

IGOR FERRARI BORGES

**MATURAÇÃO DE SEMENTES DE  
*CAESALPINIA ECHINATA* LAM. (PAU-BRASIL)  
EM BOSQUES PLANTADOS NO ESTADO DE SÃO PAULO**

São Paulo  
2007

IGOR FERRARI BORGES

**MATURAÇÃO DE SEMENTES DE  
*CAESALPINIA ECHINATA* LAM. (PAU-BRASIL)  
EM BOSQUES PLANTADOS NO ESTADO DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para 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

São Paulo  
2007

À minha parati 1.6, cinza, ano 85, carinhosamente apelidada de “*El diablo*”  
que, mesmo tendo alguns probleminhas “de percurso” durante as  
coletas de sementes, foi sempre fiel e persistente.  
Uma companheira infalível.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos e Vera, e a minha irmã Talita, por terem acreditado em mim. Sempre. Alimentando os meus sonhos e as minhas loucuras, com aquele carinho de pessoas que parecem na realidade anjos.

À minha namorada Camila, meus preciosos “olhos verdes”, pelos abraços e palavras confortantes nos momentos de desespero que surgiram durante a elaboração deste trabalho. Minha companheira eterna que me ajudou a ser confiante.

Aos companheiros de risadas, vitórias, frustrações e principalmente horas extra, Ivan, Marcio, Simone, Cris, João Molina, Paulo, Nestor, Liliane, João Parisi, Juzinha, Lamarca e Carmen do laboratório do *Index Seminum*, minha segunda casa.

Aos amigos cientistas, Fausto, Maitê e Cesinha pela amizade pura e por colocarem meus neurônios para ferverem. E como já ferveram.

À Dra Rita de Cássia L. Figueiredo-Ribeiro por ter oferecido a oportunidade de participar do Projeto Temático Pau-brasil e principalmente pelo incentivo e por ter enxergado um pequeno cientista em mim.

Ao professor Odair (Mr. Oda) pelas correções nos textos em inglês e logicamente pela amizade.

Ao Instituto de Botânica e todos os seus funcionários, por terem possibilitado a execução deste e outros trabalhos.

Aos companheiros “registreiros”, João, Luiz, Leila, Giorgio, Ana Cláudia, Daniela, Wanda, Valéria, Cecília, Gustavo, Kelly e em especial à Sandra e Luciana, minhas chefinhas, pela amizade, apoio nos meus novos desafios na BASF e, claro, por terem compreendido minhas ausências no posto de trabalho.

À Adeliana, Laís e Artur por terem me agüentado em sua casa e não reclamarem por eu ter roubado o marido e papai (meu orientador) por diversas vezes durante todo este trabalho.

Aos funcionários da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guacu pela ajuda nas coletas de sementes e pelas frutas que eu “roubei” nas árvores para comer (afinal o calor lá é grande). Em especial ao Dr. João Del Giudice Neto pela forte participação neste trabalho.

Aos funcionários do Jardim Botânico Municipal “Chico Mendes” por terem auxiliado e permitido a coleta de sementes, com um abraço especial para o amigo André Olmos.

Também aos funcionários e estagiários do Jardim Zoobotânico de Franca, por terem cuidado tão bem do grande bosque de pau-brasil e terem permitido as coletas de sementes.

Aos antigos naturalistas pela inspiração.

E agora para três pessoas muito especiais pra mim. Verdadeiras amigas que eu descobri no Instituto de botânica e que sem elas este trabalho não teria sido possível.

Primeiramente, meus bons amigos Moacir Hellmann e Juliana Iura, duas pessoas que não mediram esforços em nenhum momento para me ajudarem, fosse feriado ou madrugada, chuva ou sol, com guloseimas ou sem guloseimas no laboratório. Sou muito grato.

E por último, mas muito especial pra mim, o bom amigo, confidente e logicamente meu orientador, Dr. Claudio José Barbedo, pela transparência, dedicação, ensinamentos e bons conselhos nos temas científicos e da vida. De todas as descobertas e conquistas obtidas no Instituto de Botânica, sua amizade foi sem dúvida a mais importante pra mim.

## SUMÁRIO

1. Introdução Geral .....	1
2. Objetivo Geral .....	10
3. Capítulo 1 – Maturation of seeds of <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. (brasilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest .....	11
Abstract .....	12
Introdução .....	12
Material e Métodos .....	14
Resultados e Discussão .....	16
Resumo .....	26
Referências Bibliográficas .....	27
4. Capítulo 2 – Maturação de sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. (pau-brasil) em três bosques plantados no estado de São Paulo .....	29
Abstract .....	30
Resumo .....	31
Introdução .....	32
Material e Métodos .....	34
Resultados e Discussão .....	42
Referências Bibliográficas .....	63
5. Capítulo 3 – Variations in sugars and cyclitols during development and maturation of seeds of brasilwood ( <i>Caesalpinia echinata</i> Lam., Leguminosae) .....	67
Abstract .....	68
Resumo .....	69
Introdução .....	71

Material e Métodos .....	73
Resultados .....	75
Discussão .....	83
Referências Bibliográficas .....	86
6. Discussão Geral .....	89
7. Conclusões Gerais .....	93
8. Referências Bibliográficas citadas na Introdução Geral e Discussão Geral .....	94
9. Resumo Geral .....	99
10. Abstract of Dissertation .....	101

## INTRODUÇÃO GERAL

Biodiversidade ou diversidade biológica são termos que têm sido exaustivamente utilizados pela sociedade brasileira, principalmente quando se referem aos biomas existentes no Brasil. Entretanto, o entendimento do real significado destes termos ainda é pouco claro, sendo pouco avaliado o importante papel das espécies, inter-relações, genótipos e ecossistemas que compõem esta diversidade.

