

EDMIR VICENTE LAMARCA

**Taxas Respiratórias e Velocidade de  
Deterioração de Sementes de *Caesalpinia  
echinata* Lam. em Função de Variações  
Hídricas e Térmicas**

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

SÃO PAULO

2009

EDMIR VICENTE LAMARCA

**Taxas Respiratórias e Velocidade de  
Deterioração de Sementes de *Caesalpinia  
echinata* Lam. em Função de Variações  
Hídricas e Térmicas**

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 pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Lamarca, Edmir Vicente  
L215t Taxas respiratórias e velocidade de deterioração de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. em função de variações hídricas e térmicas / Edmir Vicente Lamarca - São Paulo, 2009.  
98 p.il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2009  
Bibliografia.

1. Sementes. 2. Deterioração. 3. Pau-brasil. I. Título

*“Se os homens voltassem mais a mente ao que a natureza está a lhes mostrar, seguindo-a,  
melhor seria toda gente”*

*Dante Alighieri*

## Agradecimentos

À minha família, principalmente aos meus pais Elisa e Vicente e ao meu irmão Eric, por dar-me estrutura no seguimento de minha vida e sempre me dar apoio e incentivo para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador e amigo Dr. Claudio Barbedo pela sincera amizade, paciência, orientação, incentivo e ensinamentos científicos e de vida.

À Adeliana, Laís e Arthur pela amizade e por terem me emprestado seu marido e seu pai por diversas vezes.

Aos amigos e quase irmãos, companheiros do dia a dia, Ruanito, Marcio, Carmem, Juliana, Tate, Nestor, Talita (Bandeirantes), Talita (Botucatu), Cibele, Igor, Moacir, Yuri, Mr. Oda, Jailma, Angélica, Liliana, Simone, Rodrigo, Paulo e FeK.

À Débora pela ilustração do embrião de pau-brasil e pela amizade.

A Carol e ao João Parisi pela amizade e pelas identificações dos fungos nas sementes.

Aos colegas de disciplina e pós graduação, Daniela Soares, Daniela Vinha, Marina, Lidiane, Ludimila, Marcelino, Luciana Mollo, Paola, Monali, Deborinha, Vanessa, Filipe, Rogério, Gisele e Renata.

A Seção de Sementes especialmente aos amigos e funcionários, Nelson, José Marcos, Mônica, Valdir, Ângela, Adriana, Márcia, Lilian, Valdete, Mariana, Irene, Solange, Ana Claudia, Marcos, Felipe e Mauricio.

Agradecimento especial a Denise Bília e a Marina Crestana pela amizade e pelos primeiros ensinamentos científicos.

Aos alunos e funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica especialmente a Dra. Rita, Dra. Márcia, Dra. Lilian e ao Dr. Emerson.

Ao Dr. Marco Aurélio Tiné pelo auxílio e esclarecimento de dúvidas e pelas contribuições na avaliação da dissertação e da defesa.

Aos pesquisadores do Instituto de Botânica, Domingos, Silvia, Clóvis, Eduardo, Vanessa e Armando.

À pós graduação e principalmente aos funcionários e membros, Marcinha, Antônio, Dra. Sônia e Dra. Solange.

Aos funcionários da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu pela ajuda nas coletas de sementes.

À Estação Ecológica de Tapacurá - PE, pela coleta e fornecimento de sementes de pau-brasil.

À Dra. Simone de Pádua Teixeira e Dra. Priscila Fratin Medina, pelo auxílio na identificação das diferentes estruturas nas sementes de pau-brasil.

Ao Dr. Victor Cardoso pelo auxílio nas informações de soma térmica.

Ao Dr. André Pereira pela amizade e auxílio nas informações sobre atmosfera.

Ao Dr. Edvaldo Amaral pelas contribuições na avaliação da dissertação e da defesa.

Ao Prof. Dr. Eduardo Navarro pela amizade e pela informação etimológica da palavra ibirapitanga.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro Processo 481484/2007-8 e a FAPESP, pelo auxílio financeiro do projeto temático Processo 2005/04139-7.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente me ajudaram para a realização desse trabalho.

## Índice

1. Introdução Geral .....	1
2. Capítulo 1 - Viabilidade e Vigor de Sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. (Pau-brasil - Leguminosae) pelo Teste de Tetrazólio .....	3
3. Abstract .....	5
4. Resumo.....	6
5. Introdução.....	7
6. Material e Métodos .....	10
7. Resultados e Discussão .....	15
8. Referências Bibliográficas .....	28
9. Capítulo 2 - Taxa Respiratória e Viabilidade de Sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. em Função do Grau de Hidratação e de Deterioração .....	33
10. Abstract .....	34
11. Resumo.....	35
12. Introdução.....	36
13. Material e Métodos .....	38
14. Resultados e Discussão .....	42
15. Referências Bibliográficas .....	58
16. Capítulo 3 - Taxa Respiratória e Viabilidade de Sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. em Função da Intensidade de Energia Térmica.....	62
17. Abstract .....	63
18. Resumo.....	64
19. Introdução.....	65
20. Material e Métodos .....	66
21. Resultados e Discussão .....	69

22. Referências Bibliográficas .....	86
23. Considerações Finais.....	89
24. Conclusões Gerais.....	93
25. Referências Bibliográficas da Introdução Geral e Considerações Finais .....	94
26. Resumo.....	97
27. Abstract .....	98

## Introdução geral

A história de devastação da Mata Atlântica foi marcada por vários episódios ocorridos desde a colonização, há mais de 500 anos, como a extração do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), os ciclos da cana-de-açúcar, do café e da soja, a exploração imobiliária e madeireira, a ocupação irregular, entre outros (Dean 1996). A floresta perdeu cerca de 93% do total de sua área, restando menos de 100.000 km<sup>2</sup>, comprometendo assim o uso dos recursos genéticos para as futuras gerações (Fundação SOS Mata Atlântica & INPE 2001).

*Caesalpinia echinata* Lam., o pau-brasil, também conhecido como ibirapitanga, que em Tupi, *ybyrapytanga* significa madeira rosada ou avermelhada, onde; *ybyrá* = madeira ou árvore e *pytang* = rosada ou avermelhada (E. A. Navarro, Universidade de São Paulo, 2008, comunicação pessoal). É uma espécie pertencente à família Leguminosae – Caesalpinioideae, nativa do Brasil, de ocorrência natural, desde o Rio Grande do Norte até o Rio de Janeiro na floresta pluvial atlântica. Sua madeira foi muito explorada no início da colonização brasileira para a extração de brasileína, matéria prima para a obtenção de corante vermelho. O pau-brasil atualmente vem sendo utilizado na arborização urbana e na fabricação de arcos de instrumentos musicais com corda, como o violino (Rocha 2004).

A preservação dos recursos genéticos baseia-se em duas estratégias de conservação: *in situ*, que envolve a conservação do material genético em seu próprio habitat natural e *ex situ*, que é a conservação de genes em condições artificiais (coleções permanentes), tais como pólen, cultura de tecidos, plantas vivas e sementes (Botanic Gardens Conservation International 2001).

O armazenamento de sementes em bancos de germoplasma é importante ferramenta para a conservação *ex situ*, uma vez que é possível manter tanto a viabilidade das sementes quanto a preservação da identidade genética, sendo uma estratégia segura e economicamente viável (Carvalho & Nakagawa 1983, Slageren 2002).

De um modo geral a capacidade de armazenamento de sementes está associada à sua qualidade inicial e às condições de armazenamento (Roberts 1973, Carvalho & Nakagawa 2000). A qualidade das sementes é máxima por ocasião da maturidade fisiológica; a partir deste momento, tende a ocorrer uma queda progressiva na qualidade, em função do processo de deterioração (Carvalho & Nakagawa 1983, Carneiro & Aguiar 1993).

A deterioração pode ser definida como toda e qualquer transformação degenerativa da semente, podendo ser de origem bioquímica, física, fisiológica ou genética. A última etapa desse processo é a perda do poder germinativo (Popinigis 1977).

O processo de deterioração é inevitável, mas seus efeitos podem ser minimizados durante o armazenamento como, por exemplo, diminuindo-se o teor de água e a temperatura como meios de redução da atividade metabólica, com reflexos sobre os níveis de respiração do embrião (Carvalho & Nakagawa 2000). O grau de hidratação associado com a temperatura conduz a mudanças no estado energético da água, bem como no tipo de ligação da água, levando a mudanças no metabolismo respiratório da semente (Bradford 1995).

A conservação de sementes com respiração ativa acelera a perda do vigor e eventuais quedas na germinação (Carvalho & Nakagawa 1983), manifestações que traduzem o processo de deterioração (Delouche 2002). Contudo, há insuficiente informação na literatura para se estabelecer a relação entre a taxa de deterioração e a intensidade respiratória e, ainda, a interferência do grau de hidratação e da temperatura na velocidade de respiração e de deterioração. O estabelecimento de relações entre o estado energético da água, a intensidade de transmissão de energia térmica e a taxa de deterioração pode trazer substancial contribuição para a conservação de sementes e, conseqüentemente, de germoplasma.

Sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. podem ser utilizadas como modelo para responder e interpretar modificações físicas, bioquímicas e fisiológicas que ocorrem durante a deterioração. Assim, no presente trabalho objetivou-se analisar a relação entre a taxa respiratória e o processo de deterioração dessas sementes, buscando, através do teste de tetrazólio, estabelecer parâmetros de identificação de tecidos em deterioração, bem como avaliar o envolvimento do grau de hidratação e da temperatura nesses processos, visando ao controle e à previsibilidade da deterioração durante o armazenamento. Para tanto, inicialmente procurou-se desenvolver tecnologia que permita a utilização do teste de tetrazólio em sementes de *C. echinata* e, em seguida, aplicar essa tecnologia às sementes com diferentes taxas de deterioração oriundas da variação no estado energético da água e na intensidade de energia térmica transmitida.

## CAPÍTULO 1

### **Viabilidade e Vigor de Sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (Pau-brasil - Leguminosae) pelo Teste de Tetrazólio**

Artigo submetido no periódico “Revista Brasileira de Botânica” em setembro de 2008

Manuscrito n° 187/08

(A formatação do texto a seguir, segue as normas para publicação do periódico acima mencionado)

**Viabilidade e Vigor de Sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (Pau-brasil -  
Leguminosae) pelo Teste de Tetrazólio<sup>1</sup>**

EDMIR VICENTE LAMARCA<sup>2</sup>, SIMONE NADUR MOTA LEDUC<sup>2</sup> e CLAUDIO JOSÉ  
BARBEDO<sup>3,4</sup>

Título resumido: teste de tetrazólio em sementes de pau-brasil

---

<sup>1</sup> Parte da dissertação de mestrado de E.V. Lamarca

<sup>2</sup> Instituto de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Av. Miguel Stéfano 3687, 04301-012 São Paulo, SP, Brasil

<sup>3</sup> Instituto de Botânica, Seção de Sementes e Melhoramento Vegetal. Bolsista CNPq.

<sup>4</sup> Autor para correspondência: claudio.barbedo@pesquisador.cnpq.br

**ABSTRACT** - (Viability and vigor of seeds of *Caesalinea echinata* Lam. (brazilwood - Leguminosae) by tetrazolium test). As an important method to quickly evaluate seed vigor and deterioration, both of them related to seed physiological quality, the tetrazolium test was analyzed for seeds of *Caesalinea echinata* Lam. (brazilwood). Mature seeds were incubated in 0.05% to 1.00% tetrazolium solutions for a period varying from 1 to 24 hours, at 35°C without light. Furthermore, embryos of different levels of deterioration were analyzed under the best conditions (0.05-0.075% for 2 hours) of incubation. It was possible to identify eight levels of vigor which will be important to a brazilwood seed lot diagnosis in a short time (4 hours) and to identify different types of embryo injury. The later essential to estimate seed storability .

**Key words:** analysis, germination, physiological quality, respiration, vigor test

**RESUMO:** (Viabilidade e vigor de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil - Leguminosae) pelo teste de tetrazólio). O teste de tetrazólio é importante componente para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes, possibilitando fornecer rápida avaliação do vigor e do estado de deterioração. Objetivou-se desenvolver metodologia do teste de tetrazólio para sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). Sementes maduras foram incubadas, com ou sem tegumento, em soluções de tetrazólio em concentrações que variaram de 0,05% a 1,0%, por períodos que variaram de 1 a 24 horas, a 35°C na ausência de luz. As melhores combinações entre concentração e período de incubação (0,05 a 0,075% por 2 horas) foram aplicadas a amostras de sementes, sem tegumento, com diferentes níveis de deterioração. Os resultados permitiram estabelecer oito classes de vigor, que permitirão diagnosticar a qualidade de lotes de sementes de pau-brasil em 4 horas, bem como identificar uma série de injúrias nos embriões, fundamentais para previsão de armazenabilidade das sementes.

**Palavras chave:** análise, germinação, qualidade fisiológica, respiração, teste de vigor

## INTRODUÇÃO

O pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), ou ibirapitanga, pertencente à família Leguminosae – Caesalpinioideae, é espécie nativa do Brasil, de ocorrência natural desde o Rio Grande do Norte até o Rio de Janeiro, na floresta pluvial atlântica. Além de sua importância histórica como responsável pelo nome do país, sua madeira foi muito explorada no início da colonização brasileira como matéria prima para a obtenção de corante vermelho (Rocha *et al.* 2007) e, atualmente, vem sendo utilizado na arborização urbana (Rocha & Barbedo 2008) e na fabricação de arcos de instrumentos musicais com corda (Rocha 2004). Embora outras madeiras estejam sendo empregadas no comércio nacional para a produção de arcos, a madeira de pau-brasil, mundialmente utilizada nessas confecções, apresenta características únicas de ressonância, densidade e durabilidade (Angyalossy *et al.* 2005).

A despeito de sua atual raridade natural, há diversas iniciativas, públicas e privadas, para a preservação *ex situ* do pau-brasil, principalmente no Estado de São Paulo (Rocha 2004). Para que essa preservação seja eficiente, a produção e armazenamento de suas sementes assume papel fundamental e, nesse caso, há necessidade de monitoramento da deterioração dessas sementes ao longo do armazenamento. Essa deterioração, mais rápida quanto mais hidratadas estiverem as sementes (Villela & Peres 2004), ocorre mesmo nas sementes ortodoxas com baixo teor de água. As sementes de pau-brasil, por exemplo, apresentam comportamento ortodoxo, tolerando redução do teor de água até 7% (Barbedo *et al.* 2002) e, em temperaturas de congelamento (-5 a -18°C), podem ser armazenadas por até 24 meses (Hellmann *et al.* 2006). Contudo, quando em temperatura ambiente, mesmo com esse baixo teor de água não ultrapassam três meses de armazenamento (Barbedo *et al.* 2002).

A qualidade das sementes é máxima por ocasião da maturidade fisiológica; a partir deste momento, as sementes começam a se deteriorar até perderem sua capacidade de germinar. A duração deste processo é determinada principalmente pela interação entre

herança genética, grau de hidratação e temperatura (Delouche 2002). A deterioração proporciona alterações fisiológicas, bioquímicas, físicas e citológicas, determinando a queda do vigor, culminando com a morte da semente (Marcos Filho 2005).

Os primeiros sinais da deterioração estão relacionados com a danificação ou perda da integridade dos sistemas de membranas, permitindo a perda mais acentuada de eletrólitos, açúcares, aminoácidos e muitas outras substâncias (Delouche & Baskin 1973, Delouche 2002). Durante a deterioração, há um decréscimo das atividades enzimáticas, os mecanismos energéticos e de síntese são afetados, reduzindo o consumo de oxigênio e aumentando a liberação de dióxido de carbono (Marcos Filho 2005).

A detecção da deterioração de sementes por intermédio de testes de vigor pode ser entendida como componente importante na avaliação da qualidade fisiológica, possibilitando avaliação rápida do vigor, auxiliando na tomada de decisões quanto ao uso ou descarte de lotes de sementes (McDonald 1999).

O principal desafio das pesquisas sobre testes de vigor está na identificação de parâmetros relacionados à deterioração das sementes que precedem a perda da capacidade germinativa. Desta forma, torna-se importante o uso de testes que possibilitem a detecção dos estágios iniciais da deterioração, relacionados ao sistema de membranas, atividade enzimática e redução dos mecanismos energéticos. Dentro deste contexto, destaca-se o teste de tetrazólio.

O teste de tetrazólio é um método rápido para estimar a viabilidade e o vigor de sementes; baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases que reduzem o sal cloreto 2,3,5 trifenil tetrazólio nos tecidos vivos da semente, onde íons de hidrogênio são transferidos para o referido sal (Delouche *et al.* 1976). Quando as sementes são imersas na solução de tetrazólio, esta se difunde através dos tecidos ocorrendo, nas células vivas, a reação de redução, resultando na formação de um composto vermelho, não difusível, conhecido como trifenilformazan, indicando haver atividade respiratória e, conseqüentemente, que o tecido é viável. Tecidos inviáveis não reagem com a solução, permanecendo na sua cor natural e

tecidos em deterioração apresentam coloração vermelho-intenso (Delouche *et al.* 1976, França Neto 1994, Pinã-Rodrigues 2004).

Sementes de diversas espécies cultivadas já foram amplamente pesquisadas, tendo-se metodologia definida e padronizada para a realização do teste de tetrazólio. Em soja, por exemplo, vários níveis de vigor podem ser identificados pelo teste do tetrazólio podendo-se, inclusive, diagnosticar problemas ocorridos na colheita, no beneficiamento, na secagem e no armazenamento apenas com esse teste, o que o torna importante ferramenta no controle de qualidade dos lotes (França Neto 1994).

Em relação às espécies nativas do Brasil, principalmente as arbóreas, poucas foram estudadas e, mesmo nessas, não é possível padronizar a metodologia para a execução desse teste, cada espécie necessitando processos próprios. Assim, dos trabalhos descritos na literatura pode-se verificar variações na melhor concentração do sal de tetrazólio, tais como 0,05% para *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Fogaça 2003) e *Shizolobium parahyba* (Vell.) Blake (Ferreira *et al.* 2007), 0,07% para *Tabebuia impetiginosa* (Martius ex A.P. de Candolle) Standley (Oliveira *et al.* 2005), 0,075% para *Pterodon pubescens* Benth. (Ferreira *et al.* 2001), *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (Fogaça 2003), *Gleditschia amorphoides* Taud. (Fogaça *et al.* 2006) e *Poecilanthe parviflora* Benth. (Pinto *et al.* 2008), 0,1% para *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert (Oliveira *et al.* 2005) e *Albizia hasslerii* (Chodat) Burr. (Zucareli *et al.* 2001), 0,25% para *Genipa americana* L. (Nascimento & Carvalho 1998), 0,5% para *Astronium graveolens* Jacq. (Fogaça 2003) e para *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. (Oliveira *et al.* 2005) e 1,0% para *Camellia japonica* (Akimoto *et al.* 2004). Tal variação é notada, também, no tempo de incubação na solução de tetrazólio, desde 60 minutos, para *Astronium graveolens* (Fogaça 2003), até 6 horas, para *Pterodon pubescens* (Ferreira *et al.* 2001), encontrando-se referências de incubação por até 48 horas (Oliveira *et al.* 2005).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver metodologia

para utilização do teste de tetrazólio em sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam). Para tanto, inicialmente procurou-se estabelecer o tempo de embebição necessário à ativação de enzimas da respiração; em seguida, procurou-se determinar a eficiência do teste de tetrazólio em sementes inteiras, variando-se tempo de incubação e concentração da solução de tetrazólio; posteriormente, procurou-se determinar a eficiência do teste de tetrazólio em embriões (sem tegumento); finalmente, com os resultados dos experimentos anteriores, procurou-se estabelecer classes de viabilidade e de vigor para sementes de pau-brasil.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

*Material vegetal* - As sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. foram obtidas de frutos maduros (Borges *et al.* 2005) colhidos em abril de 2005 na Estação Ecológica de Tapacurá, em São Lourenço da Mata, PE (7°59'S, 35°02'W) e em dezembro de 2005 e de 2006 na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, em Mogi-Guaçu, SP (22°15-16'S, 47°8-12'W), aproximadamente entre 15 a 20 matrizes. Os frutos foram mantidos ao sol, sobre base de alvenaria, cobertos por sombrite, para abertura espontânea. À medida que as sementes eram liberadas dos frutos, eram armazenadas em câmara fria a 7°C até o início dos experimentos (Bilia *et al.* 1998, Barbedo *et al.* 2002), não excedendo 14 dias.

*Determinações físicas e fisiológicas* - As sementes foram caracterizadas, inicialmente, quanto ao teor de água, potencial hídrico (embriões) e germinação. O teor de água foi determinado gravimetricamente, pelo método de estufa a 103°C por 17 horas (Ista 1985), sendo os resultados apresentados em base úmida (Brasil 1992). O potencial hídrico foi medido, em embriões sem tegumento, por meio de potenciômetro WP4 (Decagon), basendo-se na temperatura do ponto de orvalho do ar em equilíbrio com a amostra examinada. A aferição do potencial foi realizada por meio de isotermas de sorção de água em soluções de polietileno glicol 6000.

O teste de germinação foi conduzido em germinadores MA400 (Marconi), com 100% de umidade relativa do ar e regulados para a temperatura constante de 25°C, com luz contínua (Mello & Barbedo 2007). O teste foi conduzido em rolo de papel germitest, com duas folhas para base e uma para cobertura (Brasil 1992). As avaliações de germinação foram realizadas diariamente, durante 15 dias, sendo registradas as sementes que emitiram raiz primária (para o cálculo da germinação) e as que apresentaram capacidade de produção de plântulas normais (para o cálculo do desenvolvimento de plântulas normais). Foi calculado, ainda, o vigor das sementes pelo índice de velocidade de germinação (IVG), conforme Maguire (1962).

*Obtenção da curva de hidratação das sementes* - Visando a identificar o final da fase I e início da fase II da germinação, descritas por Bewley & Black (1994), sementes de Mogi-Guaçu, colhidas em 2005, foram submetidas a secagem em estufa com circulação forçada de ar, a 40°C (Barbedo *et al.* 2002), até apresentarem 7% de água e armazenadas por 5 meses a  $8\pm 2^\circ\text{C}$ . A seguir, foram colocadas para embeber a 25°C (Mello & Barbedo 2007), em folha de papel previamente umedecido com água pura (2,5 vezes o peso do papel seco) e, a cada 5 minutos, até os primeiros 60 minutos, ou a cada 30 minutos, a partir de 60 minutos, amostras foram retiradas para avaliação do teor de água e do potencial hídrico.

Aos resultados obtidos procurou-se ajustar regressão polinomial, até o terceiro grau, selecionando-se os períodos correspondentes ao início dos processos metabólicos e respiratórios e, conseqüentemente, o início da atividade das enzimas desidrogenases.

*Concentração do sal de tetrazólio e período de exposição de sementes inteiras* - Diferentes concentrações do sal cloreto 2,3,5 trifenil tetrazólio foram avaliadas, variando-se desde 0,25% até 1,00%. Em cada concentração, sementes de Mogi-Guaçu foram incubadas pelos períodos de 2, 4, 12 e 24 horas, na temperatura de 35°C, com ausência de luz. As sementes foram mantidas com seu tegumento, que apresentava trincas.

Ao final da incubação, as sementes foram lavadas em água corrente, seccionadas longitudinalmente e avaliadas individualmente, observando-se a presença e a localização de

danos no eixo embrionário e nos cotilédones, principalmente nas áreas vitais do embrião (figura 1). Para efeito de classificação das áreas dos cotilédones, considerou-se a região mais próxima à região de inserção destes com o eixo embrionário como região proximal (figura 1 - g) e a mais distante à esta inserção (incluindo-se toda a extremidade dos cotilédones), como distal (figura 1 - h). A diferenciação de cores dos tecidos obedeceu aos critérios estabelecidos por Delouche *et al.* (1976), Moore (1985) e França Neto (1994), ou seja, rosa suave representando tecido viável, vermelho intenso para tecido em deterioração, ou seja, com respiração intensa e, ainda, cor natural do tecido para tecido morto.

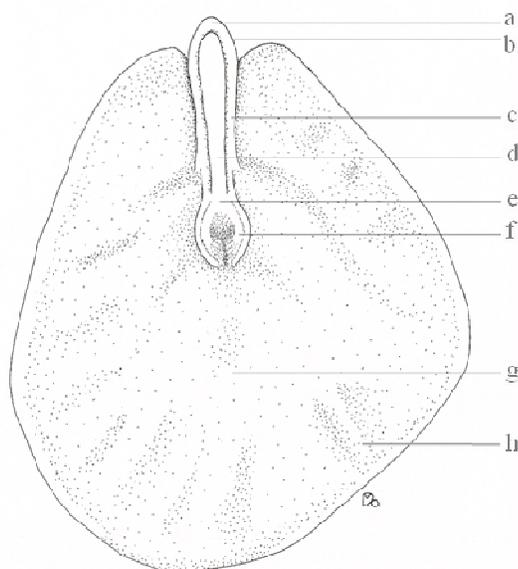


Figura 1. Corte longitudinal do embrião de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). a-d: eixo hipocótilo-radicular: radícula (a), protoderme (b), meristema fundamental (c) e procâmbio (d); região de inserção dos cotilédones no eixo (e); plúmula (f); região proximal (g); região distal (h).

*Comparação da germinabilidade de sementes inteiras pelo teste de germinação e pelo tetrazólio* - Sementes oriundas de São Lourenço da Mata, com ou sem prévia secagem, foram armazenadas sob duas temperaturas (25°C e -18°C) e duas diferentes embalagens (sacos de papel Kraft e frascos de vidro com tampa hermética). Destas combinações, após 1 ano de armazenamento foram selecionadas sementes com três qualidades fisiológicas distintas. Estas sementes foram submetidas simultaneamente ao teste de germinação e ao teste de tetrazólio.

O teste de germinação foi conduzido segundo descrição acima e o do tetrazólio, baseando-se nos melhores resultados obtidos do experimento anterior, utilizou concentração de 0,25% e 2 horas de incubação a 35°C, na ausência de luz.

*Concentração do sal de tetrazólio e período de exposição de embriões (sem tegumento)* - Para avaliação da eficiência do teste de tetrazólio em embriões sem tegumento, três diferentes concentrações do sal, 0,075%, 0,125% e 0,25%, foram avaliadas em sementes oriundas de Mogi-Guaçu em 2006, sem armazenamento, variando-se o período de incubação desde 1 até 8 horas, nas temperaturas de 25, 30 e 35°C, com ausência de luz. Ao final da incubação, seguiram-se os mesmos procedimentos descritos acima.

*Obtenção de sementes com diferentes graus de deterioração* - Para este experimento, foram coletados frutos diretamente das árvores, em Mogi-Guaçu, em 2006, ao final da maturação das sementes (Borges *et al.* 2005). A extração destas foi feita manualmente sendo, então, submetidas ao envelhecimento acelerado, com o intuito de se obterem sementes com diferentes níveis de deterioração. Para tanto, as sementes foram expostas à temperatura constante de 42°C, dentro de caixas plásticas tipo gerbox, adaptadas com tela de aço inox e 40 mL de água destilada no fundo, evitando-se o contato direto da água com as sementes (Marcos Filho 1994).

As sementes foram incubadas por períodos de 4, 8, 12, 16, 24, 48 e 72 horas. Ao final de cada período foram avaliados o teor de água, o potencial hídrico, a germinação e o vigor, conforme descrito anteriormente.

*Concentração do sal de tetrazólio e período de exposição dos embriões de lotes de diferentes qualidades* - Duas concentrações do sal cloreto 2,3,5 trifênil tetrazólio (0,05% e 0,075%) e dois períodos de incubação (2 e 4 horas) foram aplicados a sementes de Mogi-Guaçu, com três qualidades fisiológicas distintas, obtidas pela exposição daquele lote a dois períodos de envelhecimento acelerado (12 e 24 horas), baseando-se nos resultados do experimento anterior. Ao final da incubação, seguiram-se os mesmos procedimentos descritos acima.

*Categorização das sementes segundo o grau de deterioração* - Após a definição da melhor combinação entre concentração do sal, tempo de exposição e temperatura e, ainda, após avaliações realizadas nas sementes com diferentes níveis de deterioração, estabelecidas pelo envelhecimento acelerado, foram definidas classes de viabilidade e deterioração, segundo a cor de cada tecido da semente incubada no teste de tetrazólio. Para tanto, cada semente foi classificada como germinável (semente capaz de produzir plântula normal), viável (semente sem capacidade de produzir plântula normal, mas podendo emitir raiz primária), não germináveis (semente sem capacidade de emitir raiz, mas com tecidos vivos) ou morta (semente sem tecidos vivos).

