

CIBELLE FERREIRA FRANÇOSO

**Tratamentos térmicos e osmóticos para controle
de fungos associados a sementes de *Eugenia
brasiliensis* e *Eugenia uniflora*.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da
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

2012

CIBELLE FERREIRA FRANÇOSO

**Tratamentos térmicos e osmóticos para controle
de fungos associados a sementes de *Eugenia
brasiliensis* e *Eugenia uniflora*.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica
da 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**

Françoso, Cibelle Ferreira

F825t Tratamentos térmicos e osmóticos para controle de fungos associados a sementes de *Eugenia brasilienses* e *Eugenia uniflora* / Cibelle Ferreira Françoso -- São Paulo, 2012. 77 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2012
Bibliografia.

1. Semente. 2. Armazenamento. 3. Myrtaceae. I. Título

CDU: 631.53.01

Dedico
À minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Botânica de São Paulo pela oportunidade oferecida.

À minha família, que tornou tudo possível, pelo apoio e paciência.

Ao meu orientador, Claudio, pela confiança, incentivo e amizade.

Ao Dr. João José Dias Parisi pelos primeiros ensinamentos de patologia de sementes.

À Dra. Rosely A. Piccolo Grandi pela ajuda na identificação dos fungos.

Aos membros da banca de qualificação pelas valiosas críticas e sugestões.

Aos pesquisadores e funcionários do Núcleo de Pesquisa em Sementes, do Instituto de Botânica de São Paulo, pelo incentivo e colaboração.

Aos amigos por tornarem tudo mais divertido, seja no laboratório, nos fins de semana (no laboratório) ou na(s) hora(s) do café, agradeço pela atenção, paciência, incentivo e, principalmente, confiança.

Aos funcionários da Seção de pós-graduação pela atenção.

À Capes pela bolsa fornecida.

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

ÍNDICE

Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução	3
1.1. Fungos em sementes de espécies florestais	7
1.2. <i>Eugenia</i> spp.	10
2. Objetivos	12
3. Material e Métodos	13
3.1. Coleta dos frutos e extração das sementes	13
3.2. Determinações físicas e fisiológicas e avaliação da sanidade das sementes	13
3.3. Tratamentos de controle da incidência fúngica	15
3.4. Delineamento experimental e tratamento estatístico dos dados	17
4. Resultados e Discussão	18
4.1. Efeitos dos tratamentos térmicos e osmóticos sobre a germinação	38
4.2. Efeitos positivos e negativos da reaplicação de tratamentos	41
4.3. Efeitos dos tratamentos sobre as taxas respiratórias	48
4.4. Considerações Finais	56
6. Referências Bibliográficas	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidência de *Penicillium* sp. (A e B) e *Fusarium* sp. (C e D) em sementes de *E. brasiliensis* submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/30 minutos (30) e 55°C/150 minutos (150) e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas) e 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A e C) e com a reaplicação dos mesmos (B e D). Consta também a

incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão.

Figura 2. Incidência de *Penicillium* sp. (A e B) e *Fusarium* sp. (C e D) em sementes de *E. uniflora* submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/120 minutos (55) e 60°C/120 minutos (60) e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas) e 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A e C) e com a reaplicação dos mesmos (B e D). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão. 20

Figura 3. Incidência de *Chaetomium* sp. em sementes de *E. brasiliensis* submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/30 minutos (30) e 55°C/150 minutos (150) e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinza) e após 30 dias (barras pretas) e 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A) e com a reaplicação dos mesmos (B). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão. 24

Figura 4. Incidência de *Botrytis* sp. em sementes de *E. brasiliensis* (A e B) e *E. uniflora* (C e D) submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/30 minutos (30) e 55°C/150 minutos (150), para *E. brasiliensis*; e 55°C/120 minutos (55) e 60°C/120 minutos (60), para *E. uniflora*; e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas), após 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A) e com a reaplicação dos mesmos (B). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão. 26

Figura 5. Incidência de *Colletotrichum* sp. em sementes de *E. brasiliensis* (A e B) e *E. uniflora* (C e D) submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/30 minutos (30) e 55°C/150 minutos (150), para *E. brasiliensis*; e 55°C/120 minutos (55) e 60°C/120 minutos (60), para *E. uniflora*; e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas) e após 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A) e com a reaplicação dos mesmos (B). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão. 27

Figura 6. Incidência de *Chaetomium* sp. (A e B) e *Alternaria* sp. (C e D) em 28

sementes de *E. uniflora* submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/120 minutos (55) e 60°C/120 minutos (60) e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas) e 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A e C) e com a reaplicação dos mesmos (B e D). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão.

Figura 7. Incidência de *Pestalotiopsis* sp. em sementes de *E. brasiliensis* submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/30 minutos (30) e 55°C/150 minutos (150) e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e 30 dias (barras pretas) e 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A) e com a reaplicação dos mesmos (B). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão. 29

Figura 8. Incidência de *Pestalotiopsis* sp. em sementes de *E. uniflora* submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/120 minutos (55) e 60°C/120 minutos (60) e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas) e 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A) e com a reaplicação dos mesmos (B). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão. 30

Figura 9. Incidência de *Cladosporium* sp. (A e B) e *Ceratocystis* sp. (C e D) em sementes de *E. brasiliensis* submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/30 minutos (30) e 55°C/150 minutos (150) e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas) e 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A e C) e com a reaplicação dos mesmos (B e D). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão. 31

Figura 10. Incidência de *Phoma* sp. em sementes de *E. brasiliensis* (A e B) e *E. uniflora* (C e D) submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/30 minutos (30) e 55°C/150 minutos (150), para *E. brasiliensis*; e 55°C/120 minutos (55) e 60°C/120 minutos (60), para *E. uniflora*; e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas) e 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A e C) e com a reaplicação dos mesmos (B e D). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes 33

tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão.

Figura 11. Incidência de *Phomopsis* sp. em sementes de *E. brasiliensis* (A e B) e *E. uniflora* (C e D) submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/30 minutos (30) e 55°C/150 minutos (150), para *E. brasiliensis*; e 55°C/120 minutos (55) e 60°C/120 minutos (60), para *E. uniflora*; e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas) e 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A e C) e com a reaplicação dos mesmos (B e D). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão.

34

Figura 12. Incidência de *Cladosporium* sp. (A e B) e *Ceratocystis* sp. (C e D) em sementes de *E. uniflora* submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/120 minutos (55) e 60°C/120 minutos (60) e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas) e 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A e C) e com a reaplicação dos mesmos (B e D). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão.

35

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Germinação (%) de sementes de *E. brasiliensis* submetidas a tratamento térmico de 55 °C/30 minutos (30 min.), 55 °C/150 minutos (150 min.) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas a tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). As avaliações foram feitas inicialmente (Inicial) e após armazenamento de 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

22

Tabela 2. Desenvolvimento de plântulas normais (%) de sementes de *E. brasiliensis* submetidas a tratamento térmico de 55 °C/30 minutos (30 min.), 55 °C/150 minutos (150 min.) e sem tratamento térmico (STT.) e submetidas a tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). As avaliações foram feitas inicialmente (Inicial) e após armazenamento de 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

23

Tabela 3. Germinação (%) de sementes de *E. uniflora* submetidas a tratamento térmico de 55°C/120 minutos (55°C), 60°C/120 minutos (60°C) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). As avaliações foram feitas inicialmente (Inicial) e após armazenamento de 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

39

Tabela 4. Desenvolvimento de plântulas normais (%) de sementes de *E. uniflora* submetidas a tratamento térmico de 55°C/120 minutos (55°C), 60°C/120 minutos (60°C) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). As avaliações foram feitas inicialmente (Inicial) e após armazenamento de 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

40

Tabela 5. Teor de água (%) de sementes de *E. brasiliensis* submetidas a tratamento térmico de 55 °C/30 minutos (30 min.), 55 °C/150 minutos (150 min.) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas a tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). As avaliações foram feitas inicialmente (Inicial) e após armazenamento de 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

43

Tabela 6. Teor de água de sementes (%) de *E. uniflora* submetidas a tratamento térmico de 55°C/120 minutos (55°C), 60°C/120 minutos (60°C) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). As avaliações foram feitas inicialmente (Inicial) e após armazenamento de 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

44

Tabela 7. Potencial hídrico (MPa) de sementes de *E. brasiliensis* submetidas a tratamento térmico de 55 °C/30 minutos (30 min.), 55 °C/150 minutos (150 min.) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas a tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). As avaliações foram feitas inicialmente (Inicial) e após armazenamento de 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

45

Tabela 8. Potencial hídrico (MPa) de sementes de *E. uniflora* submetidas a tratamento térmico de 55°C/120 minutos (55°C), 60°C/120 minutos (60°C) e

46

sem tratamento térmico (STT) e submetidas tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). As avaliações foram feitas inicialmente (Inicial) e após armazenamento de 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 9. Massa seca (mg.semente⁻¹) de sementes de *E. brasiliensis* submetidas a tratamento térmico de 55 °C/30 minutos (30 min.), 55 °C/150 minutos (150 min.) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas a tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). As avaliações foram feitas inicialmente (Inicial) e após armazenamento de 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

47

Tabela 10. Massa seca (mg.semente⁻¹) de sementes de *E. uniflora* submetidas a tratamento térmico de 55°C/120 minutos (55°C), 60°C/120 minutos (60°C) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). As avaliações foram feitas inicialmente (Inicial) e após armazenamento de 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

48

Tabela 11. Caracterização inicial do consumo de O₂ (μmol.gMS⁻¹.d⁻¹), produção de CO₂ (μmol.gMS⁻¹.d⁻¹) e quociente respiratório (QR) de sementes de *E. brasiliensis* submetidas a tratamento térmico de 55 °C/30 minutos (30 min.), 55 °C/150 minutos (150 min.) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas a tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

49

Tabela 12. Caracterização inicial do consumo de O₂, produção de CO₂ e quociente respiratório (QR), ambos em μmol.gMS⁻¹.d⁻¹, de sementes de *E. uniflora* submetidas a tratamento térmico de 55°C/120 minutos (55°C), 60°C/120 minutos (60°C) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

50

Tabela 13. Caracterização, após 30 dias de armazenamento, do consumo de O₂, produção de CO₂ e quociente respiratório (QR), ambos em μmol.gMS⁻¹.d⁻¹, de sementes de *E. brasiliensis* submetidas a tratamento térmico de 55 °C/30 minutos (30 min.), 55 °C/150 minutos (150 min.) e sem tratamento térmico (STT) e

51

submetidas a tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 14. Caracterização, após 30 dias de armazenamento, do consumo de O₂, produção de CO₂ e quociente respiratório (QR), ambos em $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$, de sementes de *E. uniflora* submetidas a tratamento térmico de 55°C/120 minutos (55°C), 60°C/120 minutos (60°C) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas a tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

53

Tabela 15. Caracterização, após 60 dias de armazenamento, do consumo de O₂, produção de CO₂ e quociente respiratório (QR), ambos em $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$, de sementes de *E. brasiliensis* submetidas a tratamento térmico de 55 °C/30 minutos (30 min.), 55 °C/150 minutos (150 min.) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas a tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

54

Tabela 16. Caracterização, após 60 dias de armazenamento, do consumo de O₂, produção de CO₂ e quociente respiratório (QR), ambos em $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$, de sementes de *E. uniflora* submetidas a tratamento térmico de 55°C/120 minutos (55°C), 60°C/120 minutos (60°C) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas a tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

55

RESUMO

Sementes intolerantes à dessecação necessitam ser armazenadas com elevado teor de água para sua conservação, o que favorece a proliferação de microrganismos, principalmente os fungos, que podem acelerar consideravelmente a velocidade de deterioração dessas sementes. O tratamento de sementes com o uso de fungicidas pode gerar toxicidade às próprias sementes e ao ambiente, tornando necessário o estudo de métodos alternativos para o controle dos fungos, como os tratamentos térmicos e osmóticos. Porém, a proteção residual contra os patógenos ao longo do armazenamento, que é conferida ao utilizar fungicidas, não existe nesses tratamentos alternativos, o que representa uma grande limitação. Sendo assim, no presente trabalho objetivou-se avaliar o efeito de tratamentos térmicos e osmóticos, quando aplicados isolados e associados, no controle dos fungos e na manutenção da qualidade fisiológica de sementes intolerantes a dessecação, de *Eugenia brasiliensis* (grumixameira) e *Eugenia uniflora* (pitangueira), e também avaliar os efeitos da reaplicação desses tratamentos sobre o potencial de armazenamento dessas sementes. Os resultados demonstraram que o tratamento térmico reduz a incidência da maioria dos fungos presentes em sementes de *Eugenia*, porém ele apresenta baixo ou nenhum controle sobre a incidência de *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp., que foram melhor controlados com o tratamento osmótico. Este também apresentou eficiência no controle da micota e resultou em menores prejuízos sobre a qualidade fisiológica das sementes. A associação dos tratamentos aparentemente produziu resultados mais favoráveis, devendo ser melhor explorada em trabalhos futuros. A reaplicação dos tratamentos pode diminuir a deficiência causada pela falta do efeito residual e ampliar o controle dos fungos ao longo do armazenamento. Porém, a decisão de aplicar/reaplicar ou não um tratamento deve estar associada à análise inicial da micota presente nas sementes, para se avaliar o melhor tratamento, durante o armazenamento, para manter o controle da micota.

Palavras-chave: armazenamento de sementes; sementes recalcitrantes; tratamento térmico; tratamento osmótico; *Penicillium* sp; *Fusarium* sp.

ABSTRACT

Desiccation intolerant seeds need to be maintained with high water content for their conservation, favoring the proliferation of microorganisms, especially fungi, which can considerably accelerate the seed deterioration rate. The treatment with fungicides can be toxic to the seed and to the environment, requiring the study of alternative methods, such as thermal and osmotic treatments. However, the residual protection against pathogens during storage that is granted by using fungicides, does not exist in such alternatives treatments, and represents a serious limitation. Thus, the present work aimed to evaluate the effect of thermal and osmotic treatments when applied alone and associated in controlling mycota and maintaining the physiological quality of desiccation intolerant seeds, of *Eugenia brasiliensis* (grumixameira) and *Eugenia uniflora* (pitangueira), and evaluate the effects of these treatments on reapplication of the storage potential of these seeds. The results showed that the thermal treatment reduces the incidence of most fungi present in seeds of *Eugenia*, but it has low or no control over the incidence of *Penicillium* sp. and *Fusarium* sp. which were better encountered with osmotic treatment. This also was efficient in controlling mycota and resulted in less damage on the physiological quality of seeds. The association of the treatments apparently produced most favorable results and may be further explored in future work. The reapplication of treatments may compensate the deficiency caused by the lack of residual effect and increase control of fungi over storage. However, the decision to apply/reapply or not a treatment should be associated with the initial analysis of mycota present in the seeds, to evaluate the best treatment, during storage, to maintain control of mycota.

Keywords: storage of seeds; recalcitrant seeds; thermal treatment; osmotic treatment; *Penicillium* sp; *Fusarium* sp.

1. INTRODUÇÃO

O sucesso do armazenamento de sementes depende do conhecimento sobre seu comportamento em relação à tolerância à dessecação e a redução da temperatura. Na categorização das sementes são reconhecidos três grupos básicos: recalcitrantes, intermediárias e ortodoxas, podendo ser conservadas, respectivamente, por curto, médio e longo prazo (Roberts 1973; Eira 1996; Hong & Ellis 1996). As sementes classificadas como ortodoxas toleram graus de dessecação inferiores a 5%, as intermediárias em torno de 10 a 13% e as recalcitrantes não toleram dessecação a graus de umidade inferiores a 15% (Roberts 1973; Hong & Ellis 1996). Contudo, há autores que consideram essa variação em uma escala contínua de comportamentos, principalmente pela constatação de níveis de tolerância à dessecação e de armazenamento entre as espécies classificadas como recalcitrantes (Kermode & Finch-Savage 2002; Berjak 1996; Vertucci 1995; Walters 2000; Farrant 1988; Pammenter 2000).

As principais técnicas de conservação de sementes, durante o armazenamento, incluem a redução do seu metabolismo pela remoção de sua água ou pela diminuição da temperatura do ambiente. Porém, a redução do teor de água em sementes recalcitrantes não tem se mostrado eficiente como, por exemplo, em sementes de espécies de *Eugenia*, tornando necessário armazená-las com alto teor de água, mas ainda insuficientes para a germinação (Marcos Filho 2005; Kohama *et al.* 2006; Delgado & Barbedo 2007; Oliveira *et al.* 2011). 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). Dessa forma, a vida curta de sementes recalcitrantes causa sérios problemas para a conservação de germoplasma dessas espécies a longo prazo (Castro *et al.* 2004).

Segundo Pammenter *et al.* (1994) a perda da viabilidade das sementes recalcitrantes é consequência dos danos ligados ao metabolismo germinativo que, simulando uma condição de germinação muito lenta, culminaria com a falta de água livre suficiente para os processos de divisão e expansão celular. A manutenção dessa intensa atividade requer, provavelmente, elevadas taxas respiratórias e grande consumo de reservas. Durante o período no qual as sementes mantêm intensa atividade, mas não completam a germinação, o metabolismo pode ser desordenado, com consumo de reservas e liberação de radicais livres, ambas as atividades prejudicando a conservação da viabilidade das sementes durante o armazenamento e, conseqüentemente, favorecendo sua rápida deterioração (Barbedo & Marcos Filho 1998; Ferreira & Borghetti 2004; Andréo *et al.* 2006; Berjak & Pammenter 2008).

A necessidade de manter essas sementes úmidas favorece, também, a proliferação de microrganismos, principalmente os fungos, acelerando consideravelmente a velocidade de deterioração (Kohama *et al.* 2006; Fonseca & Freire 2003; Toledo & Marcos Filho 1977; Marcos Filho 2005; Oliveira 2011).

O armazenamento úmido favorece o desenvolvimento e a manutenção da viabilidade de fungos tradicionalmente classificados como fungos de campo. Estes, quando as sementes são armazenadas secas, normalmente perdem sua viabilidade ao longo do armazenamento, enquanto que os classificados como fungos de armazenamento podem aumentar sua incidência (Christensen 1972; Calistru *et al.* 2000; Marcos Filho 2005). Os fungos de campo necessitam, para o seu crescimento, de elevada umidade relativa do ar (90-95%), ou seja, em ambiente no qual o teor de água das sementes situa-se entre 20% e 25%; em umidade relativa do ar mais baixa tais fungos tem seu crescimento paralisado (Sauter *et al.* 1992). Christensen & Kaufmann (1965) verificaram que os fungos dos gêneros *Fusarium* e *Helminthosporium* desapareceram dos grãos em poucos meses em condições de baixa umidade, porém Wetzal *et al.* (1987) constataram que o fungo *Phomopsis* sp. sobreviveu por três anos em sementes de soja armazenadas a 10 °C e 25% UR. Em sementes recalcitrantes de *Inga vera* Willd. Subsp. *Affinis* (DC) T.D. e *Eugenia* spp., por outro lado, a elevada incidência de *Fusarium* sp. durante o armazenamento diferiu do comportamento típico das sementes ortodoxas (Oliveira *et al.* 2011). Berjak (1987) considera que os fungos de campo, como *Fusarium* sp., podem perder a competição com os fungos de armazenamento, xerotolerantes, como *Penicillium* sp. Esta 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 mais significativos fatores nesse processo, principalmente quando os inóculos estão presentes nos tecidos das sementes desde o início.

Berjak (1996) considera que a deterioração das sementes oferece condições para os fungos se proliferarem e que, além disso, a própria micota pode intensificar a taxa de deterioração das sementes. Dessa forma, ambos os fatores poderiam estar simultaneamente envolvidos e a remoção da principal fonte de inóculo poderia propiciar o aumento da longevidade das sementes recalcitrantes, como foi constatado por Calistru *et al.* (2000). Segundo aquela autora, sementes de *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. foram extremamente suscetíveis a *Fusarium moniliforme* e tiveram a viabilidade ampliada em armazenamento quando foram desinfestadas com fungicidas.

Os patógenos podem se associar externamente e internamente à semente, mas podem também acompanhar a semente aderidos a detritos vegetais e partículas de solo. No caso de

associação interna, os fungos podem estar presentes na casca, no endosperma, no embrião ou sob o tegumento, causando a destruição dos cotilédones. Apresentam maiores chances de sobrevivência por ficarem protegidos contra a maioria dos tratamentos que controlam, com eficiência, os patógenos de sementes transmitidos externamente (Santos *et al.* 2000). O estudo da incidência e frequência dos fungos sobre as sementes e a avaliação do seu potencial de patogenicidade são de fundamental importância, pois podem fornecer subsídios para a determinação de modelos epidemiológicos, para a produção de mudas e para o armazenamento das sementes (Santos *et al.* 1997).

A atuação dos fungos na deterioração durante o armazenamento de sementes recalcitrantes tem sido foco de alguns trabalhos nos últimos anos (Mycock & Berjak 1990, 1995; Pongapanich 1990; Singh & Singh 1990; Berjak 1996; Calistru *et al.* 2000; Sutherland *et al.* 2002; Oliveira 2011). Tem-se verificado que os fungos podem depreciar a qualidade das sementes ocasionando: 1) a perda do poder germinativo pela colonização do embrião; 2) a descoloração e apodrecimento, com reflexos tanto na viabilidade como no valor comercial e nutritivo das sementes; 3) o aumento da presença de ácidos graxos, provocando a rancificação de óleos; 4) o aquecimento da massa de sementes, com o consequente aumento da taxa respiratória e a deterioração mais rápida das sementes (Machado 1988). Também podem ser provocados danos à plântula, como podridão radicular, tombamento, manchas necróticas em folhas, caules e frutos, deformações com hipertrofias e subdesenvolvimento, descoloração de tecidos e infecções latentes (Neergaard 1979).

Dessa maneira, os patógenos não afetam somente a semente ou o crescimento das plântulas, mas infectam a planta sistematicamente, reduzindo seu vigor (Padulla 2006). Todos esses danos causam redução drástica da produção de mudas em viveiros e aumento dos custos de reflorestamento (Sales 1992).

Uma das maneiras de manter ou melhorar a qualidade sanitária da semente, evitando a disseminação de microrganismos patogênicos e controlando a transmissão de fungos por sementes, é o tratamento de sementes (Mendes *et al.* 2001). Segundo Menten (1995), as três modalidades de controle dos patógenos de sementes são: 1) químico, que consiste da incorporação de produtos químicos sintéticos às sementes; 2) físico, que consiste em expor as sementes à ação do calor ou de outro agente físico controlado; 3) biológico, método baseado na incorporação de organismos antagonistas às sementes. O controle químico tem sido a forma mais comumente utilizada (Mendes *et al.* 2001), mas sempre com riscos ambientais. Dentre estes, pode-se citar a contaminação ambiental, a resistência de patógenos, o

desequilíbrio biológico, a eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade (Bettiol & Ghini 2003).

Além da falta de produto registrado para o tratamento de sementes de espécies florestais, muitos desses produtos químicos têm também o potencial de se tornarem tóxicos às sementes e plântulas emergentes. Portanto, há necessidade de pesquisa voltada ao desenvolvimento métodos alternativos para o tratamento de sementes e o controle de doenças. Dentre eles, os tratamentos físicos, como a termoterapia (em água quente) e o condicionamento osmótico (em soluções de potencial hídrico controlado), poderiam controlar os patógenos, mas dependem do conhecimento da sensibilidade diferencial a tais estresses (térmico ou hídrico) entre a semente e o patógeno (Nameth 1998; Menten 1995; Santos & Parisi 2004).

