Escurecimento da polpa e respiração de pêssegos em função das condições de armazenamento. *Revista Brasileira de Agrociência*, 12 (1): 71-75.
- Tabarelli, M.; Pinto, L. P.; Silva, J. M. C.; Hirota, M. M.; Bedê, L. C.** 2005. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. *Megabiodiversidade*, 1 (1): 132-138.
- Veiga, R. F. A. ; Joly, C.A. ; Bicudo, C.E.deM.** 1999. Bancos de Germoplasma: Acervos de Bancos de Germoplasma do Estado de São Paulo. In: Joly, C.A; Bicudo, C.E. de M. (Org.). *Biodiversidade do Estado de São Paulo*. 1 ed. São Paulo: FAPESP, 7: 103-109.
- Vieira, A. H.; Martins, E. P.; Pequeno, P. L. L.; Locatelli, M.; Souza, M. G. de.** 2001. Técnicas de produção de sementes florestais. *Circular Técnica, EMBRAPA-CPAF Rondônia*, 205: 2-4.
- Villela, F. A.; Peres, W. B.** 2004. Coleta, beneficiamento e armazenamento. In: Ferreira, A.G. & Borghetti, F. (orgs.) *Germinação: do básico ao aplicado*, Porto Alegre, Artemed. pp. 265-275.

RESUMO – Considerando a intolerância à dessecação das sementes recalcitrantes, como as das espécies *Eugenia uniflora* e *Inga vera*, e a necessidade de manutenção do seu elevado teor de água durante o armazenamento, prejudicando a longevidade das sementes, é necessário que uma das possíveis causas da deterioração, a presença de fungos nestas sementes, seja controlada. Entretanto, analisar a influência destes microrganismos no processo de deterioração, por meio de alterações metabólicas, como as taxas respiratórias, auxiliará na compreensão desse processo e no comportamento das sementes quando expostas aos efeitos da deterioração. Para tanto, as sementes dessas espécies foram avaliadas quanto à incidência fúngica e a eficiência de diferentes tratamentos (físicos, osmóticos, biológicos e químicos) no controle destes e na otimização da germinação. Amostras com maior ou menor presença de fungos foram avaliadas quanto ao consumo de O₂ e produção de CO₂. Os resultados demonstraram que o controle fúngico foi maior com o uso de produtos químicos, mas métodos alternativos propostos têm potencial para reduzir a maioria dos gêneros de fungos ocorrentes nestas espécies, demandando mais estudos para adequação das técnicas. Quanto à influência desses no metabolismo das sementes, as respostas foram diferentes para cada espécie, sugerindo que são as próprias características fisiológicas, bioquímicas e estruturais das sementes que podem vir a favorecer a ação dos microrganismos e acelerar a deterioração dessas.

Palavras-chaves: *Eugenia*, *Inga vera*, recalcitrantes, fungos, tratamentos de sementes, taxas respiratórias.

ABSTRACT - Considering intolerance to desiccation of recalcitrant seeds, such as species *Eugenia uniflora* and *Inga vera*, and the need to maintain their high water content during storage, affecting the longevity of seeds, it is necessary that one of the possible causes of deterioration, the fungi in these seeds, is controlled. However, analyzing the influence of these microorganisms in the deterioration process, through metabolic changes, such as the respiration rate, assist in understanding this process and the behavior of seeds when exposed to the effects of deterioration. For this, the seeds of these species were evaluated for fungal incidence and efficiency of different treatments (physical, osmotic, chemical and biological) in the fungi control and optimization of germination. Samples with greater or lesser presence of fungi were evaluated for O₂ consumption and CO₂ production. The results showed that the fungal control was achieved with the use of chemicals, but alternative methods proposed have the potential to reduce most genera of fungi that occur in these species, requiring further studies for adaptation techniques. As for the influence on the metabolism of these seeds, the responses were different for each species, suggesting that they are their own physiological, biochemical and structural seed that may facilitate the action of microorganisms and accelerate the deterioration of these.

Key-words: *Eugenia*, *Inga vera*, recalcitrant seeds, fungi, seeds treatments, respiration rates.