As classes previstas foram:

Classe 1 (germinável) – embriões com coloração rósea suave uniforme e tecidos com aspectos normais e túrgidos;

Classe 2 (germinável) – pequenas regiões de coloração vermelho intenso na extremidade dos cotilédones (região distal), porém eixo embrionário mantendo coloração rósea suave;

Classe 3 (viável) – eixo embrionário com regiões de cor vermelha intensa, porém em extensão menor que a metade de sua espessura e sem incluir a radícula; cotilédones podendo apresentar coloração vermelho intenso na região distal e proximal;

Classe 4 (viável) – eixo embrionário com amplas regiões de coloração vermelho intenso, inclusive a radícula; cotilédones com regiões de coloração vermelha intensa ou pequenas pontuções descoloridas, afetando parte da região proximal, exceto a região de inserção dos cotilédones no eixo;

Classe 5 (não germináveis) – embriões com coloração vermelha intensa em sua totalidade;

Classe 6 (não germináveis) – eixo embrionário com regiões descoloridas afetando, inclusive, o procâmbio; cotilédones com coloração vermelho intenso, mas com regiões descoloridas, inclusive afetando a região proximal;

Classe 7 (não germináveis) – embriões descoloridos em mais de 75% de sua superfície;

Classe 8 (morta) – embriões completamente descoloridos.

*Delineamento experimental e análises estatística* - O delineamento experimental para todos os experimentos foi inteiramente casualizado, com 4 repetições. Os valores foram submetidos à análise de variância (teste F), ao nível de 5% de probabilidade. Para a obtenção da curva de embebição das sementes, aos valores obtidos procurou-se ajustar regressões polinomiais até terceiro grau. Nos demais experimentos, as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, também ao nível de 5%. Quando necessário para correção da normalidade e da heterogeneidade, os valores foram transformados para  $\arcsin(\sqrt{x})$  (Santana & Ranal 2004).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

*Obtenção da curva de hidratação das sementes* - Os resultados obtidos para embebição de sementes de pau-brasil (figura 2B) permitiram ajustar regressão polinomial do terceiro grau, demonstrando que o final da fase I (Bewley & Black 1994) ocorreu por volta de 120 minutos após o início da embebição. Além disso, permitiu verificar que o processo de embebição de sementes de pau-brasil é bastante rápido, duplicando o teor inicial de água (7%) já no primeiro minuto de embebição, triplicando com mais dois minutos e chegando a quintuplicar nos primeiros 10 minutos, quando atingiu cerca de 30% de água (figura 2A). Essa velocidade de embebição era esperada uma vez que a fase I da embebição é dirigida pelo gradiente de potencial hídrico entre a semente e o meio (Castro *et al.* 2004) que, no presente trabalho, foi próximo a zero (papel de germinação saturado com água pura). As sementes de pau-brasil apresentavam, inicialmente, -195,5 MPa, passando a -25,0 MPa após 5 minutos e a -5,1 MPa após 10 minutos de embebição (figura 2C).

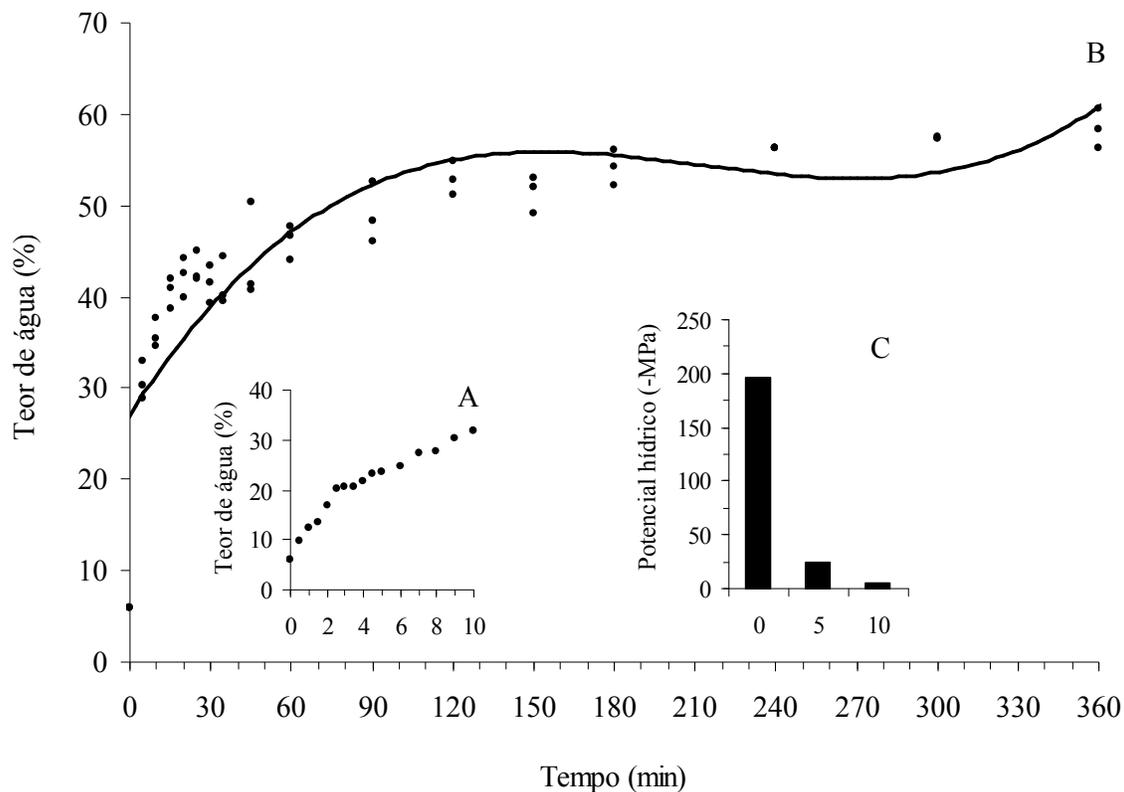


Figura 2. Embebição de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) nos primeiros 10 minutos (A) e de 10 até 360 minutos (B,  $y=0,000004X^3-0,002X^2+0,46X+27,16$ ,  $r^2=0,717$ ) e correspondentes modificações no potencial hídrico do embrião (C).

A realização da curva de embebição nas sementes de pau-brasil (figura 2) permitiu estabelecer o período mínimo de pré-condicionamento (2 horas), ou seja, o necessário para que as sementes atingissem ao menos o início da fase II. Porém, essa curva evidenciou, sobretudo, o cuidado a ser tomado para se evitarem períodos excessivos de embebição que poderiam levar as sementes à fase III, após 6 horas. O pré-condicionamento visa a, apenas, facilitar a penetração da solução de tetrazólio e o desenvolvimento de uma coloração mais clara e evidente, amolecer os tecidos, facilitando a remoção dos tegumentos e o corte longitudinal dos embriões (Delouche *et al.* 1976) e ativar os sistemas enzimáticos respiratórios (Marcos Filho 2005). Não necessita, portanto, que se inicie a divisão celular, característica da fase III.

Costa *et al.* (1998) mencionaram que, pelo protocolo de avaliação do teste de tetrazólio em sementes de soja, o período de pré-condicionamento seria de 16 horas a 25°C, quando as sementes atingiram 32% a 38% de água, porém este período demandaria muito tempo de execução. Verificaram que o pré-condicionamento por 6 horas a 41°C, com as sementes atingindo 27% a 33% de água, propiciou condições adequadas de coloração das sementes podendo com segurança substituir o método tradicional. Já para sementes de milho, Chamma & Novembre (2007) verificaram que 4 horas de embebição a 35 ou 40°C, foram suficientes para o pré-condicionamento, apresentando teor de água de 19,5% e 21,3%, respectivamente. Contudo, de acordo com Vertucci & Leopold (1984), o teor de água abaixo de 24%, em sementes de soja, restringe o início dos processos metabólicos e respiratórios, os quais aumentam rapidamente quando o teor de água encontra-se na faixa de 24% a 32%. No presente trabalho, após 2 horas de embebição o teor de água das sementes de pau-brasil atingiu valores próximos a 50% (figura 2A), ou seja, muito acima dos descritos nestes trabalhos.

*Concentração do sal de tetrazólio e período de exposição de sementes inteiras* - partindo-se dos valores de embebição obtidos no experimento anterior, inicialmente procurou-se pré-condicionar as sementes de *C. echinata* apenas por uma hora, para que as sementes apresentassem teores de água próximos aos descritos por Costa *et al.* (1998), Chamma & Novembre (2007) e Vertucci & Leopold (1984).

Os resultados iniciais obtidos para o teste de tetrazólio em sementes inteiras de pau-brasil (tabela 1) demonstraram a necessidade de utilização de solução com baixas concentrações do sal. Comparando-se com os valores obtidos no teste de germinação da amostra de sementes analisada, ou seja, 32% de germinação e 15% de desenvolvimento de plântulas normais, a combinação tempo x concentração da solução que mais se aproximou dos valores reais de germinação foi 0,25% por 2 horas (tabela 1). Deve-se salientar, contudo, que independentemente dos resultados numéricos, em todos os tratamentos houve dificuldade de

análise das sementes pela excessiva coloração desenvolvida. Reforça-se, portanto, a necessidade de estudos para cada espécie, uma vez que essa concentração, ou até superiores a ela, apresentaram bons resultados para *Genipa americana* e *Astronium graveolens* (Nascimento & Carvalho 1998, Fogaça 2003).

Tabela 1. Germinação (%) de sementes, desenvolvimento de plântulas normais (%) e porcentagem de sementes não germináveis de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), de sementes com tegumento, analisadas pelo teste de tetrazólio, em função da variação na concentração do sal e no período de incubação das sementes. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas nas colunas, maiúsculas nas linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Tempo de incubação	Concentração da solução			Médias
	0,25%	0,5%	1,0%	
<i>Germinação</i>				
2 horas	30	60	75	55 a
4 horas	55	65	55	58 a
12 horas	50	70	60	60 a
24 horas	35	85	77	66 a
Médias	42 B	70 A	67 A	
Coef. var.	21,65%			
<i>Plântulas normais</i>				
2 horas	15	30	50	32 a
4 horas	40	45	25	37 a
12 horas	20	35	40	32 a
24 horas	5	10	5	7 b
Médias	20 B	30 A	30 A	
Coef. var.	44,34%			
<i>Sementes não germináveis</i>				
2 horas	45	20	20	28 a
4 horas	20	15	15	17 a
12 horas	35	15	20	23 a
24 horas	55	15	15	28 a
Médias	39 A	16 A	18 A	
Coef. var.	44,12%			

A combinação da concentração de 0,25% pelo período de 2 horas de incubação, aplicada a sementes de três qualidades fisiológicas distintas, mostrou-se eficiente para a estimativa da germinação (tabela 2), uma vez que não houve interação significativa entre o

nível de deterioração das sementes e o mecanismo de análise da germinação (teste de germinação ou teste de tetrazólio). Contudo, o mesmo não se pode afirmar para análises mais aprofundadas da real qualidade das sementes, pois houve interação significativa entre aqueles fatores para as variáveis plântulas normais e sementes mortas (tabela 2).

Tabela 2. Germinação (%), desenvolvimento de plântulas normais (%) e porcentagem de sementes mortas de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), de sementes com três níveis de deterioração, analisadas pelo teste de germinação e pelo teste de tetrazólio. Sementes com tegumento. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas nas colunas, maiúsculas nas linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Nível de deterioração	Tipo de teste		Médias
	Germinação	Tetrazólio	
<i>Germinação</i>			
Leve	68	50	59 a
Intermediário	18	12	15 b
Severo	0	0	0 c
Médias	28 A	20 A	
Coef. var.	38,65%		
<i>Plântulas normais</i>			
Leve	38 aA	10 aB	-
Intermediário	0 bA	0 aA	-
Severo	0 bA	0 aA	-
Coef. var.	97,62%		
<i>Sementes mortas</i>			
Leve	38 cA	0 bB	-
Intermediário	82 bA	0 bB	-
Severo	100 aA	100 aA	-
Coef. var.	8,27%		

Novamente, salienta-se a dificuldade na interpretação dos resultados do teste de tetrazólio, na concentração 0,25% pelo período de duas horas, pela excessiva coloração desenvolvida pelas sementes das três amostras analisadas. A excessiva coloração desenvolvida prejudicou, sobretudo, a visualização de pequenas áreas com tecido em processo de deterioração, o qual seria caracterizado por coloração mais intensa que o tecido viável (França Neto *et al.* 1998).

*Concentração do sal de tetrazólio e período de exposição de embriões sem tegumento* - no experimento anterior, além dos tratamentos descritos, amostras de sementes foram incubadas sem o tegumento, ou seja, apenas os embriões. Embora não tivessem sido incluídas dentre os tratamentos, notou-se melhor uniformidade no desenvolvimento de coloração e maior facilidade na análise visual.

Outro aspecto importante observado nos primeiros experimentos é que as sementes apresentavam tegumentos com trincas (figura 3B), o que provavelmente facilitava a difusão da solução de tetrazólio para o interior das sementes. Nos experimentos posteriores, com sementes intactas (figura 3A), notou-se dificuldade naquela difusão. Assim, nos experimentos que se seguiram optou-se por incubar embriões (figura 3C), removendo-se o tegumento das sementes. Os valores do teste de tetrazólio de embriões de pau-brasil sem a presença de tegumento estão apresentados na tabela 3.

Dos períodos e concentrações analisados, as combinações 4, 6 e 8 horas nas concentrações 0,125% e 0,25% mostraram-se inadequadas para avaliação da qualidade das sementes. Nestas combinações, as sementes analisadas, que apresentaram 52% de germinação e 23% de desenvolvimento de plântulas normais pelo teste de germinação (portanto apenas 48% de sementes inviáveis), pelo teste do tetrazólio posicionaram mais de 85% dos embriões na categoria de inviáveis (sementes não germináveis + mortas, tabela 3). Essas combinações desenvolveram nos embriões extensas manchas de coloração vermelho-intenso indicando excesso de tempo na incubação e forte concentração da solução de tetrazólio (figura 3E).

Considerando-se ser a mesma amostra, as variações obtidas na coloração dos embriões permitiram definir melhor a combinação tempo x concentração. O período de 8 horas, por exemplo, considerado excessivo, posicionou cerca de 50% dos embriões na classe 5 (figura 3J), ou seja, embriões que desenvolveram coloração vermelho-intenso em sua totalidade. Por outro lado, o período de 1 hora de incubação no tetrazólio desenvolveu uma coloração inadequada (figura 3E), pois muitas regiões dos embriões estavam descoloridos ou com

coloração amarela, o que os situaria nas classes 7 e 8 (figuras 3M, N).

Os períodos de 2 e 4 horas a 0,075% proporcionaram o desenvolvimento de coloração rósea suave em grandes extensões dos embriões (figura 3E). Comparando-se os valores do teste de tetrazólio (tabela 3) com os do teste de germinação, descritos acima, o período de 2 horas a 0,075% foi o que mais se aproximou dos valores reais.

Tabela 3. Germinação (%), desenvolvimento de plântulas normais (%) e porcentagem de sementes não germináveis de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), obtidos da análise de embriões no teste de tetrazólio, em função da variação na concentração do sal e no período de incubação dos embriões. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas nas colunas, maiúsculas nas linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Tempo de incubação	Concentração da solução		
	0,075%	0,125%	0,25%
<i>Germinação</i>			
1 hora	17 bA	12 aA	5 aA
2 horas	40 aA	15 aB	3 aB
4 horas	25 abA	10 aAB	12 aB
6 horas	12 bA	7 aA	7 aA
8 horas	12 bA	5 aA	7 aA
Coef. var. (%)	64,41		
<i>Plântulas normais</i>			
1 hora	3 bA	5 aA	0 aA
2 horas	20 aA	0 aB	0 aB
4 horas	7 bA	0 aA	0 aA
6 horas	3 bA	0 aA	0 aA
8 horas	5 bA	0 aA	0 aA
Coef. var. (%)	168,44		
<i>Sementes não germináveis</i>			
1 hora	80 aA	85 aA	95 aA
2 horas	60 bB	85 aA	97 aA
4 horas	72 abB	90 aA	87 aAB
6 horas	87 aA	92 aA	92 aA
8 horas	87 aA	95 aA	92 aA
Coef. var. (%)	10,32		

A remoção do tegumento após o pré-condicionamento mostrou-se uma maneira adequada como preparo das sementes para o teste de tetrazólio. Visando a confirmar a melhor eficiência da remoção do tegumento na difusão da solução de tetrazólio para o interior dos embriões, neste experimento amostras foram incubadas com a presença de tegumento nos períodos de 2, 4, 6 e 8 horas; as sementes, neste caso, não desenvolveram coloração adequada e uniforme e apenas as extremidades (região distal) dos embriões coloriram, permanecendo a parte central descolorida (dados não apresentados). Provavelmente, a presença do tegumento obstruiu a penetração da solução de tetrazólio nas sementes, inviabilizando a avaliação dos embriões. A remoção do tegumento também foi fundamental para o desenvolvimento de coloração em sementes de *Gleditschia amorphoides* Taud., espécie da mesma família da estudada no presente trabalho (Caesalpinaceae), conforme reportado por Fogaça *et al.* (2006).

A temperatura de incubação na solução de tetrazólio também é um fator fundamental para o desenvolvimento da coloração. As temperaturas inferiores a 35°C (25 e 30°C) resultaram, nos embriões, em coloração desuniforme, freqüentemente apenas nas extremidades dos embriões, permanecendo descolorido todo o interior do eixo embrionário e a região proximal, não favorecendo uma avaliação confiável. Por esse motivo, os embriões, em sua maioria, foram agrupados nas classes 6 e 7 (fotos 3L, M). A incubação a 35°C favoreceu as reações das enzimas desidrogenases em sementes de *C. echinata* com o sal de tetrazólio desenvolvendo, nos embriões, uma coloração mais homogênea, permitindo diferenciar com clareza as tonalidades de vermelho e agrupar com maior confiabilidade os embriões nas classes previstas. A incubação a 35°C também foi mais adequada para sementes de *Albizia hasslerii* (Chodat) Burr. (Zucareli *et al.* 2001) e *Gleditschia amorphoides* Taub. (Fogaça *et al.* 2006).

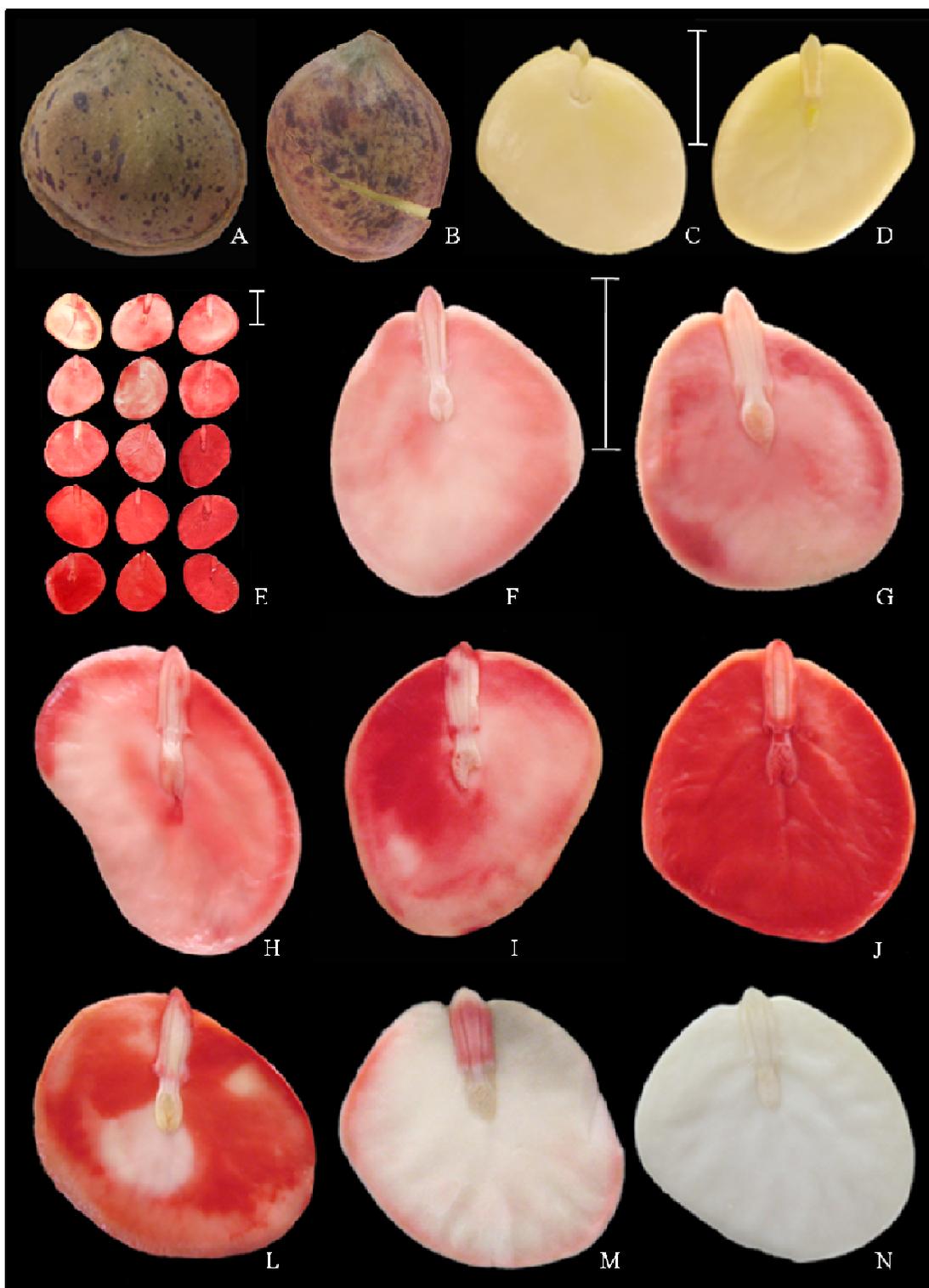


Figura 3. Sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) submetidas ao teste de tetrazólio. A: semente intacta; B: semente com trinca no tegumento; C: embrião; D: embrião em corte longitudinal; E: embriões coloridos em solução de tetrazólio de diferentes concentrações, incubados por diferentes períodos (da esquerda para direita, 0,075%, 0,125% e 0,25%; de cima para baixo, 1, 2, 4, 6 e 8 horas); F-N: classes para avaliação de vigor e viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio (F: classe 1; G: classe 2; H: classe 3; I: classe 4; J: classe 5; L: classe 6; M: classe 7; N: classe 8). Escala = 1cm.

*Obtenção de sementes com diferentes graus de deterioração* - A germinação e o vigor das sementes de pau-brasil diminuíram progressivamente desde o início do período de envelhecimento acelerado até o último período (72 horas), ora reduzindo apenas a velocidade de germinação, ora a própria protrusão da raiz primária. Essas reduções foram acompanhadas de elevação no teor de água e no potencial hídrico (tabela 4).

Tabela 4. Teor de água (% base úmida), potencial hídrico (MPa), germinação (%), desenvolvimento de plântulas normais (%) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) após diferentes períodos de exposição ao envelhecimento acelerado (EA, 42°C, 100% UR). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%

Tempo de exposição ao EA	Teor de água	Potencial hídrico	Germinação	Plântulas normais	IVG
0 horas (inicial)	13,8	-52,0	95 a	82 a	8,0 a
4 horas	17,7	-25,4	88 a	80 a	7,2 ab
8 horas	22,1	-16,9	92 a	72 ab	7,1 ab
12 horas	29,3	-9,8	85 ab	68 ab	5,8 bc
16 horas	32,3	-7,3	75 abc	60 abc	4,8 cd
24 horas	38,0	-5,4	70 abc	45 bcd	3,8 cde
48 horas	38,6	-5,1	55 bc	35 cd	3,2 de
72 horas	41,4	-4,4	48 c	30 d	2,4 e

Assim, nos dois primeiros períodos de envelhecimento (4 e 8 horas, tabela 4) não houve queda no vigor ou mesmo na porcentagem de germinação, mas já a partir de 12 horas de envelhecimento notou-se queda no IVG (tabela 4), indicando ser esse um período adequado para compor amostra com sementes em início de deterioração. De 12 a 16 horas não se verificaram alterações significativas mas, a partir de 24 horas, os valores de desenvolvimento de plântulas normais diferiram da testemunha (inicial). Portanto, este período foi considerado também importante para a composição das amostras a serem avaliadas no teste de tetrazólio.

A partir de 48 horas, as sementes começaram a apresentar queda na porcentagem de germinação, indicando que as sementes passaram a um estágio avançado de deterioração, não

sendo mais interessante para inclusão no teste de tetrazólio. Conforme descrito por (Popinigis 1977), a perda da capacidade da germinativa é a última etapa do processo de deterioração, ocorrendo antes das transformações degenerativas como alterações bioquímicas, físicas e citológicas.

O teor de água e o potencial hídrico durante o envelhecimento (tabela 4) confirmaram a grande capacidade dessas sementes em embeber rapidamente, conforme descrito anteriormente. Além disso, é importante ressaltar que a elevação do teor de água de 13,8% para 29,3% (12 horas) e 38,0% (24 horas) modifica o estado energético da água nas sementes, caracterizando a água tipo 3 (Vertucci & Farrant 1995), com potencial hídrico entre -4 a -11 MPa (tabela 4). Essa modificação é importante por indicar respiração intensificada, mas os sistemas de reparos ainda não são ativados e a deterioração é acelerada (Marcos Filho 2005).

*Concentração do sal e período de exposição em lotes de diferentes qualidades* - Para estabelecer a metodologia adequada do teste de tetrazólio em sementes é necessária uma combinação entre o pré-condicionamento, a concentração e o tempo de exposição, tal que favoreça a interpretação dos resultados. Desta forma pode-se diferenciar tecidos viáveis, em deterioração e mortos, diferenciando lotes pelo seu nível de vigor. Pode-se, ainda, compreender o processo de deterioração das sementes e sua relação com a germinação e vigor.

Após os resultados descritos nos experimentos anteriores, foram selecionados dois períodos de envelhecimento acelerado para compor sementes com três diferentes níveis de vigor, indicando baixo nível de deterioração, deterioração leve e deterioração intensa. Aplicaram-se, a essas sementes, duas concentrações (0,05% e 0,075%) da solução de tetrazólio e dois períodos de incubação (2 e 4 horas). A seguir, procurou-se analisar as sementes dos três níveis de vigor segundo as oito classes descritas anteriormente.

A análise de variância não apontou interação entre os três fatores (nível de deterioração, concentração da solução e tempo de incubação), mas foram significativas as

interações nível de deterioração x concentração e nível de deterioração x tempo de incubação para germinação e para sementes não germináveis (tabela 5).

Verificou-se que o período de 2 horas nas concentrações de 0,05% e a 0,075% permitiu o desenvolvimento de uma coloração adequada que facilitasse a avaliação da germinação e do vigor permitindo diferenciar os grupos de sementes de pau-brasil. O período de 4 horas, independentemente da concentração, desenvolveu nos embriões coloração em tonalidades mais intensas de vermelho, não favorecendo a identificação dos embriões e induzindo a classificá-los como totalmente deteriorados.

Tabela 5. Germinação (%), desenvolvimento de plântulas normais (%) e porcentagem de sementes não germináveis de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), de sementes com três níveis de deterioração (0, 12 e 24 h de envelhecimento acelerado), analisadas pelo teste de tetrazólio com duas concentrações do sal em embriões incubados por dois períodos. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas nas colunas, maiúsculas nas linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Tempo de envelhecimento	Concentração da solução		Tempo de incubação		Médias
	0,05%	0,075%	2 horas	4 horas	
<i>Germinação</i>					
0 horas (inicial)	30 aA	30 aA	39 aA	21 aB	-
12 horas	21 aA	18 bA	20 bA	19 aA	-
24 horas	22 aA	10 bB	18 bA	15 aA	-
Coef. var. (%)	22,66				
<i>Plântulas normais</i>					
0 horas (inicial)	12	10	15	8	11,2 a
12 horas	6	4	5	5	5,0 b
24 horas	5	1	4	2	3,1 b
Médias	7,9 A	5,0 A	7,9 A	5,0 A	
Coef. var. (%)	87,56				
<i>Sementes não germináveis</i>					
0 horas (inicial)	71 aA	68 bA	60 bB	79 aA	-
12 horas	79 aA	85 aA	82 aA	81 aA	-
24 horas	78 aB	90 aA	82 aA	85 aA	-
Coef. var. (%)	9,98				

Ambas as concentrações foram eficientes para as análises, mas a concentração de 0,075% desenvolveu, em alguns embriões, colorações mais acentuadas de vermelho, dificultando avaliação mais minuciosa. Como exemplo, a presença de estrias no eixo embrionário, típicas de sementes inviáveis, foram imperceptíveis quando utilizada essa concentração. A solução de tetrazólio a 0,05%, por outro lado, desenvolveu uma tonalidade de coloração mais suave permitindo maior precisão na avaliação, possibilitando identificar a formação de pequenas lesões e estrias nos cotilédones e no eixo embrionário. Esta concentração, em sementes de *Shizolobium parahyba* (Vell.) Blake (Ferreira *et al.* 2007), também permitiu avaliar a qualidade dos lotes de sementes de forma eficiente.

As sementes envelhecidas por 12 e 24 horas apresentaram manchas de grande extensão de coloração vermelho intenso, principalmente na região central dos cotilédones (área vascular). Esse comportamento provavelmente deve-se ao fato dessas regiões estarem mais expostas à condição de estresse. Como um dos primeiros sinais da deterioração é a perda da integridade das membranas, há um aumento na difusão da solução de tetrazólio nos tecidos (Delouche 2002, França Neto *et al.* 1998).