O tratamento térmico baseia-se no efeito das temperaturas elevadas sobre a atividade celular dos patógenos, sendo que o mecanismo mais provável responsável pela morte em altas temperaturas seja a desnaturação de proteínas e enzimas, importantes para o metabolismo celular. A maioria dos microrganismos fitopatogênicos apresenta ponto térmico letal a temperaturas na faixa entre 45 a 60 °C (Cochrane 1958; Deverall 1965), como foi observado por Tanaka *et al.* (2003) para *Colletotrichum acutatum* Simmonds, *C. fragariae* Brooks, *C. lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Br. & Cav., *Pythium* sp., *Phytophthora cactorum* (Leb & Cohn) Schroet., *Diaporthe phaseolorum* (Cke. & Ell.) Sacc. f. sp. *meridionales* Morgan-Jones, *Fusarium* spp., *F. subglutinans* Nelson *et al.* f. sp., *F. solani* (Mart.) Sacc., *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium rolfsii* Sacc. e *Verticillium dahlia* Kleb.

O condicionamento osmótico como método para controle de fungos, por sua vez, tem sido analisado mais recentemente. A técnica do armazenamento das sementes em soluções osmóticas foi utilizada para sementes recalcitrantes de *Inga vera* (Andréo *et al.* 2006), mas com o objetivo de reduzir o metabolismo intenso e desordenado dos embriões por meio da regulação da mobilização da água. De acordo com Marcos Filho (2005), para sementes ortodoxas a hidratação controlada promove a atividade de mecanismos de reparo das membranas e de componentes da estrutura celular, com redução da liberação de exsudados durante a embebição e, conseqüentemente, menor ocorrência de microrganismos associados às sementes. Esse método poderia, portanto, auxiliar no controle de patógenos, uma vez que a atividade da água e o seu potencial hídrico podem determinar o comportamento dos diferentes fungos (Hopkins & Mcquilken 2000). Segundo Cochrane (1958), a tolerância à elevada pressão osmótica é específica, sendo que a maioria dos fungos cessa o crescimento ou são marcadamente inibidos nessas condições.

A associação dos dois tratamentos, térmico e osmótico, poderia ampliar ainda mais a diversidade e eficiência de tratamentos alternativos aos químicos, em sementes. Essa combinação foi analisada em sementes de espécies de *Eugenia* (Oliveira 2011), constatando-se que o controle exercido pelo tratamento osmótico sobre a incidência dos fungos não necessita exposição prolongada e pode ser associado eficientemente ao tratamento térmico, desde que este não exceda a 65 °C. Segundo Edney & Burchill (1967), a falta de proteção residual contra a recontaminação por patógenos oportunistas e injúrias promovidas no hospedeiro representa a maior limitação ao uso de termoterapia, o que também foi observado para o tratamento osmótico (Oliveira 2011; Oliveira *et al.* 2011).

1.1. Fungos em sementes de espécies florestais

Os fungos são organismos heterotróficos, que se alimentam a partir de matéria orgânica inanimada ou atuam como parasitas de organismos vivos. Como saprófitos, decompõem resíduos complexos de plantas e animais em substâncias químicas mais simples que retornam ao solo e favorecem sua fertilidade (Ernest *et al.* 2003). Dos microrganismos que se associam às sementes, os fungos representam o maior grupo, seguido das bactérias e, em menor proporção, dos vírus e nematoides (Richardson 1979; Machado 1988).

Os fungos dos gêneros *Fusarium*, *Phomopsis*, *Helminthosporium*, *Rhizoctonia*, *Colletotrichum* e *Cilindrocladium* são responsáveis por mais de 90% de perda de sementes germinadas e no estágio de plântulas das plantas cultivadas (Neergaard 1977). Já em sementes florestais, tem-se verificado correlação positiva entre o índice de sementes mortas e a porcentagem de fungos incidentes (Santos *et al.* 1997; Parisi *et al.* 2005). Particularmente nas recalcitrantes, a sobrevivência e a proliferação dos fungos são favorecidas devido à elevada temperatura e umidade (Sutherland *et al.* 2002). Em geral, a população fúngica de sementes das essências florestais investigada é constituída por espécies de fungos muito comuns em sementes como saprófitos externos (Carvalho & Muchovej 1991).

Vários autores, avaliando sementes de diferentes espécies florestais, constataram a incidência de fungos como *Alternaria alternata*, *Aspergillus* spp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* spp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma* sp., entre outros (Cherobini *et al.* 2004; Grandis *et al.* 2004; Nascimento *et al.* 2004; Rego *et al.* 2004; Santos *et al.* 2001; Santos *et al.* 2000). Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Botryodiplodia*, *Fusarium*, *Phomopsis* e *Sclerotinia* têm sido relatados em sementes recalcitrantes, contudo poucos trabalhos conseguiram comprovar seus danos devido,

principalmente, a curta longevidade dessas sementes (Parisi 2012). Dentre os gêneros que podem se comportar com fitopatogênicos às espécies florestais estão as espécies de *Fusarium*, consideradas fungos de campo, isto é, que podem infectar as sementes no período de crescimento e maturação, sendo responsáveis pelo tombamento tanto de pré como de pós-emergência das plântulas (Carvalho & Muchovej 1991; Booth 1971; Carneiro 1986; Soave & Wetzel 1987).

Fungos do gênero *Fusarium* têm a capacidade de produzir uma variedade de micotoxinas, dentre elas o ácido fusárico. Este fungo sobrevive no solo, sendo transmitido por várias vias de disseminação, sobrevivendo em impurezas associadas às sementes, estruturas de plantas e em restos de cultura. Dessa forma, este fungo se desenvolve nessas estruturas, causando doenças e o seu controle torna-se difícil e, muitas vezes, impossibilitado, devido à sua agressividade na produção de enzimas hidrolíticas como celulases, xilanases, pectinase, amilases e lipases (Machado 2002). *Fusarium* spp. causa dano em plântulas de *Pinus*, *Stryphnodendron adstringens* Mart. (barbatimão), *Anadenanthera macrocarpa* Benth. (angico vermelho), *Copaifera langsdorffii* Desf. (copaíba) e *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr.All.ex Benth. (jacarandá da Bahia) (Homechin *et al.* 1986; Sales 1992; Mesquita 1999). Esse fungo tem, também, apresentando alta incidência em sementes recalcitrantes, como *Inga vera*, *Avicennia marina* e *Eugenia* spp. (Parisi 2012; Anguelova-Merhar 2003; Lisbôa-Padulla *et al.* 2010; Oliveira *et al.* 2011; Oliveira 2011)

Parisi (2012) e Oliveira (2011) também relataram incidência de *Aspergillus* e *Penicillium* em sementes de *Inga vera* e *Eugenia* spp. Esses fungos também apresentaram elevada incidência em sementes de *Zollernia ilicifolia* Vog. (pau-santo), *Plathymenia reticulata* Benth. (vinhático-do-campo), *Cassia* sp. (canafístula) e *Tabebuia* sp. (ipê) (Carneiro 1990). A presença desses fungos prejudica a qualidade das sementes com a queda de sua viabilidade (Carneiro 1990). Bajpai & Patil (1997) e Pinto (2003) destacam que as espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* têm a capacidade de produzir enzimas extracelulares sobre diversos substratos, destacando-se as lipases, proteases, amilases, pectinases, tanases e lacases.

Pestalotiopsis é outro fungo encontrado em associação com sementes de espécies florestais, como em *Eugenia* spp., *Caesalpinia echinata* (pau-brasil), *A. macrocarpa* (angico vermelho), *Copaifera langsdorffii* (copaíba), *Dalbergia nigra* (jacarandá da Bahia) e *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira pimenteira). É altamente patogênico para as sementes e as plântulas, causando podridão na semente, podridão de raiz, redução na altura e definhamento de plântulas sobreviventes (Mesquita 1999; Dhingra *et al.* 2002; Botelho *et al.* 2008; Lisbôa-Padulla *et al.* 2010; Oliveira 2011). *Pestalotiopsis maculans*, por exemplo, foi descrito em folhas de pau-brasil, causando lesões (Mendes & Muchovej 1991)

e *Pestalotiopsis* sp. como agente causal de podridões de sementes em condições inadequadas de armazenamento (Santos *et al.* 2001).

Cladosporium cladosporioides tem sido detectado com frequência e em alta incidência em sementes de espécies nativas, sendo que esse fungo pode ser responsável pela descoloração das sementes e redução na germinação (Faiad *et al.* 2004; Lisbôa-Padulla *et al.* 2004; Botelho 2006). *Alternaria alternata* provoca desfolha e curvatura de ponteiros em coníferas. *Phoma* sp. e *Phomopsis* sp. podem estar associados à diminuição do poder germinativo em *Larix* spp., *Picea* spp. e *Pinus* spp. e causam dano em plântulas de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson (ipê amarelo), *Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl. (ipê roxo), *A. macrocarpa* (angico vermelho), *S. adstringens* (barbatimão), *D. nigra* (jacarandá da Bahia) (Carneiro 1986; Mesquita 1999; Coelho & Castro 1996; Sales 1992; Martins 1991). *Colletotrichum* sp. causa dano em plântulas de angico vermelho, copaíba, jacarandá da Bahia e pau-Brasil (Mesquita 1999; Lisbôa-Padulla *et al.* 2010). Hellwig & Ueno (2009) relatou que *Colletotrichum gloeosporioides* está associado à seca de ramos e à antracnose em frutos de *Acca sellowiana* Berg. (goiaba-serrana). Espécies do gênero *Colletotrichum* podem produzir as enzimas pectinases e poligalacturonases, responsáveis pelo ataque à pectina, presente em folhas e frutos das plantas (Herbert *et al.* 2004).

Desse modo, a alta variabilidade de fungos presentes nas sementes das espécies nativas, somada a sua diversidade de comportamentos diante do armazenamento, torna imprescindível que os estudos de sanidade sejam aliados aos de armazenamento, propiciando assim a conservação *ex situ*.

1.2. *Eugenia* spp.

A família Myrtaceae compreende cerca de 100 gêneros e 3.500 espécies de árvores e arbustos que se distribuem por todos os continentes, à exceção da Antártica, mas com nítida predominância nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Barroso 1991; Marchiori & Sobral 1997). Representada por aproximadamente 1.000 espécies, Myrtaceae é uma das famílias mais importantes do Brasil (Landrum & Kawasaki 1997) destacando-se, com mais de uma centena de espécies, os gêneros *Eugenia*, *Myrcia* e *Calyptanthus*, enquanto o restante dos gêneros possui menos de 60 espécies brasileiras (Barroso & Perón 1994; Landrum & Kawasaki 1997)

Myrtaceae é uma das famílias lenhosas dominantes em várias formações vegetais brasileiras, especialmente na floresta atlântica onde mais de 50 espécies podem ocorrer endemicamente (Peixoto & Gentry 1990; Landrum & Kawasaki 1997; Tabarelli & Mantovani 1999; Oliveira Filho & Fontes 2000; Guilherme *et al.* 2004). Este gênero possui também espécies interessantes para programas de recuperação de áreas degradadas e de preservação permanente, por terem frutos amplamente consumidos pela avifauna, que auxiliam na dispersão das sementes (Lorenzi 1992), também possuem características adequadas ao uso na arborização urbana (Correa 1975; Silva *et al.* 2001) e, ainda, valor comercial, nutritivo e potencial de aproveitamento na obtenção de fármacos (Donadio 1997; Silva *et al.* 2003). Espécies como a *Psidium guajava* Lam. (goiabeira), *Eugenia uniflora* Lam. (pitangueira) e a *Myciaria cauliflora* Berg. (jabuticabeira), por exemplo, são utilizadas na fruticultura, devido à qualidade de suas frutas e adaptação a algumas condições de clima subtropical (Donadio & Moro 2004).

Muitas espécies de *Eugenia* de importância ecológica e com potencial de exploração comercial apresentam baixa densidade de ocorrência. Tal fato dificulta a obtenção de sementes em quantidade que permita a produção de mudas em larga escala, seja para aproveitamento comercial, com o plantio de pomares de produção de frutas, seja para aproveitamento em programas de repovoamento vegetal (Silva *et al.* 2005). Diversas espécies arbóreas nativas, com grande potencial de utilização na arborização urbana e reflorestamentos, têm seu uso limitado em função da carência de informações técnicas sobre o manejo de suas sementes, como é o caso de algumas espécies de *Eugenia*, tais como *Eugenia involucrata* DC. (cerejeira-do-mato), *Eugenia uniflora* L. (pitangueira), *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixameira), *Eugenia pyriformis* Cambess (uvaieira), entre outras (Barbedo & Marcos Filho 1998).

Algumas espécies estão desaparecendo da natureza antes mesmo que se tenha conhecimento básico de sua biologia (Landrum & Kawasaki 1997), como pode ser visto pelas listas de espécies de Myrtaceae ameaçadas no Brasil, onde são listadas 40 espécies, sendo nove do gênero *Eugenia*. Também são apontadas oito espécies de Myrtaceae que são consideradas presumivelmente extintas, apenas no estado de São Paulo (Biodiversitas 2012).

Dados relativos ao comportamento das sementes de *Eugenia* indicam que elas pertençam à categoria das recalcitrantes, ou sensíveis à desidratação e, consequentemente, com baixa longevidade (Delgado & Barbedo 2007). Quando dispersas, essas sementes têm teor de água em torno de 35-70%, conforme o observado por diversos autores para *E. involucrata* DC., *E. stipitata* ssp. *Sororia* McVaugh, *E. brasiliensis* Lam., *E. pyriformis* Cambess., *E. dysenterica* DC., *E. cerasiflora* Miq., *E. umbelliflora* Berg, *E. pleurantha* O.Berg e *E. rostrifolia* D.Legrand.

As sementes recalcitrantes apresentam baixa viabilidade no armazenamento, o que causa sérios problemas para a conservação de germoplasma dessas espécies, inviabilizando a conservação *ex situ*, ou seja, fora de seu habitat natural (Castro *et al.* 2004; Botanic Gardens Conservation International 2001). Para fornecer novas informações sobre espécies deste gênero, neste trabalho foram utilizadas duas espécies de *Eugenia*, *E. uniflora* Lam. (pitangueira) e *E. brasiliensis* Lam. (grumixameira).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito de tratamentos térmicos e osmóticos, quando isolados e associados, no controle dos fungos e avaliar os efeitos da reaplicação desses tratamentos sobre o potencial de armazenamento das sementes. Para tanto foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar os efeitos dos tratamentos térmicos e osmóticos no controle da micota em sementes de Myrtaceae;
- Avaliar o efeito da reaplicação dos tratamentos sobre a qualidade fisiológica e controle da micota nas sementes de Myrtaceae;
- Estabelecer relação entre a qualidade fisiológica e sanitária no processo de deterioração das sementes de Myrtaceae.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta dos frutos e extração das sementes

Os frutos de *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixameira) e *Eugenia uniflora* Lam. (pitangueira) foram obtidos nos meses de novembro/dezembro e janeiro, respectivamente, de 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 das sementes foi realizado através da extração manual da polpa e eliminação de sementes danificadas por insetos e imaturas, conforme descrito por Kohama *et al.* (2006). Em seguida as sementes foram armazenadas em sacos de polietileno, em câmara fria a 7°C (Kohama *et al.* 2006), até a instalação dos experimentos, não ultrapassando 15 dias.

3.2. Determinações físicas e fisiológicas e avaliação da sanidade das sementes

As sementes foram analisadas quanto ao teor de água, conteúdo de massa seca, potencial hídrico, germinação, capacidade de produção de plântulas normais, sanidade e taxa respiratória.

O teor de água e o conteúdo de massa seca foram determinados gravimetricamente, pelo método de estufa com circulação de ar a 103 °C por 17h (Ista 1985), sendo os resultados apresentados em porcentagem, em base úmida, para teor de água e em mg.semente⁻¹, para massa seca (Brasil 2009).

O potencial hídrico foi medido, em sementes seccionadas ao meio, por meio de potenciômetro WP4 (Decagon Devices, Pullman, EUA), baseando-se na temperatura do ponto de orvalho do ar em equilíbrio com a amostra examinada, conforme metodologia descrita por Delgado & Barbedo (2012), sendo os resultados apresentados em MPa (Decagon 2001).

O teste de germinação foi conduzido em rolos de papel Germitest, com duas folhas para a base e uma para a cobertura, previamente umedecidos com água até a saturação, porém sem excesso (Brasil 2009). Os rolos foram acondicionados em câmaras de germinação, reguladas à 25°C, com luz contínua e 100% de umidade relativa do ar, utilizando-se quatro repetições de 12 sementes. As avaliações foram realizadas a cada três dias durante setenta dias, registrando-se as sementes que emitiram raiz primária, consideradas germinadas, e as que formaram plântulas normais (Silva *et al.* 2003; Kohama *et al.* 2006; Delgado & Barbedo 2007).

A avaliação da micota das sementes foi realizada pelo método de incubação em papel de filtro (Brasil 2009). As sementes foram distribuídas equidistantemente em placas de Petri, contendo três folhas de papel de filtro umedecidas com água destilada e foram então incubadas por sete dias a 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, utilizando-se quatro repetições de 12 sementes. A identificação e contagem dos fungos foi realizada 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.

A taxa respiratória, ou seja, o consumo de oxigênio (O_2) e a produção de dióxido de carbono (CO_2), foi determinada por meio de analisador modelo ILL6600 (Illinois Instruments, Inc., Johnsburg, EUA), segundo metodologia descrita por Lamarca (2009). A porcentagem de O_2 e CO_2 no ar do recipiente de incubação das sementes foi obtida por sensores à base de óxido de zircônio (ZrO_2) para o O_2 e infravermelho para o CO_2 . As amostras de sementes foram acondicionadas em embalagens de vidro de 600mL, hermeticamente fechados, com orifícios recobertos por septo de borracha, onde foram inseridos os eletrodos do equipamento para a tomada da amostra de ar das embalagens. Antes da introdução das sementes nas embalagens, foi determinada sua massa fresca e seca total (g). O volume total do ar das embalagens foi determinado segundo o princípio da hidrostática para que se calcule o volume resultante do ar depois de descontado o volume ocupado pelas sementes.

O fechamento das embalagens foi determinado como sendo o início do experimento, o tempo zero correspondendo à atmosfera normal (21% de oxigênio e 0,03% de dióxido de carbono). O consumo de O_2 e a produção de CO_2 pelas sementes foi estimado pela diferença entre os valores medidos e os da atmosfera normal. Após cada medida, as embalagens foram abertas por alguns minutos para reequilíbrio com a atmosfera normal sendo, em seguida, novamente fechadas para a continuidade do experimento. Considerando-se a pressão atmosférica local em atm, os valores obtidos em porcentagem de O_2 ou de CO_2 foram convertidos para pressão parcial do gás, segundo a fórmula $p_1/P = v_1\%/V\%$ (Feltre 1982), sendo:

p_1 = pressão parcial do gás (em atm);

P = pressão atmosférica local;

$v_1\%$ = 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 O_2 e de CO_2 , pela equação de Clapeyron, $pV=nRT$, sendo:

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

n = número de moles do gás

R = constante universal dos gases perfeitos ($0,082 \text{ atm.L.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$)

T = temperatura (em Kelvin)

Baseando-se em experimentos prévios da média de consumo diário de O_2 e de liberação de CO_2 pelas sementes de *E. uniflora* e *E. brasiliensis*, as avaliações foram realizadas com intervalo de três dias. Os valores obtidos nas avaliações foram somados e divididos pela massa seca total da amostra de sementes e pelo número de dias em que as sementes permanecerem 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 CO_2 pelo obtido para consumo de O_2 ($\text{QR}=\text{CO}_2.\text{O}_2^{-1}$), ambos em $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$, segundo descrito por Kader & Saltveit (2002).

Após a avaliação da taxa respiratória as sementes foram analisadas pelo teste de tetrazólio, sendo categorizadas pela coloração em viáveis, deterioradas e inviáveis, quando róseo, vermelho intenso e a cor natural, respectivamente. Baseando-se em resultados prévios (dados não apresentados), as sementes foram seccionadas ao meio e incubadas em solução de cloreto 2,3,5 trifenil tetrazólio, a 35°C sob ausência de luz, com concentração e período de exposição variando de acordo com a espécie. As sementes ficaram imersas em solução de tetrazólio de 0,125%, para *E. uniflora*, e 0,250%, para *E. brasiliensis*, durante três horas.

3.3. Tratamentos de controle da incidência fúngica

Foram empregados dois tratamentos térmicos e dois osmóticos, sendo que cada tratamento foi aplicado isoladamente e também associando-se cada térmico a cada osmótico. Após a aplicação dos tratamentos, as sementes foram armazenadas em sacos de polietileno, em câmara fria a 7°C (Kohama *et al.* 2006) por 30 dias. Após esse período as amostras de sementes de cada tratamento foram divididas em duas sub-amostras, sendo que uma foi

armazenada por novo período de 30 dias e a outra foi submetida à reaplicação do tratamento que havia recebido inicialmente, sendo armazenada em seguida por 30 dias.

Os binômios tempo-temperatura, nos tratamentos térmicos, e do potencial hídrico, nos tratamentos osmóticos, foram escolhidos baseando-se em resultados anteriores dos tratamentos mais eficientes no controle da flora fúngica associada às sementes e na manutenção das porcentagens de germinação e de desenvolvimento de plântulas normais em valores superiores a 50% (Delgado & Barbedo 2007; Oliveira 2011; Oliveira *et al.* 2011).

As sementes foram submetidas a tratamento térmico conforme metodologia apresentada por Oliveira (2011), visando a otimização dos resultados obtidos para o tratamento da incidência de fungos. Para tanto, as amostras de sementes foram imersas em água destilada em béquer de vidro e acondicionadas em estufa com circulação de ar regulada para diferentes temperaturas e períodos: 55°C durante 30 minutos e 55°C durante 150 minutos, para *Eugenia brasiliensis*; 55°C e 60°C durante 120 minutos, para *Eugenia uniflora*. As sementes foram retiradas previamente do armazenamento a 7 °C até aclimatarem com a temperatura ambiente e foram então pré-aquecidas, por 20 minutos, a temperatura de 5-6 °C abaixo da temperatura do tratamento. Foi utilizada proporção de 1:5 entre o peso das sementes e o peso da água do tratamento e foi realizada agitação da água periodicamente. Ao término do período de exposição, as sementes foram resfriadas com água destilada e depositadas sobre papel de filtro, à temperatura ambiente, para retirada do excesso de água superficial.

Para o tratamento osmótico as amostras de sementes foram armazenadas por sete dias em soluções de polietilenoglicol (PEG 6000), com os potenciais hídricos de -3,4 MPa e -4,0 MPa, em caixas tipo gerbox a 7°C. Após os tratamentos osmóticos, as sementes foram lavadas em água destilada até que a solução fosse retirada da superfície das sementes, que foram em seguida armazenadas em sacos de polietileno e em câmara fria a 7°C.

As soluções osmóticas foram preparadas baseando-se em concentrações e temperaturas descritas por Michel & Kauffmann (1973), aferidas em equipamento WP4, Decagon (Pullmann, USA).

Os controles foram representados pela amostra de sementes que não recebeu tratamento, denominada testemunha, e pela amostra de sementes tratada com o produto carbendazin + tiram (produto comercial Derosal Plus), com ação de contato e sistêmica, na dose recomendada pelo fabricante e adotada em trabalhos anteriores: 300 ml/1000 kg de sementes. O fungicida serviu como referência para os resultados obtidos nos demais

tratamentos, uma vez que sua eficiência em relação à redução da incidência de fungos nas espécies trabalhadas tem sido próxima de 100% (Oliveira 2011).