A análise de intensidade (rósea a vermelha) e distribuição de coloração ao longo das estruturas vitalícias (figura 1) para a germinação da semente permitiu confirmar as oito classes previstas inicialmente, tornando possível diagnosticar embriões viáveis, inviáveis (vivos mas não germináveis) e mortos. Dessa forma, para *C. echinata*, pode-se caracterizar as sementes como: germináveis (capazes de produzir plântulas normais), quando inclusas nas classes 1 e 2; viáveis (capazes de germinar, mas não de desenvolver plântulas normais), quando nas classes 3 e 4; vivas ou, como denominado no presente trabalho, não germináveis (incapazes de germinar, mas ainda com tecidos vivos), quando nas classes 5, 6 e 7; e mortas, quando na classe 8. Além disso, quanto menor o número da classe, maior o vigor da semente. Portanto, pela metodologia de análise apresentada no presente trabalho, o teste de tetrazólio, desenvolvido para sementes de espécies cultivadas, pode também ser utilizado com segurança

em sementes de espécies florestais nativas, como as sementes de pau-brasil, contribuindo para o gerenciamento eficiente de lotes de sementes, principalmente como ferramenta de preservação da biodiversidade vegetal.

**Agradecimentos** - Os autores agradecem aos funcionários da Reserva Ecológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, pelo auxílio na coleta das sementes e ao Instituto de Botânica, pela permissão para essas coletas; à Estação Ecológica de Tapacurá, pelas sementes fornecidas; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelas bolsas de mestrado concedidas a E.V. Lamarca e a S.N.M. Leduc; ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de produtividade concedida a C.J. Barbedo e pelo auxílio financeiro ao projeto (Proc.481484/2007-8); à Fundação de Amparo à Pesquisa Científica do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro ao projeto (Proc. 2005/04139-7); a Débora Manzano Oller, pela confecção das ilustrações e a Simone de Pádua Teixeira e Priscila Fratin Medina, pelo auxílio na identificação das diferentes estruturas nas sementes.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AKIMOTO, T., CHO, S., YSHIDA, H., FURUTA, H. & ESASHI, Y. 2004. Involvement of acetaldehyde in seed deterioration of some recalcitrant woody species through the acceleration of aerobic respiration. *Plant Cell Physiology* 45:201-210.
- ANGYALOSSY, V., AMANO, E. & ALVES, E.S. 2005. Madeiras utilizadas na fabricação de arcos de instrumentos de corda: aspectos anatômicos. *Acta Botanica Brasilica* 19:819-834.
- BARBEDO, C.J., BILIA, D.A.C. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 2002. Tolerância à

- dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. *Revista Brasileira de Botânica* 25:431-439.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1994. *Seed physiology of development and germination*. 2.ed. Plenum Press, London.
- BILIA, D.A.C., MARCOS-FILHO, J. & NOVEMBRE, A.D.L.C. 1998. Conservação da qualidade fisiológica de sementes de *Inga uruguensis* Hook. & Arn. *Revista Brasileira de Sementes* 20:48-54.
- BORGES, I.F., DEL GIUDICE NETO, J., BILIA, D.A.C., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. & BARBEDO, C.J. 2005. Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48:851-861.
- BRASIL. 1992. *Regras para análises de sementes*. Brasília, Ministério da Agricultura.
- CASTRO, R.D. & HILHORST, H.W. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. *In Germinação do básico ao aplicado* (Ferreira, A.G. & Borghetti, F., orgs.). Artmed, Porto Alegre. p.148-162.
- CHAMMA, H.M.C. & NOVEMBRE, A.D.L.C. 2007. Teste de tetrazólio para sementes de milho: períodos de hidratação e coloração das sementes. *Revista Brasileira de Sementes* 29:125-129.
- COSTA, N.P., FRANÇA NETO, J.B., KRYZANOWSKI, F.C., HENNING, A. & OLIVEIRA, M.C.N. 1998. Procedimento alternativo no teste de tetrazólio em sementes de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 33:869-877.
- DELOUCHE, J.C. 2002. Germinação, deterioração e vigor da semente. *Seed News* 6:1-7.
- DELOUCHE, J.C. & BASKIN, C.C. 1973. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seeds lots. *Seed Science and Technology* 1:427-452.
- DELOUCHE, J.C., BHERING, M.C. & LIENHARD, M. 1976. O teste de tetrazólio para viabilidade da semente. Agiplan, Brasília.

- FERREIRA, R.A., VIEIRA, M.G.G.C., VON PINHO, E.V.R. & TONETTI, O.A.O. 2001. Morfologia da semente e de plântulas e avaliação da viabilidade da semente de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* Benth. - Fabaceae) pelo teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes* 23:108-115.
- FERREIRA, R.A., OLIVEIRA, L.M., TONETTI, O.A.O. & DAVIDE, A.C. 2007. Comparação da viabilidade de sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake – Leguminosae Caesalpinioideae, pelos testes de germinação e tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes* 29:73-79.
- FOGAÇA, C.A. 2003. Padronização do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade de sementes de três espécies florestais. Dissertação Mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- FOGAÇA, C.A., MALAVASI, M.M., ZUCARELI, C. & MALAVASI, U.C. 2006. Aplicação do teste de tetrazólio em sementes de *Gleditschia amorphoides* Taub. Caesalpinaceae. *Revista Brasileira de Sementes* 28:101-107.
- FRANÇA-NETO, J.B. 1994. O teste de tetrazólio em sementes de soja. *In* Testes de vigor em sementes. (Vieira, R.D. & Carvalho, N.M.). Funep, Jaboticabal. p.87-102.
- FRANÇA NETO, J.B., KRYZANOWSKI, F.C., COSTA, N.P. 1998. El test de tetrazolio en semillas de soja. Londrina: Embrapa-CNPSo, 72p. (Embrapa-CNPSo. Documentos, 117).
- HELLMANN, M.E., MELLO, J.I.O., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. & BARBEDO, C.J. 2006. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água. *Revista Brasileira de Botânica* 29:91-99.
- ISTA. 1985. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology* 13:356-513.
- MAGUIRE, J.D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2:176-177.
- MARCOS FILHO, J. 1994. Teste de envelhecimento acelerado. *In* Testes de vigor em sementes. (Vieira, R.D. & Carvalho, N.M.). Funep, Jaboticabal. p.133-149.

- MARCOS FILHO, J. 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Fealq, Piracicaba.
- MELLO, J.I.O. & BARBEDO, C.J. 2007. Temperatura, luz e substrato para a germinação de sementes de pau-brasil *Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae-Caesalpinioideae. Revista Árvore 31:645-655.
- MCDONALD, M. 1999. Seed quality assessment. Seed Science Research 8:265-275.
- MOORE, R.P. 1985. Handbook on tetrazolium testing. Ista, Zürich.
- NASCIMENTO, W.M.O. & CARVALHO, N.M. 1998. Determinação da viabilidade de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) através do teste do tetrazólio. Revista Brasileira de Sementes 20:470-474.
- OLIVEIRA, L.M., CARVALHO, M.L.M. & DAVIDE, A.C. 2005. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert – Leguminosae Caesalpinioideae. Cerne 11:159-166.
- OLIVEIRA, L.M., CARVALHO, M.L.M. & NERY, M.C. 2005. Teste de tetrazólio em sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e *T. impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley – Bignoniaceae. Revista Ciência Agronômica 36:169-174.
- PIÑA-RODRIGUES, F.C.M., FIGLIOLA, M.B. & PEIXOTO, M.C. 2004. Testes de qualidade. In Germinação do básico ao aplicado (Ferreira, A.G. & Borghetti, F., orgs.). Artmed, Porto Alegre. p.283-297.
- PINTO, T.L.F., BRANCALION, P.H.S., NOVEMBRE, A.D.L.C. & CICERO, S.M. 2008. Avaliação da viabilidade de sementes de coração-de-negro (*Poecilanthe parviflora* Benth. - Fabaceae - Faboideae) pelo teste de tetrazólio. Revista Brasileira de Sementes 30:208-214.
- POPINIGIS, F. 1977. Fisiologia da semente. Ministério da agricultura /Agiplan, Brasília.
- ROCHA, Y.T. 2004. Ibirapitanga: História, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) do descobrimento à atualidade. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo. São Paulo.

- ROCHA, Y.T. & BARBEDO, A.S.C. 2008. Pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) na arborização urbana de São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ) e Recife (PE). *Revista SBAU* 3:58-77.
- ROCHA, Y.T., PRESOTTO, A. & CAVALHEIRO, F. 2007. The representation of *Caesalpinia echinata* (brazilwood) in sixteenth-and-seventeenth-century maps. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 79:751-765.
- SANTANA, D.G & RANAL, M.A. 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. Ed. Universidade de Brasília, Brasília.
- 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.
- VERTUCCI, C.W. & LEOPOLD, A.C. 1984. Bound water in soybean seed and its relation to respiration and imbibitional damage. *Plant Physiology* 75:114-117.
- VILLELA, F.A. & PERES, W.B. 2004. Coleta, beneficiamento e armazenamento. *In* Germinação do básico ao aplicado (Ferreira, A.G. & Borghetti, F., orgs.). Artmed, Porto Alegre. p.265-281.
- ZUCARELI, C., MALAVASI, M.M., FOGAÇA, C.A. & MALAVASI, U.C. 2001. Preparo e coloração de sementes de farinha-seca (*Albizia hasslerii* (Chodat) Burr.) para o teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes* 23:186-191.

**CAPÍTULO 2****Taxa Respiratória e Viabilidade de Sementes de *Caesalpinia echinata* Lam.  
em Função do Grau de Hidratação e de Deterioração**

**Abstract** - (Respiration rate and *Caesalpinia echinata* seed viability at different water status and seed deterioration).The storage of seeds at high respiration rates, leads to their fast deterioration, including the reduction in germination and vigor. Water status is of great importance in this process modifying water activity and metabolic behavior. In this work the relation between respiration rate and *Caesalpinia echinata* seed deterioration was analyzed according to water status changes. Seeds at different deterioration level and different water content were incubated and analyzed as for water content, water potential, dry mass, germination and tetrazolium test. Results showed that the higher water content, the higher both respiration and deterioration.

**Key words:** hydration, water status, respiration, deterioration

**Resumo:** (Taxa respiratória e viabilidade de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. em função do grau de hidratação e de deterioração). A respiração e a deterioração estão estreitamente relacionadas, o armazenamento de sementes com a respiração ativa intensifica a deterioração causando a perda do vigor e eventuais quedas na germinação, sendo o grau de hidratação um dos principais fatores que altera a energia livre da água e o comportamento metabólico das sementes. O presente estudo tem como objetivo analisar alterações na taxa respiratória e no estado de deterioração das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. decorrentes de mudanças no estado energético da água. Sementes com diferentes níveis de deterioração e hidratação foram incubadas e analisadas quanto ao teor de água, potencial hídrico, massa seca, capacidade germinativa e teste de tetrazólio. Os resultados mostraram que o aumento no grau de hidratação intensifica a respiração, bem como a deterioração.

**Palavras chave:** hidratação, energia da água, respiração, deterioração

## Introdução

*Caesalpinia echinata* Lam., o pau-brasil, ou ibirapitanga, pertencente à família Leguminosae (Caesalpinioideae), é uma espécie nativa do Brasil, de ocorrência natural desde o Rio Grande do Norte até o Rio de Janeiro, na floresta pluvial atlântica. Sua madeira, muito explorada no início da colonização brasileira como matéria prima para a obtenção de corante vermelho (brasileína), atualmente vem sendo utilizada na fabricação de arcos de instrumentos musicais com corda (Rocha 2004). Embora outras madeiras estejam sendo empregadas no comércio nacional para a produção de arcos, a madeira de pau-brasil, mundialmente utilizada nessas confecções, apresenta características únicas de ressonância, densidade e durabilidade (Angyalossy *et al.* 2005).

A despeito de sua atual raridade natural, há diversas iniciativas, públicas e privadas para a conservação *ex situ* da espécie, principalmente no Estado de São Paulo (Rocha 2004). Para que a conservação e a utilização da espécie sejam eficientes, a produção e armazenamento de suas sementes como forma de conservação *ex situ* assume um papel fundamental e, nesse caso, há necessidade do controle e do conhecimento da deterioração ao longo do armazenamento (Barbedo *et al.* 2008).

As sementes de pau-brasil apresentam comportamento ortodoxo, podendo manter a germinabilidade e a capacidade de produzir plântulas normais por até 24 meses, quando armazenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$  com baixo teor de água (Hellmann *et al.* 2006); contudo, quando armazenadas a  $7^{\circ}\text{C}$  mantém a germinabilidade por apenas 18 meses e, quando em temperaturas mais elevadas ( $25^{\circ}\text{C}$ ), por apenas um a três meses, ainda que com baixo teor de água (Barbedo *et al.* 2002). Os processos fisiológicos envolvidos nessa perda de viabilidade de sementes secas de *C. echinata* ainda não foram esclarecidos mas podem estar relacionados com a respiração das sementes e conseqüente consumo de reservas, com reações químicas como a peroxidação lipídica e a atividade de espécies reativas de oxigênio ou, ainda, com a ação de microrganismos (Vertucci & Ross 1990, Villela & Peres 2004, Rajjou & Debeaujon 2008).

O controle do teor de água tem importante papel para minimizar o processo de deterioração das sementes durante o armazenamento. Ao final da maturação, as de comportamento ortodoxo passam por redução acentuada no teor de água, resultando em baixo metabolismo e paralisação do crescimento. Dessa forma, essas sementes entram num estado de criptobiose. Com o início da hidratação (embebição), a primeira atividade metabólica a ser intensificada, para a retomada do crescimento, é a respiração (Labouriau 1983).

A respiração das sementes está estritamente relacionada com a água. Em linhas gerais, durante a embebição a respiração apresenta um comportamento trifásico. A fase I é marcada por um acentuado consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono, com ativação e hidratação de enzimas das mitocôndrias; a fase II apresenta um lento acréscimo no consumo de oxigênio, mas há hidratação completa dos cotilédones; já na fase III ocorre uma retomada acentuada no consumo de oxigênio, mobilização de reservas, divisão celular e crescimento do eixo embrionário (Bewley & Black 1994).

A atividade respiratória é a principal produtora de energia para a continuidade do metabolismo. Ao nível celular, a respiração é dividida em três etapas: glicólise, ciclo de Krebs e cadeia de transporte de elétrons. Na presença de oxigênio (respiração aeróbica) há ganho energético de 36 moléculas de ATP e também ocorre a formação de água; já na ausência de oxigênio (respiração anaeróbica), o ganho energético é de 2 moléculas de ATP e ocorre a formação de compostos tóxicos, como o ácido lático e o etanol (Taiz & Zeiger 1998, Kader & Saltveit 2002, Buckeridg *et al.* 2004).

A qualidade das sementes é máxima por ocasião da maturidade fisiológica; a partir deste momento, as sementes mantidas armazenadas começam a entrar em processo de deterioração e continuam até perder sua capacidade de germinar. A duração deste processo é determinada principalmente pela interação entre a herança genética, o grau de hidratação e a temperatura (Delouche 2002). A deterioração proporciona alterações fisiológicas, bioquímicas, físicas e citológicas, determinando a queda do vigor, culminando com a morte da semente (Marcos Filho 2005).

Durante a deterioração ocorrem muitas alterações, tais como: danificação aos sistemas de membranas, diminuição na atividade respiratória e na produção de ATP, mudanças na atividade de enzimas, redução de tecidos de reserva, alterações nos cromossomos e danos no DNA, mudanças na síntese de RNA e de proteínas e alterações e desnaturação de organelas, como mitocôndria, plastídio, retículo endoplasmático, ribossomo, entre outras (Smith & Berjak 1995).

A velocidade da deterioração pode ser controlada em função da longevidade natural, da composição química e das diferenças genéticas, aliadas à qualidade inicial, grau de umidade e às condições do ambiente (Carvalho & Nakagawa 1983, Popinigis 1985, Marcos Filho 2005).

A deterioração é manifestada nas sementes através de uma seqüência de eventos que ocorrem aos níveis bioquímico e fisiológico. O primeiro evento da deterioração é a danificação dos sistemas de membranas, seguido por danificação dos mecanismos energéticos e de síntese, sendo estes eventos característicos de manifestações bioquímicas. À medida que

a deterioração avança diminuem a resistência ao armazenamento, a velocidade de germinação e o número de plântulas normais desenvolvidas. Essas manifestações que ocorrem nas sementes antes e após a retomada do crescimento podem ser diagnosticadas por testes, como o de germinação, de tetrazólio e pela taxa respiratória.

A deterioração é algo inevitável, mas seus efeitos podem ser minimizados durante o armazenamento como, por exemplo, diminuindo-se seu teor de água como meio de redução da atividade metabólica, com reflexos sobre os níveis de respiração do embrião (Carvalho & Nakagawa 2000). O aumento ou diminuição no grau de hidratação das sementes modifica o estado energético da água, bem como o tipo de ligação da água, levando a mudanças no metabolismo da semente (Bradford 1995).

Existem níveis de hidratação que podem ser considerados como críticos para o armazenamento de sementes. Abaixo de 8% ou em potencial hídrico inferior a -150 MPa, por exemplo, o metabolismo oxidativo é restrito, mas as proteções contra os radicais livres são reduzidas; entre 9% e 20% de água (equivalente a -11 a -150 MPa) há o reinício das atividades oxidativas, porém os constituintes celulares estão suscetíveis a degradação; de 21% a 33%, com potencial hídrico entre -4 a -11 MPa, a respiração é intensificada, ocorre síntese de proteínas e de ácidos nucleicos, mas os sistemas de reparos ainda não são ativados (Vertucci & Farrant 1995).

O estado da água afeta a natureza e a cinética das reações metabólicas, levando a crer que os mecanismos da deterioração de sementes diferem para cada nível de hidratação da semente durante o armazenamento (Villela & Marcos Filho 1998).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo analisar alterações na taxa respiratória e no estado de deterioração das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. decorrentes de mudanças no estado energético da água.

### **Material e Métodos**

*Material vegetal* - As sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. foram obtidas de frutos maduros (Borges *et al.* 2005) colhidos em dezembro de 2006 e de 2007 na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, em Mogi-Guaçu, SP (22°15-16'S, 47°8-12'W), aproximadamente entre 15 a 20 matrizes. Os frutos foram mantidos ao sol, sobre base de alvenaria, cobertos por sombrite, para abertura espontânea. À medida que as sementes foram liberadas dos frutos, foram armazenadas em câmara fria a 7°C até o início dos experimentos (Bilia *et al.* 1998, Barbedo *et al.* 2002), não excedendo 14 dias.

*Determinações físicas e fisiológicas* - As sementes foram caracterizadas, inicialmente, quanto ao teor de água, conteúdo de massa seca, potencial hídrico (apenas dos embriões) e germinação. O teor de água e o conteúdo de massa seca foram determinados gravimetricamente, pelo método de estufa a 103°C por 17 horas (Ista 1985), sendo os resultados apresentados em porcentagem, em base úmida, para teor de água e em  $\text{mg.semente}^{-1}$ , para massa seca (Brasil 1992).

O potencial hídrico foi medido, em embriões sem tegumento, por meio de potenciômetro WP4 (Decagon Devices, Pullman, EUA), basendo-se na temperatura do ponto de orvalho do ar em equilíbrio com a amostra examinada. A aferição do potencial foi realizada por meio de isotermas de sorção de água em soluções de polietileno glicol 6000.

O teste de germinação foi conduzido conforme recomendações de Mello & Barbedo (2007), em germinadores MA400 (Marconi, Piracicaba, Brasil), com 100% de umidade relativa do ar e regulados para a temperatura constante de 25°C, com luz contínua. O teste foi conduzido em rolo de papel Germitest, com duas folhas para base e uma para cobertura (Brasil 1992). As avaliações de germinação foram realizadas diariamente, durante 15 dias, sendo registradas as sementes que emitiram raiz primária (para o cálculo da germinação) e as que mantiveram a capacidade de produção de plântulas normais (para o cálculo do desenvolvimento de plântulas normais). Foi calculado, ainda, o índice de velocidade de germinação (IVG), conforme fórmula de Maguire (1962).

A qualidade fisiológica das sementes foi analisada, também, pelo teste de tetrazólio, segundo metodologia e categorias descritas no capítulo anterior. Para tanto, as sementes foram pré-condicionadas em água, pelo período de 2 horas a 25°C; a seguir, tiveram seu tegumento removido e foram incubadas na solução de tetrazólio a 0,05% por 2 horas a 35°C na ausência de luz.

Baseando-se nas oito categorias estabelecidas no teste de tetrazólio foram calculadas, também, as estimativas de distribuição de frequência de tecidos viáveis, deteriorados e mortos, considerando-se a soma dos tecidos de todas as sementes. Para tanto, inicialmente foram estabelecidas porcentagens de áreas viáveis, deterioradas e mortas para cada semente dentro de cada categoria, conforme o que se segue:

Categoria 1: 100% de áreas viáveis;

Categoria 2: 90% de áreas viáveis, 10% de deterioradas;

Categoria 3: 70% de áreas viáveis, 30% de deterioradas;

Categoria 4: 50% de áreas viáveis, 50% de deterioradas;

Categoria 5: 10% de áreas viáveis, 90% de deterioradas;

Categoria 6: 10% de áreas viáveis, 50% de deterioradas, 40% de mortas;

Categoria 7: 30% de áreas deterioradas, 70% de mortas;

Categoria 8: 100% de áreas mortas.

Após a distribuição das sementes de cada tratamento nas categorias foram, então, calculadas as áreas totais de tecidos vivos, deteriorados e mortos de toda a amostra de sementes, ou seja, a distribuição de frequência de tecidos vivos, deteriorados e mortos da amostra.

O consumo de oxigênio ( $O_2$ ) e a produção de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) foram determinados em analisador modelo 6600 (Illinois Instruments, Inc., Johnsbury, EUA). O  $O_2$  foi mensurado por sensor potenciométrico, com eletrólito sólido cerâmico na forma de tubo à base de óxido de zircônio ( $ZrO_2$ ), onde interna e externamente são depositados dois eletrodos. A zircônia possui a habilidade de conduzir íons de oxigênio em temperaturas superiores a  $650^\circ C$ . A medida é dada mediante a diferença de potencial da pressão parcial do oxigênio entre os dois eletrodos (Steil *et al.* 2002, Caproni 2007). O sensor de dióxido de carbono é um infravermelho, baseando-se na absorção, pelo  $CO_2$ , de radiação no espectro do vermelho. Os valores são expressos em porcentagem da amostra de ar tomada.

*Acondicionamento das sementes* - Amostras de sementes de *C. echinata* foram acondicionadas em embalagens de vidro de 600mL, hermeticamente fechados, com tampas perfuradas, formando orifícios que foram recobertos por um septo de borracha; por este septo foram inseridos os eletrodos do equipamento por onde foi tomada a amostra do ar da embalagem. Antes da introdução das sementes nas embalagens, foram determinados as massas fresca e seca totais (g), o teor de água e o potencial hídrico dessas sementes; o volume total do ar das embalagens foi determinado segundo o princípio da hidrostática para que se calculasse o volume resultante de ar após 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 embaladas foram estimados pela diferença entre os valores medidos e os da atmosfera normal. Após cada medida, as embalagens eram abertas por alguns minutos para re-equilíbrio com a atmosfera normal sendo, em seguida, novamente fechadas para a continuidade do experimento. Considerando-se a pressão atmosférica local como 0,90 atm (A. B. Pereira, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2007, comunicação pessoal), os valores obtidos em porcentagem de  $O_2$  ou de  $CO_2$  foram convertidos para pressão parcial do gás, segundo a fórmula  $p_1/P=v_1\%/V\%$  (Feltre 1985), onde:

$p_1$  = pressão parcial do gás (em atm);

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

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

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

A seguir, baseando-se no volume das embalagens e na temperatura registrada em cada avaliação, os valores foram convertidos para  $\mu\text{mol}$  de  $\text{O}_2$  e de  $\text{CO}_2$ , pela equação de Clapeyron,  $p_1V=nRT$ , onde:

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

$n$  = número de moles do gás

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

$T$  = temperatura (em Kelvin)

Baseando-se em experimentos prévios da média de consumo diário de  $\text{O}_2$  (e de liberação de  $\text{CO}_2$ ) pelas sementes de *Caesalpinia echinata* (dados não apresentados), estabeleceu-se o intervalo de dez dias entre as avaliações. 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 permaneceram nas embalagens, obtendo-se o valor expresso em micromol por grama de massa seca por dia ( $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ). Foi calculado, também, o quociente respiratório (QR), dividindo-se o valor obtido para produção de  $\text{CO}_2$  pelo obtido para consumo de  $\text{O}_2$  ( $\text{QR}=\text{CO}_2.\text{O}_2^{-1}$ ), ambos em  $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , segundo descrito por Kader & Saltveit (2002).

*Taxas respiratórias e viabilidade de sementes com diferentes níveis de hidratação* - sementes colhidas em 2006, com 6% de água (nível inicial), foram acondicionadas em caixas plásticas tipo gerbox (11,5x11,5x3,5cm) com 100% UR, a 25°C, procurando-se obter sementes com 14%, 18%, 22% e 26% de água. Os dois primeiros níveis de hidratação basearam-se na faixa descrita por Carvalho & Nakagawa (1983) como sendo de respiração ativa e na descrita por Vertucci & Farrant (1995) como sendo de início de atividades oxidativas; para os dois últimos, baseou-se na mudança do estado energético da água nas sementes (Marcos Filho 2005), correspondendo a grande alteração na atividade fisiológica das sementes e início da síntese de proteínas e ácidos nucleicos (Vertucci & Farrant 1995). Imediatamente após atingido cada nível, as sementes foram acondicionadas nas embalagens descritas acima e incubadas a 25°C e 35°C. Além das avaliações de  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$ , descritas anteriormente, ao final de 30 dias as sementes foram submetidas aos testes de germinação e de tetrazólio, bem como avaliadas quanto ao teor de água, potencial hídrico e conteúdo de massa seca.

*Taxas respiratórias e viabilidade de sementes com diferentes níveis de deterioração* - uma vez analisada a relação entre o grau de hidratação das sementes e a taxa respiratória, em sementes vigorosas, avaliaram-se mudanças nessa relação em sementes submetidas a diferentes graus de deterioração.

Para tanto, sementes foram colhidas em 2007, diretamente de frutos pré-deiscentes Borges *et al.* (2005), consideradas vigorosas. Parte dessas sementes foram submetidas a envelhecimento artificial, em gerbox com 100% UR, a 42°C por 12 horas, segundo metodologia descrita por Marcos Filho (1994). Neste mesmo ano foram coletadas sementes recém-caídas ao solo, consideradas deterioradas naturalmente. Parte destas sementes também foi submetida ao mesmo envelhecimento acelerado. Dessa forma, foram obtidos quatro níveis de deterioração de sementes: vigorosas, vigorosas envelhecidas, deterioradas e deterioradas envelhecidas. As sementes de cada tratamento foram analisadas quanto ao teor de água, potencial hídrico, conteúdo de massa seca, germinação e, também, submetidas ao teste de tetrazólio.

Em seguida amostras das sementes de cada tratamento foram submetidas a hidratação até que atingissem 10%, 14% e 16% de água, conforme descrito anteriormente e acondicionadas em frascos de vidro com fechamento hermético, a 13°C, durante 60 dias; a cada 10 dias foram tomadas as medidas do consumo de oxigênio e de produção de dióxido de carbono. Ao final dos 60 dias, as sementes foram analisadas quanto a teor de água, potencial hídrico, conteúdo de massa seca, germinação e submetidas ao teste de tetrazólio.

*Delineamento experimental e procedimento estatístico* - O delineamento experimental para todos os experimentos foi inteiramente casualizado, com 3 repetições. Os dados obtidos para teor de água, conteúdo de massa seca, potencial hídrico, germinação, desenvolvimento de plântulas normais, consumo de O<sub>2</sub> e produção de CO<sub>2</sub> e análise pelo teste de tetrazólio foram submetidos à análise de variância (teste F), ao nível de 5% de probabilidade. Quando pertinente, as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, também ao nível de 5% e, quando necessária a correção da normalidade e da heterogeneidade, os valores foram transformados para  $\text{arc sen } (\%)^{0,5}$  (Santana & Ranal 2004). A análise estatística dos valores de potencial hídrico foi realizada com os dados sendo considerados em módulo.

## **Resultados e Discussão**

*Taxas respiratórias e viabilidade de sementes com diferentes níveis de hidratação* - A análise de variância dos dados de teor de água e de potencial hídrico para sementes de *Caesalpinia echinata* apresentou interação significativa para nível de hidratação e período de incubação e para temperatura e período de incubação.

Os valores de teor de água efetivamente atingidos pelas sementes após a hidratação controlada (tabela 1) ficaram muito próximos aos pretendidos inicialmente (6%, 14%, 18%, 22% e 26%), abrangendo três estados energéticos da água, tipos 1, 2 e 3 (Vertucci & Farrant

1995), ou seja, < -150 MPa, -150 a -11 MPa e -11 a -4 MPa, respectivamente. Os teores de água pouco se modificaram após os 30 dias de incubação nos frascos herméticos e os correspondentes estados energéticos apresentaram mudanças pequenas, exceto para os dois níveis mais baixos de hidratação (tabela 1).