3.4. Delineamento experimental e tratamento estatístico dos dados

O delineamento experimental para todos os experimentos foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições, em esquema fatorial 3 x 3 x 2, associando-se tratamento térmico, tratamento osmótico e reaplicação de tratamentos. Assim, para *Eugenia brasiliensis* o fatorial foi representado pela associação de três níveis de tratamento térmico (representados pelos períodos de zero, 30 minutos e 150 minutos, fixando-se a temperatura em 55°C), três níveis de tratamento osmótico (representados pela ausência de tratamento, -3,4 MPa e -4,0 MPa) e dois níveis de reaplicação (com ou sem). Já para *E. uniflora*, no fatorial substituíram-se os níveis de tratamento térmico pela variação de temperatura (55°C e 60°C, fixando-se o período em 120 minutos). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (teste F), ao nível de 5% de probabilidade, com comparação das médias das variáveis físicas e fisiológicas pelo teste de Tukey (Santana & Ranal 2004). Para os resultados de sanidade, foi utilizado o desvio padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ação de fungos acelerando a deterioração ou reduzindo o vigor de sementes recalcitrantes (sensíveis à dessecação) durante o armazenamento foi demonstrada para algumas espécies (Mycock & Berjak 1990; Mycock & Berjak 1995; Berjak 1996; Calistru *et al.* 2000; Anguelova-Merhar 2003). Verificou-se que o armazenamento obrigatoriamente úmido dessas sementes favorece o desenvolvimento de fungos tradicionalmente classificados como fungos de campo que, em sementes ortodoxas (tolerantes à dessecação), normalmente perderiam sua viabilidade ao longo do armazenamento. Em sementes de milho (ortodoxas), por exemplo, *Fusarium* sp., *Alternaria alternata* e *Botryodiplodia theobromae*, fungos considerados como típicos de campo, tiveram redução na incidência durante o armazenamento, enquanto que fungos típicos de armazenamento, dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, tiveram aumento (Bankole 1994; Mycock & Berjak 1995). Nas sementes recalcitrantes de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia uniflora* do presente trabalho, tanto *Penicillium* sp. (fungo de armazenamento) quanto *Fusarium* sp. (de campo) foram observados durante todo o armazenamento (Figuras 1A e C, 2A e C).

Foi observada alta diversidade de fungos nas sementes analisadas, sendo constatado na testemunha de *E. brasiliensis* incidência de 71% para *Penicillium* sp., 77% para *Fusarium* sp., 33% para *Cladosporium* sp., 2% para *Botrytis* sp., 6% para *Chaetomium* sp., 13% para *Ceratocystis* sp., 4% para *Pestalotiopsis* sp., 4% para *Phoma* sp., 2% para *Phomopsis* sp. e *Colletotrichum* sp. foi observado apenas após armazenamento. Já para *E. uniflora* foi observada incidência de 4% para *Penicillium* sp., 79% para *Fusarium* sp., 88% para *Cladosporium* sp., 81% para *Botrytis* sp., 4% para *Chaetomium* sp., 27% para *Pestalotiopsis* sp., 21% para *Phoma* sp., 4% para *Phomopsis* sp., 2% para *Colletotrichum* sp., 29% para *Alternaria* sp. e *Ceratocystis* sp. foi observado apenas após armazenamento.

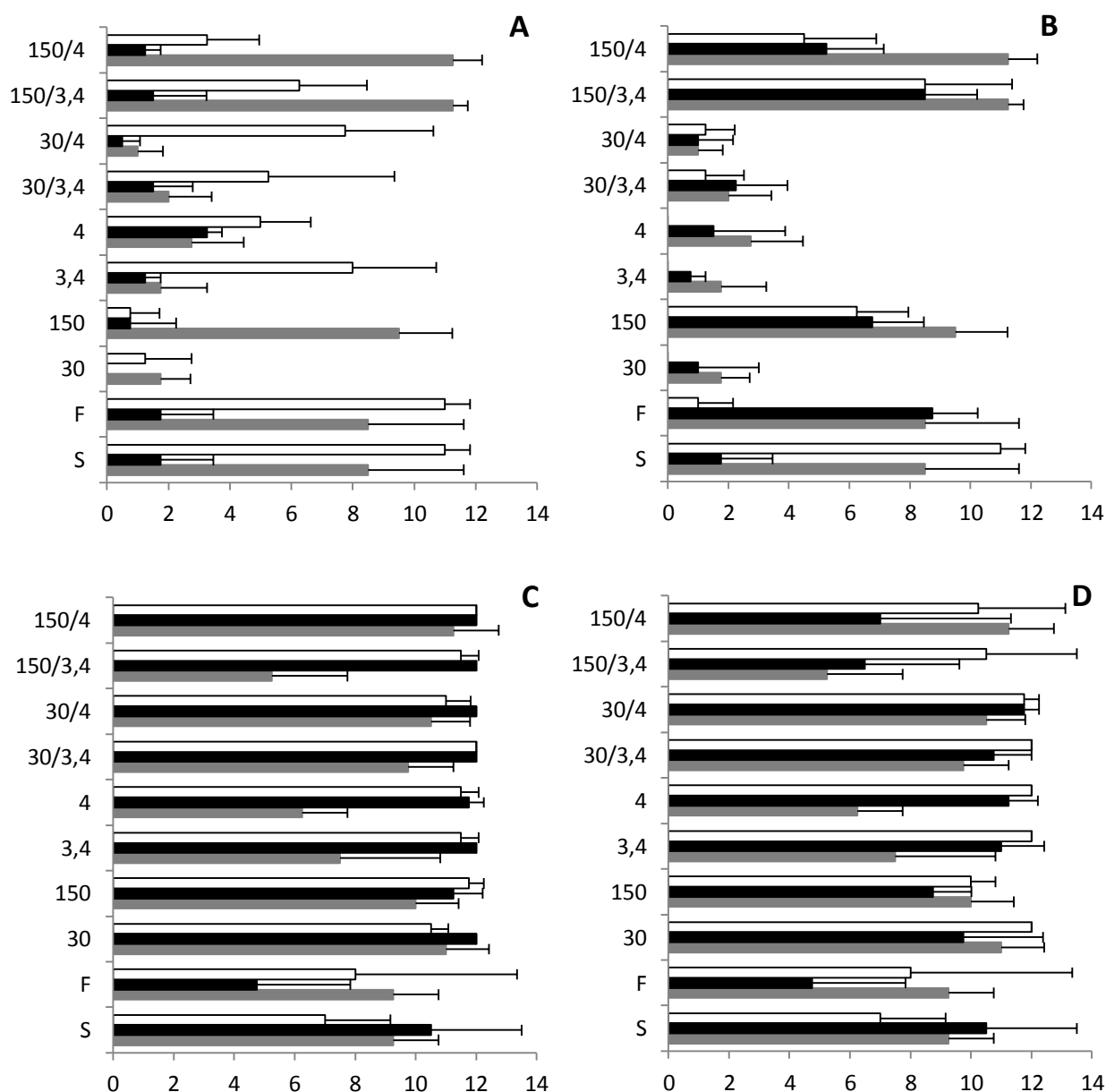


Figura 1. Incidência de *Penicillium* sp. (A e B) e *Fusarium* sp. (C e D) em sementes de *E. brasiliensis* submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/30 minutos (30) e 55°C/150 minutos (150) e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas) e 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A e C) e com a reaplicação dos mesmos (B e D). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão.

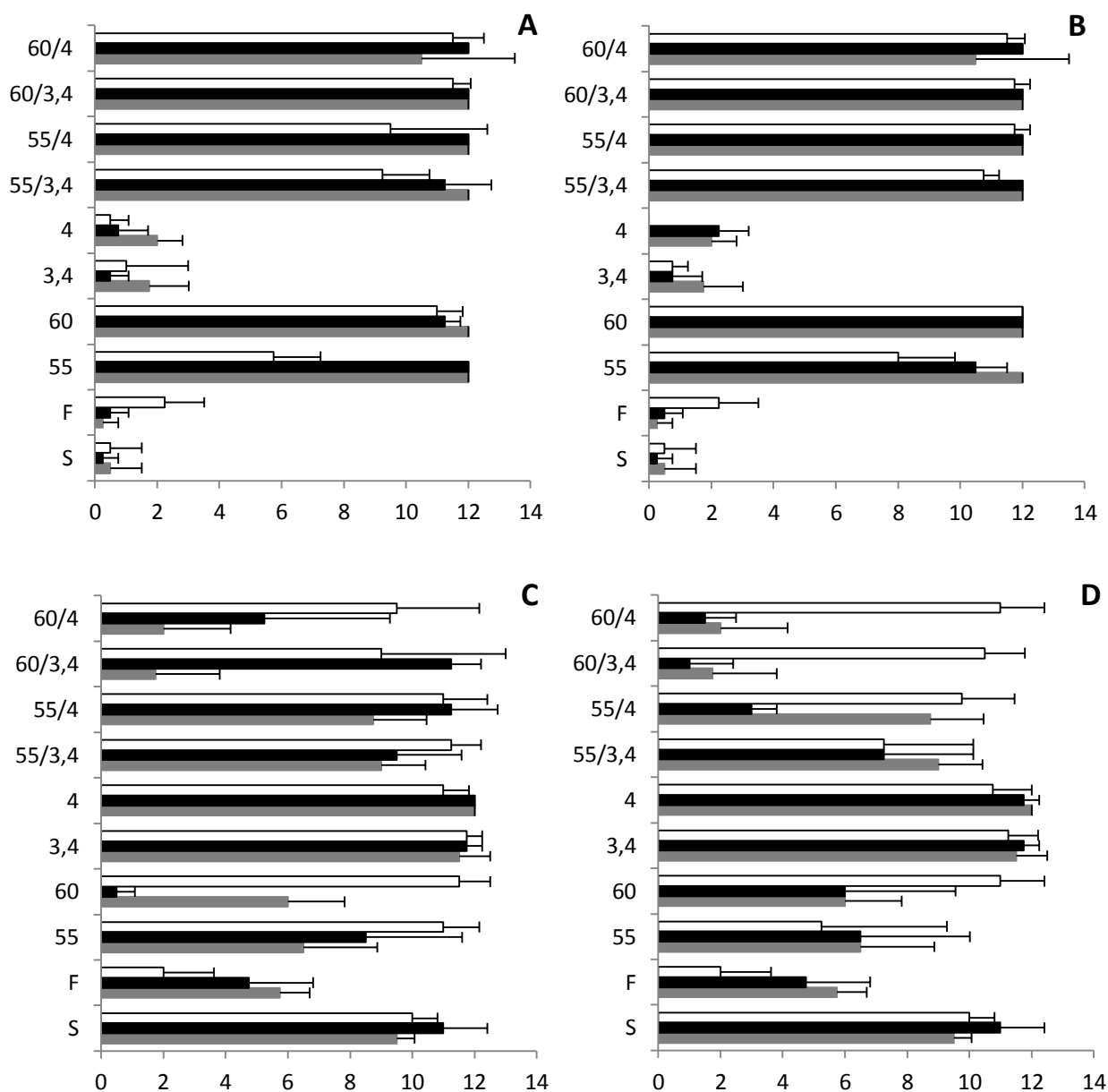


Figura 2. Incidência de *Penicillium* sp. (A e B) e *Fusarium* sp. (C e D) em sementes de *E. uniflora* submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/120 minutos (55) e 60°C/120 minutos (60) e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas) e 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A e C) e com a reaplicação dos mesmos (B e D). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão.

O emprego de fungicidas tem sido a forma mais comumente utilizada no controle de fungos associados às sementes durante o armazenamento, principalmente devido ao seu efeito residual (Mendes *et al.* 2001; Bettiol & Ghini 2003). Sua atuação já foi verificada em sementes recalcitrantes de *Avicennia marina* inoculadas com *Fusarium moniliforme*, que foram extremamente suscetíveis ao fungo, mas tiveram sua viabilidade estendida quando

desinfestadas com o fungicida (Calistru *et al.* 2000). Porém, produtos químicos têm o potencial de tornarem-se tóxicos às sementes e às plântulas emergentes (Nameth 1998), principalmente quando as sementes têm teor de água elevado (Araujo *et al.* 1985). Tal fato pode ter sido observado no presente trabalho em *E. brasiliensis* pois, embora não se tenha verificado diferença significativa nos valores de germinação (Tabela 1) e de formação de plântulas normais (Tabela 2), cerca de 27% das sementes tratadas com o fungicida sistêmico carbendazin + tiram desenvolveram plântulas anormais, fato não observado em quaisquer dos demais tratamentos. Essas plântulas apresentaram raiz grossa de, no máximo, 5mm de comprimento, sem formação de raízes secundárias, ainda que a parte aérea se desenvolvesse. Após 70 dias de avaliação do teste, apenas algumas dessas plântulas conseguiram desenvolver raiz que, ainda assim, era menor em relação às que se desenvolveram normalmente. Contudo, nas sementes de *E. uniflora* não foi observado o desenvolvimento de plântulas anormais. Dessa forma, análises por maiores períodos de armazenamento são necessárias para se obter mais informações a respeito do efeito fitotóxico de fungicidas em sementes recalcitrantes.

Tabela 1. Germinação (%) de sementes de *E. brasiliensis* submetidas a tratamento térmico de 55 °C/30 minutos (30 min.), 55 °C/150 minutos (150 min.) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas a tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). As avaliações foram feitas inicialmente (Inicial) e após armazenamento de 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamento de sementes	Sem Reaplicação			Com Reaplicação				
	STT	30 min.	150 min.	Médias	STT	30 min.	150 min.	Médias
Inicial								
STO	100	96	98	98a				
-3,4 MPa	98	98	98	98a				
- 4 MPa	96	98	100	98a				
Médias	98 A	97 A	99 A					
Coef. var.	4,56%							
Armazenamento de 30 dias								
STO	98 aA _a	96 aA _a	98 aA _a		98 bA _a	100 aA _a	100 aA _a	
-3,4 MPa	94 aA _b	98 aA _a	98 aA _a		73 aA _a	100 aB _a	90 aB _a	
- 4 MPa	92 aA _b	92 aA _a	96 aA _a		79 aA _a	92 aAB _a	94 aB _a	
Coef. var.	8,26%							
Armazenamento de 60 dias								
STO	73	90	92	85 a	73	96	88	84 a
-3,4 MPa	50	58	92	67 a	75	92	77	81 b
- 4 MPa	33	65	90	63 a	67	94	90	83 b
Coef. var.	11,36%							

Tabela 2. Desenvolvimento de plântulas normais (%) de sementes de *E. brasiliensis* submetidas a tratamento térmico de 55 °C/30 minutos (30 min.), 55 °C/150 minutos (150 min.) e sem tratamento térmico (STT.) e submetidas a tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). As avaliações foram feitas inicialmente (Inicial) e após armazenamento de 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamento de sementes	Sem Reaplicação			Médias	Com Reaplicação			Médias	
	STT	30 min.	150 min.		STT	30 min.	150 min.		
Inicial									
STO	79	88	94	87	a				
-3,4 MPa	90	96	94	93	a				
- 4 MPa	94	94	92	93	a				
Médias	88 A	92 A	93 A						
Coef. var.	9,45%								
Armazenamento de 30 dias									
STO	88 aA _a	90 aA _a	94 aA _a	88	bA _a	94 bA _a	94 bA _a		
-3,4 MPa	88 aA _b	94 aA _b	90 aA _a	56	aA _a	77 aB _a	79 abB _a		
- 4 MPa	85 aA _a	85 aA _a	88 aA _b	75	bAB _a	88 aB _a	71 aA _a		
Coef. var.	11,55%								
Armazenamento de 60 dias									
STO	71	90	90	83	a	71	96	73	80 a
-3,4 MPa	46	46	88	60	a	65	75	71	70 a
- 4 MPa	29	60	83	58	a	60	92	71	74 a
Médias	49 A	65 A	87 B			65 A	88 B	72 A	
Coef. var.	21,85%								

Dificuldades no controle com fungicida foram evidenciados por Oliveira *et al.* (2011) em sementes de *Eugenia brasiliensis* tratadas com Vitavax+Thiram que, apesar da redução da incidência de alguns fungos, como *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Cladosporium* sp., após 90 dias de armazenamento apenas as sementes tratadas com fungicida apresentaram elevada incidência de *Botrytis* sp. e *Cladosporium* sp. Oliveira (2011) relatou que o fungicida carbendazin + tiram foi o que apresentou resultados mais satisfatórios no controle e erradicação de fungos associados às sementes e embriões de *Eugenia uniflora* e *Inga vera*, porém não foi eficaz no controle de *Fusarium* sp. dos embriões de *I. vera*. No presente trabalho, o tratamento químico com carbendazin + tiram teve baixo controle sobre *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. (Figuras 1A e C e 2C), mas ainda assim foi o tratamento mais eficiente contra *Fusarium* sp. A dose aplicada do produto e sua formulação, a carga de inóculo do lote e o elevado teor de água das sementes, que dificultaria a adesão do produto, podem estar relacionados à ineficiência de tratamentos químicos (Dhingra 2005; Oliveira 2011).

Diante dos riscos do uso de fungicidas no ambiente, tem-se estudado o uso de tratamentos alternativos, sendo que a termoterapia e o condicionamento osmótico

demonstraram potencial para o controle de patógenos e preservação da capacidade germinativa das sementes (Oliveira 2011; Oliveira *et al.* 2011).

No presente trabalho, observou-se que o tratamento térmico resultou em redução da incidência da maioria dos fungos presentes em sementes de *E. brasiliensis* e *E. uniflora*, exceto *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. e *Chaetomium* sp. (Figuras 1A, 1C e 3A) em *E. brasiliensis*. Para *E. uniflora*, os tratamentos térmicos de 55 e 60 °C chegaram a potencializar a incidência de *Penicillium* sp. (Figura 2A) para até 100% das sementes. O calor destrói facilmente conídios e hifas, porém muitas espécies de fungos produzem esporos termo-resistentes (Splittstoesser 1991). O ponto de morte térmica, definida como a temperatura na qual todas as células são mortas em 10 minutos, foi determinado para os esporos de diversos fungos como sendo 40-60 °C (Ames 1915; Chaudhuri 1923; Cochrane 1932; Cole *et al.* 1956; Tanaka 2003). Já a maioria dos microrganismos fitopatogênicos apresenta ponto térmico letal em temperaturas na faixa entre 45 a 60 °C (Cochrane 1958; Deverall 1965; Civello *et al.* 1997). No entanto, conídios de algumas espécies são muito mais resistentes, como os de *Penicillium* sp. (Williams *et al.* 1941) e os de *Fusarium* sp., o que explica a persistência desses fungo apesar de ter o micélio destruído na termoterapia. A resistência de *Fusarium* sp. aos tratamentos se deve provavelmente à formação de clamidósporos, estruturas de resistência formadas em condições desfavoráveis (Amorim *et al.* 1995).

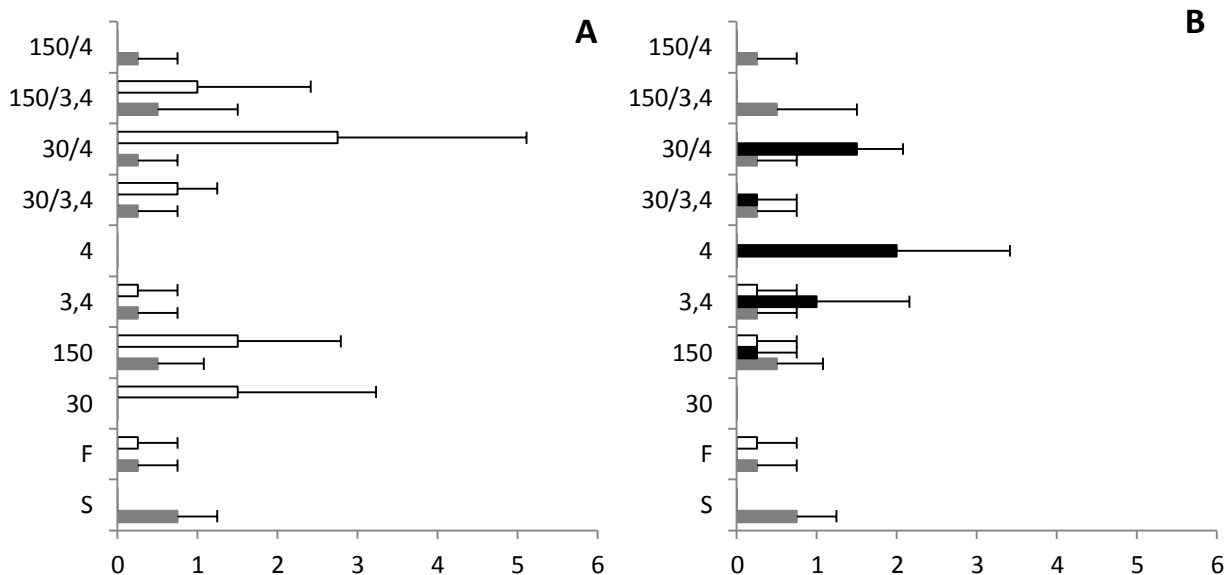


Figura 3. Incidência de *Chaetomium* sp. em sementes de *E. brasiliensis* submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/30 minutos (30) e 55°C/150 minutos (150) e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas) e 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A) e com a reaplicação dos mesmos (B). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram

analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão.

Os fungos observados no presente estudo apresentaram comportamentos diversos diante do tratamento osmótico. A tolerância à elevada pressão osmótica é específica, sendo que a maioria dos fungos cessa o crescimento ou são marcadamente inibidos nessas condições (Cochrane 1958), porém os fungos tolerantes à baixa umidade são também em geral tolerantes à alta pressão osmótica no meio de germinação (Fukuda *et al.* 1954; Hawkins 1916; Klaus 1941). Em *E. brasiliensis*, o potencial de -4 MPa zerou a incidência de *Botrytis* sp. (Figura 4A), enquanto o de -3,4 MPa potencializou seu desenvolvimento. Em *E. uniflora*, o tratamento osmótico só reduziu sua incidência inicialmente (Figura 4C). O oposto ocorreu em *E. brasiliensis* para *Colletotrichum* sp. (Figura 5A), para o qual -3,4 MPa reduziu a incidência e -4 MPa potencializou-a. Para *E. uniflora* os dois tratamentos osmóticos mantiveram baixa a incidência de *Colletotrichum* sp. (Figura 5C) e levaram ao aumento da incidência de *Chaetomium* sp. (Figura 6A). Em *E. uniflora* o tratamento osmótico reduziu a incidência, mas foi menos eficiente do que o tratamento térmico, no controle de *Alternaria* sp. (Figura 6C). Dessa forma, para esses fungos o controle com a termoterapia foi mais eficiente.