Tabela 1. Teor de água (% de base úmida) e potencial hídrico (-MPa) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam., incubadas com cinco níveis de hidratação por 30 dias a 25 e 35°C. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, maiúsculas dentro de linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Temperatura (°C)	Teor de água (%)		Potencial hídrico (-MPa)	
	antes da incubação	incubadas	antes da incubação	incubadas
25	16,8 bB	18,3 aA	51,25 aA	44,34 bB
35	17,7 aB	18,4 aA	50,87 aA	50,57 aA
Hidratação				
6%	5,7 eA	5,6 eA	180,67 aA	146,50 aB
14%	14,6 dA	14,6 dA	27,76 bB	39,37 bA
18%	18,1 cB	19,0 cA	21,53 bcA	24,55 cA
22%	22,3 bB	23,4 bA	15,30 cdA	17,20 cdA
26%	25,0 aB	29,2 aA	10,04 dA	9,68 dA
Coeficiente de variação (%)		4,00	11,40	

As taxas respiratórias das sementes de *C. echinata* hidratadas de 6% até 14% foram baixas e bastante semelhantes nas temperaturas de 25°C e 35°C (figura 1). Contudo, para teores de água mais elevados o aumento da temperatura de 25°C (figura 1A) para 35°C (figura 1A) intensificou a taxa respiratória até 22% de água, quando as sementes apresentaram tendência a estabilizar consumo e produção de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, respectivamente. Quando as sementes atingiram 26% de água, o consumo ultrapassou 10 μmolO<sub>2</sub>.gMS<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> a 35°C (figura 1B), mas ficou abaixo de 8 μmolO<sub>2</sub>.gMS<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> a 25°C (figura 1A).

O quociente respiratório (QR) é um parâmetro utilizado para indicar qual via respiratória esta sendo usada na oxidação de um substrato. Valores de QR próximos ou iguais a 1, como os que ocorreram nas sementes do presente trabalho com teores de água superiores a 14% (figura 1), indicam que as vias aeróbicas estão sendo utilizadas; já valores acima de 1

(não identificados nos resultados obtidos) indicam a ativação das vias anaeróbicas (Labouriau 1983, Kader & Saltveit 2002, Saquet & Streif 2002).

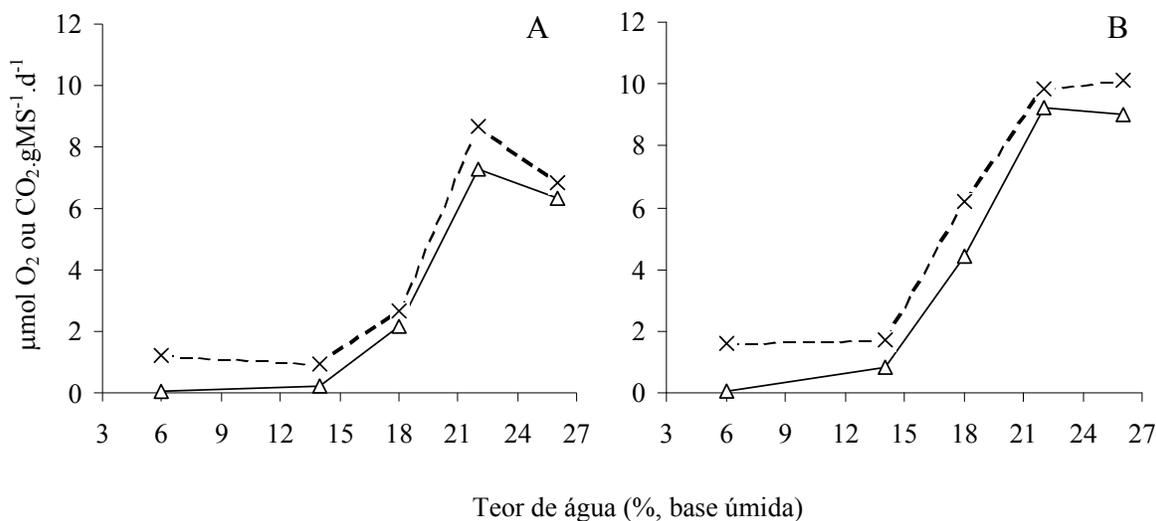


Figura 1. Consumo de O<sub>2</sub> (x, linha tracejada) e produção de CO<sub>2</sub> (Δ, linha cheia) por sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. com diferentes teores de água, incubadas por 30 dias em frascos de vidro com fechamento hermético, a 25°C (A) ou 35°C (B). Valores expressos em média diária por grama de massa seca de sementes.

Através do QR é possível, também, estimar qual substrato está sendo utilizado na respiração. Na oxidação completa de um carboidrato tem-se o QR igual a 1, na de um ácido (como o málico, o cítrico e o glutâmico) o QR é maior do que 1 e quando os substratos iniciais são os ácidos graxos, como em sementes oleaginosas, o valor do QR é inferior a 1. Tal diferença ocorre em função da molécula a ser oxidada ter ou não em sua estrutura a presença de oxigênio, exigindo respectivamente menor ou maior quantidade desse elemento (Labouriau 1983).

Os resultados de consumo de O<sub>2</sub> de sementes de *C. echinata* em relação à produção de CO<sub>2</sub> (figura 1), cerca de 50 vezes maior em sementes com 6% de água e 4 vezes maior quando com 14%, geram QR bastante inferior a 1 sugerindo, portanto, uma possível utilização de ácidos graxos como substrato para a respiração dessas sementes. Conforme demonstrado por Mello (2008), as sementes de *C. echinata* apresentam teores relativamente elevados de ácidos graxos (17%). Contudo, nesses níveis de hidratação também podem ter ocorrido reações oxidativas diferentes da respiração aeróbica (Vertucci & Leopold 1987, Walters *et al.* 2002), tais como a peroxidação de lipídios e a oxidação de compostos fenólicos presentes no tegumento, processos estes que reduzem a molécula de oxigênio. Especialmente em teores de água abaixo de 9%, há mudanças no metabolismo das sementes que, além da restrição na

atividade respiratória, têm diminuída a proteção contra os radicais livres, favorecendo o aumento da autoxidação de lipídios, reação que envolve a redução do oxigênio (Vertucci 1989, Marcos Filho 2005). Vertucci (1989) também observou QR abaixo de 1 em sementes de soja com teores de água inferiores a 10% e atribuiu o consumo de O<sub>2</sub> a reações oxidativas não resultantes de transporte de elétrons na mitocôndria ou na glicólise.

Após 30 dias de incubação nos frascos de vidro com fechamento hermético foi possível observar a perda da capacidade germinativa das sementes, em ambas as temperaturas, porém mais acentuada a 35°C (tabela 2). Inicialmente, as sementes apresentavam 73% de germinação com 40% das sementes capazes de produzir plântulas normais. Após 30 dias, nas sementes com 6% de água, incubadas a 25°C, a germinação caiu para 53%, com 20% das sementes capazes de produzir plântulas; quando a 35°C, a germinação caiu para 27% e o desenvolvimento de plântulas normais para 3% (tabela 2).

Tabela 2. Germinação (%), desenvolvimento de plântulas normais (%) e avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio (TZ) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam., incubadas com cinco níveis de hidratação a 25 e 35°C, durante 30 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, maiúsculas dentro de linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Temperatura de incubação	Níveis de hidratação				
	6%	14%	18%	22%	26%
<i>Germinação (%)</i>					
25°C	53 aA	10 aB	0 aC	0 aC	0 aC
35°C	27 bA	0 bB	0 aB	0 aB	0 aB
Coeficiente de variação. (%)	25,23				
<i>Plântulas normais (%)</i>					
25°C	20 aA	0 aB	0 aB	0 aB	0 aB
35°C	3 bA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
Coeficiente de variação. (%)	127,25				
<i>Viáveis em TZ (%)</i>					
25°C	47 aA	17 aB	0 aC	0 aC	0 aC
35°C	30 bA	0 bB	0 aB	0 aB	0 aB
Coeficiente de variação. (%)	27,09				

Essa diferença na capacidade germinativa e na taxa respiratória a 25 e 35°C entre as sementes não hidratadas, demonstra como o aumento da energia térmica intensifica o processo respiratório e a deterioração. O aumento da taxa respiratória nas condições de armazenamento acelera o consumo de reservas, levando à rápida senescência dos tecidos, o que implica no consumo de matéria seca e na promoção da germinação e no desenvolvimento das sementes (Carneiro & Aguiar 1993). No presente trabalho, não foi possível detectar variações significativas na massa seca das sementes dos diferentes tratamentos, que apresentaram média geral de 0,255 mg.semente<sup>-1</sup>. Contudo, ficou evidente a diferença na evolução da deterioração de tecidos das sementes incubadas com diferentes teores de água (tabela 2).

As sementes hidratadas até 14% de água, após 30 dias de armazenamento a 25°C, ainda apresentavam germinação, mas as incubadas a 35°C perderam totalmente sua capacidade germinativa. Com hidratação acima de 14%, em ambas as temperaturas as sementes perderam totalmente a capacidade germinativa após os 30 dias de incubação (tabela 2). Temperaturas elevadas favorecem a desorganização dos sistemas de membranas, bem como a desnaturação e redução da atividade de enzimas, comprometendo assim o metabolismo dos tecidos (Taiz & Zeiger 1998). Tal fato pode ter contribuído para a redução mais acentuada da germinação observada para sementes incubadas a 35°C.

A diminuição da atividade enzimática a 35°C foi constatada em sementes de *Coffea arabica* L. (café) por Lima *et al.* (2004), que verificaram diminuição da atividade da isocitrato desidrogenase (IDH), enzima atuante no ciclo de Krebs. A atividade das desidrogenases também foi analisada no presente trabalho pelo teste do tetrazólio, possibilitando verificar que o aumento da respiração durante o armazenamento condicionou as sementes de *C. echinata* a diferentes níveis de deterioração.

Através da distribuição da frequência de perda da vitalidade dos tecidos (figura 2A) verificou-se que os embriões armazenados a 25°C, com 18% de água, mesmo não estando mais viáveis (tabela 2), ainda apresentavam grandes extensões de tecidos vivos, desenvolvendo coloração vermelha intensa (figura 3); já embriões com 26% de água apresentavam mais de 81% de tecidos mortos (figura 2A), porém com aspectos de viáveis, permanecendo íntegros quando hidratados (figura 3).

Quando incubados a 35°C, a partir de 18% de água os embriões apresentavam poucas extensões de tecidos vivos (figura 2B) e, além disso, já com aspecto de tecido deteriorado (figura 3); neste mesmo nível de hidratação, os tecidos que já estavam mortos apresentavam aspectos de tecido completamente degradado (figura 3).

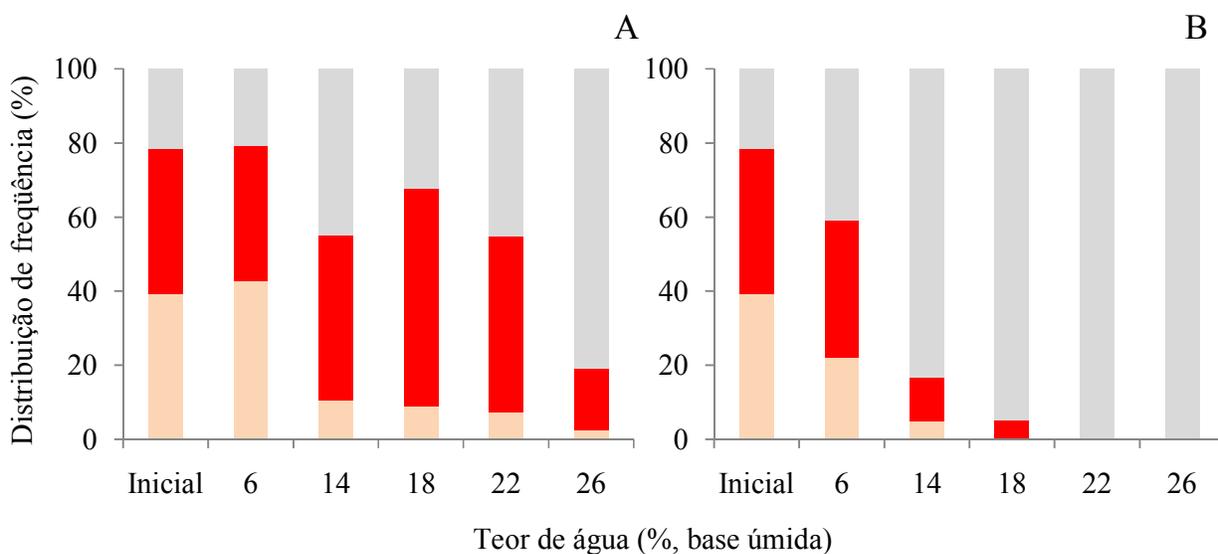


Figura 2. Distribuição das frequências de tecidos viáveis (rosa), deteriorados (vermelho) e mortos (cinza), obtidos do teste de tetrazólio, de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. com diferentes teores de água, incubadas por 30 dias, em frascos de vidro com fechamento hermético, a 25°C (A) ou 35°C (B).



Figura 3. Embriões de *Caesalpinia echinata* Lam. após o teste de tetrazólio. Da esquerda para a direita, embriões de sementes incubadas com teores iniciais de água de, respectivamente, 6%, 14%, 18%, 22% e 26%. Linha superior: incubação a 25°C; linha inferior: 35°C. Escala = 1 cm.

A análise conjunta dos resultados de taxas respiratórias (por meio do consumo de O<sub>2</sub> e emissão de CO<sub>2</sub>, (figura 1) e das imagens obtidas no teste de tetrazólio (evidenciando a dimensão e localização de tecidos viáveis, deteriorados e mortos, figuras 2 e 3) permitiu melhor compreensão do comportamento respiratório e da deterioração das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. Dessa forma, verificou-se que as maiores taxas respiratórias dos níveis intermediários de hidratação favoreceram o desenvolvimento de tecidos de coloração vermelha intensa, ou seja, em acelerado processo de deterioração. Por outro lado, pequenas reduções nessas taxas respiratórias, nas sementes com 26% de água, podem ser resultado da grande quantidade de tecidos mortos (figuras 2 e 3). Ou seja, o aumento da taxa respiratória das sementes de *C. echinata* em função de mudanças no estado energético da água gradativamente favoreceu o avanço da deterioração que, ao final, culminou com a morte de tecidos e perda completa da capacidade germinativa das sementes. A associação das taxas respiratórias obtidas com as mudanças observadas nas características dos tecidos das sementes estão em acordo, também, com a seqüência de eventos descrita por Delouche (2002).

A intensa atividade respiratória e de consumo de reservas podem determinar a redução acentuada da disponibilidade destas, bem como promover metabolismo desordenado, com liberação e atividade de radicais livres (Barbedo & Marcos Filho 1998). A redução da capacidade germinativa das sementes de *C. echinata* (tabela 2) e o aumento de tecidos deteriorados e mortos (figura 3) são reflexos desse metabolismo desordenado.

Pelo teste de tetrazólio (figura 3) foi verificado que a rápida deterioração das sementes, durante a incubação, foi acompanhada de deterioração de boa parte da região proximal (ver capítulo anterior), de toda a extensão do eixo embrionário e da parte mais externa do embrião (figura 3). Estas lesões poderiam justificar, portanto, a baixa capacidade de conservação da viabilidade de sementes de *C. echinata* quando armazenadas em temperaturas superiores às de congelamento, ainda que com reduzido teor de água, conforme descrito por Barbedo *et al.* (2002) e por Hellmann *et al.* (2006).

*Taxas respiratórias e viabilidade de sementes com diferentes níveis de deterioração* - as características iniciais dos grupos de sementes submetidos a diferentes processos de deterioração estão apresentadas nas tabelas 3, 4 e 5. Para este experimento todo o material foi incubado a 13°C, baseando-se no estreitamento da relação entre consumo de O<sub>2</sub> e o ganho energético oriundo da elevação da temperatura. Esta relação foi obtida no estudo que analisou os efeitos da energia térmica sobre a respiração das sementes (vide capítulo seguinte).

Tabela 3. Teor de água (% , base úmida) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam., de quatro níveis de deterioração, sem ou após dois níveis hidratação, inicial e após 60 dias de incubação a 13°C. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, maiúsculas dentro de linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Níveis de deterioração	Níveis de hidratação			
	10%	14%	16%	
Vigorosas	10,25 aC	13,08 aB	14,21 cA	
Vigorosas envelhecidas	10,58 aC	13,42 aB	15,69 abA	
Deterioradas	10,27 aB	14,17 aA	14,61 bcA	
Deterioradas envelhecidas	10,75 aC	13,20 aB	15,87 aA	
Antes da incubação	10,22 cA	13,96 bA	15,81 aA	
Incubadas	10,70 cA	13,00 bB	14,38 aB	
	Níveis de deterioração			
	Vigorosas	Vigorosas envelhecidas	Deterioradas	Deterioradas envelhecidas
Antes da incubação	13,33 aA	13,58 aA	12,87 aA	13,55 aA
Incubadas	11,70 aB	12,92 aA	13,16 aA	12,99 aA
Coefficiente de variação	5,84			

Os valores de teor de água, potencial hídrico, germinação e vigor apresentados nessas tabelas demonstraram o sucesso na uniformidade da aplicação do envelhecimento acelerado e na obtenção de sementes com quatro níveis distintos de qualidade fisiológica sendo, da maior para a menor, vigorosas, deterioradas, vigorosas envelhecidas e deterioradas envelhecidas.

Tabela 4. Potencial hídrico (-MPa) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam., de dois níveis de hidratação e quatro níveis de deterioração (V: vigorosas; VE: vigorosas envelhecidas; D: deterioradas; DE: deterioradas envelhecidas), antes e após 60 dias de incubação a 13°C. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, maiúsculas dentro de linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Incubação	Níveis de hidratação			
	10%	14%	16%	
Antes da incubação	81,70 aA	37,13 bB	29,95 bC	
Incubadas	62,34 bA	49,00 aB	41,78 aC	
	Níveis de deterioração			
	V	VE	D	DE
	52,26 A	48,98 B	50,33 AB	48,69 B
Coefficiente de variação	8,73			

Tabela 5. Germinação (%), desenvolvimento de plântulas normais (%), índice de velocidade de germinação (IVG) e avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam., de quatro níveis de deterioração e três níveis hidratação, após 60 dias de incubação a 13°C. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, maiúsculas dentro de linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Níveis de deterioração	Valores iniciais	Níveis de hidratação		
		10%	14%	16%
<i>Germinação (%)</i>				
Vigorosas	71	51 aA	13 aB	5 aB
Vigorosas envelhecidas	29	20 bA	7 aB	0 aB
Deterioradas	69	49 aA	13 aB	5 aB
Deterioradas envelhecidas	20	7 bA	2 aB	0 aB
Coefficiente de variação (%)			41,73	
<i>Plântulas normais (%)</i>				
Vigorosas	58	24 aA	5 aB	2 aB
Vigorosas envelhecidas	24	5 cA	0 aA	0 aB
Deterioradas	62	15 bA	7 aB	0 aC
Deterioradas envelhecidas	9	0 cA	0 aA	0 aA
Coefficiente de variação (%)			65,71	
<i>IVG</i>				
Vigorosas	5,33	2,37 aA	0,58 aB	0,22 aB
Vigorosas envelhecidas	1,33	0,92 bA	0,33 aB	0 aB
Deterioradas	5,08	2,49 aA	0,60 aB	0 aB
Deterioradas envelhecidas	1,01	0,27 cA	0,07 aA	0 aA
Coefficiente de variação (%)			35,81	
<i>Viáveis em TZ (%)</i>				
Vigorosas	56	49 aA	11 aB	9 aB
Vigorosas envelhecidas	24	16 bA	7 aAB	0 aB
Deterioradas	53	38 aA	9 aB	7 aB
Deterioradas envelhecidas	18	9 bA	4 aA	5 aA
Coefficiente de variação (%)			50,72	

Tanto as sementes vigorosas quanto as deterioradas apresentaram comportamento similar na cinética dos gases, aumentando a taxa respiratória com a elevação do teor de água (figura 4A, C). Nota-se, ainda, consumo de oxigênio mais acentuado no nível mais elevado de hidratação (16%) e, assim como discutido no experimento anterior, o QR destas sementes também foi sempre inferior a 1, indicando processos de oxidação diferentes da respiração.

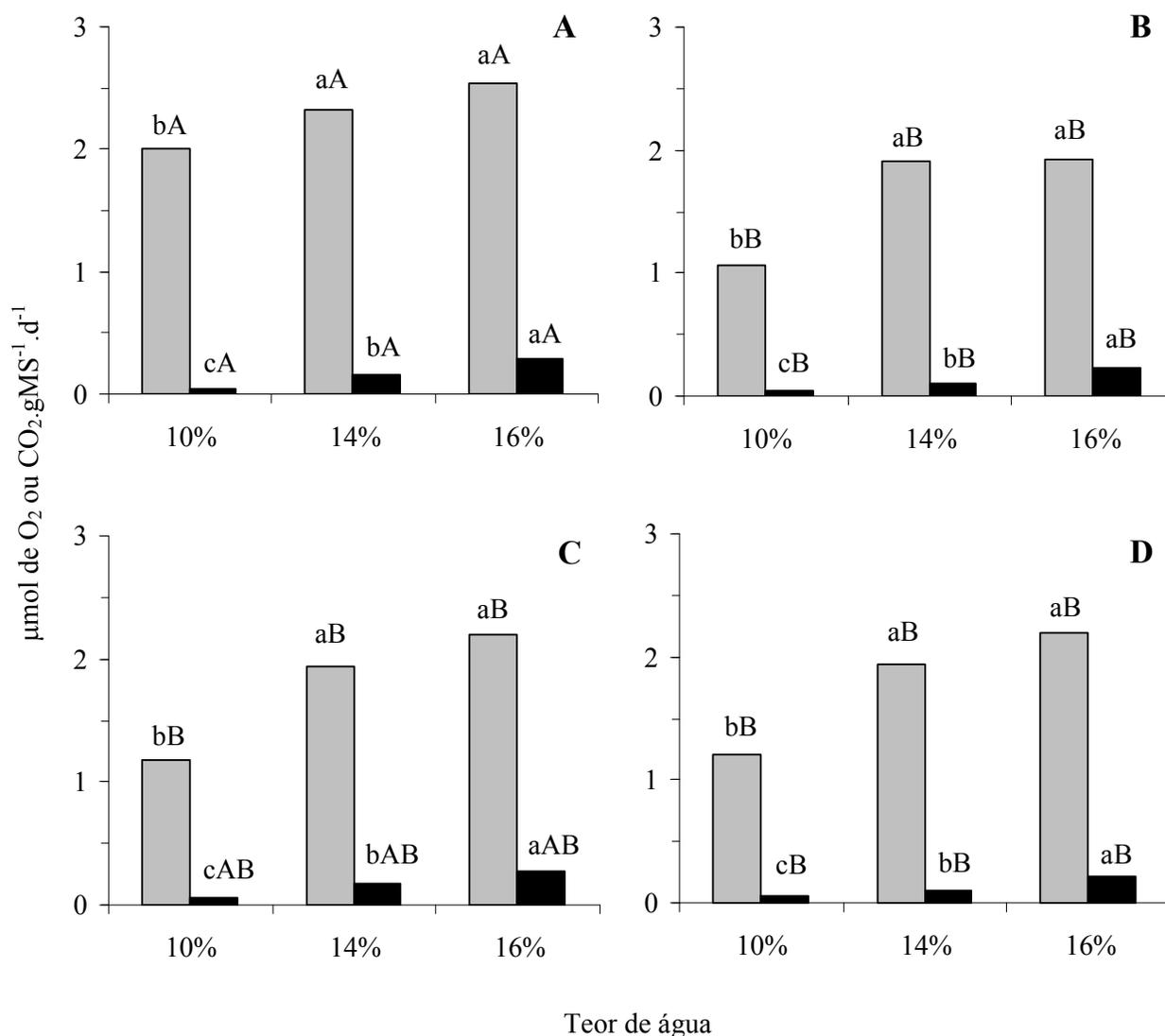


Figura 4. Consumo de O<sub>2</sub> (colunas em cinza) e produção de CO<sub>2</sub> (colunas em preto) por sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. vigorosas (A), vigorosas envelhecidas (B), deterioradas (C) e deterioradas envelhecidas (D), incubadas a 13 °C por 60 dias com diferentes teores iniciais de água. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas comparando teores de água, maiúsculas comparando lotes) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

As sementes com 10% de água apresentavam potencial hídrico próximo de -84 MPa, aumentando para valores próximos a -30 MPa quando hidratadas até 16% (tabela 4). A hidratação da semente modifica o estado energético, caracterizando mudanças no tipo de ligação da água, alterando o comportamento fisiológico, bem como o metabolismo das sementes (Marcos Filho 2005). Ainda que os potenciais hídricos das sementes com 10%, 14% e 16% de água correspondam todos à água tipo 2, na qual há o início das atividades

oxidativas, o potencial hídrico das sementes com 16% de água aproximou-se da água tipo 3, na qual a respiração aeróbica é intensificada e há o início do metabolismo, com síntese de proteínas e ácidos nucleicos (Vertucci & Farrant 1995, Villela & Marcos Filho 1998).

Analisando-se o consumo de O<sub>2</sub> dentro de cada nível de hidratação verifica-se que as sementes vigorosas consumiram maior quantidade (figura 4). Isso pode ser devido ao fato de que sementes mais deterioradas apresentam menor eficiência no uso do oxigênio e, portanto, menor consumo deste gás na atividade respiratória (McDonald 1999, Marcos Filho 2005). Embora inicialmente as sementes vigorosas e as deterioradas praticamente não apresentaram diferenças significativas na capacidade germinativa, após 60 dias as deterioradas mostraram-se menos vigorosas (tabela 5). À medida que a deterioração avança, a resistência ou a tolerância das sementes aos estresses diminuem, reduzindo a longevidade em armazenamento, enquanto que sementes mais vigorosas suportam períodos mais prolongados sob estas condições (Delouche 2002).

O menor consumo de oxigênio pelas sementes de menor qualidade pode estar relacionado com a perda de atividade e integridade das mitocôndrias, organelas semi-autônomas com inúmeras membranas. Como os sistemas de membranas são os primeiros componentes celulares afetados no processo de deterioração, reduzindo a proteção e favorecendo o ataque de radicais livres, as mitocôndrias estão mais suscetíveis a esses processos, implicando em menor eficiência de suas atividades (Smith & Berjak 1995, McDonald 1999, Marcos Filho 2005).

Para as sementes submetidas ao envelhecimento acelerado (figura 4C, D), o consumo de oxigênio também foi crescente conforme se elevou o teor de água, mas foi sempre inferior ao consumo apresentado pelas sementes não submetidas a envelhecimento. Além disso, diferentemente das não envelhecidas, não houve diferença de comportamento entre as vigorosas e as deterioradas. Benamar *et al.* (2002) observaram que, durante a germinação, a atividade mitocondrial de sementes de ervilha (*Pisum sativum* L.) envelhecidas artificialmente foi menor do que as não envelhecidas, porém o consumo de oxigênio foi maior. Essa maior demanda no consumo de oxigênio pela mitocôndria de sementes mais deterioradas seria uma forma de compensar sua menor eficiência, semelhante ao que ocorreu no presente estudo.

A dinâmica na produção de dióxido de carbono foi semelhante para sementes dos quatro níveis de deterioração, com tendência a aumento conforme se aumentou o teor de água (figura 4). A baixa produção de dióxido de carbono para sementes com 10% de água reforça a hipótese da ocorrência de processos oxidativos em níveis mais baixos de hidratação, fato já descrito por Vertucci (1989).

Outro fato que pode estar associado ao aumento da respiração e da deterioração durante o armazenamento é o desenvolvimento de microorganismos. De fato, no nível mais elevado de hidratação notou-se grande incidência de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Fusarium* (J.J.D Parisi & C.F. Oliveira 2008, informação pessoal). A intensa atividade respiratória das sementes, somadas às atividades de microorganismos, podem provocar o aquecimento da massa, acelerando ainda mais o processo de deterioração (Carneiro & Aguiar 1993).

Quando se comparou a quantidade de dióxido de carbono produzida entre os grupos de sementes com diferentes níveis de deterioração verificou-se que houve diferenças menos expressivas entre eles, ao contrário do que ocorreu com o consumo de oxigênio. 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 oxidativo para o metabolismo fermentativo, aumentando a produção de dióxido de carbono (Marcos Filho 2005). Esse comportamento foi verificado por Crispim *et al.* (1994) que constataram que sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merr) mais deterioradas apresentaram maior taxa de respiração que as mais vigorosas. A produção semelhante de dióxido de carbono das sementes de *C. echinata* com diferentes níveis de deterioração poderia indicar que as mais deterioradas apresentavam, em seus embriões, maiores extensões de tecidos mortos com conseqüente redução de regiões com atividade metabólica.

Analisando-se a distribuição da freqüência de perda da vitalidade dos tecidos de embriões de *C. echinata* (figura 5) verifica-se que, após 60 dias de incubação, as sementes vigorosas com 14% e 16% de água apresentavam, respectivamente, 34% e 38% de tecidos mortos, valores bastante próximos aos das sementes deterioradas (41% e 40%). As sementes vigorosas com 10% de água, por sua vez, apresentaram 40% de tecidos em processo de deterioração, enquanto que as deterioradas apresentaram 51% de tecidos nessas condições (figura 5).