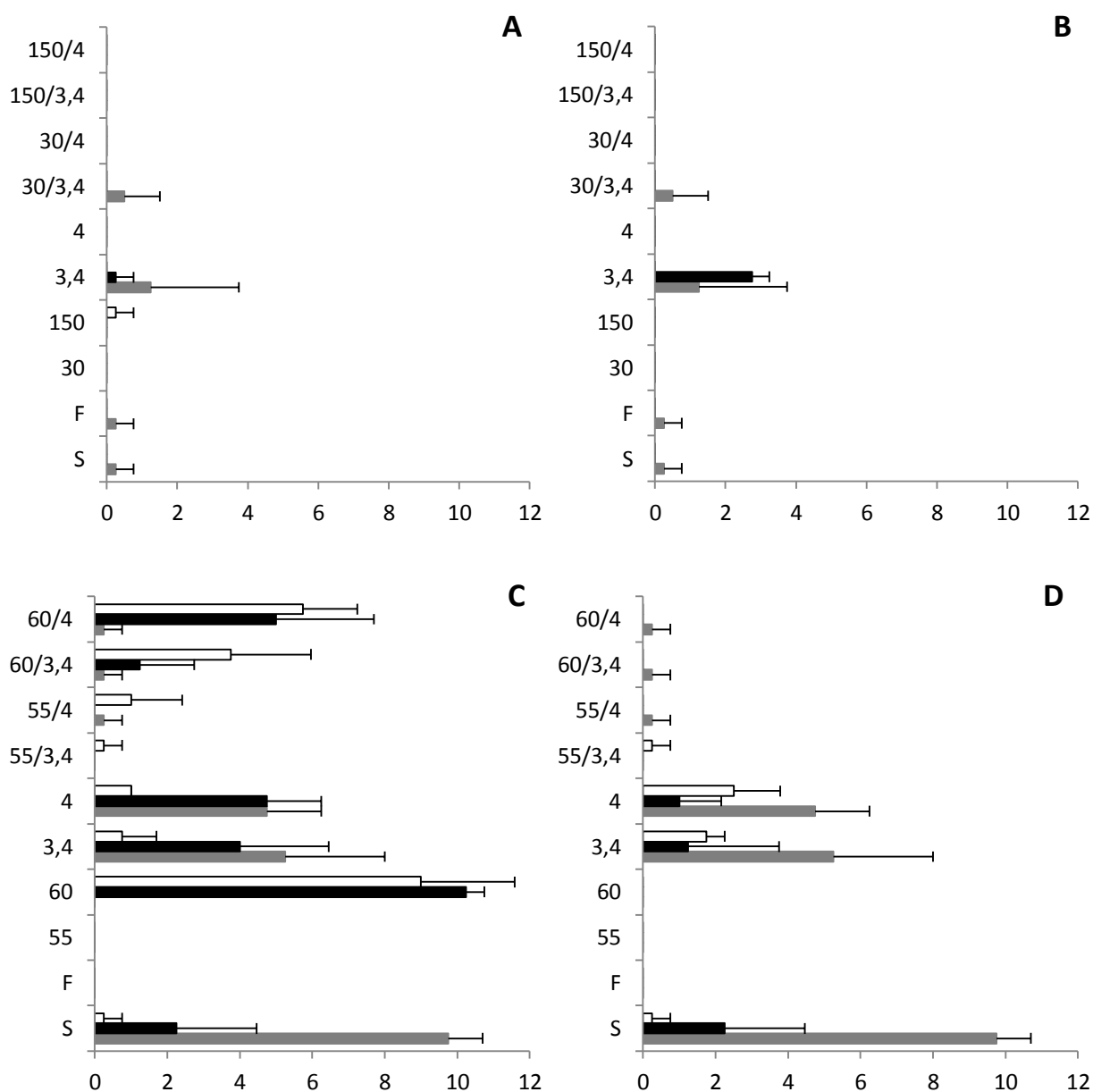


Figura 4. Incidência de *Botrytis* sp. em sementes de *E. brasiliensis* (A e B) e *E. uniflora* (C e D) submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/30 minutos (30) e 55°C/150 minutos (150), para *E. brasiliensis*; e 55°C/120 minutos (55) e 60°C/120 minutos (60), para *E. uniflora*; e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas), após 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A) e com a reaplicação dos mesmos (B). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão.

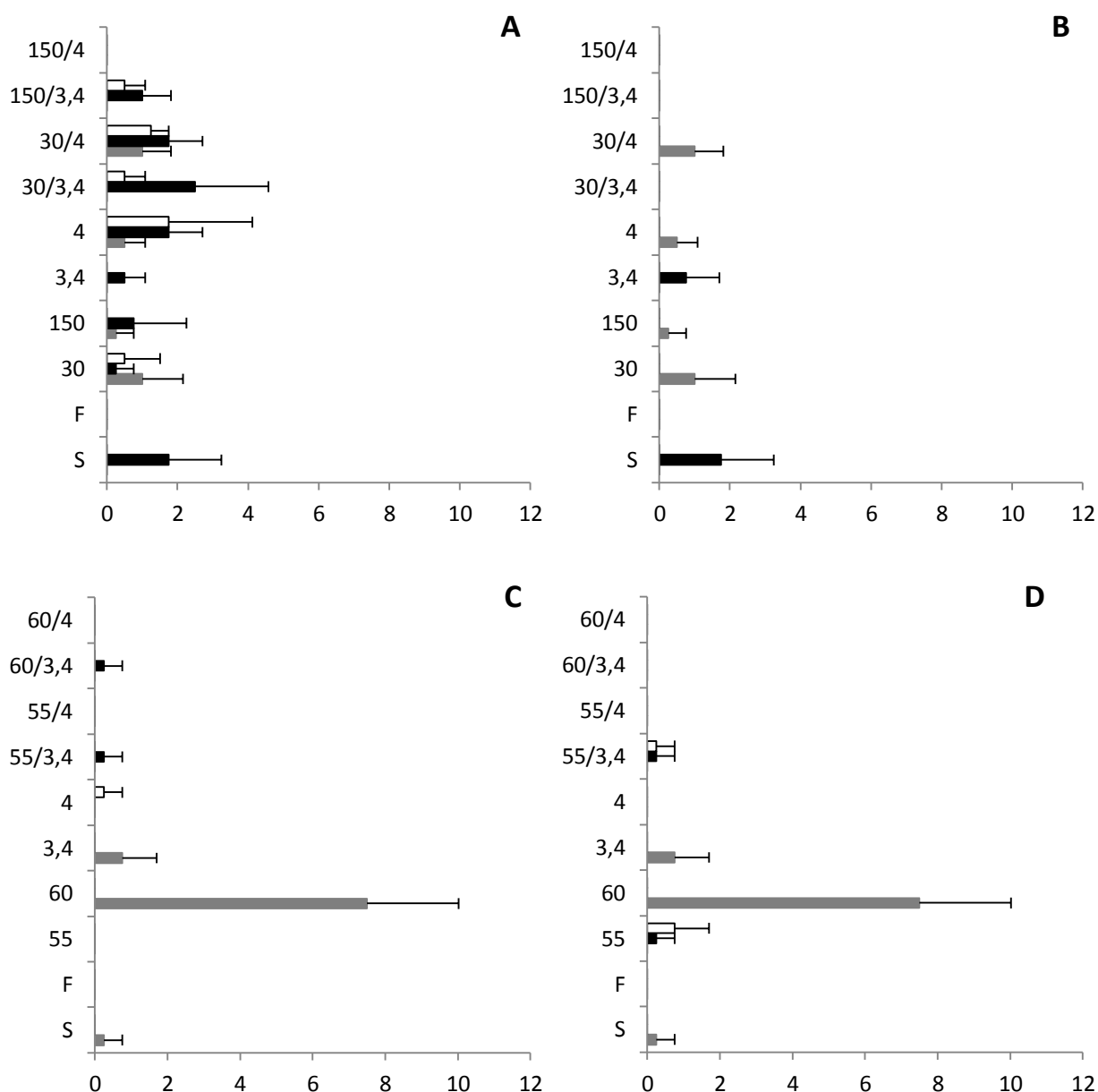


Figura 5. Incidência de *Colletotrichum* sp. em sementes de *E. brasiliensis* (A e B) e *E. uniflora* (C e D) submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/30 minutos (30) e 55°C/150 minutos (150), para *E. brasiliensis*; e 55°C/120 minutos (55) e 60°C/120 minutos (60), para *E. uniflora*; e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas) e após 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A) e com a reaplicação dos mesmos (B). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão.

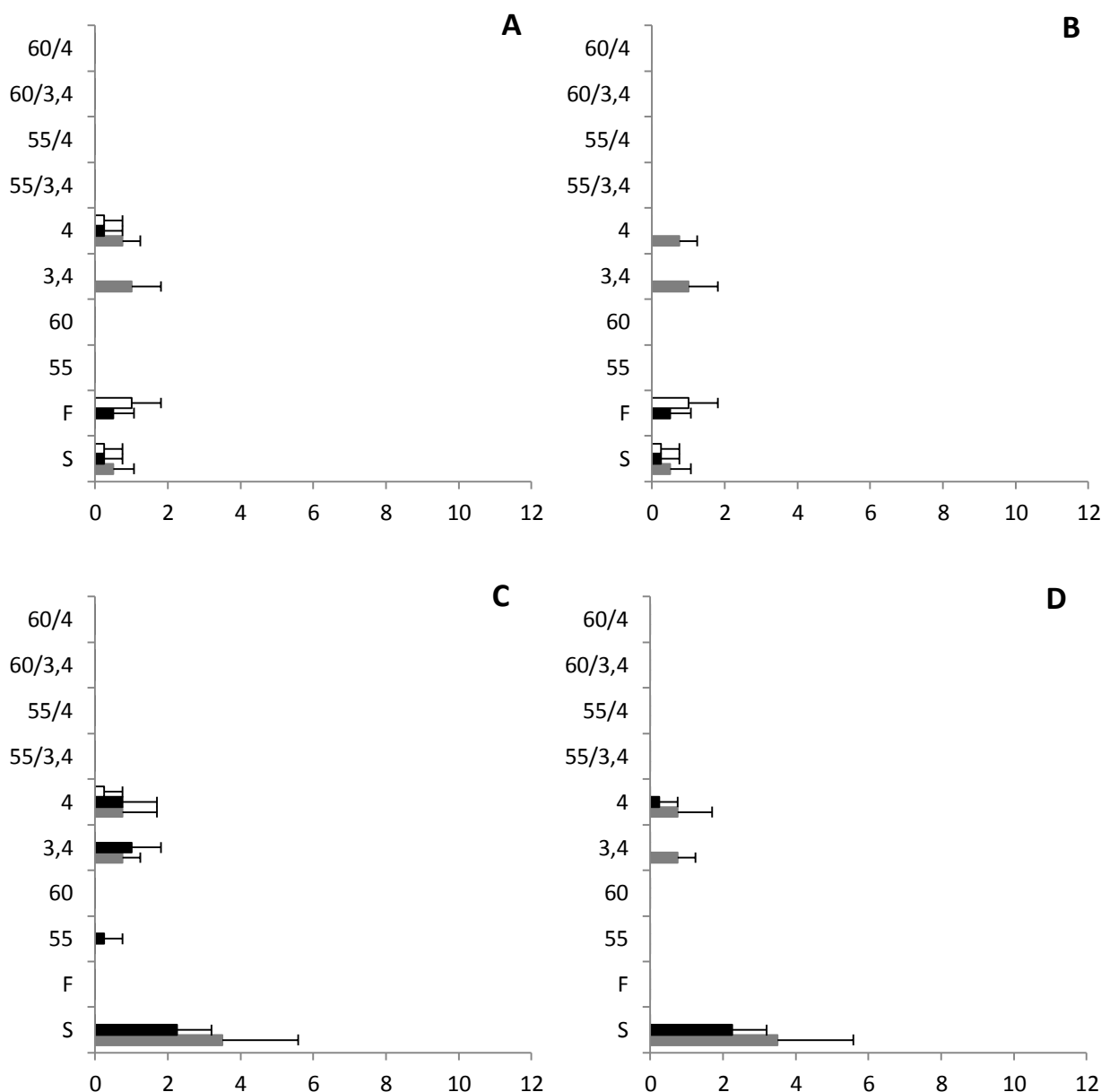


Figura 6. Incidência de *Chaetomium* sp. (A e B) e *Alternaria* sp. (C e D) em sementes de *E. uniflora* submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/120 minutos (55) e 60°C/120 minutos (60) e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas) e 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A e C) e com a reaplicação dos mesmos (B e D). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão.

Com o tratamento osmótico, *Pestalotiopsis* sp. (Figura 7A) teve redução da incidência em sementes de *E. brasiliensis*, sendo que o potencial mais negativo de -4 MPa mostrou melhor eficiência no controle e, diferentemente da testemunha, o fungo ficou evidenciado até os 60 dias de armazenamento. Segundo Hopkins & Mcquilken (2000), esse fungo tem

capacidade de se desenvolver em meios de baixa disponibilidade de água e apenas em meios ajustados osmoticamente com NaCl entre -9,9 e -10,5MPa ocorre parada na extensão de hifas. Porém, em meios ajustados com polietilenoglicol os isolados foram menos tolerantes, com nenhum crescimento ocorrendo a -6,5MPa. O mesmo é observado em diversos outros fungos patogênicos de plantas, sendo que *Pestalotiopsis* sp. apresentou desenvolvimento 80% menor no potencial de -4,8 MPa (Adebayo & Harris 1971; Duniway 1979; Brownell & Schneider 1985; Jorge-Silva *et al.* 1989; Hopkins & Mcquilklen 2000). Delgado & Barbedo (2012) observaram que espécies de *Eugenia*, inclusive *E. uniflora* e *E. brasiliensis*, mantem altos os valores de germinação e formação de plântulas normais quando atingem potenciais em torno de -5 a -10 MPa e que para algumas espécies de *Eugenia* a viabilidade não foi perdida quando atingiram o potencial entre -10 a -20 MPa. Sendo assim, possivelmente a grande maioria das espécies de *Eugenia* toleraria o uso de soluções osmóticas mais negativas nos tratamentos osmóticos.

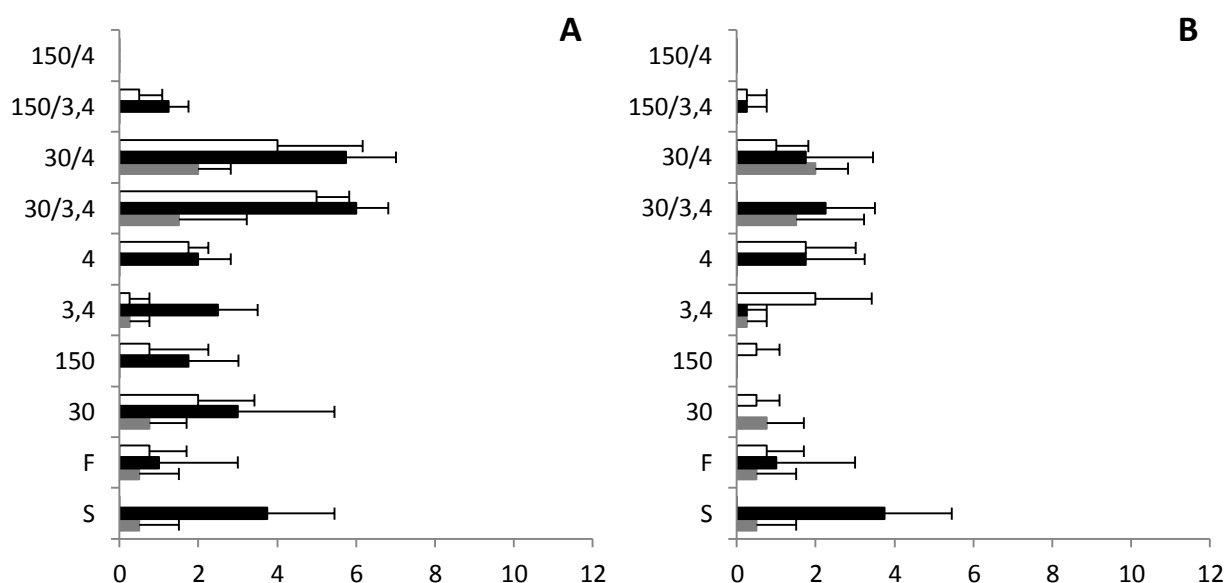


Figura 7. Incidência de *Pestalotiopsis* sp. em sementes de *E. brasiliensis* submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/30 minutos (30) e 55°C/150 minutos (150) e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e 30 dias (barras pretas) e 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A) e com a reaplicação dos mesmos (B). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão.

Nas sementes de *E. uniflora* o tratamento osmótico teve inicialmente menor controle de *Pestalotiopsis* sp. (Figura 8A), mas a incidência do fungo diminuiu com o armazenamento. Hopkins & Mcquilklen (2000) indicam que a temperatura ótima para o crescimento de

Pestalotiopsis sp. é de 20-25 °C, com pouco ou nenhum crescimento ocorrendo a 5 °C ou acima de 30 °C. Desse modo, o próprio armazenamento a 7 °C pode ter contribuído com o controle. É interessante observar que na testemunha das sementes de *E. brasiliensis* a incidência de *Pestalotiopsis* sp. (Figura 7A) chega a zerar aos 60 dias, possivelmente pelo efeito da baixa temperatura, porém na testemunha das sementes de *E. uniflora* a incidência do fungo pouco se altera, indicando que o tratamento osmótico teve algum efeito deletério sobre o fungo.

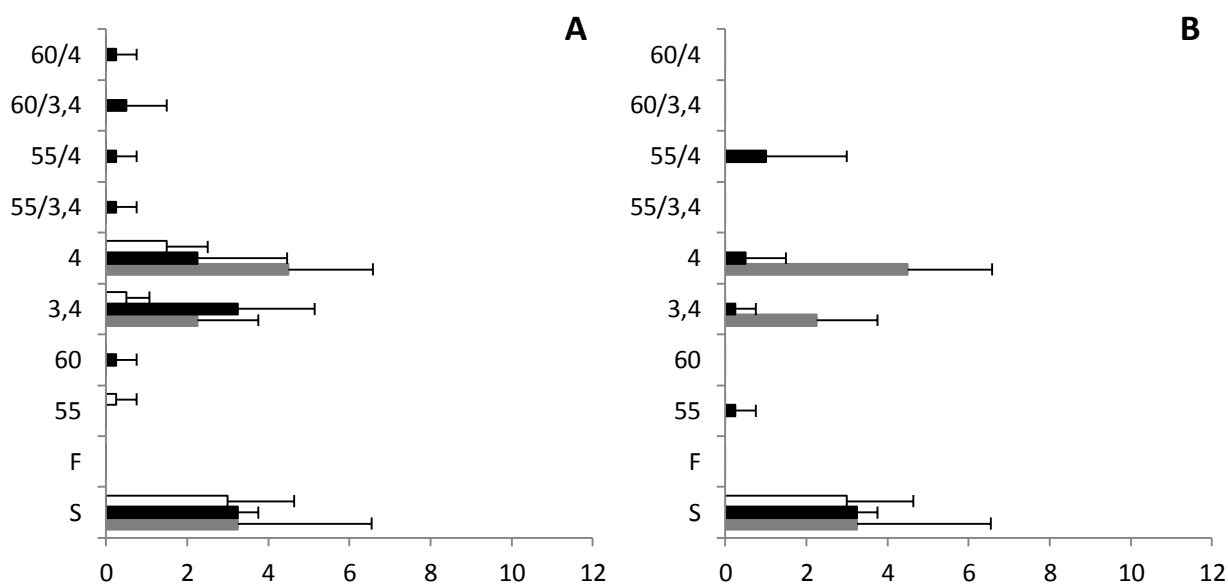


Figura 8. Incidência de *Pestalotiopsis* sp. em sementes de *E. uniflora* submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/120 minutos (55) e 60°C/120 minutos (60) e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas) e 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A) e com a reaplicação dos mesmos (B). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão.

Observa-se que cada tratamento aplicado às sementes teve efeito específico para cada um dos diferentes fungos, o que pode ser explicado pela própria diversidade do Reino. Para realizar o controle, tais tratamentos dependem da sensibilidade diferencial ao estresse hídrico entre a semente e o fungo, proporcionado pelo binômio tempo-temperatura e pelo potencial hídrico da solução. Contudo, os fungos conquistaram uma imensa variedade de habitats, sendo adaptados para tolerar diversos estresses ambientais e apresentando, para cada espécie, limites máximos e mínimos de tolerância a variações de temperatura, pH, oxigênio, dióxido de carbono e água (Menten 1995; Dix & Webster 1995; Cochrane 1958). O tratamento térmico de 55 °C por 30 minutos, em sementes de *E. brasiliensis*, por exemplo, reduziu a

incidência de *Penicillium* sp., *Chaetomium* sp., *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Cladosporium* sp. (Figuras 1A, 3A, 4A, 5A, 7A e 9A) ao mesmo tempo em que propiciou, direta ou indiretamente, o aumento da incidência de *Fusarium* sp. e *Ceratocystis* sp. (Figuras 1C e 9C), que podem ter sido favorecidos pela falta de competição.

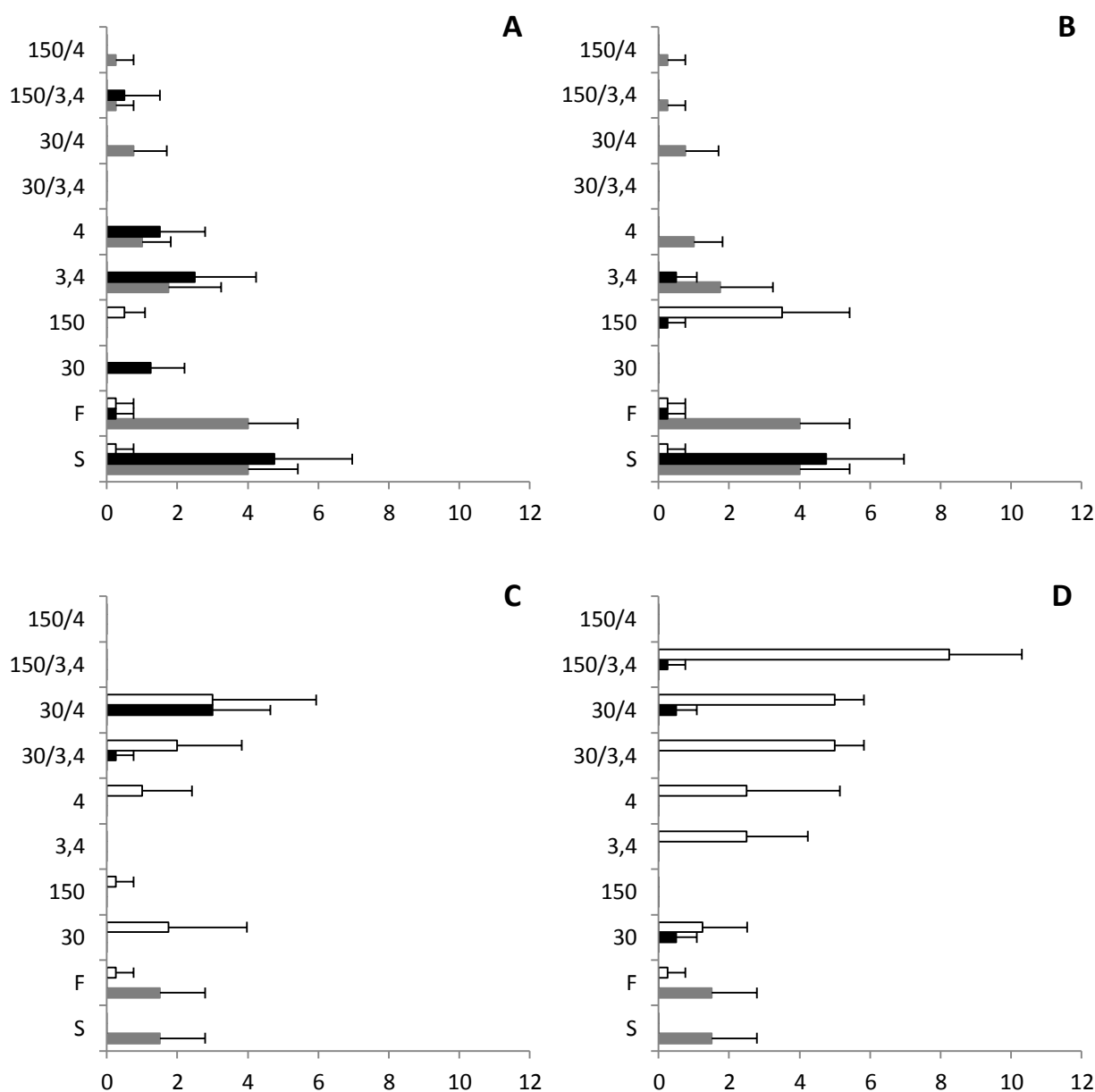


Figura 9. Incidência de *Cladosporium* sp. (A e B) e *Ceratocystis* sp. (C e D) em sementes de *E. brasiliensis* submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/30 minutos (30) e 55°C/150 minutos (150) e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas) e 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A e C) e com a reaplicação dos mesmos (B e D). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão.

A associação dos tratamentos térmicos e osmóticos se mostrou eficiente para a redução da incidência dos fungos. Em sementes de *E. brasiliensis* e *E. uniflora*, *Phoma* sp. (Figuras 10A e 10C), *Phomopsis* sp. (Figuras 11A e 11C), *Cladosporium* sp. (Figuras 9A e 12A), *Pestalotiopsis* sp. (Figuras 7A e 8A), *Ceratocystis* sp. (Figuras 9C e 12C) e *Colletotrichum* sp. (Figuras 5A e 5C) tiveram sua incidência reduzida e por vezes zerada com a aplicação dos tratamentos associados nas sementes, o que concorda com os resultados obtidos por Oliveira (2011) que obteve o controle dos fungos *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. e *Phoma* sp. para sementes de pitanga quando utilizou tratamentos térmicos e osmóticos associados. A autora ressalta que a associação desses tratamentos possibilita que os resultados mais favoráveis obtidos quando aplicados isoladamente sejam replicados, destacando que, na associação desses tratamentos, embriões de *Inga vera* 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.

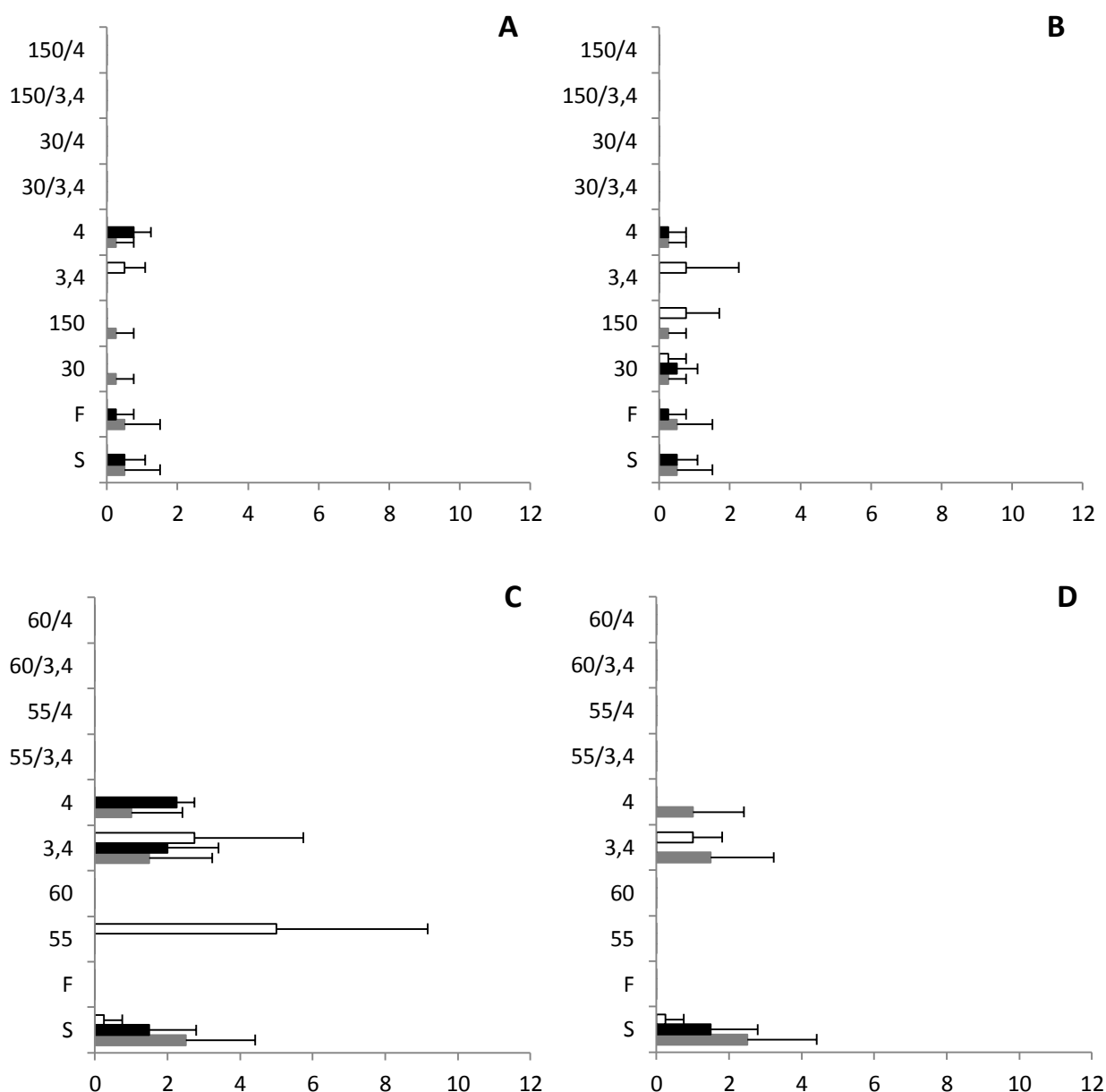


Figura 10. Incidência de *Phoma* sp. em sementes de *E. brasiliensis* (A e B) e *E. uniflora* (C e D) submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/30 minutos (30) e 55°C/150 minutos (150), para *E. brasiliensis*; e 55°C/120 minutos (55) e 60°C/120 minutos (60), para *E. uniflora*; e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas) e 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A e C) e com a reaplicação dos mesmos (B e D). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão.

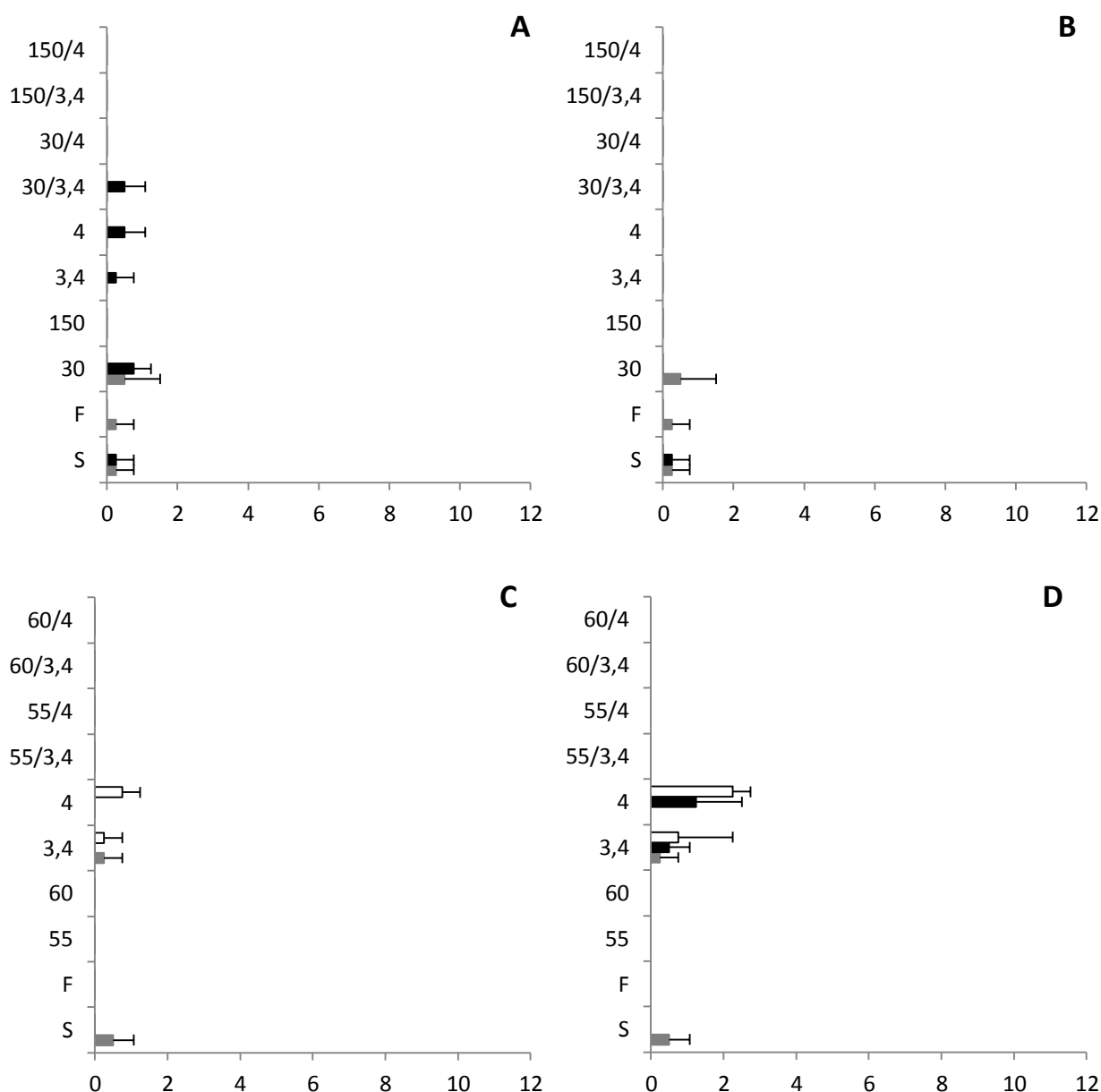


Figura 11. Incidência de *Phomopsis* sp. em sementes de *E. brasiliensis* (A e B) e *E. uniflora* (C e D) submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/30 minutos (30) e 55°C/150 minutos (150), para *E. brasiliensis*; e 55°C/120 minutos (55) e 60°C/120 minutos (60), para *E. uniflora*; e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas) e 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A e C) e com a reaplicação dos mesmos (B e D). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão.

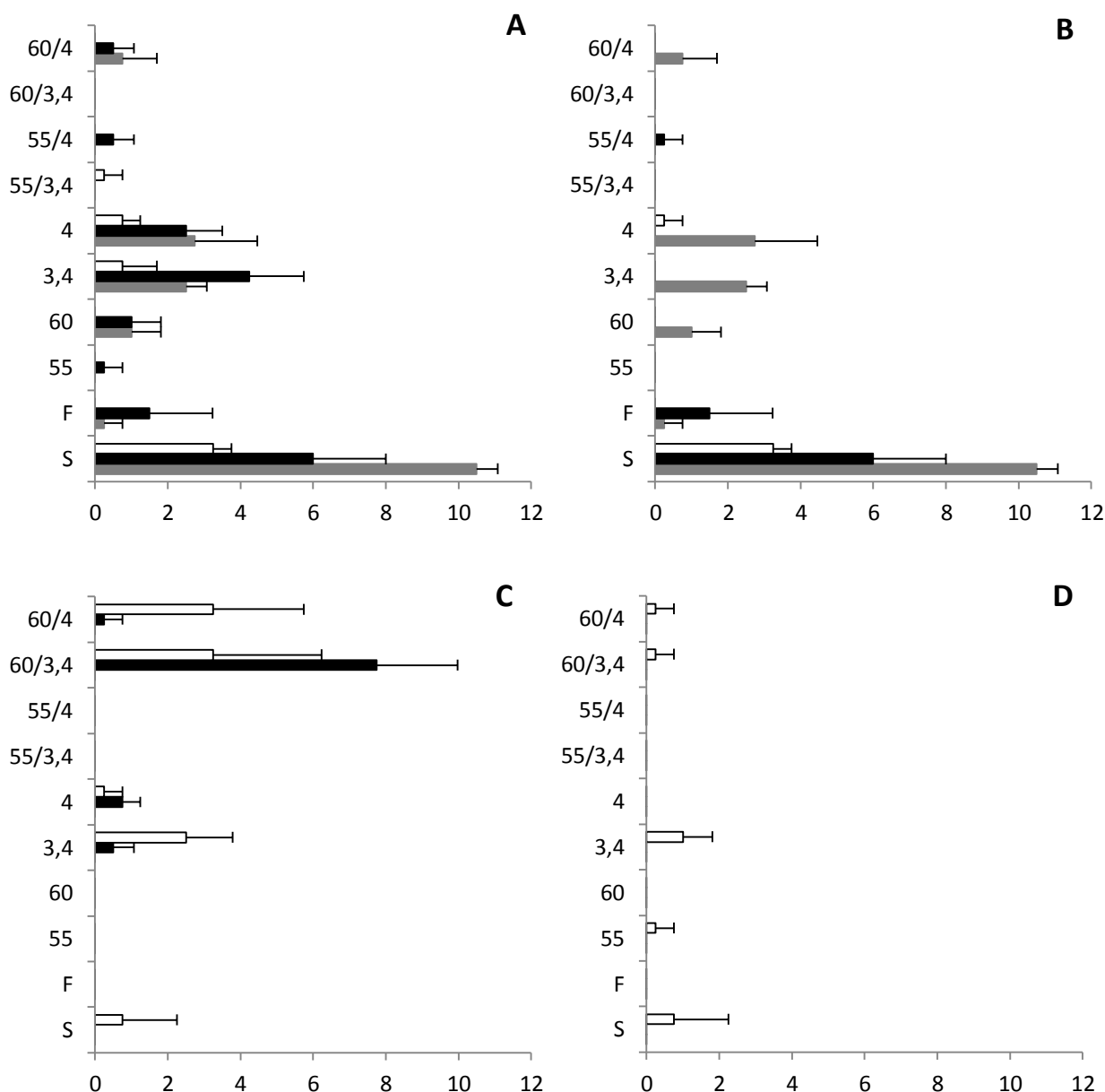


Figura 12. Incidência de *Cladosporium* sp. (A e B) e *Ceratocystis* sp. (C e D) em sementes de *E. uniflora* submetidas aos tratamentos térmicos de 55°C/120 minutos (55) e 60°C/120 minutos (60) e osmóticos de -3,4 MPa (3,4) e -4 MPa (4). A incidência foi avaliada inicialmente (barras cinzas) e após 30 dias (barras pretas) e 60 dias (barras brancas) de armazenamento, sem a reaplicação dos tratamentos (A e C) e com a reaplicação dos mesmos (B e D). Consta também a incidência do fungo em sementes sem tratamento (S) e em sementes tratadas com carbendazin + tiram (F). Foram analisadas 12 sementes por repetição, sendo apresentados os valores das médias e desvio padrão.

Nos tratamentos associados a 55 °C durante 120 minutos também foi observado, até os 60 dias de armazenamento, o menor desenvolvimento dos micélios de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. Contudo, nas sementes onde foram aplicados os tratamentos associados a 60 °C durante 120 minutos foi observado o desenvolvimento mais agressivo de *Fusarium* sp. e

Penicillium sp., que recobriam a maior parte da superfície da semente e estavam altamente concentrados. Também a associação ao tratamento de 60 °C, além de prejudicar a germinabilidade, potencializou a incidência de *Ceratocystis* sp. (Figura 19), possivelmente devido a redução da competição com outros fungos que foram controlados e pela perda da viabilidade das sementes submetidas a esse tratamento.

O tratamento térmico úmido foi empregado para diferentes espécies de *Fusarium* sp. e pode ser considerado uma opção para o seu controle em sementes de diversas espécies, como foi observado por Winter *et al.* (1997) para *F. nivale* Ces. ex Sacc. e *F. graminearum* Schwabe em sementes de cereais. Erley *et al.* (1997) também erradicou *F. moniliforme* de sementes de milho com calor úmido a 57-60 °C por 15 minutos e Mendes (2001) reduziu significativamente a incidência de *F. oxysporum* em sementes de alfaça com calor úmido a 60 °C por 20 e 30 minutos e erradicou o fungo ao associar esses tratamentos a um pré-tratamento com calor úmido a 40 °C por 20 minutos. Nas sementes de *E. uniflora*, o tratamento térmico com calor úmido reduziu, inicialmente, a incidência de *Fusarium* sp. (Figura 2C), porém potencializou o desenvolvimento nas sementes de *E. brasiliensis* (Figura 1C).

Segundo Masum *et al.* (2009), em sementes de sorgo o tratamento térmico em água quente a 55 °C durante 10 minutos também não causa redução de *Fusarium moniliforme*. O aumento do tempo de exposição pode proporcionar o controle em alguns casos, mas o mesmo não ocorreu para as sementes de *E. brasiliensis* tratadas (Figura 1C). Tanaka (2003) também observou a termo-resistência de *Fusarium* spp (*F. solani* (Mart.) Sacc f. sp. phaseoli (Burk.), *F. subglutinans* Nelson *et al.* f. sp. *ananas* e *Fusarium* sp.) ao tratamento térmico de inóculos em água a 55 °C por até 30 minutos e 60 °C por 10 minutos. Mendes *et al.* (2001) conseguiu reduzir significativamente a incidência de *F. oxysporum* em sementes ao aplicar o tratamento térmico de calor seco a 60 °C por 20 e 30 minutos. É possível que, assim como as sementes recalcitrantes, *Fusarium* sp. possa ser intolerante a secagem, o que explicaria a redução de sua incidência durante o armazenamento de sementes com baixo teor de água e baixa umidade relativa (Mycok & Berjak 1995; Bankole 1994). A identificação das espécies de *Fusarium* presentes poderia ajudar na escolha do tratamento, já que na literatura observa-se que as espécies apresentam diferença de resistência aos binômios tempo-temperatura.

O tratamento osmótico levou à redução de 33% da incidência de *Fusarium* sp. em sementes de *E. brasiliensis* (Figura 1C), porém chega a 100% aos 30 dias de armazenamento. Para *E. uniflora*, o tratamento osmótico não levou a qualquer redução na incidência (Figura 2C). Para diversos fungos a tolerância à umidade relativa baixa parece estar associada com a tolerância à pressão osmótica elevada (Hayashi 1954; Kaess & Schwartz 1935). Apesar de *Fusarium* sp. ter se mostrado intolerante ao calor seco, como observado por Mendes *et al.*

(2001) ao aplicarem o tratamento térmico de calor seco a 60 °C por 20 e 30 minutos, o fungo se mostrou tolerante aos tratamentos osmóticos. Tolerância a potenciais hídricos negativos pode ser vista em outras espécies de fungos, como *Aspergillus flavus* que pode crescer entre 12 e 48 °C e à potenciais de água tão baixos quanto -35MPa (Klich *et al.* 1994.).

Observou-se, em sementes de *E. uniflora* e *E. brasiliensis* tratadas osmoticamente que, embora não tenha diminuído a incidência, ocorreu redução no desenvolvimento de *Penicillium* e *Fusarium*, com menor crescimento dos micélios. Aos 60 dias de armazenamento as sementes de *E. uniflora* tratadas a -4 MPa apresentavam *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. distribuídos em grande parte da superfície da semente, mas com menor densidade na formação do micélio. Em futuros trabalhos, a avaliação da severidade da ação do fungo, através da quantificação da área da superfície das sementes infestada por colônia do fungo (Pabhu & Bebendo 1988; Ferreira *et al.* 2011), poderia demonstrar com mais eficiência o grande potencial desse tratamento no controle de fungos.

A alta incidência de *Fusarium* sp. pode também ser explicada pela possível associação desse patógeno internamente, no embrião, no endosperma ou no cotilédone das sementes. Dessa forma o fungo tem maior resistência devido à proteção mecânica fornecida pela semente, o que favorece sua sobrevivência e disseminação devido ao maior potencial das sementes de manterem a viabilidade dos fungos ao longo do tempo em comparação com outros propágulos vegetais (Machado 1988; Santos *et al.* 2000).

Machado (2002) ressalta que o controle de *Fusarium* é difícil devido a sua agressividade na produção de enzimas hidrolíticas como celulasas, xilanases, pectinases, amilases e lipases. Fungos dos gêneros *Fusarium* e *Penicillium* são notáveis produtores de amilases (Cuzzi *et al.* 2011), sendo que o amido é o principal compostos de reserva de sementes de *Eugenia* estudadas, chegando, em *Eugenia uniflora* (pitanga), a 64,1% (Mello *et al.* 2010). Dessa forma, o amplo desenvolvimento desses fungos nas sementes de *Eugenia* estudadas mostra-se preocupante.

Moraes *et al.* (2005) estudou a tolerância de *Musa* spp. (banana) e do fungo *Colletotrichum musae* à termoterapia no controle de podridões em pós-colheita, realizando testes *in vivo* e *in vitro*, e observou que o tratamento 56 °C durante 6 minutos retardou, mas não paralisou o crescimento micelial *in vitro*, porém foi efetivo no controle completo das podridões *in vivo*. Também segundo Tanaka *et al.* (2003), *in vitro*, o tratamento térmico de 45 °C por 30 minutos é suficiente para inativar o inóculo de *Colletotrichum* spp. No entanto, foi observada maior incidência do fungo nas sementes tratadas. O tratamento térmico de 55 °C reduz a incidência em *E. brasiliensis* (Figura 5A), mas não chega a inativar *Colletotrichum* sp. Em *E. uniflora* o tratamento a 60 °C leva ao aumento da incidência do fungo (Figura 5A).

O maior desenvolvimento de *Colletotrichum* sp. pode ser devido a redução na competição, pela eliminação de outros fungos, ou pela redução do vigor das sementes. *Colletotrichum* sp. também é um fungo importante para sementes de *Eugenia* devido à sua alta capacidade de secreção de amilases (Cuzzi *et al.* 2011).

Moraes *et al.* (2005) observou aumento na incidência de *Colletotrichum musae* quando aumentou o período de exposição ao tratamento térmico, usando a combinação de 56 °C/12 min que reduziu, mas não paralisou o crescimento micelial. A potencialização da ação do fungo com o aumento do período de exposição também foi observado para *Penicillium* sp. (Figura 1A) e *Cladosporium* sp. (Figura 9A), em *E. brasiliensis*.

Botrytis sp. é um fungo que se desenvolve em alta umidade relativa, podendo ser um grande problema para as sementes recalcitrantes armazenadas, pois geralmente coloniza primeiramente tecidos mortos, senescentes ou enfraquecidos, para assim, iniciar a colonização de tecidos sadios (Töfoli 2011). Conforme Oster (2004), a sobrevivência de conídios de *Botrytis dothidea* foi inibida na temperatura de 58 °C durante 60 s. De fato, *Botrytis* sp. foi controlado pelo tratamento térmico, sendo que 55 °C foi eficiente para ambas as espécies (Figura 4A e 4C). O controle de *Botrytis* por termoterapia apresenta grande importância, pois o gênero apresenta vários relatos de ocorrência de resistência a fungicidas (Töfoli 2011).