O teste de tetrazólio permitiu verificar que o aumento da taxa de deterioração das sementes foi diretamente proporcional ao aumento da taxa respiratória. Nas sementes vigorosas, por exemplo, quando se elevou de 10% para 14% o teor de água a produção de dióxido de carbono triplicou (de 0,05 a 0,15  $\mu\text{molCO}_2 \cdot \text{gMS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , figura 4A) e a quantidade de tecidos mortos ou em processo de deterioração (respectivamente, tecidos sem coloração ou com coloração vermelha) aumentou de 50% para 90% (figura 5A).

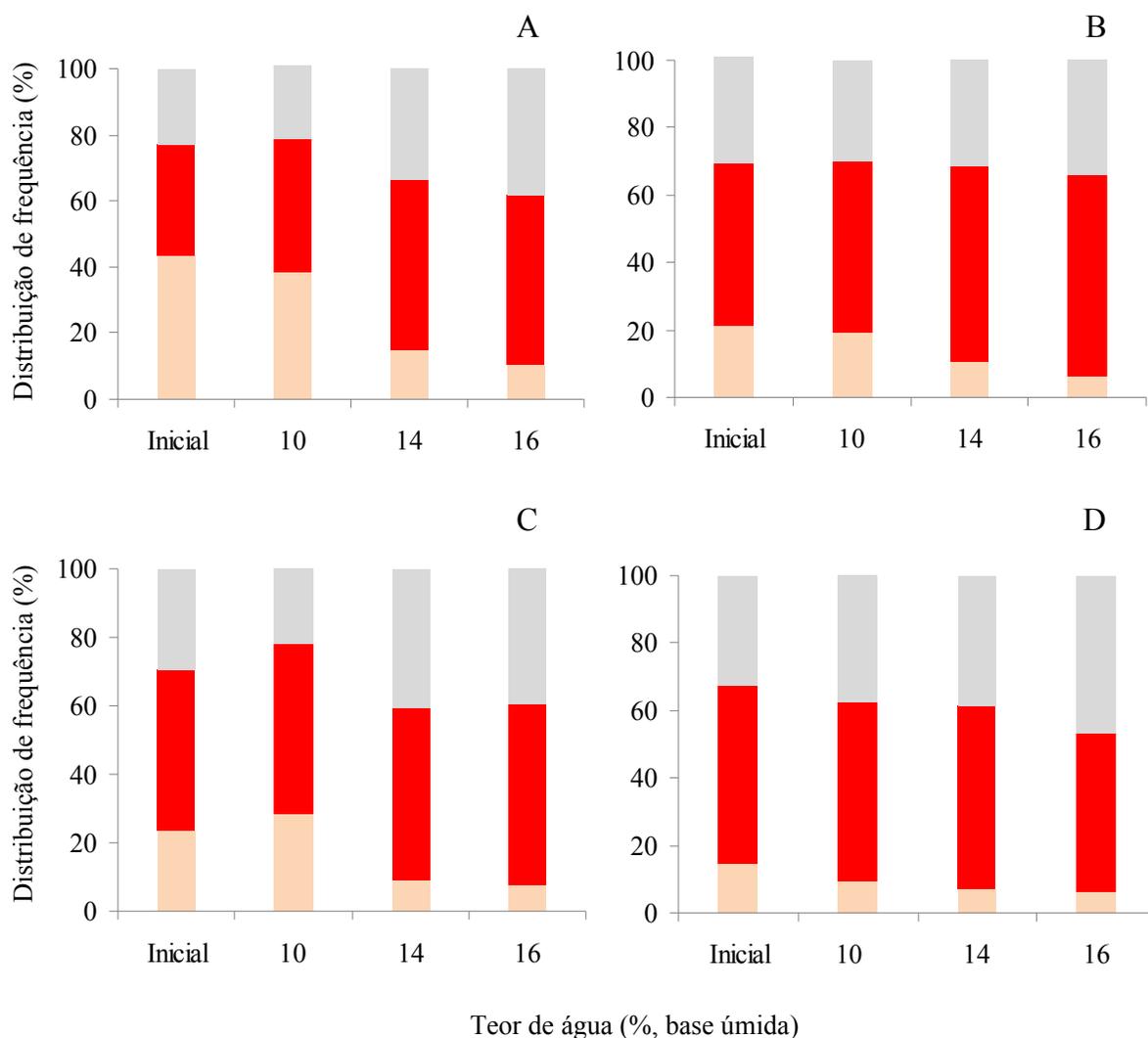


Figura 5. Distribuição das frequências de tecidos viáveis (rosa), deteriorados (vermelho) e mortos (cinza), obtidos do teste de Tetrazólio, de sementes de diferentes níveis de deterioração, de *Caesalpinia echinata*, com diferentes teores de água, incubadas por 60 dias em frascos de vidro com fechamento hermético a 13°C. A: sementes vigorosas; B: sementes vigorosas envelhecidas; C: sementes deterioradas; D: sementes deterioradas envelhecidas.

Nas sementes vigorosas envelhecidas artificialmente, antes da incubação já havia quantidade superior de tecidos deteriorados, quando comparadas com as sementes sem envelhecimento (figura 5A, B). Após 60 dias de incubação, ampliaram-se as áreas com tecidos deteriorados, mas não com tecidos mortos, mesmo nos maiores níveis de hidratação. Isso demonstra que, mesmo estando mais deterioradas, as sementes podem apresentar maior quantidade de tecidos vivos, porém não viáveis. Verifica-se, assim, que o aumento do grau de hidratação, seguido de intensificação da taxa respiratória, favoreceu a redução de tecidos

viáveis (áreas em rosa, figura 5), contribuindo para a diminuição da capacidade germinativa e do vigor das sementes (tabela 5).

O acompanhamento da perda da vitalidade dos tecidos através do teste de tetrazólio e a avaliação da taxa respiratória podem vir a ser uma importante ferramenta para explicar mudanças no comportamento fisiológico de sementes de *C. echinata*, principalmente de alterações nas vias respiratórias e, também, servir para diagnosticar o estágio de deterioração no qual se encontra a semente. Esse teste foi utilizado como ferramenta para avaliar diferentes comportamentos fisiológicos em sementes de *Coffea arabica* L. (Silva *et al.* 2005), *Camellia japonica* L. (Akimoto *et al.* 2004) e *Medicago truncatula* Gaertner. (Faria *et al.* 2006).

Na tabela 5 estão apresentados os valores de sementes viáveis (germináveis e plântulas normais), obtidos no teste de tetrazólio. Este teste permitiu diferenciar os grupos de sementes de *C. echinata* com diferentes níveis de deterioração, com valores muito próximos aos do teste de germinação; também permitiu classificar os embriões como vivos ou mortos, algo que no teste de germinação não é possível. Essa separação mais minuciosa favoreceu a compreensão das mudanças que ocorrem no comportamento fisiológico das sementes, tais como o metabolismo respiratório, a redução do vigor, a queda da germinação e o aumento do processo de deterioração.

Pelas imagens do teste de tetrazólio, apresentadas na figura 6, também foi possível acompanhar a manifestação da deterioração nos tecidos de embriões de *C. echinata* durante a incubação, localizando o desenvolvimento de coloração vermelho intenso (tecido em processo de deterioração) e ausência de cores (tecido morto); conforme dito anteriormente, a distribuição deste mosaico de cores ao longo das regiões essenciais para a germinação (vide capítulo anterior) caracteriza a viabilidade ou a inviabilidade das sementes.

Dessa forma, verificou-se que embriões de sementes vigorosas desenvolveram coloração rósea suave em quase toda sua extensão, diferentemente dos embriões de sementes deterioradas que apresentaram extensas áreas de coloração vermelha intensa, principalmente na região proximal e distal dos cotilédones (figuras 6A, C). As áreas dos embriões mais prejudicadas pelo envelhecimento acelerado situaram-se na região central dos cotilédones (região proximal), com extensas manchas de coloração vermelha intensa (figuras 6B, D).

Com o avanço da deterioração, ocasionada pela intensificação da taxa respiratória, houve aumento no desenvolvimento de coloração vermelha intensa nas regiões meristemáticas e, também, na região proximal. Essa manifestação, identificada já nos primeiros níveis de hidratação, contribuiu para a perda do vigor, reduzindo o desenvolvimento de plântulas normais e a velocidade de germinação após a incubação das sementes (tabela 5).

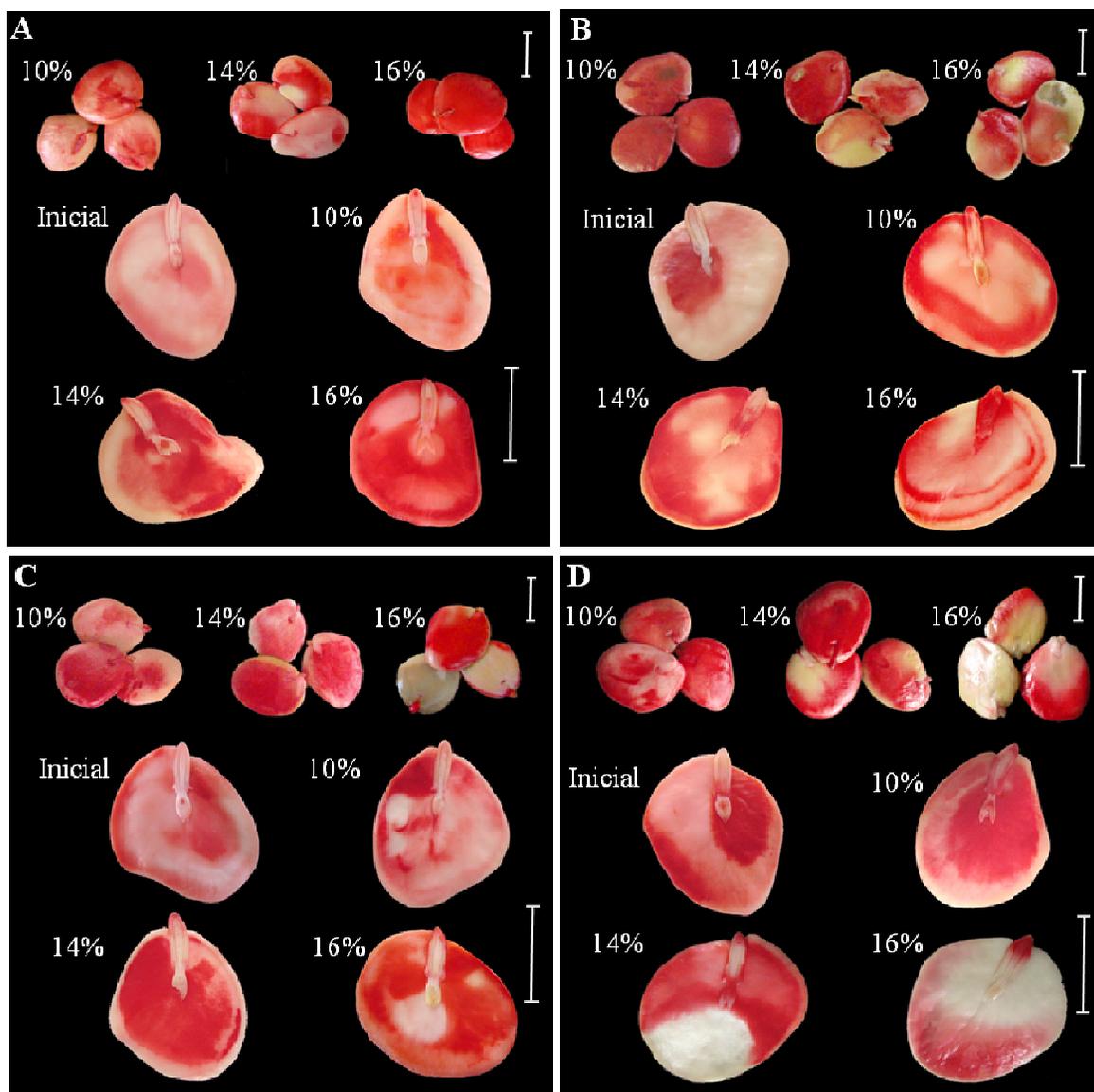


Figura 6. Embriões de *Caesalpinia echinata* Lam., incubados por 60 dias a 13°C, com teores de água de 10%, 14% ou 16%, coloridos pelo teste de tetrazólio. A: embriões de sementes vigorosas; B: de sementes vigorosas envelhecidas; C: de sementes deterioradas; D: de sementes deterioradas envelhecidas. Embriões em escala menor: visão do exterior; em escala maior: visão do interior. Escalas = 1cm.

O teste de tetrazólio permitiu observar, também, que o grau de hidratação durante o armazenamento influenciou mais as sementes de menor qualidade inicial (tabela 4); como exemplo, nota-se que os embriões deteriorados e envelhecidos, hidratados até atingirem 16% de água, apresentaram extensas áreas de tecidos necrosados (figura 6).

Para Delouche (2002) a descoberta e aplicação da reação do tetrazólio foram fundamentais para a compreensão do processo de deterioração nas sementes e sua relação com o vigor e a germinação. De fato, as imagens do tetrazólio permitem inferir que a

deterioração das sementes de *C. echinata* não segue uma rota homogênea. As regiões meristemáticas (provavelmente devido à sua intensa atividade metabólica) e a região proximal (provavelmente devido a sua proximidade às regiões primeiramente hidratadas durante a embebição) mostraram-se mais suscetíveis às transformações degenerativas causadas pela deterioração. Corroborando essa idéia, estudos da seqüência da deterioração em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merr), avaliando a produção de radicais livres (McDonald 1999) e quantificando através do teste de tetrazólio as regiões mais afetadas (Chauhan 1985) verificaram que a deterioração geralmente se inicia nas áreas meristemáticas, e dentre essas áreas as mais afetadas são a radícula e a plúmula.

A deterioração é um processo inevitável: após atingir a maturidade fisiológica, as sementes, caso não germinem, iniciam a deterioração. Contudo, a velocidade desse processo pode ser controlada em função da longevidade natural, da composição química e das diferenças genéticas, aliadas à qualidade inicial, grau de umidade e às condições de armazenamento (Popinigis 1985, Carvalho & Nakagawa 1983, Marcos Filho 2005). O aumento no grau de hidratação em sementes de *C. echinata* favoreceu a deterioração das sementes, bem como a perda da viabilidade e do vigor.

Inicialmente, as sementes não envelhecidas apresentavam 71% e 69% de germinação e 59% e 62% de plântulas normais (respectivamente, vigorosas e deterioradas), enquanto que os grupos de sementes envelhecidas apresentavam, respectivamente, 29% e 20% de germinação, com 24% e 9% de desenvolvimento de plântulas normais (tabela 5). Todos os níveis de hidratação favoreceram a perda do vigor e da viabilidade das sementes após 60 dias de incubação, mas o aumento do nível de hidratação intensificou essa redução (tabela 5). Ao final da incubação, as sementes que não foram hidratadas perderam em torno de 20% de germinação, mas ainda apresentavam produção de plântulas normais (exceto as envelhecidas). Já o aumento do grau de hidratação intensificou linearmente a diminuição da germinação, da velocidade e da produção de plântulas normais (tabela 5). Chave & Usberti (2003) reportaram, também, que o aumento do teor de água durante o armazenamento diminui a longevidade de sementes de *Dimorphandra mollis* Benth.

Analisando-se, conjuntamente, as taxas respiratórias e a viabilidade de sementes com diferentes níveis de hidratação e com diferentes níveis de deterioração, nos dois experimentos desenvolvidos no presente trabalho, algumas considerações merecem ser destacadas. Quando as sementes continham baixo teor de água (6%), ou seja, apenas com água tipo I (< -150 MPa), as sementes apresentaram restrição do metabolismo oxidativo, com baixos níveis de produção de dióxido de carbono; neste nível de hidratação, porém, há diminuição da proteção contra os radicais livres, o que foi constatado pelo elevado consumo de oxigênio. Entre 10% e

22% de água (água tipo II, entre -11 e -150 MPa), o início das atividades oxidativas, com os constituintes celulares suscetíveis a degradação, foi constatado pelas mudanças observadas na velocidade da cinética dos gases, com aumento da taxa respiratória desencadeando aumento de tecidos com aspectos de deteriorados. Acima de 22% de água (água tipo III, entre -4 e -11 MPa), a respiração aeróbica intensificada e o início do metabolismo sem que os sistemas de reparos estejam ativados, conferindo grau de hidratação crítico para o armazenamento, foi observado pela intensificação no consumo de oxigênio e na produção de dióxido de carbono, associados com o aumento de tecidos mortos nos embriões, principalmente nos cotilédones.

Finalmente, diferenças na qualidade inicial das sementes, associadas a mudanças no estado energético da água, favoreceram alterações na taxa respiratória e proporcionaram aumento de tecidos deteriorados e mortos, afetando regiões vitais do embrião e promovendo redução no vigor e na capacidade germinativa das sementes.

### Referências bibliográficas

- Akimoto, T., Cho, S., Yshida, H., Furuta, H. & Esashi, Y.** 2004. Involvement of acetaldehyde in seed deterioration of some recalcitrant woody species through the acceleration of aerobic respiration. *Plant Cell Physiology* 45: 201-210.
- Angyalossy, V., Amano, E. & Alves, E.S.** 2005. Madeiras utilizadas na fabricação de arcos de instrumentos de corda: aspectos anatômicos. *Acta Botanica Brasilica* 19: 819-834.
- Barbedo, C. J., Bilia, D. A. C. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.** 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. *Revista Brasileira de Botânica* 25: 431-439.
- Barbedo, C.J. & Marcos Filho, J.** 1998. Tolerância à dessecação de sementes. *Acta Botanica Brasilica* 12: 145-164.
- Barbedo, C.J., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Moraes, M.H.D., Richter, A.A.** 2008. A semente: desenvolvimento, maturação, armazenamento, sanidade e germinação. *In*: R.C.L. Figueiredo-Ribeiro, C.J. Barbedo, E.S. Alves, M. Domingos, M.R. Braga (eds.). Pau-brasil, da semente a madeira: conhecer para conservar. Instituto de Botânica/SMA, São Paulo, pp. 41-49.
- Benamar, A., Grelet, J., Tallon, C., Teyssier, E., Renard, M., Satour, P., Duval, F., Montrichard, P.R., Richomme, P. & Macherel, D.** 2002. Some observations on seed quality and mitochondrial performance. *In*: G. Nicolás, K.J. Bradford, & H.W. Pritchard (eds.). *The biology of seeds. Recent Research Advances. International workshop on seeds.* Salamanca, Spain. ed. CABI Publishing. Wallingford/Cambridge – USA, pp. 243-249.

- Bewley, J.D. & Black, M.** 1994. Seed physiology of development and germination. 2.ed. Plenum Press, London.
- Bilia, D.A.C., Marcos Filho, J. & Novembre, A.D.L.C.** 1998. Conservação da qualidade fisiológica de sementes de *Inga uruguensis* Hook. & Arn. Revista Brasileira de Sementes 20: 48-54.
- Borges, I.F., Del Giudice Neto, J., Bilia, D.A.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Barbedo, C.J.** 2005. Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. Brazilian Archives of Biology and Technology 48: 851-861.
- Bradford, K.J.** 1995. Water relations in seed germination. *In*: J. Kingel & G. Galili (eds.). Seed development and germination. Marcel Dekker, New York, pp. 351-396.
- Brasil.** 1992. Regras para análises de sementes. Brasília, Ministério da Agricultura.
- Buckeridge, M.S., Tiné, M.A.S., Minhoto, M.J. & Lima, D.U.** 2004. Respiração. *In*: G.K. Kerbauy, (ed.). Fisiologia vegetal. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 198 – 216.
- Caproni, E.** 2007. Eletrólitos sólidos cerâmicos à base de óxido de zircônio para a detecção de oxigênio. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Carneiro, J.G.A. & Aguiar, I.B.** 1993. Armazenamento de sementes. *In*: I.B. Aguiar, F.C.M. Piña-Rodrigues & M.B. Figliolia (eds.). Sementes florestais tropicais. ABRATES, Brasília, pp. 333-350.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J.** 1983. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 3.ed. Campinas Fundação Cargill, 424p.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J.** 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4.ed. Jaboticabal, Funep, 588p.
- Castro, R.D. & Hilhorst, H.W.** 2004. Embebição e reativação do metabolismo. *In*: (A.G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). Germinação do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre, pp.148-162.
- Chauhan, K.P.S.** 1985. The incidence of deterioration and its localisation in aged seeds of soybean and barley. Seed Science & technology 13: 769-773.
- Chaves, M.M.F. & Usberti, R.** 2003. Previsão de longevidade de faveiro (*Dimorphanandra mollis* Benth.). Revista Brasileira de Botânica 26: 557-564.
- Crispim, J.E., Martins, J.C., Pires, J.C., Rosolem, C.A. & Cavariani, C.** 1994. Determinação da taxa de respiração em sementes de soja pelo método da titulação. Pesquisa agropecuária brasileira 29: 1517-1521.

- Dahal, P., Kim, N.S. & Bradford, K.J.** 1996. Respiration and germination rates of tomato seeds at suboptimal temperatures and reduced water potentials. *Journal of Experimental Botany* 47: 941-947.
- Delouche, J.C.** 2002. Germinação, deterioração e vigor da semente. *Seed News* 6: 1-7.
- Faria, J.M.R., Buitink, J., Van Lammeren, A.A.M. & Hilhorst.** 2006. Changes in DNA and microtubules during loss and reestablishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. *Journal of Experimental Botany* 56: 2119-2130.
- Feltre, R.** 1982. Química geral. 2.ed. Moderna. São Paulo 1: 364p.
- Hellmann, M.E., Mello, J.I.O., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Barbedo, C.J.** 2006. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 91-99.
- Ista.** 1985. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology* 13: 356-513.
- Kader, A.A. & Saltveit, M.E.** 2002. Respiration and gas exchange. *In*: J.A. Bartz, J.K. Brecht & J. Weichmann. Postharvest physiology and pathology of vegetables. Marcel Dekker, New York, pp.7-29.
- Labouriau, L.G.** 1983. A germinação das sementes. OEA: Washington, 175p.
- Lima, S.M.P., Guimarães, R.M., Oliveira, J.A. & Vieira, M.G.G.C.** 2004. Efeitos de tempos e temperaturas de condicionamento sobre a qualidade fisiológica de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica*, l.) sob condições ideais e de estresse térmico. *Ciênc. agrotec., Lavras* 28: 505-514.
- Maguire, J.D.** 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2: 176-177.
- Marcos Filho, J.** 1994. Teste de envelhecimento acelerado. *In*: R.D. Vieira & N.M. Carvalho (eds.). Testes de vigor em sementes. Funep, Jaboticabal, pp. 133-149.
- Marcos Filho, J.** 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Fealq, Piracicaba.
- McDonald, M.** 1999. Seed quality assessment. *Seed Science Research* 8: 265-275.
- Mello, J.I.O. & Barbedo, C.J.** 2007. Temperatura, luz e substrato para a germinação de sementes de pau-brasil *Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae-Caesalpinioideae. *Revista Árvore* 31: 645-655.
- Mello, J.I.O.** 2008. Compostos de reserva de sementes e suas relações com diferentes níveis de sensibilidade à dessecação e ao congelamento. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo.
- Popinigis, F.** 1985. Fisiologia de sementes. Brasília, 289p.
- Raujjou, L. Debeaujon, I.** 2008. Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendus Biologies* 331: 796-805.

- Rocha, Y.T.** 2004. Ibirapitanga: História, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) do descobrimento à atualidade. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Santana, D.G. & Ranal, M.A.** 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. Universidade de Brasília, Brasília.
- 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.
- Silva, E.A.A., Toorop, P.E., Nijse, J., Bewley, D. & Hilhorst, H.W.M.** 2002. Exogenous gibberellins inhibit coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination and cause cell death in the embryo. *Journal of Experimental Botany* 56: 1029-1038.
- Smith, M.T., Berjak, P.** 1995. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation sensitive seeds. *In: J. Kingel & G. Galili (eds.). Seed development and germination.* Marcel Dekker, New York, pp.701-746.
- Steil, M.C., Fonseca, F.C., França, Y.V., Rey, J.F.Q., Muccillo, E.N.S. & Muccillo, R.** 2002. Montagem, calibração e testes de um sistema de medidas elétricas em função da temperatura e da pressão parcial de oxigênio. *Cerâmica* 48(307): 146-152.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 1998. *Plant physiology.* 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 793p.
- Vertucci, C.W. & Farrant, J.M.** 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. *In: J. Kigel & G. Galili. (eds.). Seed development and germination.* Marcel Dekker, New York, pp. 237-271.
- Vertucci, C.W. & Leopold, A.C.** 1987. Water Binding in Legume Seeds. *Plant Physiology* 85: 224-231.
- Vertucci, C.W. & Roos, E.E.** 1990. Theoretical basis of protocols for seed storage. *Plant Physiology* 94: 1019-1023.
- Vertucci, C.W.** 1989. The effects of low water contents on physiological activities of seeds. *Physiologia Plantarum* 77: 172-176.
- Villela, F.A. & Peres, W.B.** 2004. Coleta, beneficiamento e armazenamento. *In: A.G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). Germinação do básico ao aplicado.* Artmed, Porto Alegre, pp. 265-281.
- Villela, F.A., Marcos Filho, J.** 1998. Estado energético tipos de água na semente. *Revista Brasileira de Sementes* 20: 317-321.
- Walters, C., Farrant, J.M., Pammenter, N.W. & Berjak, P.** 2002. Desiccation stress and damage. *In: M. Black & H.W. Pritchard (eds.). Desiccation and survival in plants: drying without dying.* CAB Publishing, New York, pp. 263-291.

**CAPÍTULO 3**

**Taxa Respiratória e Viabilidade de Sementes de *Caesalpinia echinata* Lam.  
em Função da Intensidade de Energia Térmica**

**Abstract** (Respiration rate and viability of seeds of *Caesalpinia echinata* at different heat sum). Temperature is one of the most important factors affecting seed respiration and deterioration. The higher the temperature, the shorter is the seed storability. In this work respiration rates were related to the speed of seed deterioration in *Caesalpinia echinata* according to different temperatures. Results showed the possibility of establish a respiration base temperature and the heat sum needed to increase significantly the respiration. This allows better analysis concerning physiological changes occurring during seed deterioration.

**Key words:** Heat sum , thermal time, base temperature, respiration, deterioration

**Resumo:** (Taxa respiratória e viabilidade de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. em função da intensidade de energia térmica). O aumento da temperatura é um dos principais fatores físicos que podem intensificar a respiração e conseqüentemente a deterioração, o que diminuem o tempo de armazenamento. O presente estudo teve como objetivo analisar alterações na taxa respiratória e no estado deterioração de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam., em função de mudança na intensidade de energia térmica transmitida. Os resultados possibilitaram estabelecer a temperatura basal e a energia térmica necessária para um significativo aumento na respiração. Isto permitiu uma melhor análise das respectivas manifestações fisiológicas que ocorrem durante a deterioração.

**Palavras chave:** energia térmica, soma térmica, temperatura basal, respiração, deterioração

## Introdução

Sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) apresentam características de grande interesse à investigação científica por serem tolerantes à dessecação e a temperaturas de congelamento (características de sementes ortodoxas), mas perderem rapidamente a capacidade germinativa quando não mantidas sob condições de baixas temperaturas (características de sementes recalcitrantes ou de comportamento intermediário), conforme observado por Barbedo *et al.* (2002) e por Hellmann *et al.* (2006).

A velocidade de perda da capacidade germinativa durante o armazenamento das sementes está, geralmente, associada à sua qualidade inicial e às condições de armazenamento (Roberts 1973, Carvalho & Nakagawa 2000). No final da maturação das sementes ortodoxas ocorre grande redução do seu metabolismo e paralisação do crescimento, caracterizando a permanência das sementes em estado de criptobiose (Marcos Filho 2005). Nesse estado, todas as trocas de matéria e de energia entre a semente e o exterior se dão em níveis e velocidades caracteristicamente baixos; mesmo mantidas nesse estado, em períodos prolongados as sementes entram em processo de deterioração (Labouriau 1983), cuja duração é determinada, principalmente, pela interação entre a herança genética, a qualidade inicial, o grau de umidade e as condições do ambiente (Popinigis 1977).

A conservação da viabilidade das sementes criptobióticas depende, principalmente, de dois fatores: temperatura e água (Labouriau 1983). Esta última foi estudada, em sementes de pau-brasil, no capítulo anterior. Em relação à temperatura, mudanças na energia térmica das sementes em função do fluxo de calor modificam o estado de agitação das moléculas de água, afetando a natureza e a cinética das reações metabólicas, podendo se tornar críticas para as sementes durante o armazenamento, favorecendo o processo de deterioração (Villela & Marcos Filho 1998).

Todo processo biológico ocorre entre limites de temperatura (temperaturas cardeais) e é desencadeado quando há fornecimento de certa quantidade de calor. O conceito de soma térmica é definido como a soma de calor acima da condição mínima e abaixo da condição máxima de temperatura necessária para o desencadeamento de um processo biológico. Esse conceito foi desenvolvido para superar as inadequações no calendário civil e prever eventos biológicos, sendo um método simples e mais eficiente como medida de tempo biológico para a ocorrência de um processo (Gilmore & Rogers 1958, Garcia-Huidobro *et al.* 1982, Bradford 1995, Dahal *et al.* 1996, Trudgill *et al.* 2005).

O conceito de soma térmica pressupõe a existência de uma temperatura mínima, chamada de basal, na qual não ocorre o processo biológico. Cada grau acima dessa

temperatura basal corresponde à quantidade de calor por dia que uma semente recebe (Gilmore & Rogers 1958, Bradford 1995, Trudgill *et al.* 2005). Cada processo como, por exemplo, a germinação de sementes, possui uma temperatura base que pode apresentar variações intra e interespecífica e, ainda, em função de fatores ambientais (Daws *et al.* 2004), caracterizando gradientes de exigência térmica mínima para a germinação (Garcia-Huidobro *et al.* 1982, Pritchard *et al.* 1995, Dahal *et al.* 1996, Cheng & Bradford 1999, Steinmaus *et al.* 2000, Daws *et al.* 2004, Larsen & Bibby 2005, Patanè *et al.* 2006).

Assim como a germinação, a deterioração também depende da quantidade de calor recebida pelas sementes e sua velocidade é, provavelmente, influenciada pela intensidade de calor recebida acima da temperatura basal.

De acordo com Delouche (2002), a deterioração ocorre de forma gradativa, manifestando nas sementes uma seqüência de eventos de origem bioquímica ou fisiológica, tais como danificação aos sistemas de permeabilidade das membranas, diminuição na atividade respiratória e na produção de ATP, mudanças na atividade de enzimas, redução de tecidos de reserva, queda na velocidade e na capacidade de germinação e redução no desenvolvimento de plântulas normais. Esses eventos provavelmente apresentam diferentes exigências de calor.

A respiração e a deterioração também estão estreitamente relacionadas. Quando armazenadas com respiração ativa, as sementes têm intensificada a sua deterioração, causando perda do vigor e eventuais quedas na germinação (Carvalho & Nakagawa 1983). Mudanças na energia térmica associada ao estado energético da água conduzem as sementes a diferentes níveis de respiração, os quais se tornam críticos ou letais para o armazenamento de sementes (Vertucci & Farrant 1995).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo analisar alterações na taxa respiratória e no estado deterioração de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam., em função de mudança na intensidade de energia térmica transmitida.

### **Material e métodos**

*Material vegetal* - as sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. foram obtidas de frutos maduros (Borges *et al.* 2005) colhidos em dezembro de 2007 na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, em Mogi-Guaçu, SP (22°15-16'S, 47°8-12'W), aproximadamente entre 15 a 20 matrizes. Os frutos foram mantidos ao sol, sobre base de alvenaria, cobertos por sombrite, para abertura espontânea. À medida que as sementes foram liberadas dos frutos, foram armazenadas em câmara fria a 7°C até o início dos experimentos

(Bilia *et al.* 1998, Barbedo *et al.* 2002), não excedendo 14 dias.

*Determinações físicas e fisiológicas* - As sementes foram caracterizadas, inicialmente, quanto ao teor de água, conteúdo de massa seca, potencial hídrico (apenas dos embriões), germinação e vigor, estes dois últimos pelos testes de germinação e de tetrazólio, conforme descrito no capítulo 2 e, ainda, pelo teste de condutividade elétrica da solução de embebição das sementes (condutividade de massa).

A condutividade elétrica foi determinada por meio de condutivímetro digital de bancada MA150 (Marconi, Piracicaba). Para tanto, amostras de sementes foram acondicionadas em copos plásticos descartáveis de 300mL, contendo 75mL de água deionizada, incubados por 12 horas em câmara tipo BOD ajustada para temperatura constante de 20°C, sem luz. Simultaneamente à introdução das sementes nas embalagens, amostras foram tomadas para determinação das massas fresca e seca totais. O resultado obtido, em  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , foi dividido pela massa seca da amostra (g), fornecendo a condutividade por unidade de massa seca, em  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  (Barbedo & Cícero 1998).

*Acondicionamento das sementes* – amostras de sementes foram acondicionadas em embalagens de vidro de 600mL, hermeticamente fechados, com tampas perfuradas, formando orifícios que foram recobertos por um septo de borracha; por este septo foram inseridos os eletrodos do equipamento por onde foi tomada a amostra do ar da embalagem. As determinações das quantidades de  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$  nas embalagens seguiram os mesmos procedimentos descritos no capítulo 2. Contudo, diferentemente do realizado no capítulo anterior, no qual as temperaturas de acondicionamento para sementes com diferentes teores de água foram constantes, neste capítulo foram utilizadas diferentes temperaturas, estas constituindo os tratamentos, conforme descrito a seguir.

*Taxas respiratórias e viabilidade de sementes em relação à intensidade de energia térmica e à temperatura basal* - sementes colhidas em 2007, diretamente de frutos pré-deiscentes (Borges *et al.* 2005), foram consideradas vigorosas enquanto que as coletadas no solo, não excedendo 24 horas da dispersão, foram consideradas deterioradas. As sementes desses dois níveis de vigor foram analisadas quanto a teor de água, potencial hídrico, conteúdo de massa seca, germinação e vigor, conforme descrito anteriormente.

Após avaliação inicial do teor de água, amostras de sementes foram hidratadas até que atingissem 16% de água, seguindo-se os mesmos procedimentos descritos no capítulo 2. Este nível de hidratação baseou-se na descrição de Carvalho & Nakagawa (1983), como sendo de respiração ativa e na de Vertucci & Farrant (1995), como sendo o correspondente ao início de atividades oxidativas. Imediatamente após atingido esse nível, as sementes foram acondicionadas nas embalagens herméticas (vide capítulo 2) e incubadas a 3, 7, 10, 13, 16, 19

e 22°C. Além das avaliações de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, ao final de 40 dias as sementes foram submetidas aos testes de germinação, tetrazólio e condutividade elétrica, bem como avaliadas quanto a teor de água, potencial hídrico e conteúdo de massa seca.

Com os valores de produção de dióxido de carbono foram ajustadas regressões lineares para se estabelecer a temperatura basal para a respiração das sementes, caracterizada pela intersecção da regressão com a abscissa. Uma vez estabelecida, a temperatura basal passou a ser o referencial de início da atividade respiratória para as sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. Assim, subtraindo-se o valor da temperatura de incubação pela temperatura basal foi possível quantificar o total de energia térmica transmitida constantemente, expresso em graus (°C), que as sementes receberam durante 40 dias de incubação: Energia térmica transmitida (°C) = (T<sub>i</sub> - T<sub>b</sub>), onde:

T<sub>i</sub> = temperatura de incubação (°C);

T<sub>b</sub> = temperatura basal (°C).

Esse procedimento permitiu criar curvas de estreitamento da relação entre o consumo de oxigênio e o ganho energético oriundo da elevação da temperatura. Para tanto os valores de consumo de oxigênio foram divididos pela quantidade de energia térmica transmitida constantemente as sementes (μmolO<sub>2</sub>.°C<sup>-1</sup>).

Embora as unidades de medida de calor sejam *caloria* (cal) ou *joule* (J), no presente estudo foi utilizada a unidade graus-dia (°C.d) para representar o total de calor emitido e graus Celsius (°C) para representar a intensidade de energia térmica transmitida constantemente às sementes.

*Taxas respiratórias e viabilidade de sementes com diferentes níveis de deterioração em função de mudanças na intensidade de energia térmica* - visando a comparar a taxa respiratória entre diferentes níveis de deterioração de sementes em relação à intensidade de energia térmica, concomitante ao estudo anterior, amostras de sementes vigorosas e deterioradas foram envelhecidas artificialmente por 12 horas, segundo a metodologia descrita no capítulo 2. Após este período foram deixadas em ambiente até que atingissem o peso inicial. Em seguida, foram submetidas à hidratação até que atingissem 16% de água e acondicionadas em frascos de vidro com fechamento hermético, sendo incubadas a 7, 16 e 22°C durante 40 dias. As sementes foram, então, analisadas quanto ao teor de água, potencial hídrico, conteúdo de massa seca, germinação, teste de tetrazólio e condutividade elétrica.

*Soma térmica para manifestações fisiológicas durante a deterioração* - para a determinação da soma térmica para processos fisiológicos durante a deterioração, tais como alterações nas taxas respiratórias, modificações na permeabilidade das membranas (condutividade elétrica), redução na vitalidade dos tecidos (tetrazólio) e queda na germinação e na produção de

plântulas normais, primeiramente foi determinada a soma de calor que cada temperatura de incubação forneceu durante 40 dias, adaptando-se os modelos de Garcia-Huidobro *et al.* (1982) e Daws *et al.* (2004):  $\theta_c = (T_i - T_b)/d$ , onde:

$\theta_c$  = soma de calor (°C.d);

$T_i$  = temperatura de incubação (°C);

$T_b$  = temperatura basal (°C).

$d$  = tempo (dias)

Em seguida os valores de consumo de oxigênio, produção de dióxido de carbono, condutividade elétrica, total de tecidos viáveis analisados pelo tetrazólio, plântulas normais e germinação foram plotados com a respectiva soma de calor.

*Delineamento experimental e procedimento estatístico* - O delineamento experimental para todos os experimentos foi inteiramente casualizado, com 3 repetições. Os dados obtidos para teor de água, conteúdo de massa seca, potencial hídrico, germinação, desenvolvimento de plântulas normais, teste de tetrazólio e de condutividade elétrica, além do consumo de O<sub>2</sub> e da produção de CO<sub>2</sub> foram submetidos à análise de variância (teste F), ao nível de 5% de probabilidade. Quando pertinente, as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, também ao nível de 5% e, quando necessária a correção da normalidade e da heterogeneidade, os valores foram transformados para  $\text{arc sen } (\%)^{0,5}$  (Santana & Ranal 2004).

## Resultados e Discussão

*Taxas respiratórias e viabilidade de sementes em relação à intensidade de energia térmica e à temperatura basal* - A análise de variância para teor de água, potencial hídrico e massa seca para as sementes vigorosas e deterioradas de *Caesalpinia echinata* incubadas nas diferentes temperaturas apresentou interação significativa apenas para os dados de potencial hídrico e diferenças significativas para o teor de água entre temperaturas de incubação (tabela 1). Já a variável massa seca apresentou diferença significativa entre os níveis de deterioração, sendo ligeiramente maior para as sementes deterioradas (0,317) em relação as vigorosas (0,283).

As sementes acondicionadas em diferentes temperaturas apresentavam, inicialmente, o mesmo nível de hidratação (16% de água). Ao final de 40 dias, observaram-se pequenas reduções no teor de água e alterações no potencial hídrico (tabela 1), contudo aparentemente sem relação com as mudanças na temperatura. À medida que se eleva a temperatura do ar aumenta-se sua capacidade de contenção de água (Marcos Filho 2005), o que poderia resultar em contínua redução no potencial hídrico das sementes; contudo, os resultados não se modificaram com tendência evidente de aumento ou redução, prevalecendo a água tipo II para

todas as temperaturas, na qual há início de metabolismo oxidativo, com os constituintes celulares suscetíveis à degradação (Vertucci & Farrant 1995).

Tabela 1. Teor de água (% base úmida) e potencial hídrico (-MPa) de sementes vigorosas e deterioradas de *Caesalpinia echinata* Lam., incubadas 40 dias com 16% de água, em sete temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas nas colunas, maiúsculas nas linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Temperaturas (°C)	Teor de água	Potencial hídrico	
		Vigorosas	Deterioradas
3	13,6 bc	45,49 cdA	40,46 cdB
7	13,0 cd	48,45 bA	39,60 dB
10	15,0 a	37,27 eA	34,76 eB
13	14,2 abc	46,58 bcA	39,28 dB
16	14,3 ab	31,49 fB	42,69 bcA
19	14,1 abc	43,81 dA	43,69 bA
22	12,1 d	54,87 aA	56,47 aA
CV (%)	4,78	2,46	

As variações na taxa respiratória com as modificações na temperatura foram semelhantes para sementes vigorosas e deterioradas. À medida que se aumentou a temperatura, houve correspondente aumento, linear, tanto para o consumo de oxigênio quanto para a produção de dióxido de carbono (figuras 1A, C), porém mais intenso para o primeiro. O elevado consumo de O<sub>2</sub>, sem equivalente liberação de CO<sub>2</sub>, pode significar a presença de outras reações que não a respiração, tais como a peroxidação de lipídeos e a oxidação de compostos fenólicos presentes no tegumento. Outro fato possível seria o uso de ácidos graxos saturados e insaturados como substrato inicial para a respiração das sementes, necessitando maiores quantidades de oxigênio. Sementes de *C. echinata* apresentam teores elevados desses compostos (Mello 2008).

As menores diferenças entre consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono nas menores temperaturas podem, por sua vez, ser resultado da maior dificuldade de difusão do oxigênio (Buckeridge *et al.* 2004).

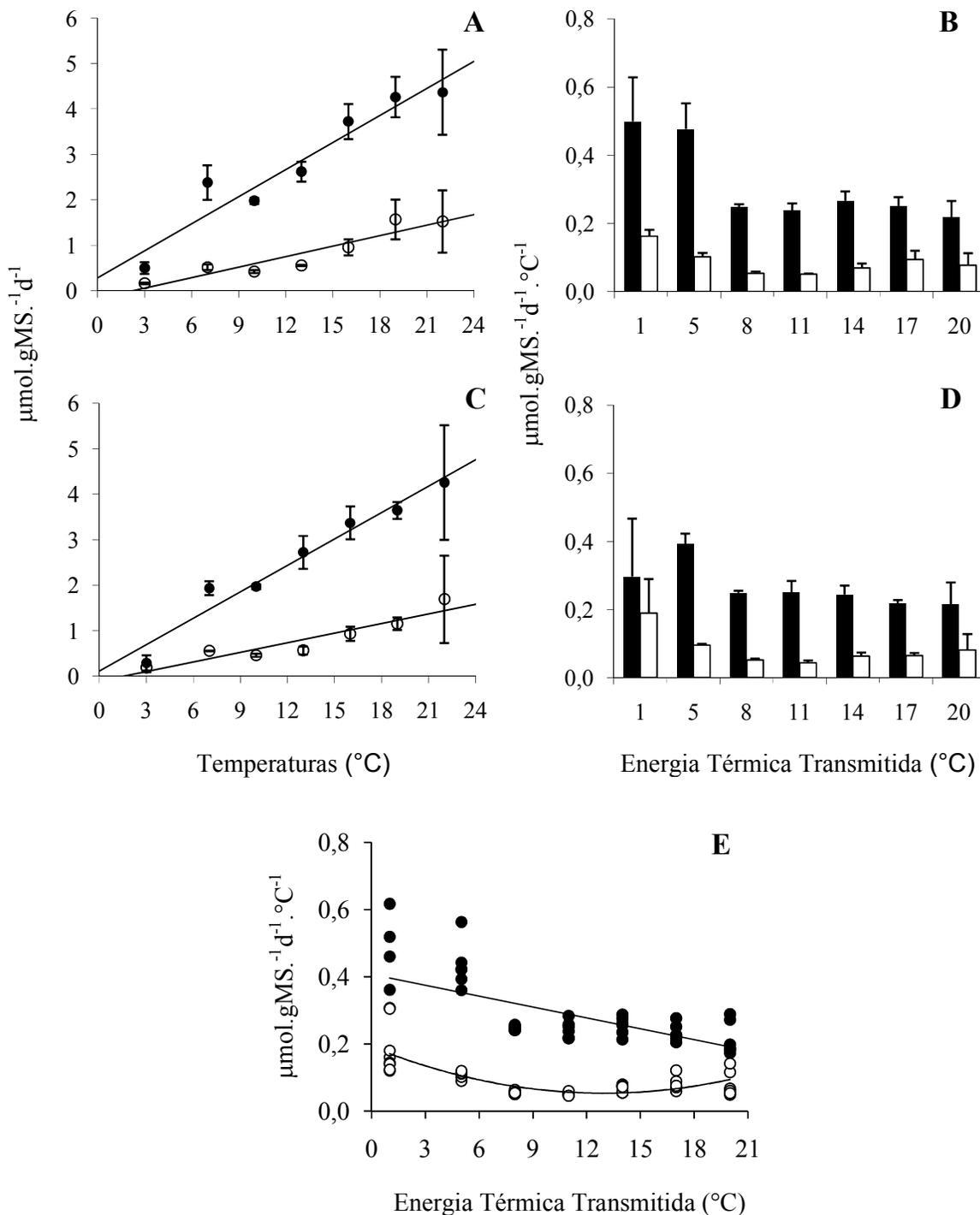


Figura 1. Taxa respiratória de sementes vigorosas (A e B) e deterioradas (C e D) de *Caesalpinia echinata* Lam., incubadas por 40 dias, com 16% de água em sete temperaturas (A e C), correspondendo à transmissão de diferentes intensidades de energia térmica (B e D). Círculos fechados e barras em preto: consumo de  $\text{O}_2$  ( $Y_A = 0,283+0,198X$ ,  $R^2 = 0,915$ ;  $Y_C = 0,108+0,193X$ ,  $R^2 = 0,957$ ); círculos abertos e barras em branco: produção de  $\text{CO}_2$  ( $Y_A = -0,174+0,0771X$ ,  $R^2 = 0,875$ ;  $Y_C = -0,116+0,07X$ ,  $R^2 = 0,877$ ). E: regressões obtidas para  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$  em função do ganho energético diário, para sementes vigorosas e deterioradas ( $Y_{\text{oxigênio}} = 0,4059-0,107X$ ,  $R^2 = 0,40$ ;  $Y_{\text{dióxido de carbono}} = 0,189-0,0211X+0,00082X^2$ ,  $R^2 = 0,61$ ).

A temperatura é fator de grande influência na respiração. Em linhas gerais, um tecido vegetal responde a mudanças na temperatura da seguinte forma: abaixo de 5°C, há uma diminuição drástica na taxa respiratória, devido à redução das atividades enzimáticas e mitocondrial, além da dificuldade de difusão do oxigênio (Kader & Saltveit 2002, Buckeridge *et al.* 2004), fatos que podem explicar a baixa taxa respiratória das sementes de *C. echinata* a 3°C; entre 5 e 30°C, um aumento de 10°C na temperatura corresponde a praticamente o dobro da taxa respiratória, devido ao favorecimento da atividade enzimática e da difusão do oxigênio (Taiz & Zeiger 1998, Buckeridge *et al.* 2004), o que foi observado para as sementes de *C. echinata* quando se analisou a taxa respiratória entre 3°C e 22°C. Acima de 35°C os tecidos vegetais apresentam diminuição da eficiência respiratória, em função de danos aos sistemas de membranas e desnaturação de enzimas (Taiz & Zeiger 1998), alterações semelhantes que também foram observadas com as sementes de *C. echinata* no capítulo anterior.

Todo processo biológico necessita de determinada quantidade de energia, ocorrendo entre temperaturas cardeais máxima e mínima. Esta última também pode ser chamada de temperatura basal (Trudgill *et al.* 2005). Através da regressão linear, com os valores de produção de dióxido de carbono foi possível estimar a temperatura basal para a respiração de sementes de *C. echinata*, ou seja, o encontro da regressão com a abscissa (próximo a 2°C, figuras 1A, C). Essa temperatura basal representa a temperatura abaixo da qual as sementes não apresentam mais atividade respiratória. Para este estudo foi considerada apenas a produção de dióxido de carbono pois o consumo de oxigênio indicou a existência de processos outros que não a respiração, conforme discutido anteriormente.

O uso da temperatura basal, substituindo a escala centígrada (que se baseia no estado de agitação das moléculas de água), visa a mudar o referencial energético de processos físicos para metabólicos que envolvem uma complexidade de sistemas e exigências de calor (Ramalho Junior 1984, Trudgill *et al.* 2005). Uma vez estabelecida à temperatura basal, esta passou a ser adotada como referencial, ou seja, o “zero” para ocorrência do processo respiratório. Dessa forma foi possível monitorar a intensidade de energia térmica transmitida constantemente, durante a incubação das sementes nas diferentes temperaturas. A escala centígrada como unidade de medida para quantificar a soma de calor foi também utilizada por Daws *et al.* (2004) no estudo de maturação e desenvolvimento de sementes de *Aesculus hippocastanum* L.

Processos biológicos apresentam distintas exigências de calor e, conseqüentemente, diferenças na temperatura basal, mesmo se tratando do mesmo material vegetal. Sementes de *C. echinata*, por exemplo, cuja temperatura basal para a respiração foi 2°C (figuras 1A, C),

apresentam temperatura basal para germinação em torno de 10°C (Mello & Barbedo 2007). Essas exigências distintas também foram verificadas por Dahal *et al.* (1996) em sementes de *Lycopersicon esculentum* Mill.

As figuras 1B e D representam o consumo de oxigênio e a produção de dióxido de carbono em função da energia térmica transmitida oriunda da elevação da temperatura, ou seja, a taxa de respiração de sementes de *C. echinata* em relação à intensidade de energia térmica transmitida. Analisando o consumo de oxigênio verificou-se que a taxa de respiração de sementes que receberam energia térmica entre 8 e 20°C é diretamente proporcional a esse ganho de calor. Contudo, com energia térmica inferior a 8°C há proporcionalmente maior consumo de oxigênio, demonstrando que a variação da taxa de respiração é irregular, ou seja, não ocorre proporcionalmente à redução da energia térmica. Esse comportamento repetiu-se para as variações de liberação de dióxido de carbono, embora em intensidades inferiores às de consumo de oxigênio (figuras 1B, D).

Esses resultados apresentam novas perspectivas para a conservação de sementes durante o armazenamento. Conforme discutido anteriormente a taxa de respiração condiciona a capacidade de armazenamento das sementes. Considerando-se que, para as sementes do presente estudo, não se verificou redução uniforme da eficiência de uso do O<sub>2</sub> com a redução da temperatura, a redução contínua da temperatura poderia levar a uma condição metabolicamente desfavorável à conservação dessas sementes.

Patanè *et al.* (2006) verificaram que, durante a germinação, as sementes de *Sorghum bicolor* (L.) Moench que receberam menor quantidade de calor levaram mais tempo para germinar e, com isso, acumularam maior quantidade de dióxido de carbono, como consequência de maior gasto de energia para atingir a germinação.

A análise de variância dos dados de germinação, de plântulas normais, de IVG e de condutividade elétrica revelou não haver interação entre nível de deterioração de lote e temperatura de incubação das sementes. Além disso, para os valores de germinação e condutividade elétrica houve diferenças significativas para temperatura e nível de deterioração e para plântulas normais e IVG houve diferenças apenas para o fator temperatura (tabela 2).

O fato de haver diferença significativa entre os níveis de deterioração para a variável germinação e não para plântulas normais demonstrou que as sementes classificadas como vigorosas já apresentavam baixo vigor, mas apresentavam maior vigor que as classificadas como deterioradas. Após 40 dias de incubação, verificou-se que o aumento da energia térmica do sistema favoreceu o avanço da deterioração até o seu último evento, ou seja, a perda da capacidade germinativa. Logo a 7°C verificou-se que a capacidade e a velocidade de

germinação foram reduzidas e que um aumento de 5°C na energia térmica acima da temperatura basal (figuras 1A, C) foi o suficiente para afetar o vigor e a germinação das sementes (tabela 2).

Tabela 2. Germinação (G, %), desenvolvimento de plântulas normais (PN, %), índice de velocidade de germinação (IVG) e condutividade elétrica da solução de embebição (CE,  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de sementes vigorosas e deterioradas de *Caesalpinia echinata* Lam., incubadas 40 dias com 16% de água, em sete temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, maiúsculas dentro de linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Temperaturas (°C)	G	PN	IVG	CE
3	58 a	33 a	3,72 a	194 c
7	32 b	19 ab	1,92 b	211 bc
10	25 bc	15 ab	1,55 bc	247 abc
13	15 bcd	9 b	0,84 bc	220 bc
16	13 bcd	9 b	0,65 bc	221 bc
19	4 cd	3 b	0,45 c	257 ab
22	1 d	1 b	0,11 c	293 a
CV (%)	56,54	79,25	60,45	13,21
	Germinação		Condutividade elétrica	
	Vigorosas	Deterioradas	Vigorosas	Deterioradas
	26 A	17 B	224 B	244 A

O teste de condutividade elétrica revelou tendência de diminuição na permeabilidade das membranas (tabela 2). À medida que a deterioração avança as membranas vão perdendo a permeabilidade seletiva e, durante a embebição, as sementes lixiviam maiores quantidades de solutos, tais como açúcar, aminoácidos e ácidos nucléicos (Smith & Berjak 1995, McDonald 1999). A perda da permeabilidade seletiva dos sistemas de membranas figura entre os primeiros eventos da deterioração de sementes e tem fortes relações com o aumento na intensidade respiratória dos tecidos. Tal fato foi possível de observar através do teste de tetrazólio, com o desenvolvimento de coloração vermelha intensa em tecidos deteriorados. Com a danificação aos sistemas de membranas diminui a permeabilidade seletiva, aumentando a difusão da solução de tetrazólio nos tecidos vivos, favorecendo a reação do sal de tetrazólio com as enzimas desidrogenases, conseqüentemente desenvolvendo coloração vermelha intensa (França Neto *et al.* 1998).

Através das imagens do teste de tetrazólio apresentados na figura 2 foi possível verificar como o aumento da temperatura favoreceu a deterioração dos tecidos. As figuras 2A e B apresentam as imagens do teste de tetrazólio de embriões de *Caesalpinia echinata*. As sementes que receberam menor quantidade de calor durante a incubação, ao final de 40 dias apresentavam extensas áreas de tecidos com aspecto de viáveis (coloração rósea suave). À medida que aumentou a temperatura, aumentaram também regiões com tecidos deteriorados (vermelha intensa). Um aumento de 5°C foi o suficiente para afetar regiões essenciais para a manutenção da viabilidade das sementes, como as regiões meristemáticas (plúmula, radícula e o procâmbio) e também a região proximal (vide capítulo 1). Já nas temperaturas mais elevadas a deterioração progrediu e favoreceu o desenvolvimento de coloração vermelha intensa em quase toda a extensão dos embriões (figuras 2A, B).

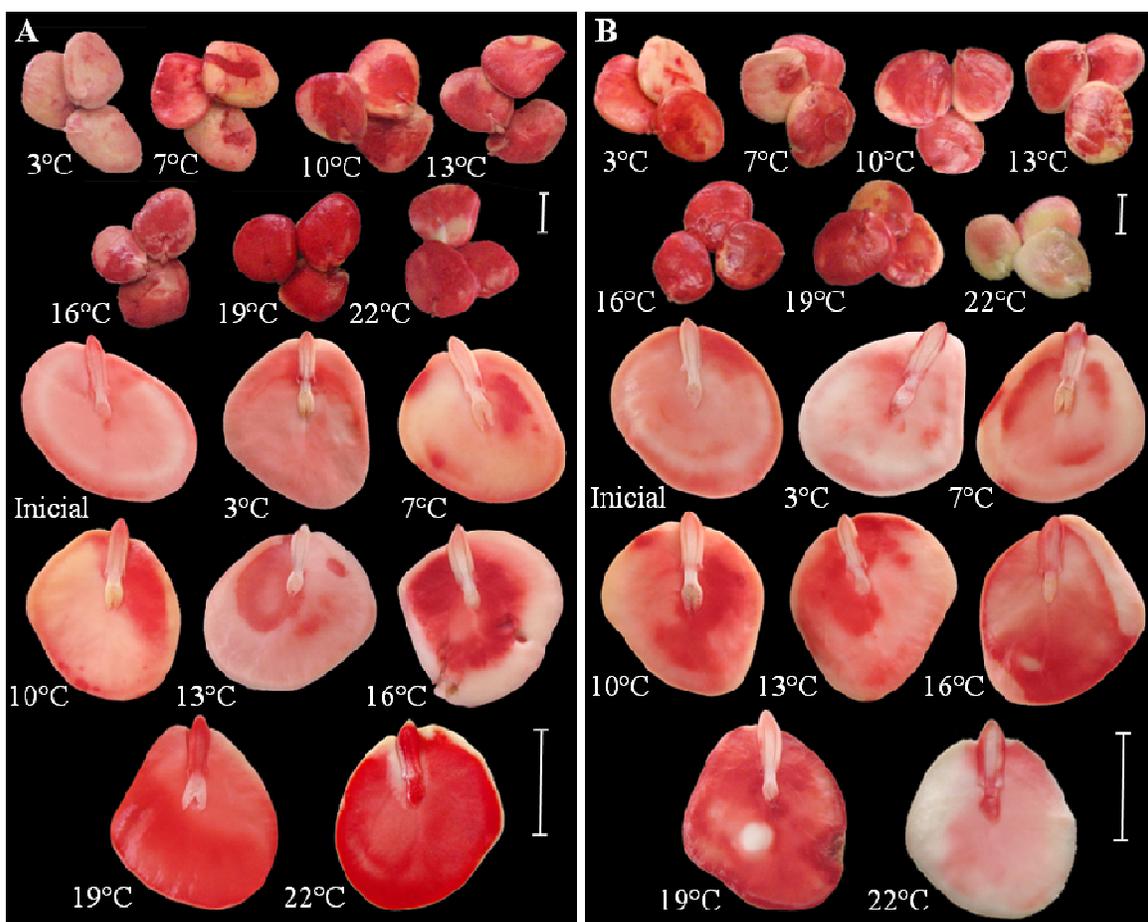


Figura 2. Embriões de *Caesalpinia echinata*, incubados por 40 dias em diferentes temperaturas, com 16% de água, coloridos pelo teste de tetrazólio. A: embriões de sementes vigorosas; B: de sementes deterioradas. Embriões em escala menor: visão do exterior; em escala maior: visão do interior. Escalas = 1cm.