4.1. Efeitos dos tratamentos térmicos e osmóticos sobre a germinação

O tratamento térmico pode influenciar positivamente ou negativamente a germinação das sementes, sendo que isso varia de espécie para espécie. Em sementes da espécie florestal de *Lafoensia pacari* A.St.-Hil. o tratamento térmico em água a temperatura de 60°C durante 10 minutos, reduziu a incidência de patógenos como *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Alternaria* spp. e aumentou o poder germinativo das sementes (Piveta *et al.* 2009). Entretanto, o tratamento térmico de sementes de *Medicago sativa* L (alfafa) a 50 °C durante 30 minutos foi eficiente na erradicação de fungos, mas afetou a germinação (Mendes *et al.* 2001). Nas sementes de *E. brasiliensis* não houve diferença significativa para os valores de germinação (Tabela 1) e desenvolvimento de plântulas normais (Tabela 2) das sementes tratadas termicamente, porém o aumento da temperatura do tratamento para 60 °C em sementes de *E. uniflora* teve efeito negativo na viabilidade dessas sementes (Tabela 3 e 4). Tal resultado difere do observado por Oliveira (2011) que obteve germinação acima de 75% em sementes de pitanga tratadas com calor úmido a 65 °C durante 30 minutos.

Tabela 3. Germinação (%) de sementes de *E. uniflora* submetidas a tratamento térmico de 55°C/120 minutos (55°C), 60°C/120 minutos (60°C) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). As avaliações foram feitas inicialmente (Inicial) e após armazenamento de 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamento de sementes	Sem Reaplicação			Médias	Com Reaplicação			Médias
	STT	55 °C	60 °C		STT	55 °C	60 °C	
Inicial								
STO	85	83	25					
-3,4 MPa	90	88	23					
- 4 MPa	81	81	23					
Médias	85 B	84 B	24 A					
Coef. var.	16,44%							
Armazenamento de 30 dias								
STO	79	90	0	56 <u>a</u>	79	88	0	56 <u>a</u>
-3,4 MPa	75	87	8	57 <u>a</u>	94	87,5	29	70 <u>b</u>
- 4 MPa	96	94	38	76 <u>b</u>	81	81	19	60 <u>a</u>
Médias		STT. - 84,7 B		55°C – 87,8B		60°C – 15,6 A		
Coef. var.	16,12%							
Armazenamento de 60 dias								
STO	71	90	0		71	85	2	
-3,4 MPa	85	81	4		81	81	2	
- 4 MPa	75	83	4		81	77	0	
Médias		STT. - 77 B		55°C - 83 B		60°C - 2 A		
Coef. var.	16,66%							

Tabela 4. Desenvolvimento de plântulas normais (%) de sementes de *E. uniflora* submetidas a tratamento térmico de 55°C/120 minutos (55°C), 60°C/120 minutos (60°C) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). As avaliações foram feitas inicialmente (Inicial) e após armazenamento de 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamento de sementes	Sem Reaplicação			Médias	Com Reaplicação			Média
	STT	55 °C	60 °C		STT	55 °C	60 °C	
Inicial								
STO	81	71	12					
-3,4 MPa	79	77	8					
- 4 MPa	71	67	8					
Médias	77 B	72 B	10 A					
Coef. var.	20,94%							
Armazenamento de 30 dias								
STO	77	90	0	56 <u>a</u>	77	88	0	56 <u>a</u>
-3,4 MPa	73	81	8	54 <u>a</u>	94	79	19	64 <u>b</u>
- 4 MPa	92	88	21	54 <u>a</u>	75	75	13	67 <u>b</u>
		STT - 82 B		55°C – 83 B		60°C – 10 A		
Coef. var.	19,88%							
Armazenamento de 60 dias								
STO	63	81	0		77	83	2	
-3,4 MPa	77	75	2		81	77	0	
- 4 MPa	73	75	0		75	75	0	
Médias		STT - 72 B		55°C – 78 B		60°C – 1 A		
Coef. var.	20,04%							

Os tratamentos térmicos de 55 °C e 60 °C durante 120 minutos aplicados as sementes de *E. uniflora* potencializaram o desenvolvimento de *Penicillium* sp. (Figura 2A), sendo que o tratamento de 60 °C prejudicou a germinação (Tabela 3), que foi reduzida inicialmente a menos de 25% e chegou a praticamente zero aos 60 dias de armazenamento, o que poderia indicar que a redução do vigor dessas sementes propiciou o desenvolvimento do fungo. Porém, o tratamento a 55 °C também potencializou a ação do fungo, mas a germinabilidade e a formação de plântulas normais (Tabela 4) não foram prejudicadas. É possível que a algum microrganismo de ação antagônico a *Penicillium* sp. tenha sido eliminado, beneficiando o fungo por falta de competição, ou que o tratamento térmico tenha prejudicado algum possível fator de proteção da semente, seja ele físico ou químico, deixando-a mais vulnerável.

Segundo Oliveira *et al.* (2011) o tratamento osmótico é potencialmente interessante, porém o armazenamento por período superior a sete dias de sementes de *Eugenia uniflora* em solução osmótica prejudicou a germinação destas sementes e aumentou a presença de

Penicillium sp. Possivelmente, ocorreu 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; Oliveira 2011). A aplicação do tratamento osmótico por sete dias seguido de armazenamento em sacos de polietileno a 7 °C apresentou bons resultados, controlando a incidência de fungos e não prejudicando a germinação (Tabela 1 e 3) e o desenvolvimento de plântulas normais (Tabela 2 e 4) em sementes de *E. brasiliensis* e *E. uniflora*.

Oliveira (2011) afirma que a proliferação de *Penicillium* sp. pode ter sido favorecida pela diminuição da germinabilidade e morte das sementes nas soluções osmóticas, que teria ocasionado a diminuição da resistência destas ao estresse hídrico e a alteração do potencial hídrico das soluções, com liberação de exsudatos que propiciaram o desenvolvimento deste fungo. De fato, as sementes de *E. brasiliensis* submetidas ao tratamento osmótico apresentavam, aos 60 dias de armazenamento, redução estatisticamente significativa da germinação, chegando a menos de 50% (Tabela 1), e maior incidência do fungo, sendo maior que 45% (Figura 1). Porém, a testemunha apresentava incidência de *Penicillium* sp. maior que a das tratadas osmoticamente, acima de 70%, e germinação sempre acima de 70%, indicando que *Penicillium* sp. pode se desenvolver mesmo em sementes mais vigorosas. Diferente do que ocorreu no armazenamento em solução osmótica, os tratamentos osmóticos de -3,4 MPa e -4 MPa foram eficientes em promover a redução da incidência de *Penicillium* sp. nas duas espécies estudadas (Figuras 1A e 2A), sendo que -4 MPa propiciou menor incidência do fungo após 60 dias de armazenamento. Nas sementes de *E. uniflora* não houve redução da germinabilidade (Tabela 3) e do desenvolvimento de plântulas normais (Tabela 4) após o tratamento osmótico, que foi o único eficiente em reduzir a incidência de *Penicillium* sp.

4.2. Efeitos positivos e negativos da reaplicação de tratamentos

Os tratamentos alternativos têm um efeito imediato notável, como é observado, por exemplo, com a redução da incidência de *Penicillium* sp. em *E. brasiliensis* (Figura 1A) para a maioria dos tratamentos, mas o efeito deles não persiste a longo prazo, o que se mostrou um empecilho para seu uso como um tratamento voltado para o armazenamento. Segundo Edney & Burchill (1967) a falta de proteção residual contra a recontaminação por patógenos oportunistas e injúrias promovidas no hospedeiro representa a maior limitação ao uso de termoterapia e o mesmo pode ser observado para o tratamento osmótico (Oliveira 2011; Oliveira *et al.* 2011). Contudo, a reaplicação dos tratamentos mostrou grande potencial para reforçar o efeito de controle sobre os fungos.

Em *E. brasiliensis* os tratamentos osmóticos reaplicados obtiveram grande sucesso no

controle de *Penicillium* sp. (Figura 1B), sendo que aos 60 dias de armazenamento o fungo teve sua incidência zerada. Vale ressaltar que nesses tratamentos o desenvolvimento de *Fusarium* sp. foi menor, apesar da alta incidência, o que exclui a possibilidade de competição como responsável pela redução de *Penicillium* sp. A incidência de *Colletotrichum* sp. (Figura 5B) e *Pestalotiopsis* sp. (Figura 7B) também foi melhor controlada com a reaplicação, sendo que a termoterapia foi a mais eficiente para *Pestalotiopsis* sp. Os tratamentos associados à 55 °C durante 30 minutos com reaplicação também demonstraram maior eficiência no controle do que sem reaplicação. Inclusive, para esses tratamentos a reaplicação foi fundamental pra a manutenção da qualidade das sementes, com maiores valores de germinação (Tabela 1) e desenvolvimento de plântulas normais (Tabela 2).

Para *E. uniflora* a reaplicação do tratamento termico de 55 °C durante 120 minutos, isolado e associado aos tratamentos osmóticos, levou a redução da incidência de *Fusarium* sp. (Figura 2C e 2D). Nesses tratamentos também ocorreu o menor desenvolvimento de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., embora o segundo tenha apresentado alta incidência (Figura 2A e 2B). Já para *E. brasiliensis* a reaplicação em geral não reduziu a incidência de *Fusarium* sp. (Figura 1C e 1D), sendo que na maioria dos tratamentos a incidência do fungo foi maior em relação à testemunha, principalmente aos 60 dias. O tratamento associado -3,4 MPa a 55 °C durante 30 minutos com reaplicação foi o que levou à maior redução da incidência do fungo.

Foram observados casos em que a reaplicação dos tratamentos levou a potencialização da ação de alguns fungos. Embora a reaplicação tenha melhorado a eficiência dos tratamentos osmóticos no controle de *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phoma* sp. e *Cladosporium* sp. em sementes de *E. uniflora* (Figuras 5C e D, e 6C e D e 8A e B, 10C e D e 12A e B), levou ao aumento da incidência de *Phomopsis* sp (Figura 11C e D). *Chaetomium* sp. (Figura 3) teve maior incidência, em *E. brasiliensis*, com a reaplicação do tratamento -4 MPa, que havia sido controlado sem reaplicação, o que aconteceu também para *Ceratocystis* sp. (Figura 9C e D) e *Botrytis* sp. (Figura 4A e B) no tratamento -3,4 MPa. *Ceratocystis* sp. tem sua incidência potencializada com a reaplicação dos tratamentos osmóticos e osmóticos associados, com exceção de 55 °C/150 minutos -4 MPa, que zera a incidência do fungo, assim como o tratamento 55 °C/150 minutos, indicando menor resistência desse fungo a maior exposição do tratamento térmico. Sendo assim, a decisão de reaplicar ou não um tratamento pode depender dos fungos presentes nas sementes.

A aplicação do tratamento osmótico de -3,4 e -4,0 MPa levou a reduções de 2% a 4% nos valores iniciais de teor de água das sementes (Tabelas 5 e 6). Como as sementes apresentavam inicialmente potencial hídrico de -1,46 MPa para *E. brasiliensis* (Tabela 7) e -

2,25 para *E. uniflora* (Tabela 8), seria esperado maior movimentação da água do meio de potencial menos negativo para o mais negativo (Taiz & Zeiger 2004), porém o teor de água apresentou poucas alterações significativas após os tratamentos osmóticos. Esse comportamento de resistência das sementes a perda de água para a solução osmótica, sugerindo um mecanismo de controle a perda de água, foi observado antes por Delgado & Barbedo (2007), Oliveira (2011) e Bonjovani (2011) em sementes de *Eugenia sp.* e *Inga vera*.

Tabela 5. Teor de água (%) de sementes de *E. brasiliensis* submetidas a tratamento térmico de 55 °C/30 minutos (30 min.), 55 °C/150 minutos (150 min.) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas a tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). As avaliações foram feitas inicialmente (Inicial) e após armazenamento de 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamento de sementes	Sem Reaplicação				Com Reaplicação			
	STT	30 min.	150 min.	Médias	STT	30 min.	150 min.	Média
<i>Inicial</i>								
STO	52,10	52,73	51,11	52,0 b				
-3,4 MPa	49,36	49,93	49,38	49,6 a				
- 4 MPa	49,03	49,54	48,15	48,9 a				
Médias	50,17 A	50,73 A	49,55 A					
Coef. var.	3%							
<i>Armazenamento de 30 dias</i>								
STO	49,89 aAa	51,70 bAa	50,41 aAa		49,89 aAa	51,75 aBa	51,00 aBa	
-3,4 MPa	48,47 aAa	49,48 abAa	49,46 aAa		50,30 aAa	49,76 aAa	50,64 aAa	
- 4 MPa	49,92 aAa	47,84 aAa	49,37 aAa		49,74 aAa	50,17 aAb	50,88 aAa	
Coef. var.	2,72%							
<i>Armazenamento de 60 dias</i>								
STO	53,10	50,26	49,53	50,96a	53,10	52,35	51,86	52,44b
-3,4 MPa	50,81	49,88	50,02	50,24a	50,85	50,09	50,84	50,59a
- 4 MPa	51,17	49,95	50,50	50,53a	49,08	50,14	50,31	49,84a
Coef. var.	2,64%							

Tabela 6. Teor de água de sementes (%) de *E. uniflora* submetidas a tratamento térmico de 55°C/120 minutos (55°C), 60°C/120 minutos (60°C) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). As avaliações foram feitas inicialmente (Inicial) e após armazenamento de 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamento de sementes	Sem Reaplicação						Com Reaplicação			
	STT		55 °C		60 °C		Médias	STT		Médias
Inicial										
STO	52,46	Aa	55,81	Aa	57,04	Ab				
-3,4 MPa	54,25	Aa	54,33	Aa	53,26	Aab				
- 4 MPa	54,23	Ba	51,81	ABa	48,59	Aa				
Coef. var.	5,07%									
Armazenamento de 30 dias										
STO	52,4		58,3		57,3		52,4	58,2	55,1	55,86b
-3,4 MPa	50,2		52,2		53,8		51,7	49,4	51,6	51,47a
- 4 MPa	50,7		51,9		51,2		49,6	54,6	50,9	51,48a
Médias			Sem trat. - 51,41 A				55 °C - 54,09 B		60 °C - 53,31 B	
Coef. var.	4,33%									
Armazenamento de 60 dias										
STO	55,51		55,78		58,00		55,51	55,48	59,53	56,6b
-3,4 MPa	54,16		54,76		55,27		54,44	56,64	52,46	54,62a
- 4 MPa	51,91		54,53		53,31		53,34	55,11	53,65	53,64a
Coef. var.	4,80%									

Tabela 7. Potencial hídrico (MPa) de sementes de *E. brasiliensis* submetidas a tratamento térmico de 55 °C/30 minutos (30 min.), 55 °C/150 minutos (150 min.) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas a tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). As avaliações foram feitas inicialmente (Inicial) e após armazenamento de 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamento de sementes	Sem Reaplicação				Com Reaplicação			
	STT	30 min.	150 min.	Médias	STT	30 min.	150 min.	Médias
<i>Inicial</i>								
STO	-	-	-		-	-	-	
-3,4 MPa	-	-	-		-	-	-	
- 4 MPa	-	-	-		-	-	-	
Coef. var.	-							
<i>Armazenamento de 30 dias</i>								
STO	1,46 aA _a	1,38 aA _a	1,31 aA _a		1,46 aA _a	1,30 aA _a	1,13 aA _a	
-3,4 MPa	1,54 aA _b	1,60 aA _b	1,93 bB _b		1,31 aA _a	1,37 aA _a	1,40 bA _a	
- 4 MPa	1,61 aA _a	1,48 aA _a	2,01 bB _b		1,45 aA _a	1,40 aA _a	1,39 bA _a	
Coef. var.	9,19%							
<i>Armazenamento de 60 dias</i>								
STO	1,74	1,69	1,67		1,74	1,76	1,38	1,67a
-3,4 MPa	1,68	2,24	2,66		1,79	2,16	2,23	2,13b
- 4 MPa	1,80	2,26	2,48		2,28	2,41	2,00	2,2b
Médias	1,74 <u>a</u>	2,06 a	2,27 <u>b</u>		1,94 <u>a</u>	2,11 <u>a</u>	1,87 <u>a</u>	
Coef. var.	9,19%							

Tabela 8. Potencial hídrico (MPa) de sementes de *E. uniflora* submetidas a tratamento térmico de 55°C/120 minutos (55°C), 60°C/120 minutos (60°C) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). As avaliações foram feitas inicialmente (Inicial) e após armazenamento de 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamento de sementes	Sem Reaplicação			Médias	Com Reaplicação			Média
	STT	55 °C	60 °C		STT	55 °C	60 °C	
Inicial								
STO	2,25	1,99	2,08	2,10a				
-3,4 MPa	2,43	2,24	1,90	2,18a				
- 4 MPa	2,18	2,28	2,24	2,23a				
Médias	2,28 A	2 A	2,07 A					
Coef. var.	9,83%							
Armazenamento de 30 dias								
STO	2,57	2,23	2,28		2,57	1,98	2,26	2,27a
-3,4 MPa	3,11	3,15	2,52		3,01	2,87	2,63	2,88b
- 4 MPa	3,23	2,79	2,86		2,86	2,70	2,91	2,89b
Médias		Sem trat. - 2,9B		55°C - 2,62A	60°C - 2,57A			
Coef. var.	10,52%							
Armazenamento de 60 dias								
STO	2,58	2,41	2,40	2,46 <u>a</u>	2,58	2,19	1,97	2,25 <u>a</u>
-3,4 MPa	2,64	2,78	2,40	2,6 <u>a</u>	2,84	2,75	2,30	2,63 <u>a</u>
- 4 MPa	2,75	3,19	2,63	2,86 <u>b</u>	2,68	2,49	2,20	2,46 <u>a</u>
Médias	2,66 <u>a</u>	2,79 <u>b</u>	2,48 <u>b</u>		2,70 <u>a</u>	2,48 <u>a</u>	2,15 <u>a</u>	
Coef. var.	11,33%							

O potencial hídrico das sementes foi alterado ao longo do armazenamento para alguns tratamentos (Tabela 7 e 8), atingindo, em *E. brasiliensis*, valores mais negativos nos tratamentos osmóticos associados a 55 °C/ 150 minutos. Oliveira (2011) e Delgado (2006) observaram que sementes de *E. uniflora* submetidas 55 °C/ 120 minutos também apresentavam valores mais negativos de potencial hídrico após o tratamento osmótico, apesar das sementes não atingirem os valores das soluções osmóticas, tendendo a estabilizar em determinado potencial hídrico. A reaplicação dos tratamentos osmóticos nas sementes levou a valores menos negativos de potencial hídrico, possivelmente por meio da regulação da mobilização da água na semente, que leva a redução do metabolismo das mesmas (Andréo *et al.* 2006).

Apesar do efeito da reaplicação sob o potencial hídrico, aos 60 dias de armazenamento em sementes de *E. brasiliensis*, mesmo apresentando teor de água sempre superior a 49,8% (Tabela 5), os valores de potencial hídrico foram inferiores a -2,0 MPa para todos os tratamentos associados (Tabela 7), reaplicados ou não. A redução dos valores de potencial

hídrico das sementes, sem que haja redução do teor de água (Tabelas 5 e 6) e alterações significativas nos valores de massa seca (Tabelas 9 e 10), sugere a quebra de moléculas na semente, levando ao aumento de sítios de ligação onde a água ficaria mais tempo retida, reduzindo os valores do potencial hídrico, devido a menor disponibilidade de água livre (Taiz & Zeiger 2004). Tal alteração pode ser causada por processos de deterioração da própria semente ou pelo desenvolvimento do fungo, que pode estar retendo a água ou degradando as sementes e desestruturando suas células e compostos de reserva.

Tabela 9. Massa seca (mg.semente⁻¹) de sementes de *E. brasiliensis* submetidas a tratamento térmico de 55 °C/30 minutos (30 min.), 55 °C/150 minutos (150 min.) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas a tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). As avaliações foram feitas inicialmente (Inicial) e após armazenamento de 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamento de sementes	Sem Reaplicação				Com Reaplicação			
	STT	30 min.	150 min.	Médias	STT	30 min.	150 min.	Médias
<i>Inicial</i>								
STO	158,6	122,3	159	146,5	a			
-3,4 MPa	150,6	121,2	164	144,8	a			
- 4 MPa	152,9	150,4	183	162,0	a			
Médias	154,0 b	131,3 a	168 b					
Coef. var.	14,59%							
<i>Armazenamento de 30 dias</i>								
STO	143,9 aA <u>a</u>	118,7 aA <u>a</u>	141,3 aA <u>a</u>	143,9 aA <u>a</u>	132,8 aA <u>a</u>	168,6 bB <u>b</u>		
-3,4 MPa	151,4 aA <u>a</u>	148,9 bA <u>a</u>	151,0 aA <u>a</u>	127,5 aA b	147,1 aA <u>a</u>	148,4 abA <u>a</u>		
- 4 MPa	139,2 aA <u>a</u>	164,9 bA b	156,2 aA b	146,9 aA <u>a</u>	137,5 aA <u>a</u>	131,7 aA <u>a</u>		
Coef. var.	11,28%							
<i>Armazenamento de 60 dias</i>								
STO	122,9 aA <u>a</u>	140,2 aAB <u>a</u>	157,2 bB <u>b</u>	122,9 aA <u>a</u>	118,8 aA <u>a</u>	122,0 aA <u>a</u>		
-3,4 MPa	141,1 aAB <u>a</u>	151,1 aB <u>b</u>	117,6 aA <u>a</u>	130,5 aA <u>a</u>	127,7 aA <u>a</u>	129,9 aA <u>a</u>		
- 4 MPa	132,9 aA <u>a</u>	127,7 aA <u>a</u>	139,0 abA <u>a</u>	137,8 aA <u>a</u>	144,6 aA <u>a</u>	138,1 aA <u>a</u>		
Coef. var.	11,36%							

Tabela 10. Massa seca (mg.semente⁻¹) de sementes de *E. uniflora* submetidas a tratamento térmico de 55°C/120 minutos (55°C), 60°C/120 minutos (60°C) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). As avaliações foram feitas inicialmente (Inicial) e após armazenamento de 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamento de sementes	Sem Reaplicação				Com Reaplicação			
	STT	55 °C	60 °C	Médias	STT	55 °C	60 °C	Médias
<i>Inicial</i>								
STO	136,8 Ba	103,2 ABa	87 Aa					
-3,4 MPa	118 Aa	137,5 Aa	121,9 Aab					
- 4 MPa	114 Aa	104 Aa	133 Ab					
Médias								
Coef. var.	17%							
<i>Armazenamento de 30 dias</i>								
STO	125,6	125,9	130,8		125,6	117,8	136,6	
-3,4 MPa	134,6	114,8	140,1		97,65	110,9	119,7	
- 4 MPa	111,5	127	139,5		105,8	106,7	116,8	
Médias	Sem trat. - 116,23A		55 °C - 117,16A		60 °C - 130,48B			
Coef. var.	13,81%							
<i>Armazenamento de 60 dias</i>								
STO	118,6	123,3	110,1	117,3a	118,6	115,2	101,3	111,9a
-3,4 MPa	126,2	108,5	137,2	124,0a	125,4	113,8	134,2	124,5a
- 4 MPa	113,2	117,4	117,4	116,0a	118	121,3	126,3	121,8a
Médias	119,3 A	116 A	122 A		120,8 A	116,8 A	120,6 A	
Coef. var.	12,02%							

4.3. Efeitos dos tratamentos sobre as taxas respiratórias

As sementes de *E. brasiliensis* não tratadas osmoticamente tiveram maiores valores de germinação (Tabela 2) após 60 dias de armazenamento, em relação às tratadas que não receberam reaplicação, que tiveram germinação inferior a 50%. Sendo assim, a reaplicação do tratamento osmótico mostrou-se importante não apenas para garantir a persistência do efeito de controle da micota, mas também para permitir a manutenção da germinabilidade, provavelmente através da redução do metabolismo das sementes (Andréo *et al.* 2006). Oliveira (2011) observou redução de $\frac{1}{3}$ na produção de CO₂ em sementes de *Inga vera* quando tratadas osmoticamente. Tal efeito regulador foi observado também nas taxas respiratórias de sementes de *E. brasiliensis*, onde após a aplicação dos tratamentos osmóticos ocorreu redução significativa do consumo de O₂ e da produção de CO₂ (Tabela 11), indicando que o tratamento diminuiu o metabolismo dessas sementes. Ressalta-se que a deterioração é manifestada nas sementes através de uma série de eventos que ocorrem aos níveis bioquímico

e fisiológico, sendo que quanto maiores as taxas de respiração, maiores são as expectativas de deterioração das sementes (Marcos Filho 2005; Lamarca 2009; Bonjovani 2011).