Através da reação do sal de tetrazólio com a atividade das enzimas desidrogenases verificou-se que o aumento da energia térmica teve um efeito semelhante no processo de deterioração, porém com diferentes intensidades para sementes vigorosas e deterioradas (figuras 2A, B).

A distribuição da frequência da perda de vitalidade dos tecidos, entre os dois níveis de deterioração (figuras 3A, B) permitiu a quantificação do total de tecidos viáveis, deteriorados e mortos e favoreceu o acompanhamento da evolução da deterioração de sementes de *C. echinata* em relação ao aumento da energia térmica transmitida. À medida que se aumentou a temperatura durante a incubação diminuiu-se o total de tecidos vivos (viáveis e deteriorados) e aumentou-se o total de tecidos mortos. Essas perdas na vitalidade dos tecidos provavelmente conduziram à redução no vigor e a quedas na capacidade germinativa das sementes de *C. echinata*.

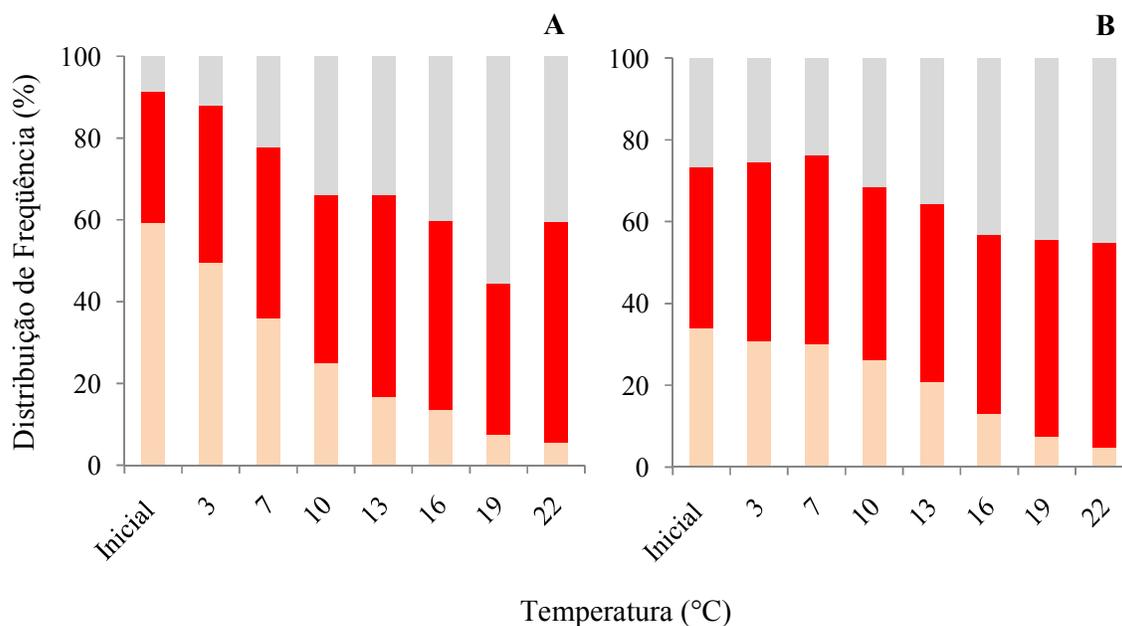


Figura 3. Distribuição das frequências de tecidos viáveis (rosa), deteriorados (vermelho) e mortos (cinza), obtidos do teste de tetrazólio, de sementes de diferentes níveis de deterioração, de *Caesalpinia echinata* Lam., incubadas com 16% de água em sete temperaturas, durante 40 dias. (A) sementes vigorosas, (B) sementes deterioradas.

A perda da capacidade germinativa de sementes de *C. echinata* e a diferença na qualidade fisiológica entre os níveis de deterioração puderam ser estimadas previamente ao teste de germinação através do teste de tetrazólio (tabela 3).

Tabela 3. Viabilidade de sementes vigorosas e deterioradas de *Caesalpinia echinata* Lam., pelo teste de tetrazólio (viáveis, germináveis e não germináveis, em %), após incubação com 16% de água em sete temperaturas, durante 40 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, maiúsculas dentro de linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Temperaturas (°C)	Viáveis	Germináveis		Não germináveis	
		Vigorosas	Deterioradas	Vigorosas	Deterioradas
3	55 a	27 aA	11 aB	33 dB	58 cA
7	40 ab	18 abA	9 abB	60 cA	60 cA
10	34 bc	11 bcA	11 aA	69 bcA	67 bcA
13	23 cd	5 cdA	2 abA	82 abA	71 bcA
16	17 de	0 dA	2 abA	82 abA	84 abA
19	7 ef	2 cdA	0 bA	91 aA	95 aA
22	0 f	0 dA	0 bA	100 aA	100 aA
CV (%)	33,07	55,97		9,43	

Pelas imagens do tetrazólio (figuras 2A, B) foi possível verificar que a integridade de regiões meristemáticas e vasculares essenciais para a germinação foram afetadas em função de alterações na taxa respiratória, oriundas de mudanças na intensidade de energia térmica, traduzindo, desta forma, o avanço da deterioração. Danos a essas regiões acarretaram manifestações fisiológicas de deterioração, como perda na capacidade de produzir plântulas normais, redução na velocidade de germinação, culminando com os últimos eventos da deterioração: a perda da capacidade de germinação e a morte das sementes.

*Taxas respiratórias e viabilidade de sementes com diferentes níveis de deterioração em função de mudanças na intensidade de energia térmica* - Os valores de teor de água para as sementes de *Caesalpinia echinata* envelhecidas artificialmente apresentaram diferenças significativas entre as temperaturas de incubação após 40 dias de armazenamento (tabela 4); já entre os dados de potencial hídrico houve interação significativa para os níveis de deterioração e temperatura de incubação.

O teor de água, assim como o potencial hídrico, pouco se modificou após o período de incubação em embalagens herméticas mas, como ocorreu anteriormente nas sementes não envelhecidas (tabela 1), as temperaturas mais elevadas contribuíram para a evaporação da água e conseqüente mudança no seu estado energético.

Tabela 4. Teor de água (% base úmida) e potencial hídrico (-MPa) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam., vigorosas e deterioradas envelhecidas (VE: vigorosas envelhecidas e DE: deterioradas envelhecidas), incubadas com 16% de água em três temperaturas, durante 40 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, maiúsculas dentro de linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Temperaturas (°C)	Teor de água	Potencial hídrico	
		VE	DE
7	15,9 a	29,34 bA	25,76 bB
16	15,7 ab	29,61 bA	29,59 bB
22	15,4 b	34,10 aA	29,41 aB
CV (%)	2,18	1,36	

A variação na cinética dos gases para as sementes envelhecidas está apresentada nas figuras 4A, C. À medida que se elevou a temperatura intensificou-se a taxa respiratória das sementes. A 22°C o consumo de oxigênio foi cerca de 2 vezes maior do que a produção de dióxido de carbono, mas a 7°C a produção de dióxido de carbono foi maior do que o consumo de oxigênio para ambas sementes (figuras 4A, C). A relação entre o consumo de oxigênio e o ganho energético oriundo da elevação da temperatura, ao contrário das sementes não envelhecidas (figuras 1B, D), foi maior quando aumentou a intensidade de energia térmica transmitida (figuras 4B, D). Esse comportamento provavelmente ocorreu em função do aumento de processos oxidativos, devido ao avanço da deterioração.

A análise de variância dos dados do quociente respiratório apresentou interação significativa para nível de deterioração e temperatura; a 7°C o valor foi superior a 1,0, diferindo dos demais, e os valores das deterioradas foram maiores do que o das vigorosas (figura 4E). Portanto, as sementes de *C. echinata* envelhecidas e incubadas a 7°C podem ter apresentando menor eficiência no consumo de oxigênio e aumento na produção de dióxido de carbono, sugerindo que as sementes estejam realizando respiração anaeróbica. Como as sementes foram envelhecidas artificialmente, suas mitocôndrias – principal elemento para a ocorrência de respiração aeróbica – estariam com sua integridade e atividade danificadas; como o primeiro evento do processo de deterioração é a danificação dos sistemas de membranas, as mitocôndrias, por serem organelas com inúmeras membranas, estão mais suscetíveis a este processo (Smith & Berjak 1995, McDonald 1999, Marcos Filho 2005).

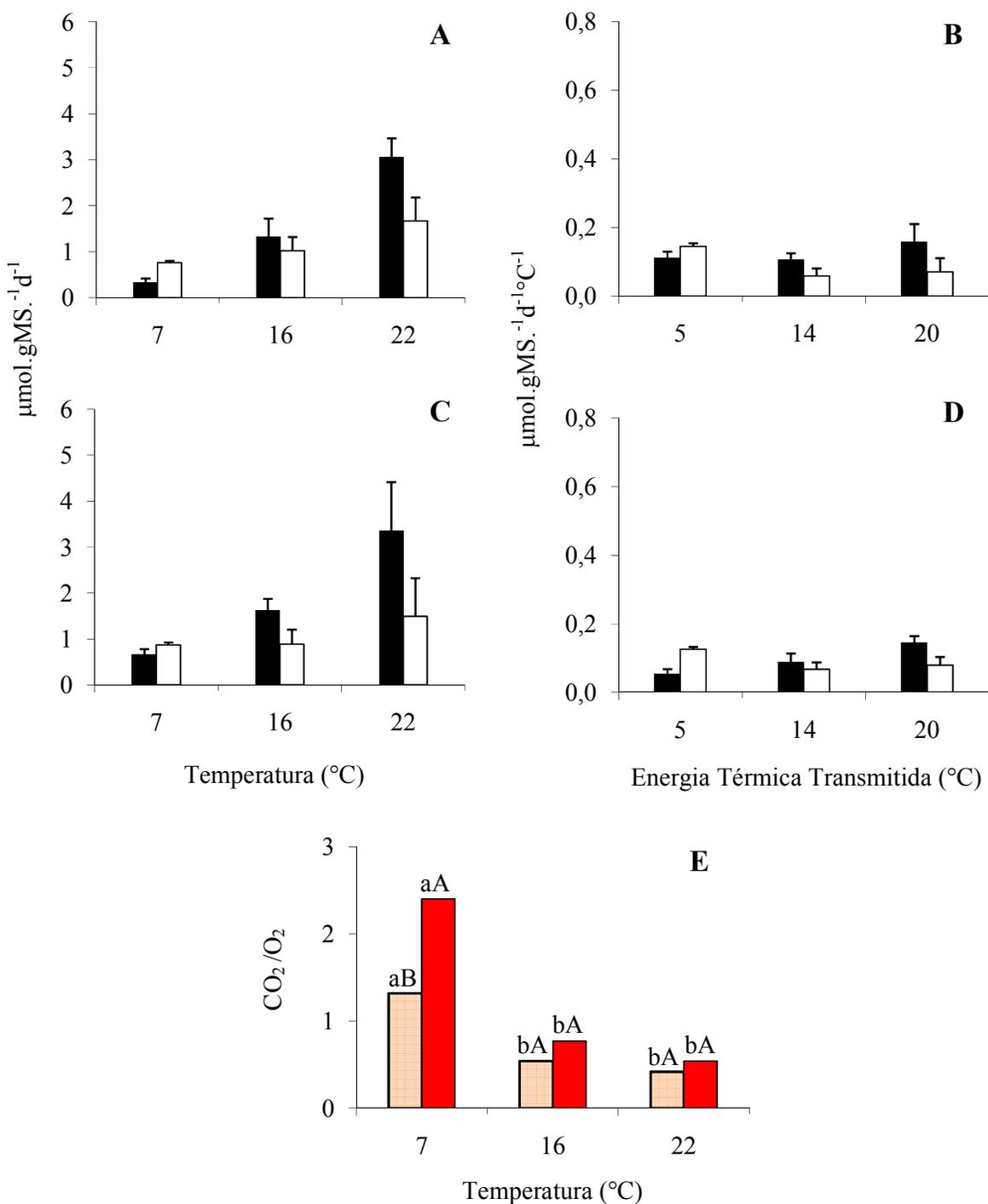


Figura 4. Taxa respiratória de sementes vigorosas envelhecidas (A e B) e deterioradas envelhecidas (C e D) de *Caesalpinia echinata* Lam., incubadas por 40 dias, com 16% de água em três temperaturas (A e C), correspondendo à transmissão de diferentes intensidades de energia térmica (B e D). Barras em preto: consumo de oxigênio e barras em branco: produção de dióxido de carbono. E: quociente respiratório  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  ( $\mu\text{mol gMS}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) barras em rosa: sementes vigorosas envelhecidas e barras em vermelhas: sementes deterioradas envelhecidas. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, maiúsculas dentro de linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Somado à perda de atividade e integridade das mitocôndrias, outro fato que pode explicar a maior produção de dióxido de carbono em relação ao consumo de oxigênio pelas sementes envelhecidas seria a incubação em baixas temperaturas.

A temperatura, assim como a pressão e o volume, é uma variável de estado de um gás. O oxigênio tem diminuição na energia cinética de suas moléculas com a redução da temperatura, diminuindo conseqüentemente a sua velocidade de difusão (Feltre 1982, Ramalho Junior 1984). Na ausência deste elemento, a respiração celular poderia passar das vias oxidativas para as vias fermentativas (Kader & Saltveit 2002, Buckeridge *et al.* 2004).

Comparando-se a quantidade de dióxido de carbono produzida pelas sementes não envelhecidas (figuras 1A, C) e envelhecidas (figuras 4A, C) foi possível observar que as sementes envelhecidas e deterioradas produziram maiores quantidades deste gás do que as vigorosas. Comportamento semelhante foi verificado por Crispim *et al.* (1994) constatando que sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merr) mais deterioradas apresentam maior produção de dióxido de carbono do que as sementes mais vigorosas.

À medida que as sementes deterioram, a respiração se torna gradativamente menos intensa e tem como conseqüência final o colapso metabólico da semente. As alterações respiratórias durante a deterioração determinam o declínio da tomada e consumo de oxigênio pelos tecidos embrionários e de reserva e aumento na produção de dióxido de carbono (Marcos Filho 2005).

Mudanças na energia térmica durante o armazenamento podem condicionar as sementes a diferentes níveis de respiração e deterioração, tanto pela intensificação quanto pela redução do metabolismo; no primeiro, acelera o consumo, determinando uma redução acentuada na disponibilidade de reservas e o metabolismo desordenado, com liberação e atividade de radicais livres (Barbedo & Marcos Filho 1998); no segundo, diminuem a respiração e a proteção contra os radicais livres (Vertucci & Farrant 1995, Marcos Filho 2005).

O aumento da temperatura teve grande influência na intensidade de deterioração das sementes de *C. echinata* envelhecidas. Os dados de condutividade elétrica e germinação apresentaram interação significativa entre os níveis de deterioração e temperatura de incubação (tabela 5).

Mudanças na condutividade elétrica e queda na germinação são resultados do avanço gradativo da deterioração manifestado em alterações bioquímicas e fisiológicas, manifestações estas que estão de acordo com a seqüência de eventos que ocorrem na deterioração, segundo Delouche (2002).

Tabela 5. Germinação (%) e condutividade elétrica ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam., vigorosas e deterioradas, envelhecidas artificialmente (VE: vigorosas envelhecidas; DE: deterioradas envelhecidas), após incubação com 16% de água em três temperaturas, durante 40 dias. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, maiúsculas dentro de linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Temperaturas (°C)	Germinação		Condutividade elétrica	
	VE	DE	VE	DE
7	0 aB	7 aA	258 aA	230 bA
16	0 aA	2 bA	265 aB	321 aA
22	0 aA	0 bA	291 aB	336 aA
CV (%)	106,07		8,79	

Através do teste de tetrazólio foi possível monitorar, também, essa seqüência de eventos, verificando que a deterioração ocorreu gradativamente nas sementes e conduziu os tecidos ao colapso metabólico (desenvolvimento de coloração vermelha intensa), seguido de necrose (ausência de coloração), conforme apresentado nas imagens da figura 5.

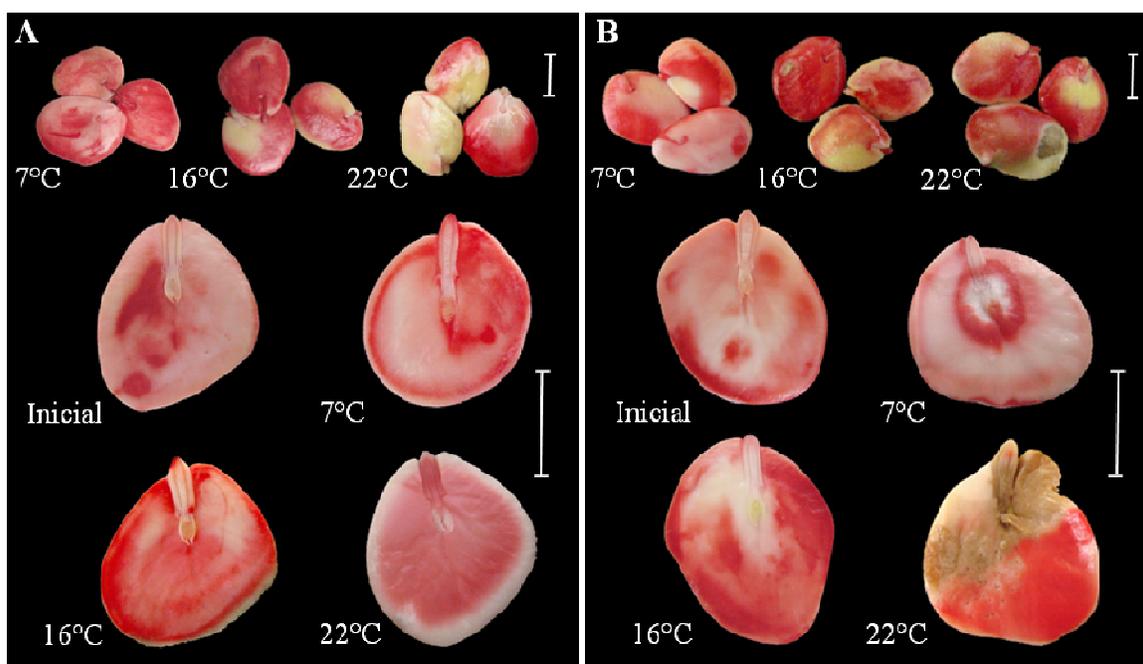


Figura 5. Embriões de *Caesalpinia echinata*, incubados por 40 dias em três temperaturas, com 16% de água, coloridos pelo teste de tetrazólio. A: embriões de sementes vigorosas envelhecidas; B: de sementes deterioradas envelhecidas. Embriões em escala menor: visão do exterior; em escala maior: visão do interior. Escalas = 1cm.

Nas sementes envelhecidas, verificaram-se extensas regiões com tecidos deteriorados e mortos, inclusive as regiões meristemáticas (figuras 5A, B), o que favoreceu o aumento no total de tecidos mortos, observados na figuras 6A, B. Quando se comparam as imagens das sementes envelhecidas com as não envelhecidas (figuras 2 e 5), verificam-se diferentes estágios de deterioração, evidenciando que as condições de colheita, umidade relativa, estresse térmico, armazenamento e respiração são fatores que podem condicionar as sementes a diferentes níveis de deterioração.

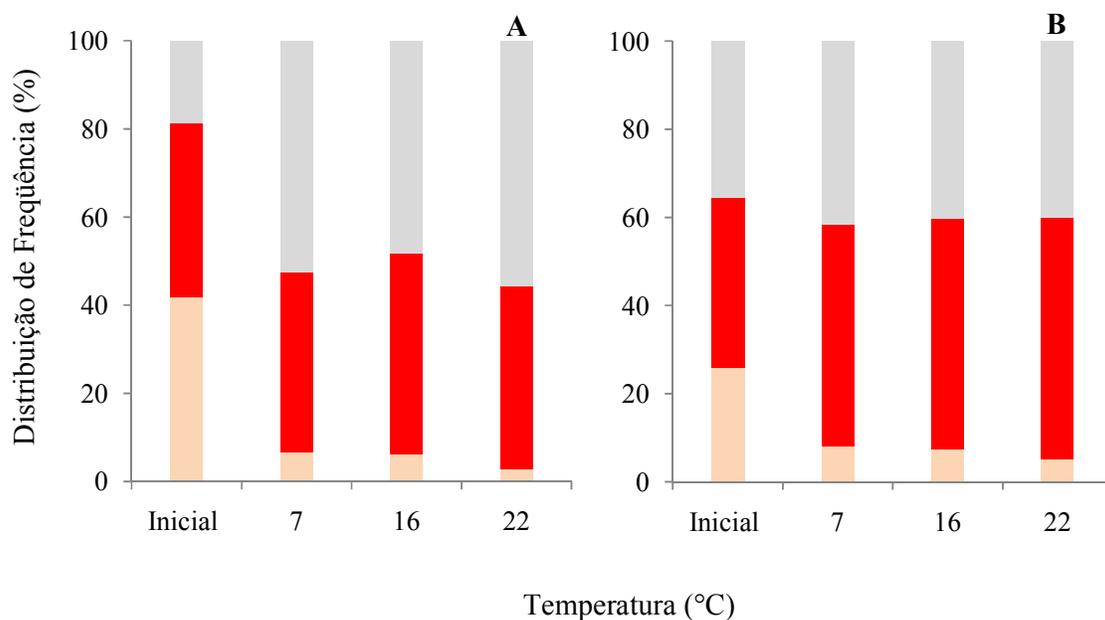


Figura 6. Distribuição das frequências de tecidos viáveis (rosa), deteriorados (vermelho) e mortos (cinza), obtidos do teste de tetrazólio, de sementes de diferentes níveis de deterioração, de *Caesalpinia echinata* Lam., incubadas com 16% de água em três temperaturas, durante 40 dias. (A) sementes vigorosas envelhecidas, (B) sementes deterioradas envelhecidas.

A deterioração é inevitável, seus efeitos podem ser controlados durante o armazenamento, por exemplo, com reduções na intensidade de energia térmica fornecida, diminuindo a atividade metabólica e a taxa respiratória. Os resultados apresentados demonstram, contudo, que a contínua redução da temperatura pode não ter correspondente eficiência no controle da respiração e, conseqüentemente, da velocidade de deterioração das sementes.

*Soma térmica de manifestações fisiológicas da deterioração* - todos os processos biológicos como, por exemplo, maturação, respiração, germinação e desenvolvimento, para que sejam desencadeados, necessitam determinadas quantidades de energia. A somatória da energia térmica é chamada de soma térmica. Uma vez estabelecida à soma térmica, sabe-se a

dependência térmica para a realização de um processo biológico, como a deterioração.

A deterioração é manifestada nas sementes em uma seqüência de eventos bioquímicos ou fisiológicos (Smith & Berjak 1995, McDonald 1999, Delouche 2002). As figuras 7A, B representam os valores acumulados de consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono em relação à soma de calor, demonstrando que a taxa respiratória aumentou quando se intensificou a transmissão de energia térmica. Provavelmente o aumento da respiração durante a incubação favoreceu a ocorrência de alguns eventos da deterioração, como a perda da permeabilidade dos sistemas de membranas, redução no total de tecidos viáveis, queda no desenvolvimento de plântulas normais e na germinação, cada um desses eventos correspondendo a um processo biológico com diferentes exigências térmicas para o seu desencadeamento.

Os valores de condutividade elétrica mostraram que quando as sementes receberam calor acima de 560°C.d houve elevado aumento na lixiviação de solutos (figura 7C), demonstrando que a soma térmica para a perda da permeabilidade dos sistemas de membranas de sementes de *C. echinata* está próxima a esse valor.

Na figura 7D está apresentada a relação do total de tecidos viáveis em função da soma de calor. A redução no total de tecidos viáveis dos embriões vigorosos foi contínua, desde os 40°C.d; já para as sementes deterioradas essa redução ocorreu apenas após 320°C.d. Curiosamente, quando ambas as sementes receberam calor próximo a 320°C.d houve aproximação entre as curvas (figura 7D), talvez indicando que, a partir de determinada quantidade de calor, as sementes de qualidades iniciais diferentes tendem à mesma taxa de deterioração. A redução no total de tecidos viáveis (figura 7D) acompanhou o aumento da taxa respiratória (figuras 7A, B), provavelmente prejudicando o vigor das sementes.

Taxas elevadas de respiração aceleram o consumo de reservas, levando à rápida senescência dos tecidos (Carneiro & Aguiar 1993, Patanè *et al.* 2006). De acordo com Carvalho & Nakagawa (1983), o armazenamento de sementes com respiração ativa intensifica a deterioração, causando a perda do vigor e eventuais quedas na germinação.

Essa relação foi observada quando se analisou a germinação e o desenvolvimento de plântulas normais. Entre as sementes vigorosas, a queda na capacidade de produzir plântulas normais ocorreu quando as sementes receberam um total de 40°C.d (figura 7E); já com as sementes deterioradas o desenvolvimento de plântulas normais foi afetado a partir 200°C.d (figura 7E). A partir de 440°C.d a produção de plântulas normais entre ambos os níveis de deterioração foi praticamente a mesma, observando-se aproximação entre as curvas (figura 7E).

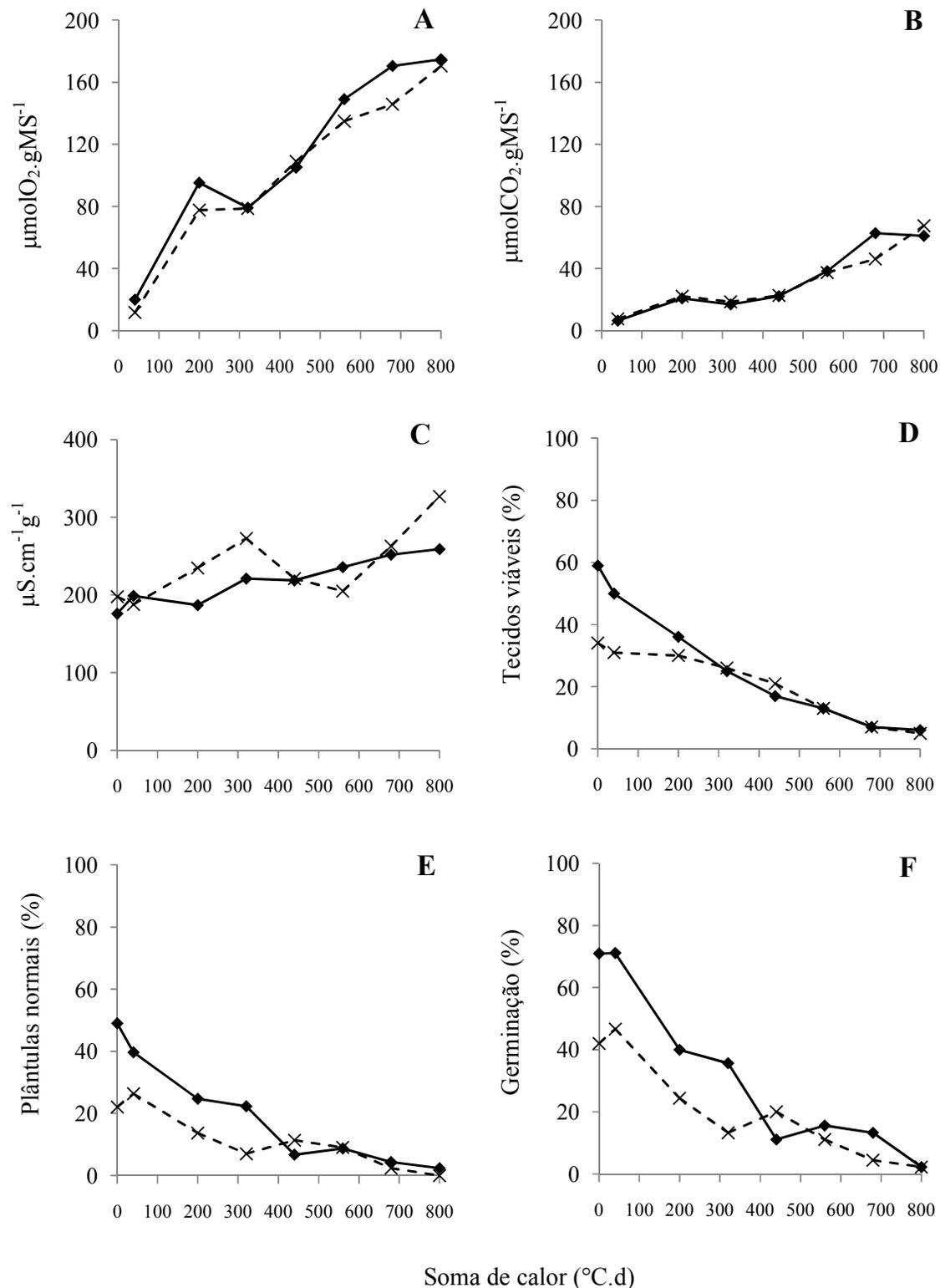


Figura 7. A: Consumo de oxigênio ( $\mu\text{molO}_2.\text{gMS}^{-1}$ ), B: produção de dióxido de carbono ( $\mu\text{molCO}_2.\text{gMS}^{-1}$ ), C: condutividade elétrica ( $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$ ), D: total de tecidos viáveis em TZ (%), E: plântulas normais (%) e F: germinação (%) de sementes vigorosas e deterioradas de *Caesalpinia echinata* Lam., em relação à soma de calor emitida durante 40 dias de incubação. Linhas contínuas – sementes vigorosas e linhas tracejadas – sementes deterioradas.