Tabela 11. Caracterização inicial do consumo de O_2 ($\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$), produção de CO_2 ($\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e quociente respiratório (QR) de sementes de *E. brasiliensis* submetidas a tratamento térmico de 55 °C/30 minutos (30 min.), 55 °C/150 minutos (150 min.) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas a tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamento de sementes	STT	30 min.	150 min.	Médias
<i>Consumo de O_2</i>				
STO	115,41	101,26	95,82	104,16 b
-3,4 MPa	63,24	94,65	78,04	78,64 a
- 4 MPa	71,12	65,45	69,15	68,57 a
Coef. Var.	21,99%			
<i>Produção de CO_2</i>				
STO	74,57	80,65	72,97	76,06 b
-3,4 MPa	56,32	81,86	64,58	67,59 ab
- 4 MPa	63,70	52,66	54,74	57,03 a
Coef. Var.	18,27%			
<i>Quociente Respiratório</i>				
STO	0,69	0,79	0,76	0,7465 a
-3,4 MPa	0,89	0,86	0,82	0,8567 b
- 4 MPa	0,90	0,80	0,79	0,8297 b
Coef. Var.	8,73%			

Porém, as sementes de *E. uniflora*, inicialmente (Tabela 12), e as de *E. brasiliensis*, após a reaplicação dos tratamentos associados (Tabela 13), à exceção de 55 °C/150 minutos - 3,4 MPa, apresentaram valores extremamente elevados de consumo de O_2 . A variação do consumo de O_2 não foi semelhante à liberação de CO_2 , resultando em valores de quociente respiratório (QR) entre 0,2 e 0,41. O quociente respiratório (QR) é um parâmetro utilizado para indicar qual via respiratória esta sendo usada na oxidação de um substrato (Labouriau 1983). Esse elevado consumo de O_2 seria justificado pelo uso de ácidos graxos saturados e insaturados como substrato inicial para a respiração das sementes, necessitando maiores quantidade de oxigênio. Porém as sementes de *Eugenia uniflora* apresentam apenas 0,9% de lipídios (Mello *et al.* 2010).

Tabela 12. Caracterização inicial do consumo de O₂, produção de CO₂ e quociente respiratório (QR), ambos em $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$, de sementes de *E. uniflora* submetidas a tratamento térmico de 55°C/120 minutos (55°C), 60°C/120 minutos (60°C) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamento de sementes	STT	55 °C	60 °C
<i>Consumo de O₂</i>			
STO	326,50 aA	313,18 abA	380,58 aA
-3,4 MPa	314,59 aA	307,32 aA	545,09 bB
- 4 MPa	344,06 aA	416,21 bAB	471,13 abB
Coef. Var.	15,79%		
<i>Produção de CO₂</i>			
STO	134,45	86,69	153,27
-3,4 MPa	122,00	92,06	161,09
- 4 MPa	138,45	98,60	150,09
Média	131,63 B	92,45 A	154,82 B
Coef. Var.	23,26%		
<i>Quociente Respiratório</i>			
STO	0,41	0,28	0,40
-3,4 MPa	0,39	0,30	0,30
- 4 MPa	0,40	0,25	0,32
Média	0,40 C	0,27 A	0,34 B
Coef. Var.	17,57%		

Tabela 13. Caracterização, após 30 dias de armazenamento, do consumo de O₂, produção de CO₂ e quociente respiratório (QR), ambos em $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$, de sementes de *E. brasiliensis* submetidas a tratamento térmico de 55 °C/30 minutos (30 min.), 55 °C/150 minutos (150 min.) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas a tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamento de sementes	Sem Reaplicação			Com Reaplicação		
	STT	30 min.	150 min.	STT	30 min.	150 min.
<i>Consumo de O₂</i>						
STO	89,6 aA _a	96,9 aA _a	96,1 aA _a	90,3 aA _a	106,7 aA _a	94,9 aA _a
-3,4 MPa	193,6 aA _a	88,9 aA _a	83,8 aA _a	198,8 aA _a	582,3 bB _b	61,4 aA _a
- 4 MPa	157,8 aA _a	70,4 aA _a	78,1 aA _a	55,2 aA _a	844,2 cC _b	462,5 bB _b
Coef. Var.	61,07%					
<i>Produção de CO₂</i>						
STO	75,3 aA _a	87,3 aA _a	78,5 aA _a	75,2 abA _a	72,4 bA _a	70,9 aA _a
-3,4 MPa	103,4 aB _a	75,3 aAB _a	63,6 aA _a	85,2 bB _a	99,7 bB _a	50,8 aA _a
- 4 MPa	86,9 aA _b	57,9 aA _b	67,6 aA _a	50,0 aAB _a	27,8 aA _a	66,9 aB _a
Coef. Var.	24,16%					
<i>Quociente Respiratório</i>						
STO	0,84 bA _a	0,90 aA _a	0,82 aA _a	0,84 bA _a	0,71 cA _a	0,82 bA _a
-3,4 MPa	0,54 aA _a	0,84 aB _b	0,76 aAB _a	0,62 aB _a	0,27 bA _a	0,83 bB _a
- 4 MPa	0,66 abA _a	0,82 aA _b	0,86 aA _b	0,89 bB _b	0,03 aA _a	0,20 aA _a
Coef. Var.	19,58%					

O elevado consumo de O₂ sem liberação equivalente de CO₂ poderia significar a presença de outras reações que não a respiração, tal como a peroxidação de lipídios e a oxidação de compostos fenólicos com a liberação do radical superóxido e que podem estar envolvidos com a deterioração das sementes (Hendry 1993; Bailly 2004; Marcos Filho 2005; Berjak & Pammenter 2008; Berjak *et al.* 2011). Delgado (2010) descreve a presença de idioblastos fenólicos em embriões de *Eugenia* spp., inclusive em *Eugenia uniflora* foram observados em maior densidade. A presença desses compostos está relacionada à função de proteção dos tecidos e a mecanismos de interação de plantas e animais, agindo como dissuasivo alimentar e reduzindo a herbivoria (Castro & Machado 2006; Coneglian 2007). Segundo Pinol & Palazón (1993) os compostos fenólicos podem interferir no processo de germinação, por sequestro do oxigênio necessário ao processo respiratório. Dessa forma, a oxidação de compostos fenólicos poderia explicar as altas taxas de consumo de oxigênio apresentadas, mas ainda é necessário verificar a produção de produtos secundários típicos a oxidação.

Ao final do teste de respiração foi verificada a viabilidade das sementes através do

teste de tetrazólio, sendo que para *E. brasiliensis* foi evidenciado que o tratamento 55 °C/30 minutos associado a -3,4 e -4 MPa e 55 °C/150 minutos -4 MPa apresentava 90%, 100% e 85% de sementes mortas, respectivamente, aos 30 dias de armazenamento. Para as sementes de pitanga os tratamentos iniciais de 60 °C e -3,4 MPa e -4 MPa associados a 60 °C apresentavam 65%, 35% e 30% de sementes mortas, respectivamente, estando as outras altamente deterioradas. Durante o teste de respiração, nos tratamentos indicados acima, muitos dos recipientes apresentavam aroma alcoólico, sendo que o mesmo não se repetiu no teste de respiração aos 60 dias de armazenamento em *E. brasiliensis* e foi menos incidente em *E. uniflora* aos 30 dias de armazenamento. Foi feita então a montagem de lâmina e em microscópio ótico foi confirmada a presença de leveduras. Durante o crescimento da levedura, se a concentração de substrato excede um valor crítico, mesmo em condições aeróbias, a via respiratória e a fermentativa podem ocorrer simultaneamente, caracterizando neste caso o metabolismo respiro-fermentativo (Lidén 1993). A intensa atividade desses microrganismos, fungos e leveduras, também pode ser uma das possíveis causas das taxas anormais de respiração nos tratamentos indicados acima.

Nas sementes de *E. uniflora* o alto consumo de O₂ regride (Tabela 14), a exceção das sementes submetidas aos tratamentos térmicos associados a -3,4 MPa e ao tratamento com fungicida, cujos quocientes respiratórios indicam a presença de processos oxidativos. O quociente respiratório dos outros tratamentos, com exceção dos tratamentos -4 MPa e 55 °C, indicam a ocorrência de processos fermentativos.

Tabela 14. Caracterização, após 30 dias de armazenamento, do consumo de O₂, produção de CO₂ e quociente respiratório (QR), ambos em $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$, de sementes de *E. uniflora* submetidas a tratamento térmico de 55°C/120 minutos (55°C), 60°C/120 minutos (60°C) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamento de sementes	Sem Reaplicação			Com Reaplicação		
	STT	55 °C	60 °C	STT	55 °C	60 °C
<i>Consumo de O₂</i>						
STO	66,69 aA _a	198,27 bB _b	164,11 aAB _a	66,69 aA _a	91,56 aA _a	90,00 aA _a
-3,4 MPa	74,92 aA _a	333,05 cB _b	507,25 bC _b	56,65 aA _a	73,04 aA _a	139,74 aA _a
- 4 MPa	113,19 aA _a	74,76 aA _a	117,75 aA _a	74,84 aA _a	75,25 aA _a	162,63 aA _a
Coef. Var.	46,13%					
<i>Produção de CO₂</i>						
STO	71,41 aA _a	128,67 bB _b	173,28 cC _b	71,41 aA _a	94,65 aA _a	100,47 aA _a
-3,4 MPa	85,05 aA _a	109,67 abA _b	83,41 aA _a	63,23 aA _a	73,63 aA _a	107,36 aB _a
- 4 MPa	80,05 aA _a	85,17 aA _a	119,85 bB _a	84,66 aA _a	79,53 aA _a	123,95 aB _a
Coef. Var.	20,32%					
<i>Quociente Respiratório</i>						
STO	1,08 abB _b	0,72 bA _a	1,07 bB _a	1,08 aA _a	1,05 aA _b	1,12 bA _a
-3,4 MPa	1,14 bB _a	0,43 aA _a	0,19 aA _a	1,11 aB _a	1,01 aAB _b	0,78 aA _b
- 4 MPa	0,85 aA _a	1,15 cB _a	1,05 aAB _b	1,13 aB _b	1,06 aB _a	0,79 aA _a
Coef. Var.	16,08%					

Aos 60 dias de armazenamento as sementes que receberam a reaplicação dos tratamentos apresentaram valores de QR próximos ou iguais a 1 (tabela 15), indicando a utilização das vias aeróbicas. Diferentemente das sementes não submetidas a reaplicação dos tratamentos e das sementes de pitanga (Tabela 16), que apresentaram QR superior a 1, indicando a ativação das vias anaeróbicas de respiração (Labouriau 1983; Kader & Saltveit 2002; Saquet & Streif 2002). Geralmente sementes mais deterioradas, por apresentarem menor eficiência da atividade mitocondrial, mas necessitando produzir ATP, podem apresentar mudanças nos caminhos respiratórios, ou seja, do metabolismo oxidativos para o metabolismo fermentativo, aumentando a produção de dióxido de carbono (Marcos Filho 2005). A produção semelhante de dióxido de carbono das sementes com diferentes níveis de deterioração poderia indicar que as mais deterioradas apresentavam maiores extensões de tecidos mortos com consequente redução de regiões com atividade metabólica (Lamarca 2009). Tal evento pode ser observado no QR das sementes de *E. brasiliensis* tratadas a -4 MPa, com e sem reaplicação aos 60 dias de armazenamento, que apresentavam germinabilidade significativamente menor quando não submetidas a reaplicação (Tabela 1).

Tabela 15. Caracterização, após 60 dias de armazenamento, do consumo de O₂, produção de CO₂ e quociente respiratório (QR), ambos em $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$, de sementes de *E. brasiliensis* submetidas a tratamento térmico de 55 °C/30 minutos (30 min.), 55 °C/150 minutos (150 min.) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas a tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamento de sementes	Sem Reaplicação				Com Reaplicação			
	STT	30 min.	150 min.	Médias	STT	30 min.	150 min.	Médias
<i>Consumo de O₂</i>								
STO	116,1	67,85	55,0		116,1	116,1	90,56	
-3,4 MPa	79,01	90,65	53,8		121,9	106,9	102,6	
- 4 MPa	86,37	76,84	43,9		157,1	109,0	108,7	
Médias		Sem trat.	112,75 B		30 min.	87,25 A	150 min.	75,74 A
Coef. Var.	34,92%							
<i>Produção de CO₂</i>								
STO	125,8	80,35	62,43		125,8	73,4	90,80	
-3,4 MPa	97,68	111,6	63,03		117,3	88,4	103,5	
- 4 MPa	100,4	95,20	60,50		117,9	89,4	77,17	
Médias	107,9 <u>a</u>	95,73 <u>b</u>	61,99 <u>a</u>		120,3 <u>b</u>	83,72 <u>a</u>	90,49 <u>b</u>	
Coef. Var.	14,26%							
<i>Quociente Respiratório</i>								
STO	1,08	1,18	1,14	1,14 <u>a</u>	1,08	1,02	1,00	1,03 <u>a</u>
-3,4 MPa	1,24	1,23	1,18	1,22 <u>b</u>	1,05	0,93	1,02	1,00 <u>a</u>
- 4 MPa	1,18	1,24	1,38	1,27 <u>b</u>	0,79	1,03	0,78	0,86 <u>a</u>
Coef. Var.	15,15%							

Tabela 16. Caracterização, após 60 dias de armazenamento, do consumo de O₂, produção de CO₂ e quociente respiratório (QR), ambos em $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$, de sementes de *E. uniflora* submetidas a tratamento térmico de 55°C/120 minutos (55°C), 60°C/120 minutos (60°C) e sem tratamento térmico (STT) e submetidas tratamento osmótico de -3,4 MPa, -4 MPa e sem tratamento osmótico (STO). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculo dentro das colunas, maiúsculo dentro de linhas e sublinhado entre sem e com reaplicação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamento de sementes	Sem Reaplicação			Com Reaplicação		
	STT	55 °C	60 °C	STT	55 °C	60 °C
<i>Consumo de O₂</i>						
STO	71,9 aA _a	79,2 aA _a	171,7 aB _b	71,9 aA _a	66,2 aA _a	108,0 aB _a
-3,4 MPa	110,6 bA _b	107,1 aA _b	155,1 aB _a	65,9 aA _a	75,6 aA _a	132,2 abB _a
- 4 MPa	75,7 aA _a	92,7 aA _a	151,9 aB _a	59,8 aA _a	78,4 aA _a	143,8 bB _a
Coef. Var.	18,91%					
<i>Produção de CO₂</i>						
STO	83,2	88,7	193,1	83,2	75,5	123,9
-3,4 MPa	128,2	129,2	180,3	75,5	93,0	131,9
- 4 MPa	89,9	112,2	175,1	71,9	94,5	139,7
Médias	100,4 <u>b</u>	110,0 <u>b</u>	182,8 <u>b</u>	69,3 <u>a</u>	87,7 <u>a</u>	131,9 <u>a</u>
Coef. Var.	17,16%					
<i>Quociente Respiratório</i>						
STO	1,16	1,12	1,12	1,16	1,14	1,15
-3,4 MPa	1,16	1,21	1,17	1,14	1,23	1,01
- 4 MPa	1,19	1,21	1,16	1,21	1,20	0,99
Médias	1,17 <u>a</u>	1,18 <u>a</u>	1,15 <u>b</u>	1,17 <u>a</u>	1,19 <u>a</u>	1,05 <u>a</u>
Coef. Var.	5,06%					

4.4. Considerações finais

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram constatar que o tratamento térmico reduz a incidência da maioria dos fungos presentes em sementes de *Eugenia*, porém ele pode potencializar a incidência de *Penicillium* sp. e apresenta baixo ou nenhum controle sobre *Fusarium* sp. A escolha dos binômios tempo-temperatura requer atenção, pois os limites máximos de tolerância térmica entre as sementes de *Eugenia* e os fungos são muito próximos. O tratamento osmótico, por sua vez, que também apresentou eficiência no controle da micota, resultou em menor prejuízo sobre a qualidade fisiológica, principalmente quando são utilizados períodos curtos de exposição das sementes à solução osmótica. O tratamento osmótico demonstrou grande potencial para reduzir particularmente o desenvolvimento de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., diminuindo seu desenvolvimento, mas para os demais fungos a termoterapia foi mais eficiente. Em futuros trabalhos, a quantificação da área das sementes tomada pelos fungos poderá demonstrar mais claramente a eficiência desses tratamentos. A associação do tratamento térmico com o osmótico aparentemente produziu resultados mais favoráveis e também pode ser melhor explorada em trabalhos futuros.

Embora os tratamentos osmóticos e térmicos tenham demonstrado alguma eficiência no controle de fungos em sementes de *Eugenia*, mantendo a qualidade fisiológica das mesmas, deve-se salientar que não houve um tratamento em particular que tenha sido efetivo no controle de todos os fungos. Portanto, é fundamental que se tenha conhecimento da micota de cada lote de sementes para se adequar o tratamento mais indicado. Contudo, independente dessa análise inicial, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. demandam maior atenção devido à dificuldade de controle e ao efeito deletério durante o armazenamento de sementes recalcitrantes.

A falta do efeito residual típico dos fungicidas é um dos maiores problemas para o uso de tratamentos alternativos. No presente trabalho foi possível demonstrar que a reaplicação dos tratamentos pode diminuir aquela deficiência e ampliar o controle ao longo do armazenamento. Os tratamentos osmóticos, em particular, mostraram melhor controle sobre a micota quando reaplicados, favorecendo, direta ou indiretamente, a manutenção da qualidade das sementes. Porém, a decisão de reaplicar ou não um tratamento deve, novamente, estar associada à análise da micota inicial presente nas sementes, pois a reaplicação pode levar à potencialização de alguns fungos. A reaplicação dos tratamentos pode garantir a persistência do efeito de controle sobre os fungos, porém ainda há a necessidade de se avaliar durante o armazenamento, por testes de sanidade, o melhor tratamento para manter o controle da micota.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adebayo, A.A. & Harris, R.F.** 1971. Fungal growth responses to osmotic as compared to matric water potential. *Soil Science Society of America* 35: 465–469.
- Ames, A.** 1915. *Phytopathology* 5: 11-19. In: Cochrane, V.W. 1958. *The Fisiology of Fungi*. New York. John Wiley & Sons Inc. 524p.
- Amorim, L.** 1995. Ciclos primários e secundários. In: Bergamin Filho, A; Kimati, H; Amorim, L. (Ed.). *Manual de fitopatologia*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. 900p.
- 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.
- Anguelova-Merhar, V.S., Calistru, C. & Berjak, P.** 2003. A Study of Some Biochemical and Histopathological Responses of Wet-store Recalcitrant Seeds of *Avicennia marina* Infected by *Fusarium moniliforme*. *Annals of botany* 92(3): 401-408.
- Araujo, E.F., Martins, D.S., Ferreira, M.A.L. & Silva, R.F.** 1985. Efeito de fumigantes e inseticidas de contato na germinação e vigor de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Ceres, Viçosa* 32: 110-119.
- Bailly, C.** 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* 14: 93-107.
- Bajpai, B. & Patil, S.** 1997. Induction of tannin acyl hydrolases (EC 3.1.1.20) activity in some members of fungi imperfecti. *Enzyme and Microbial Technology* 20:612-614.
- Bankole, S.K.** 1994. Changes in moisture content fungal infection and kernel germinability of maize in storage. *International Journal of Tropical Plant Diseases, Ago-Iwoye* 12: 213-218.
- Barbedo, C.J. & Bilia, D.A.C.** 1998. Evolution of research on recalcitrant seeds. *Scientia Agricola* 55(special): 121-125.
- Barbedo, C.J. & Marcos Filho, J.** 1998. Tolerância a dessecação em sementes. *Acta Botânica Brasilica* 12:145-164.
- Barkai-Golan, R. & Phillips, D.J.** 1991. Postharvest heat treatment of fresh fruit and vegetables for decay control. *Plant Disease* 75: 1085-1089.
- Berjak, P.** 1987. Stored seeds: the problems caused by microorganisms. *Proceedings, An advanced International Course on Seed Pathology, Passo Fundo, RS. Embrapa/Abrates* p.93-112.
- Berjak, P.** 1996. The role of micro-organisms in deterioration during storage of recalcitrant and intermediate seeds. Quedraogo, A.S.; Poulsen, N, K.; Stubsgaard, F. (Ed.). In: *Workshop on Improved Methods for Handling and Storage of Intermediate/ Recalcitrant Tropical Forest Tree Seeds*. 1996: Rome, *Proceedings...Rome: IPGRI* p.121-126.
- Berjak, P. & Pammenter, N.W.** 2008. From *Avicennia* to *Zizania*: Seed Recalcitrance in Perspective. *Annals of Botany* 101: 213-228.
- Berjak, P., Seršen., Varguese, B. & Pammenter, N.W.** 2011. Cathodica melioration of the adverse effects of oxidative stress accompanying procedures necessary for cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant-seeded species. *Seed science Research* 03: 187-203.

- Barroso, G.M.** 1991. Sistematica das angiospermas do Brasil. Vicosá: UFV 2:377.
- Barroso, G.M. & Perón, V.** 1994. Myrtaceae. *In*: Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo, RJ. Aspectos florísticos das espécies vasculares. (M.P.M. Lima & R.R. Guedes-Bruni, eds.). Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 1:261-302.
- Bettiol, W. & Ghini, R.** 2003. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. *In*: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (eds.) Métodos alternativos de controle fitossanitário, Jaguariúna; Embrapa Meio Ambiente p.79-96.
- Biodiversitas.** 2006. Lista da flora ameaçada de extinção com ocorrência no Brasil IUCN. http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/listas_flora.asp (acesso em 2012)
- Bonjovani, M.R.** 2011. Taxas respiratórias em sementes recalcitrantes de *Inga vera* Willd. Subsp. *Affinis* (DC.) T.D. Pennington. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, 122p.
- Booth, E.** 1971. The genus *Fusarium* (Kew). Commonwealth Mycology Institute. 237p.
- Botanic Gardens Conservation International.** 2001. Normas internacionais de conservação para jardins botânicos. Conselho Nacional do Meio Ambiente/Rede Brasileira de jardins botânicos/Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro/EMC, Rio de Janeiro, 109p.
- Botelho, L.S.** 2006. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*), ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*), aroeira-pimenteira (*Schinus terebinthifolius*) e aroeira-salsa (*Schinus molle*): incidência, efeitos na germinação, transmissão para plântulas e controle. 114f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- Botelho, L.S., Moraes, M.H.D. & Menten, J.O.M.** 2008. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeito na germinação e transmissão para as plântulas. Summa Phytopathologica 34(4):343-348.
- Brasil.** 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: MAPA/ACS. 399p.
- Brownell, KH. & Schneider, R.W.** 1985. Roles of matric and osmotic components of water potential and their interactions with temperature in the growth of *Fusarium oxysporum* in synthetic medium and in soil. Phytopathology 75:53–57.
- Calistru C., McLean M., Pammenter, N.M. & Berjak, P.** 2000. The effects of Mycofloral infection of the viability and ultrastructure of wet-stored recalcitrant seeds of *Avicennia marina* (Forssk) Vierh. Seed Science Research 10: 341-353.
- Carneiro, J.S.** 1986. Fungos associados a sementes de essências florestais. Fitopatologia Brasileira 11(3): 557-566.
- Carneiro, J.S.** 1990. Qualidade sanitária de sementes de espécies florestais em Paraopeba, MG. Fitopatologia Brasileira 15(1): 75-77.
- Carvalho, W.L. & Muchovej, J.J.** 1991. Fungos associados a sementes de essências florestais. Revista Árvore, Viçosa 15(2): 173-178.
- Castro, R.D. & Hilhorst, H.W.M.** 2004. Desenvolvimento das sementes e conteúdo de água. *In*: Germinação: do básico ao aplicado (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre, p.51-67.

Castro, R.D. & Machado, S.R. 2006. Células e tecidos secretores. Anatomia vegetal. Appezato-da-Gloria, B. & Carmello-Guerreiro, S. (editoras). – 2ª edição. Viçosa: Ed. UFV. 438p.

Chaudhuri, M. 1923. Ann. Botany 37: 519-539. *In*: Cochrane, V.W. 1958. The Fisiology of Fungi. New York. John Wiley & Sons Inc. 524p.

Cherobini, E.A.I., Muniz, M.F.B., Hoppe, J.M., Ávila, A.L. & Camargo, R.F. 2004. Qualidade sanitária de sementes de *Eugenia involucrata* DC, *Eugenia pyriformis* Cambessedes, *Feijoa sellowiana* Berg, *Psidium cattleianum* Sabine. *In*: Simpósio brasileiro de patologia de sementes, 8., 2004, João Pessoa. Palestras e Resumos: João Pessoa, p.163.

Christensen, C.M. 1972. Microflora and seed deterioration. *In*: Roberts, E.H. (ed.). Viability of seeds. Chapman & Hall, London 3: 59-93.

Christensen, C.M. & Kaufmann, H.H. 1965. Deterioration of stored grains by fungi. Annual Review of Phytopathology 3:69-84.

Civello, P.M., Martínez, G.A., Chaves, A.R. & Añón, M.C. 1997. Heat treatments delay ripening and postharvest decay of strawberry fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45:4589-4594.

Cochrane, L. C. 1932. Phytopathology 22: 791-812. *In*: Cochrane, V.W. 1958. The Fisiology of Fungi. New York. John Wiley & Sons Inc. 524p.

Cochrane, V.W. 1958. The Fisiology of Fungi. New York. John Wiley & Sons Inc. 524p.

Coelho, R.M.S & Castro, H.A. 1996. Patogenicidade de *Phomopsis* e *Phoma* associados a sementes de ipê (*Tabebuia serratifolia*) e angico vermelho (*Anadenanthera peregrina*). Summa Phytopathologica 22(3/4):224-227.

Cole, H. Jr. & Fergus, C. L. 1956. Phytopathology 46: 159-163. *In*: Cochrane, V.W. 1958. The Fisiology of Fungi. New York. John Wiley & Sons Inc. 524p.

Coneglian, I.R.M. 2007. Morfologia e antogênese do pericarpo e semente de *Eugenia puniceifolia* (H.B. & K.) DC., *Myrcia bela* Camb. e *Campomanesia pubescens* (DC.) Berg. (Myrtaceae). Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 107p.

Corrêa, M.P. 1975. Dicionário da plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura.

Cuzzi, C., Link, S., Vilani, A. & Onofre, S.B. 2011. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). Global Science and Technology 4(2): 47-57.

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

Delgado, L.F. 2006. Tolerância a dessecação em sementes de espécies brasileiras de *Eugenia*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo. 106f.

Delgado, L.F. 2010. Fracionamento, maturação e origem da capacidade regenerativa de sementes de algumas espécies brasileiras de *Eugénias* (Myrtaceae). Tese de doutorado, Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo. 106f.

Delgado, L.F. & Barbedo, C.J. 2007. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 42: 265-272.

Delgado, L.F. & Barbedo, C.J. 2012. Water potential and viability of seeds of *Eugenia* (Myrtaceae), a tropical tree species, based upon different levels of drying. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55(4): 583-590.

Deverall, B.J. 1965. The physical environment for fungal growth. *In: Ainsworth, G.C. & Sussman, A.S. (Ed.). The fungi: An advanced treatise.* New York: Academic Press 1: 543-560.

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*, Saint Paul 150: 451-455.

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.

Dix, N.J. & Webster, J. 1995. *Fungal Ecology.* Chapman and Hall, London, 549 pp.

Donadio, L.C. 1997. Study of some Brazilian Myrtaceae in Jaboticabal - SP. *Acta Horticulturae* 452:181-183.

Donadio, L.C. & Moro, F.V. 2004. Potential of brazilian *Eugenia* Myrtaceae - as ornamental and as a fruit crop. *Acta Horticulturae* 632:65-68.

Duniway, J.M. 1979. Water relations of water molds. *Annual Review of Phytopathol* 17: 431-460.

Edney, K.L. & Burchill, R.T. 1967. The use of heat to control the rotting of Cox's orange apples by *Gloeosporium*. *Annual Applied Biology* 59: 389-400.

Eira, M.T.S. 1996. Classificação de sementes em ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias. *In: PUIGNAU, J. P. (Ed.). Conservacion de germoplasma vegetal.* Montevideu: IICA (Procisur, Dialog, 45) p. 119-122.

Erley, D.P., Mycock, D.J. & Berjak, P. 1997. The elimination of *Fusarium moniliforme* Sheldon infection in maize caryopses by hot water treatments. *Seed Science and Technology* 25:485-501.

Ernest, M., Mendgen, W. K. & Wirsal, W. 2003. Endophytic Fungal Mutualists: Seed-Borne *Stagonospora* spp. Enhance reed biomass production in axenic microosms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 580-587.

Faiad, M.G.R., Ramos, V.R. & Wetzel, M.M.V. 2004. Patologia de espécies florestais do cerrado. *In: Simpósio brasileiro de patologia de sementes, 8, 2004, João Pessoa. Palestras e Resumos: João Pessoa, p.36-42.*

Farrant, J.M., Pammenter, N.M. & Berjak, P. 1988. Recalcitrance - a current assessment. *Seed Science and Technology* 16: 155-66.

Feltre, R. 1982. *Química Geral.* 2ed. Moderna. São Paulo 1:364.

Ferreira, A.G. & Borghetti, F. (orgs.). 2004. *Germinação: do básico ao aplicado.* Artmed, Porto Alegre, 323p.

Ferreira, G.F.P., Novaes, Q.S., Batista, R.L., Souza, S.E., Azevedo, G.B. & Silva, D.M. 2011. Fungos associados a grãos de café (*Coffea arabica*L.) beneficiados no sudoeste da Bahia. *Summa phytopathol* 37:98-102.

- Fonseca, S.C.L. & Freire, H.B.** 2003. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. *Bragantia* 62: 297-303.
- Fukuda, Y., Takami, S. & Ikeshoji, Y.** 1954. Journal of Japanese Botany 14: 67-90. *In*: Cochrane, V.W. 1958. The Fisiology of Fungi. New York. John Wiley & Sons Inc. 524p.
- Grandis, A., Godoi, S., Moraes, M.H.D. & Meneghetti, C.S.B.** 2004. Qualidade sanitária das sementes de *Astronium graveolens* (Guarita). *In*: Simpósio brasileiro de patologia de sementes, 8, 2004, João Pessoa. Palestras e Resumos: João Pessoa, p.177.
- Guilherme, F.A.G., Morellato, L.P.C. & Assis, M.A.** 2004. Horizontal and vertical tree community structure in a lowland Atlantic rain forest, Southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 27:725-737.
- Hayashi, K.** 1954. Japan. J. Botany 14: 91-98. *In*: Cochrane, V.W. 1958. The Fisiology of Fungi. New York. John Wiley & Sons Inc. 524p.
- Hawkins, L.A.** 1916. Agr. Research 7: 255-260. *In*: Cochrane, V.W. 1958. The Fisiology of Fungi. New York. John Wiley & Sons Inc. 524p.
- Hellwig, T. & Ueno, B.** 2009. Levantamento de Fitopatógenos Causadores de Doenças em Frutíferas Nativas na Região Sul do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agroecologia* 4 (2).
- Hendry, G.A.F.** 1993. Oxygen, free radical processes and seed longevity. *Seed Science Researach* 3: 141-153.
- Herbert, C., O'Connell, R., Gaulin, E., Salesses, V., Esquerré-Tugayé, M. T. & Dumas, B.** 2004. Production of a cell wall associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. *Fungal Genetics and Biology* 41:140-147.
- Homechin, M., Pizzinatto, M.A. & Menten, J.O.M.** 1982. Sanidade de sementes de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. e *Pinus taeda* e patogenicidade de *Fusarium oxysporum* em plântulas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. *Summa Phytopathologica* 12(1/2):103-12.
- Hong, T.D. & Ellis, R.H.** 1996. A protocol to determine seed storage behavior. Rome: Internacional Plant genetic Resources Institute 55. (Technical Bulletin, 1)
- Hopkins, K.L. & McQuilken, M.P.** 2000. Characteristics of Pestalotiopsis associated with hardy ornamental plants in the UK. *European Journal of Plant Pathology* 106: 77- 85.
- Ista.** 1985. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology* 13: 356-513.
- Jorge-Silva, M.L., Rodrigues, M.L., Ferraz, J.F.P. & Ricardo, C.P.P.** 1989. Effect of water availability on growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and on host parasite relations. *Mycological Research* 92: 157-161.
- 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 Deckker, New York, pp.7-29.
- Kaess, G. & Schwartz, W.** 1935. Arch. Mikrobiol 6: 208-214. *In*: Cochrane, V.W. 1958. The Fisiology of Fungi. New York. John Wiley & Sons Inc.

- Kermode, A.R. & Finch-Savage, B.E.** 2002. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. *In* Desiccation and survival in plants: drying without dying (M. Black & H.W. Pritchard, eds.). CABI Publishing, New York. p.149-184.
- Klaus, H.** 1941. Phytopathol. Z 13: 126-195. *In*: Cochrane, V.W. 1958. The Fisiology of Fungi. New York. John Wiley & Sons Inc. 524p.
- Klich, M.A., Arthur, K.S., Lax, A.R. & Bland, J.M.** 1994. Iturin A: a potential new fungicide for stored grains. *Mycopathologia* 127, 123–127.
- Kohama, S., Maluf, A.M., Bilia, D.A.C. & Barbedo, C.J.** 2006. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixameira). *Revista Brasileira de Sementes* 28: 72-78.
- Labouriau, L.G.** 1983. A germinação das sementes. OEA: Washington, 175p.
- Lamarca, E.V.** 2009. Taxas respiratórias e velocidade de deterioração de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. em função de variações hídricas e térmicas. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica de São Paulo, 98p.
- Landrum, L.R. & Kawasaki, M.L.** 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil – an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia* 49:508-536.
- Lidén, G.** 1993. On-line Monitoring Techniques for the Study for Yeast Physiology. Some Studies on the Yeasts *Pichia stipites* and *Saccharomyces cerevisiae*. Tese (doutorado). Department of chemical reaction engeneering, Chalmers University of Technology, Göteborg, Denmark.
- Lisbôa-Padulla, T., Moraes, M.H.D. & Menten, J.O.M.** 2004. Sanidade e potencial germinativo de sementes de *Caesalpinia echinata*, Lam (pau-brasil) coletadas no campus da ESALQ/USP, em Piracicaba. *In*: Simpósio brasileiro de patologia de sementes, 8, 2004, João Pessoa. Palestras e Resumos: João Pessoa, p.182.
- Lisbôa-Padulla, T., Moraes, M.H.D., Barbedo, C.J., Borges, I.F., Menten, J.O.M. & Pascholati, S.F.** 2010. Detecção de fungos em sementes de pau-Brasil (*Caesalpinia echinata*) coletadas durante sua formação e dispersão. *Revista Brasileira de Sementes* 32:154-159.
- Lorenzi, H.** 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, Plantarum. 352p.
- Machado, J.C.** 1988. Patologia de sementes fundamentos e aplicações. Brasília, MEC-ESAL-FAEPE. 106p.
- Machado, A. Q.** 2002. Uso da restrição hídrica em testes de sanidade de semente de algodoeiro. 55f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavra.
- Marchiori, J.N.C. & Sobral, M.** 1997. Dendrologia das angiospermas – Myrtales. Editora da UFSM, Santa Maria. 304p.
- Marcos Filho, J.** 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: Fealq, 495p.
- Martins, S.E.** 1991. Aspectos fitossanitários e fisiológicos de sementes de barbatimão, ipê amarelo e ipê roxo de algumas localidade do Sul de Minas Gerais. 72p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.
- Masum, M.M.I., Islam, S.M. & Fakir, M.G.A.** 2009. Effect of seed treatment practices in controlling of seed-borne fungi in sorghum. *Scientific Research and Essay* 4: 22-27.

Mello, J.I.O., Barbedo, C.J., Salatino, A. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 2010. Reserve Carbohydrates and lipids from the seeds of four tropical tree species with diferente sensitivity to desiccation. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53:889-899.

Mendes, M.L. & Muchovej, J.J. 1991. *Pestalotiopsis* leaf spot of brazil Wood, *Caesalpinia echinata*. *Plant Pathology* 40:635-636.

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. 1995. Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. São Paulo SP. CibaAgro. 312p.

Mesquita, J.B. 1999. Patologia de sementes de angico-vermelho, copaíba e jacarandá-da-Bahia. 53p. Tese (doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

Michel, B.E. & Kaufmann, M.R. 1973. The osmotic potential of polyethylene glicol 6000. *Plant Physiology* 51:914-916.

Moraes, W.S., Zambolim, L., Lima, J.D., Salomão, L.C.C. & Cecon, P. 2005. Termoterapia de banana ‘Prata-Anã’ no controle de podridões em pós-colheita. *Fitopatologia Brasileira* 30: 603-608.

Mycock, D.J. & Berjak, P. 1990. Fungal contaminants associated with several homoiohydrous (recalcitrant) seed species. *Phytophylactica* 22:413-418.

Mycock, D.J. & Berjak, P. 1995. The implications of seed associated mycoflora during storage. In: Jaime, K.& Galili, G. Seed development and germination. New York-Basel: Hong-Kong, 853p.

Nameth, S.T. 1998. Priorities in seed pathology research. *Scientia Agricola* 55 (Especial):94-97.

Nascimento, L.C., Nery, A.R., Araújo, E., Souto, F.M., Alves, E.U. & Almeida, F.A. 2004. Incidência de fungos em sementes de espécies nativas do Semi-árido Nordeste. In: Simpósio brasileiro de patologia de sementes, 8, 2004, João Pessoa. Palestras e Resumos: João Pessoa, p.197.

Neergaard, P. 1979. Seed Pathology. London. The MacMillan Press. v. 1, 839p.

Oliveira Filho, A.T. & Fontes, M.A. 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic forests in southeastern Brazil, and the influence of climate. *Biotropica* 32:793-810.

Oliveira, C.F. 2011. Conservação de sementes de *Eugenia uniflora* Lam. e *Inga vera* Penn.: qualidade sanitária e taxas respiratórias. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo. 100f.

Oliveira, C.F., Oliveira, D.C., Parisi, J.J.D. & Barbedo, C.J. 2011. Deterioração de sementes de espécies brasileiras de *Eugenia* em função da incidência e do controle de fungos. *Revista brasileira de sementes* 33:520-532.

Oster, A.H. 2004. Tratamento com calor no controle de *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not.) em maçãs cv. Fuji. 85p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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.

- Pammenter, N.W., Berjak, P., Farrant, J.M., Smith, M.T. & Ross, G.** 1994. Why do stored hydrated recalcitrant seeds die? *Seed Science Research* 4:187-191.
- Pammenter, N.W. & Berjak, P.** 2000. Aspects recalcitrant seed physiology. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12:56-59.
- Parisi, J.J.D.** 2012. Associação entre fungos e a viabilidade de embriões de *Inga vera*. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola.
- Parisi, J.J.D., Andrade, F.A., Coutinho, E.L., Botosso, M.C., Martins, M.C. & Sales, W.R.M.** 2005. Qualidade sanitária de sementes e mudas de espécies arbóreas nativas do Estado de São Paulo. *Informativo Abrates* 15(1, 2, 3).
- Peixoto, A.L. & Gentry, A.H.** 1990. Diversidade e composição florística da mata de tabuleiro na Reserva Florestal de Linhares (Espírito Santo, Brasil). *Revista Brasileira de Botânica* 13:19-25.
- Pinol, M.T. & Palazón, J.** 1993. Fisiologia y bioquímica vegetal. 1ª ed. Madrid: McGraw Hill, 581p.
- Pinto, G. A. S.** 2003. Produção de Tanase por *Aspergillus niger*. 213f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Piveta, G., Lazarotto, M., Girardi, L.B., Mezzomo, R., Muniz, M.F.B. & Blume, L.** 2009. Efeito do tratamento térmico na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de *Lafoensia pacari* St. Hil. *Revista Brasileira de Agroecologia* 4(2): 1653-1657.
- Pongapanich, K.** 1990. Fungi associated with forest tree seeds in Thailand. In: Anon, ed. Pests and diseases of forest plantation in the Asia-Pacific Region. Bangkok: RAPA, 114-121.
- Prabhu, A.S. & Bedendo, I.P.** 1988. Glume blight of rice in Brazil: etiology, varietal, reaction and loss estimates. *Tropical Pest Management*, London 34:85-88.
- Rego, S.S., Santos, A.F., Medeiros, A.C.S. & Abreu, D.C.A.** 2004. Associação de fungos com frutos e sementes de imbuia (*Ocotea porosa*). In: Simpósio brasileiro de patologia de sementes, 8., 2004, João Pessoa. Palestras e Resumos: João Pessoa p.214.
- Richardson, M.J.** 1979. Na annotated list of seed-borne diseases. 3ed. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 320p.
- Roberts, E.H.** 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1: 499-514.
- Sales, N.L.** 1992. Efeito da população fúngica e do tratamento e do tratamento químico no desempenho de sementes de ipê-amarelo, ipê-roxo e barbatimão. 89p. Dissertação (Mestrado em fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.
- Santana, D.G. & Ranal, M.** 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. Ed. Universidade de Brasília, Brasília, 248p.
- 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.** 2001. Fungos em sementes de espécies arbóreas da mata Atlântica. Colombo, *Boletim de Pesquisa Florestal* (jan/jun) 42:51-60.

Santos, A.F. & Parisi, JJD. 2004. Estado da arte e perspectivas da patologia de sementes florestais no Brasil. In: VII Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, João Pessoa, p.43-47.

Santos, M.C.A., Aroucha, E.M.M., Souza, M.S., Silva, R.F. & Souza, P.A. 2008. Condicionamento osmótico de sementes – Revisão de Literatua. Caatinga 21(2):01:06.

Santos, M.F., Ribeiro, R.C.W., Faiad, M.G.R. & Salomão, S.M. 1997. Fungos associados as sementes de barú (*Dipteryx alata* Vog.). Revista Brasileira de Sementes 19:135-139.

Saquet, A.A. & Streif, J. 2002. Respiração e produção de etileno de maçãs armazenadas em diversas concentrações de oxigênio. Revista Brasileira de Agrociências 8: 71-75.

Sauter, D.B., Meronuck, R.A. & Christensen, C.M. 1992. Microflora. In: Sauter, D.B. (Ed.). Storage of cereal grains and their products. 4ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemist, p.313-40.

Silva, C.V., Bilia, D.A.C., Maluf, A.M. & Barbedo, C.J. 2003. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae). [Seed germination of "uvaia" (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae) after cutting]. Revista Brasileira de Botânica 26:213-221.

Silva, C.V., Bilia, D.A.C. & Barbedo, C.J. 2005. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. [Germination of *Eugenia* species seeds after cutting]. Revista Brasileira de Sementes 27, 86-92.

Silva, R.S.M., Chaves, L.J. & Aves, R.V. 2001. Caracterização de frutos e árvores de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) no sudeste do Estado de Goiás, Brasil. Revista Brasileira de Fruticultura 23:330-334.

Singh, D. & Singh, K.G. 1990. Occurrence of fungi in rubber seeds of Malaysia. Journal of Natural Rubber Research 3: 64–65.

Soave, J. & Whetzel, M.M.V.S. (Ed.) 1987. Patologia de sementes. Campinas: Fundação Cargill. 480p.

Splittstoesser, D.F. & Churey, J.J. 1991. Reduction of heat resistance of *Neosartorya fischeri* ascospores by sulfur dioxide. Journal of Food Science, Chicago 56:876-877.

Sutherland, J.R., Dikmann, M. & Berjak, P. (Eds.). 2002. Forests tree seed health for germplasm conservation. Rome: IPGRI, 85p. (Technical Bulletin, n 6).

Tabarelli, M. & Mantovani, W. 1999. A riqueza de espécies arbóreas na floresta atlântica de encosta no estado de São Paulo (Brasil). Revista Brasileira de Botânica 22:217-223.

Taiz, L. & Zeiger, E. 2004, Fisiologia Vegetal. 3ªed. Artmed, Porto Alegre, 719p.

Tanaka, M.A.S., Ito, M.F., Braga, C.A.S. & Armond, G. 2003. Tratamento térmico solar da água para controle de fitopatógenos. Fitopatologia brasileira (Ago) 28:386-393.

Töfoli, J.G., Ferrari, J.T., Domingues, R.J. & Nogueira, E.M.C. 2011. Botrytis sp. em espécies hortícolas: hospedeiros, sintomas e manejo. Biológico, Divulgação Técnica, São Paulo 73:11-20.

Toledo, F.F. & Marcos Filho, J. 1977. Manual das sementes - tecnologia da produção. São Paulo: Ceres. 224p.

Vertucci, C.W. & Farrant, J.M. 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. *In: Seed development and germination* (J. Kigel & G. Galili, eds.). Marcel Dekker Inc., New York, p.237-271.

Vieira, A. H., Martins, E. P., Pequeno, P. L. L., Locatelli, M. & Souza, M. G. 2001. Técnicas de produção de sementes florestais. Circular Técnica, Embrapa-CPAF Rondônia, 205: 2-4.

Walters, C. 2000. Levels of recalcitrance in seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia* 12(especial):7:21.

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

Williams, C.C., Cameron, E.J. & Williams, O.B. 1941. Food Research 6:69-73. *In: Cochrane, V.W.* 1958. The Fisiology of Fungi. New York. John Wiley & Sons Inc.

Winter, W., Banziger, I., Krebs, H. & Ruegger, A. 1997. Water treatments against damping-off diseases of cereals. *Agrarforschung* 4:467-470.

Woods, D.M. & Duniway, J.M. 1986. Some effects of water potential on growth, turgor and respiration of *Phytophthora cryptogea* and *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 76: 1248–1253.