A deterioração e o vigor estão fisiologicamente ligados, são aspectos recíprocos da qualidade das sementes: à medida que a deterioração avança, o vigor diminui. A deterioração é o processo de envelhecimento e morte da semente, enquanto que o vigor é o principal componente da qualidade, diretamente afetado pelo processo de deterioração (Delouche 2002, Marcos Filho 2005).

Na figura 7F foi possível analisar a relação entre a queda na germinação e a soma de calor de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. Para ambos os níveis de deterioração, a germinação diminuiu quando as sementes receberam um total de 200°C.d (figura 7F). Esses resultados demonstram que esse calor é suficiente para que o processo de deterioração progrida até o último evento da deterioração. Sendo assim, 200°C.d é a soma térmica para a perda da capacidade germinativa de sementes de *Caesalpinia echinata*.

Quanto ao controle da deterioração, condições de armazenamento que visem à redução da velocidade de respiração e do metabolismo são estratégias recomendadas. Assim, o armazenamento de sementes próximo à sua temperatura basal deve ser condição essencial para atender a essa necessidade. Pritchard *et al.* (1995), por exemplo, recomendam o armazenamento de sementes de *Araucaria hunteinii* K. Schum em temperatura ligeiramente abaixo da basal (6°C). O armazenamento das sementes fora dessas condições intensificaria a deterioração, conseqüentemente proporcionando danos irreversíveis à sua qualidade fisiológica.

Em sementes de *Caesalpinia echinata* a temperatura basal para a germinação foi entre 10 e 14°C, como verificado por Mello & Barbedo (2007). Para respiração, contudo, foi 2°C (figuras 1A, C). Essa maior exigência térmica da germinação, em relação à respiração, provavelmente deve-se ao fato de que esta última caracteriza-se como processo prioritário em relação à anterior, sendo a principal fonte de energia para todos os processos biológicos, inclusive a própria germinação.

Utilizando-se a recomendação citada acima, a temperatura adequada para o armazenamento dessas sementes seria próxima à temperatura basal para a germinação, ou seja, 10°C. Porém, como foi visto no presente trabalho, a incubação próxima a essa temperatura prejudicaria a viabilidade das sementes. Ao contrário, a incubação em temperatura próxima à basal para a respiração favoreceria a conservação dessas sementes durante seu armazenamento.

### Referências bibliográficas

- Barbedo, C.J. & Cicero, S.M.** 1998. Utilização do teste de condutividade elétrica para previsão do potencial germinativo de sementes de ingá. *Scientia Agricola* 55: 249-259.
- Barbedo, C.J. & Marcos filho, J.** 1998. Tolerância à dessecação de sementes. *Acta Botanica Brasilica* 12: 145-164.
- Barbedo, C.J., Bilia, D.A.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. *Revista Brasileira de Botânica* 25: 431-439.
- Bilia, D.A.C., Marcos Filho, J. & Novembre, A.D.L.C.** 1998. Conservação da qualidade fisiológica de sementes de *Inga uruguensis* Hook. & Arn. *Revista Brasileira de Sementes* 20: 48-54.
- Borges, I.F., Del Giudice Neto, J., Bilia, D.A.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Barbedo, C.J.** 2005. Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 851-861.
- Bradford, K.J.** Water relations in seed germination. 1995. *In: J. Kingel & G. Galili (eds.)*. Seed development and germination. Marcel Dekker, New York, pp. 351-396.
- Buckeridge, M.S., Tiné, M.A.S., Minhoto, M.J. & Lima, D.U.** 2004. Respiração. *In: G.K. Kerbauy, (ed.)*. Fisiologia vegetal. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 198 – 216.
- Carneiro, J.G.A. & Aguiar, I.B.** 1993. Armazenamento de sementes. *In: I.B. Aguiar, F.C.M. Piña-Rodrigues & M.B. Figliolia (eds.)*. Sementes florestais tropicais. ABRATES, Brasília, pp. 333-350.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J.** 1983. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 3.ed. Campinas Fundação Cargill, 424p.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J.** 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4.ed. Jaboticabal, Funep, 588p.
- Cheng, K. & Bradford, K.J.** 1999. Hydrothermal time analysis of tomato seed germination responses to priming treatments. *Journal of Experimental Botany* 50: 89-99.
- Crispim, J.E., Martins, J.C., Pires, J.C., Rosolem, C.A. & Cavariani, C.** 1994. Determinação da taxa de respiração em sementes de soja pelo método da titulação. *Pesquisa agropecuária brasileira* 29: 1517-1521.
- Dahal, P., Kim, N.S. & Bradford, K.J.** 1996. Respiration and germination rates of tomato seeds at suboptimal temperatures and reduced water potentials. *Journal of Experimental Botany* 47: 941-947.

- Daws, M.I., Lydall, E., Chmielarz, P., Leprince, O., Matthews, S., Thanos, C.A. & Pritchard, H.W.** 2004. Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastanum* across Europe. *New Phytologist* 162: 157-166.
- Delouche, J.C.** 2002. Germinação, deterioração e vigor da semente. *Seed News* 6: 1-7.
- Feltre, R.** 1982. Química geral. 2.ed. Moderna. São Paulo 1: 364p.
- França Neto, J.B., Kryzanowski, F.C., Costa, N.P.** 1998. El test de tetrazolio en semillas de soja. Londrina: Embrapa-CNPSO, 72p. (Embrapa-CNPSO. Documentos, 117).
- Garcia-Huidobro, J., Monteith, J.L. & Squire, G.R.** 1982. Time, temperature and germination of pearl millet (*Pennisetum typhoides* S. & H.). *Journal of Experimental Botany* 33: 288-296.
- Gilmore, E.C.Jr. & Rogers, J.S.** 1958. Heat units as a method of measuring maturity in corn. *Agronomy Journal, Madison* 50: 611-703.
- Hellmann, M.E., Mello, J.I.O., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Barbedo, C.J.** 2006. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 91-99.
- Kader, A.A. & Saltveit, M.E.** 2002. Respiration and gas exchange. *In: J.A. Bartz, J.K. Brecht & J. Weichmann. Postharvest physiology and pathology of vegetables.* Marcel Dekker, New York, pp.7-29.
- Labouriau, L.G.** 1983. A germinação das sementes. OEA: Washington, 175p.
- Larsen, S.U. & Bidy, B.M.** 2005. Differences in thermal time requirement for germination of three turfgrass species. *Crop Science Society of America* 45: 2030-2037.
- Marcos Filho, J.** 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Fealq, Piracicaba.
- McDonald, M.** 1999. Seed quality assessment. *Seed Science Research* 8: 265-275.
- Mello, J.I.O. & Barbedo, C.J.** 2007. Temperatura, luz e substrato para a germinação de sementes de pau-brasil *Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae-Caesalpinioideae. *Revista Árvore* 31: 645-655.
- Mello, J.I.O.** 2008. Compostos de reserva de sementes e suas relações com diferentes níveis de sensibilidade à dessecação e ao congelamento. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo.
- Patanè, C., Cavallaro, V., Avola, G. & D'Agosta, G.** 2006. Seed respiration of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] during germination as affected by temperature and osmoconditioning. *Seed Science Research* 16: 251-260.
- Popinigis, F.** 1977. Fisiologia da semente. Ministério da agricultura /Agiplan, Brasília.
- Pritchard, H.W., Tompsetti, P.B., Manger, K. & Smidt.** 1995. The effect of moisture content on the low temperature responses of *Araucaria hunsteinii* seed and embryos.

Annals of Botany 76: 79-88.

**Ramalho Junior, F.** 1982. Os fundamentos da física. 3 ed. São Paulo, Moderna 2: 358p.

**Roberts, E.H.** 1973. Predicting the storage life of seeds. Seed Science and Technology 1: 499-514.

**Santana, D.G & Ranal, M.A.** 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. Universidade de Brasília, Brasília.

**Smith, M.T., Berjak, P.** 1995. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation sensitive seeds. *In: J. Kingel & G. Galili.* Seed development and germination. Marcel Dekker, New York, pp. 701-746.

**Steinmaus, S.J., Prather, T.S. & Holt, J.S.** 2000. Estimation of base temperatures for nine weed species. Journal of Experimental Botany 51: 275-286.

**Taiz, L. & Zeiger, E.** 1998. Plant physiology. 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 793p.

**Trudgill, D.L., Honek, A., Li, D. & Van Straalen, N.M.** 2005. Thermal time – concepts and utility. Annals of Applied Biology 146: 1-14.

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

**Villela, F.A., Marcos Filho, J.** 1998. Estado energético tipos de água na semente. Revista Brasileira de Sementes 20: 317-321.

### Considerações finais

Na primeira etapa do presente estudo (capítulo 1) foi possível padronizar o teste de tetrazólio para as sementes de *Caesalpinia echinata* Lam, permitindo diagnosticar tecidos viáveis, em deterioração e mortos; assim, a observação da distribuição do mosaico de cores nas regiões vitalícias para a germinação permitiu estabelecer oito categorias de avaliação de vigor e viabilidade das sementes de *Caesalpinia echinata*.

Os principais eventos da deterioração manifestados antes da perda da capacidade germinativa são o aumento na peroxidação de lipídeos, a danificação aos sistemas de membranas e aos mecanismos energéticos e a redução na atividade enzimática, na respiração e na biossíntese. Algumas dessas mudanças foram constatadas nas sementes de *C. echinata* através da análise de consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono e através do uso do teste de tetrazólio e de condutividade elétrica, permitindo analisar regiões mais suscetíveis à deterioração.

Quando as sementes foram incubadas observou-se que o consumo de oxigênio frequentemente era maior que a produção de dióxido de carbono, indicando a existência de outras reações que não a respiração. Essas reações, contudo, também reduzem a molécula de oxigênio, e podem ser a peroxidação de lipídeos e a oxidação de compostos fenólicos presentes no tegumento.

A danificação aos sistemas de membranas foi observada principalmente pelo teste de condutividade elétrica; quando as sementes foram incubadas em temperaturas mais elevadas e/ou apresentavam maior nível de deterioração houve aumento na quantidade de solutos lixiviados. A perda da integridade dos sistemas de membranas diminui a permeabilidade seletiva, aumentando com isso a difusão de soluções, como foi visto com a solução de tetrazólio, desenvolvendo nos tecidos fortes coloração de tonalidade vermelha intensa.

Mudanças na energia livre da água e na energia térmica transmitida foram os principais fatores que alteraram o metabolismo respiratório e favoreceram a deterioração das sementes. Quando se analisou a taxa respiratória e a deterioração em função da temperatura verificou-se que o aumento da energia térmica conduz simultaneamente ao aumento de ambos os processos. Aumento de 5°C na temperatura de incubação, (acima da basal), por exemplo, foi o suficiente para que as regiões meristemáticas e a região proximal desenvolvessem tecidos com aspectos de deteriorados. O aumento da temperatura eleva o consumo das reservas e a velocidade de senescência dos tecidos; pelo teste de tetrazólio foi possível observar que a deterioração ocorre de forma gradativa, desenvolvendo nos tecidos coloração vermelha intensa seguida de ausência de cores.

Dentro das faixas térmicas e hídricas estudadas, alterações na energia térmica transmitida influenciaram mais a deterioração das sementes do que as alterações hídricas. Contudo, ambos promoveram substancial alteração na taxa de respiração. Para as sementes de *Caesalpinia echinata*, o valor de 14% de água pode ser considerado como crítico para o armazenamento, pois acima deste há substancial aumento da taxa respiratória, conseqüentemente acelerando a deterioração. Comparando-se esse valor com o de outras espécies (tabela 1) nota-se grande variação no teor de água mínimo para ativar a respiração. Talvez fatores como a impermeabilidade do tegumento, a energia livre da água (potencial hídrico) nas sementes com mesmo teor de água e a atividade enzimática contribuam para tal variação.

Tabela 1. Teor de água mínimo a 25°C de algumas espécies para o início do metabolismo oxidativo (% de base úmida), com características de família e ocorrência.

Espécie	Família	Ocorrência	Teor de água para respiração ativa	Fonte
<i>Malus domestica</i> Borkh	Rosaceae	China	12%	1
<i>Brassica oleracea</i> L.	Brassicaceae	Costa Sul e Oeste da Europa	14%	2
<i>Arachis hypogaea</i> L.	Fabaceae	Brasil, Paraguai, Bolívia e Argentina	16%	2
<i>Lactuca sativa</i> L.	Asteraceae	Leste Mediterrâneo	16%	2
<i>Glycine max</i> L.	Fabaceae	China	20%	2, 3
<i>Zea mays</i> L.	Poaceae	México	20%	1
<i>Pisum sativum</i> L.	Fabaceae	Ásia Central e Europa	22%	2

<sup>1</sup>Leopold & Vertucci 1989; <sup>2</sup>Vertucci & Roos 1990; <sup>3</sup>Vertucci 1989

Assim como o teor de água, há também uma exigência térmica mínima ou basal para o início da respiração que, em sementes de *C. echinata*, foi 2°C. Essa temperatura basal também apresenta grandes variações conforme a espécie (tabela 2). Embora esta tenha sido estudada em relação à germinação, pouco se sabe quanto à respiração. Os dados apresentados na tabela 2 permitem pouca generalização quanto à relação entre a origem e a temperatura basal. Contudo, vale ressaltar os trabalhos realizados com sementes da mesma espécie colhidas em diferentes regiões, como os de Daws *et al.* (2004), que apresentaram relação entre a latitude e a temperatura basal. Seriam interessantes, portanto, estudos dessa natureza com sementes de *C. echinata* coletadas desde o Rio Grande do Norte até o Rio de Janeiro.

Tabela 2. Temperatura basal (°C) de algumas espécies para o início do processo de germinação, com características de família e ocorrência.

Espécie	Família	Ocorrência	Local de colheita	Temperatura basal (°C)	Fonte
<i>Poa pratensis</i> L. (cv Broadway)	Poaceae	Europa, Ásia, Norte da África e América do Norte	não identificado	1,6	1
<i>Poa pratensis</i> L. (cv. Andante)	Poaceae	Europa, Ásia, Norte da África e América do Norte	não identificado	3,5	1
<i>Lolium perenne</i> L. (cv. Fígaro)	Poaceae	Europa, Ásia e Norte da África	não identificado	3,4	1
<i>Lolium perenne</i> L. (cv. Taya)	Poaceae	Europa, Ásia e Norte da África	não identificado	3,8	1
<i>Lotus corniculatus</i> L.	Faboideae	Eurásia e Norte da África	não identificado	4,7	2
<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) De Wit	Fabaceae	México	não identificado	Entre 5 e 10	3
<i>Araucaria hunsteinii</i> K. Schum	Araucariaceae	Nova Guiné (Oceania)	não identificado	6	4
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Asteraceae	Ásia e Europa	não identificado	7	5
<i>Senna macranthera</i> (Collad). Irwin et Barn	Caesalpiniaceae	Ceara até São Paulo	São Paulo	7,8	6
<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench (cv. Brandes)	Poaceae	Africana	não identificado	8,6	7
<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench (cv. H128)	Poaceae	África tropical	não identificado	11	7
<i>Portulaca oleracea</i> L.	Portulacaceae	Índia e Oriente Médio	não identificado	9	5
<i>Pterogyne nitens</i> Tul.	Fabaceae	Ceara até o Paraná, incluindo Argentina e Paraguai	São Paulo	Entre 9 e 11	8
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. (cv.PI 341988 e T5)	Solanaceae	América Central e do Sul	não identificado	9,3	9
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. (cv.Hypack-2409)	Solanaceae	América Central e do Sul	não identificado	13,5	10
<i>Poecilanthus parviflora</i> Bentham	Fabaceae	Bahia até Rio Grande do Sul	São Paulo	Entre 10 e 14	11
<i>Emeranthus elaeagnus</i> (Mart. Ex. DC)	Asteraceae	Minas Gerais, Goiás e Bahia	Minas Gerais	Entre 10 e 14	12
<i>Emeranthus glomerulatus</i> (Less.)	Asteraceae	Minas Gerais, Goiás e Bahia	Minas Gerais	Entre 15 e 19	12

Continuação da tabela 2.

<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.	Sterculiaceae	Toda América Latina	São Paulo	Entre 10 e 14	13
<i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão	Anacardiaceae	Ceara até o Paraná incluindo Bolívia, Paraguai e Argentina	Paraíba	Entre 10 e 14	14
<i>Caesalpinia echinata</i> Lam	Caesalpinioideae	Rio Grande do Norte até o Rio de Janeiro	São Paulo	Entre 10 e 14	15
<i>Hirschfeldia incana</i> (L) Larg-Foss	Brassicaceae	Bacia do mediterrâneo	não identificado	11	5
<i>Pennisetum typhoides</i> S. & H.	Poaceae	África tropical	não identificado	12	16
<i>Setaria glauca</i> L.	Poaceae	Índia e Oeste e Sul da África	não identificado	12	5
<i>Echinochloa crus-galli</i> (L.) Beauv.	Poaceae	Europa e Índia	não identificado	13	5
<i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronquist	Asteraceae	América do Norte	não identificado	13	5
<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.	Poaceae	América do Norte	não identificado	14,9	5
<i>Tibouchina benthamiana</i> Cong.	Melastomataceae e	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	Entre 15 e 19	17
<i>Tibouchina moricandiana</i> (DC.)Baill	Melastomataceae e	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	Entre 15 e 19	17
<i>Amaranthus albus</i> L.	Amaranthaceae	América tropical	não identificado	15,6	5
<i>Amaranthus palmeri</i> S. Wats	Amaranthaceae	Sul da América do Norte	não identificado	17	5
<i>Croton floribundus</i> Spreng	Euphorbiaceae	Rio de Janeiro até o Paraná	São Paulo	Entre 20 e 24	18
<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	Sapindaceae	Europa	Grécia	19	19
<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	Sapindaceae	Europa	França	21,9	19
<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	Sapindaceae	Europa	Polônia	23,1	19
<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	Sapindaceae	Europa	Inglaterra	23,9	19

<sup>1</sup>Larsen & Bibby 2005; <sup>2</sup>Hur & Nelson 1985; <sup>3</sup>Cavalcante & Perez 1995; <sup>4</sup>Pritchard *et al.* 1995; <sup>5</sup>Steinmaus *et al.* 2000; <sup>6</sup>Cassaro-Silva 2001; <sup>7</sup>Patanè *et al.* 2006; <sup>8</sup>Nassif & Perez 2000; <sup>9</sup>Dahal *et al.* 1996; <sup>10</sup>Cheng & Bradford 1999; <sup>11</sup>Valadares & Paula 2008; <sup>12</sup>Velten & Garcia 2005; <sup>13</sup>Araujo Neto *et al.* 2002; <sup>14</sup>Silva *et al.* 2002; <sup>15</sup>Mello & Barbedo 2007; <sup>16</sup>Garcia-Huidobro *et al.* 1982; <sup>17</sup>Andrade 1995; <sup>18</sup>Abdo & Paula 2006; <sup>19</sup>Daws *et al.* 2004.

Como já dito anteriormente, a respiração também apresenta uma temperatura mínima para o seu desencadeamento. No presente trabalho, foi possível estabelecer a quantidade de calor necessária para que as sementes de *C. echinata* apresentem expressiva deterioração. Além disso, o uso da soma térmica, ou seja, a soma de calor acima da condição mínima e abaixo da condição máxima de temperatura necessária para a ocorrência de uma resposta biológica permitiu demonstrar que cada manifestação da deterioração tem a sua soma térmica. Estas manifestações foram caracterizadas como perda na seletividade do sistema de membranas, redução na vitalidade dos tecidos, diminuição na porcentagem de germinação e perda da capacidade de produzir plântulas normais. A soma térmica, dessa forma, principalmente quando associada à análise dos tecidos em processo de deterioração e ao acompanhamento da dinâmica dos gases consumidos e emitidos, poderia ser utilizada para previsibilidade do tempo de armazenamento de sementes e conferir importante ferramenta para diagnóstico do real estado fisiológico das sementes de *Caesalpinia echinata*.

### **Conclusões gerais**

- O grau de deterioração das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. é dependente da intensidade respiratória e esta condiciona as sementes a diferentes níveis de deterioração;
- Mudanças no estado energético da água e na energia térmica interferem nessa intensidade respiratória;
- O teste de tetrazólio permitiu identificar tecidos com intensa respiração, demonstrando que a deterioração é previsível;
- As manifestações fisiológicas da deterioração como perdas na permeabilidade dos sistemas de membranas, no desenvolvimento de plântulas normais e na germinação apresentam uma soma térmica para o seu desencadeamento.

### Referências bibliográficas

- Abdo, M.T.V.N. & Paula, R.C.** 2006. Temperaturas para a germinação de sementes de capixingui (*Croton floribundus* - spreng - euphorbiaceae). Revista Brasileira de Sementes 28: 135-140.
- Andrade, A.C.S.** 1995. Efeito da luz e da temperatura na germinação de *Leandra breviflora* Cong., *Tibouchina benthamiana* Cong., *Tibouchina grandifolia* Cong. e *Tibouchina moricandiana* (DC.) Baill. (Melastomataceae). Revista Brasileira de Sementes 17: 29-35.
- Araújo Neto, J.C., Aguiar, I.B., Ferreira, V.M & Rodrigues, T.J.D.** 2002. Temperaturas cardeais e efeito da luz na germinação de sementes de mutamba. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental 6: 460-465.
- Botanic Gardens Conservation International.** 2001. Normas internacionais de conservação para jardins botânicos. Rio de Janeiro: Conselho Nacional do Meio Ambiente/Rede Brasileira de Jardins Botânicos/Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro/EMC.
- Bradford, K.J.** 1995. Water relations in seed germination. In: J. Kingel & G. Galili (eds.). Seed development and germination. Marcel Dekker, New York, pp. 351-396.
- Carneiro, J.G.A. & Aguiar, I.B.** 1993. Armazenamento de sementes. In: I.B. Aguiar, F.C.M. Piña-Rodrigues & M.B. Figliolia (eds.). Sementes florestais tropicais. ABRATES, Brasília, pp. 333-350.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J.** 1983. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 3.ed. Campinas Fundação Cargill, 424p.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J.** 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4.ed. Jaboticabal, Funep, 588p.
- Cassaro-Silva, M.** 2001. Efeito da temperatura na germinação de sementes de manduirana (*Senna macranthera* (collad.) irwin et barn. - Caesalpiniaceae) Revista Brasileira de Sementes 23: 92-99.
- Cavalcante, A.M.B. & Perez, S.C.J.G.A.** 1995. Efeitos da temperatura sobre a germinação de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. Revista Brasileira de Sementes 17: 1-8.
- Cheng, K. & Bradford, K.J.** 1999. Hydrothermal time analysis of tomato seed germination responses to priming treatments. Journal of Experimental Botany 50: 89-99.
- Dahal, P., Kim, N.S. & Bradford, K.J.** 1996. Respiration and germination rates of tomato seeds at suboptimal temperatures and reduced water potentials. Journal of Experimental Botany 47: 941-947.

- Daws, M.I., Lydall, E., Chimielarz, P., Leprince, O., Matthews, S., Thanos, C.A. & Pritchard, H.W.** 2004. Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastanum* across Europe. *New Phytologist* 162: 157-166.
- Dean, W.** 1996. A ferro e fogo: a história e a devastação da mata atlântica brasileira. Companhia das Letras, São Paulo, 484p.
- Delouche, J.C.** 2002. Germinação, deterioração e vigor da semente. *Seed News* 6: 1-7.
- Fundação SOS Mata Atlântica & INPE (Instituto nacional de pesquisas espaciais).** 2001. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica e ecossistemas associados no período de 1995–2000. Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, São Paulo.
- Garcia-Huidobro, J., Monteith, J.L. & Squire, G.R.** 1982. Time, temperature and germination of pearl millet (*Pennisetum typhoides* S. & H.). *Journal of Experimental Botany* 33: 288-296.
- Hur, S. N. & Nelson, C. J.** 1985: Temperature effects on germination of birdsfoot trefoil and seombadi. *Agronomy Journal* 77: 557-560.
- Larsen, S.U. & Bidy, B.M.** 2005. Differences in thermal time requirement for germination of three turfgrass species. *Crop Science Society of America* 45:2030-2037.
- Leopold, A.C. & Vertucci, C.W.** 1989. Moisture as a regulator of physiological reaction in seeds. *In: Stanwood, P.C. & McDonald, M.B Seed Moisture* (eds.). Crop Scienci Society of America, Madison pp. 51-67.
- Mello, J.I.O. & Barbedo, C.J.** 2007. Temperatura, luz e substrato para a germinação de sementes de pau-brasil *Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae-Caesalpinioideae. *Revista Árvore* 31: 645-655.
- Nassif, S.M.L & Perez, S.C.J.G.A.** 2000. Efeitos da temperatura na germinação de sementes de amendoim-do-campo (*Pterogyne nitens* tul.). *Revista Brasileira de Sementes* 22: 1-6.
- Patanè, C., Cavallaro, V., Avola, G. & D'Agosta, G.** 2006. Seed respiration of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] during germination as affected by temperature and osmoconditioning. *Seed Science Research* 16: 251-260.
- Popinigis, F.** 1977. Fisiologia da semente. Ministério da agricultura /Agiplan, Brasília.
- Pritchard, H.W., Tompsetti, P.B., Manger, K. & Smidt.** 1995. The effect of moisture content on the low temperature responses of *Araucaria hunsteinii* seed and embryos. *Annals of Botany* 76: 79-88.
- Roberts, E.H.** 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1: 499-514.
- Rocha, Y.T.** 2004. Ibirapitanga: História, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) do descobrimento à atualidade. Tese de

Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- Silva, L.M.M., Rodrigues, T.J.D. & Bergemann, I.A.** 2002. Efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* allemão) Revista Árvore, Viçosa-MG 26: 691-697.
- Slageren, M.W.V.** 2002. The Millennium seed bank: building partnerships in arid regions for the conservation of wild species. Journal of Arid Environments. Elsevier Science Ltda, p.1-7.
- Steinmaus, S.J., Prather, T.S. & Holt, J.S.** 2000. Estimation of base temperatures for nine weed species. Journal of Experimental Botany 51: 275-286.
- Valadares, J. & Paula, R.C.** 2008. Temperaturas para germinação de sementes de *Poecilanthe paviflora* Bentham (Fabaceae – Faboideae). Revista Brasileira de Sementes 30: 164-170.
- Veltren, S.B. & Garcia, Q.S.** 2005. Efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Eremanthus* (Asteraceae), ocorrentes na Serra do Cipó, MG, Brasil. Acta Botânica Brasilica 19: 753-761.
- Vertucci, C.W. & Roos, E.E.** 1990. Theoretical basis of protocols for seed storage. Plant Physiology 94: 1019-1023.
- Vertucci, C.W.** 1989. The effects of low water contents on physiological activities of seeds. Physiologia Plantarum 77: 172-176.

**Resumo:** (Velocidade de deterioração de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. sob diferentes taxas respiratórias). O armazenamento de sementes com respiração ativa proporciona deterioração acelerada, conduzindo à perda do vigor e eventuais quedas na germinação, dificultando a conservação das sementes. Assim, o grau de hidratação e a intensidade de energia térmica representam dois dos principais fatores que favorecem esses processos. Usando o diagnóstico de tecidos das sementes e analisando alterações no consumo de O<sub>2</sub> e produção de CO<sub>2</sub>, o presente trabalho objetivou analisar a relação entre a taxa respiratória e a deterioração dessas sementes bem como avaliar o envolvimento do grau de hidratação e da temperatura nesses processos, visando ao controle e à previsibilidade da deterioração durante o armazenamento. Os resultados demonstraram que a deterioração é dependente da taxa respiratória e que o grau de hidratação e a intensidade de energia térmica apresentam envolvimento nesses processos. Verificou-se, ainda, que esses processos podem ser previsíveis e controláveis, respectivamente através do teste de tetrazólio e da soma térmica e do conhecimento da temperatura basal.

**Palavras chave:** Tetrazólio, energia da água, energia térmica, respiração, deterioração

**Abstract:** (Velocity deterioration seed of *Caesalpinia echinata* Lam in different respiration rate). Seeds stored at high respiration rates have faster deterioration, diminished both vigor and germination and reduced conservation. This deterioration can be influenced by water status and heat sum. Using seed tissues diagnosis and analyzing alterations in seed consumption of O<sub>2</sub> and liberation of CO<sub>2</sub>, this work reports the relation between respiration rate and seed deterioration at different water and temperature status, therefore making possible the control and foreseeability of seed storage deterioration. The results confirmed that respiration rate, water status and heat sum directly influence the deterioration of seeds of *Caesalpinia echinata*. The foreseeability and control of this deterioration were possible by, respectively, tetrazolium test, thermal time and the knowledge of base temperature.

**Key words:** tetrazolium, water status, heat sum, respiration, deterioration