Entre os biomas brasileiros, a Mata Atlântica destaca-se pela grande biodiversidade – uma das maiores do mundo. Contudo, como restam menos de 7,5% de sua cobertura original, este bioma é classificado como *hotspot*, por tratar-se de área com grande diversidade biológica, expressivo endemismo de plantas e com menos de 30% de sua cobertura vegetal original intacta (Mittermeier *et al.* 1999, Myers *et al.* 2000).

Bioma tropical de fisionomia uniforme, a Mata Atlântica teve um longo histórico de devastação iniciada na época do descobrimento do Brasil, com a exploração de diversas espécies vegetais e animais. Entre estas espécies, o pau-brasil (*Caesalpinia echinata*), utilizado para o tingimento de tecidos, foi extensamente removido por toda a sua área de ocorrência natural. Em tempos mais recentes, a espécie é apreciada por arquiteiros (fabricantes de arcos de violinos) de todo o mundo, pois sua madeira apresenta propriedades acústicas únicas (Rocha 2004, Angyalossy 2005).

A extração, o comércio e o tráfico dessa madeira foi o primeiro ciclo econômico da colônia recém formada devido ao interesse pelo corante encontrado em seu cerne, denominado brasilina, incolor naturalmente, mas quando em contato com o oxigênio do ar, se torna vermelho e recebe o nome de brasileína, muito utilizada na época para o tingimento de penas e algodão (Viana 1944 apud Rocha 2004).

Neste panorama da importância e da exploração do pau-brasil até os dias atuais, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento de ações que criem subsídios para permitir a reposição

desta espécie no bioma. Segundo Garay & Dias (2001), a reposição de uma espécie nas áreas de sua ocorrência natural está entre as responsabilidades da comunidade e dos órgãos públicos, bem como o gerenciamento destinado a avaliar, conservar e adequar a utilização de áreas de grande diversidade biológica. Contudo, mesmo com o grande esforço da comunidade científica, ainda são insuficientes as informações sobre diversas espécies.

O conhecimento dos aspectos biológicos de espécies vegetais do bioma da Mata Atlântica é um dos fatores necessários para subsidiar planos de conservação a curto e longo prazo. O pau-brasil apresenta um importante valor histórico para o país. Entretanto, hoje sua população está restrita a poucas áreas naturais e reservas experimentais (Bueno *et al.* 2002, Rocha 2004). Desta forma, o estudo desta espécie é importante para se criarem metodologias que possibilitem a sua reintrodução nas áreas remanescentes da Mata Atlântica, bem como fomentar planos de conservação.

Um importante aspecto da espécie é a manutenção da viabilidade de suas sementes. A qualidade das sementes decai rapidamente (Aguiar & Barbosa 1985) impossibilitando, por exemplo, a composição de bancos de germoplasma. Desta forma, para impedir a perda da viabilidade das sementes, antes do início do armazenamento é necessária a aplicação de técnicas adequadas, que requerem lotes de alta qualidade (Carvalho & Nakagawa 2000). Barbedo *et al.* (2002), que classificaram as sementes desta espécie como ortodoxas por suportarem além da dessecação até baixo conteúdo de água (7,6%), também o armazenamento por até 18 meses (81% de germinação), sugerem que este período pode ser ainda estendido se utilizados lotes de altíssima qualidade fisiológica.

O estudo de maturação permite identificar o momento ideal de coleta das sementes durante o seu processo de desenvolvimento e assim, a obtenção de lotes com boa qualidade, uma vez que é identificado o momento no qual as sementes estão realmente maduras e com o seu máximo vigor. Desta forma, novos resultados foram recentemente obtidos, como os de Hellmann *et al.* (2006), armazenando estas sementes por até 24 meses em temperatura de congelamento e obtendo, ao final desse período, elevada capacidade germinativa e de produção de plântulas normais.

*Caesalpinia echinata*

*Caesalpinia echinata* Lam., o pau-brasil, apesar de possuir valor histórico para o Brasil, já foi incluída na lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (Portaria IBAMA nº 37-N, de 3 de abril de 1992). Além do seu valor econômico atual para a confecção de arcos de violino, a espécie é reconhecida também como uma excelente árvore paisagística (Bueno *et al.* 2002, Barbedo *et al.* 2002), apesar de sensível, enquanto jovem, aos poluentes aéreos de grandes cidades (Bulbovas 2005). Pertencente à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae, também é conhecida, na linguagem tupi-guarani, como ibirapitanga (madeira vermelha). Sua altura varia bastante segundo os autores, entre 5 a 15 metros, com um tronco variando de 30 a 40 centímetros de diâmetro (DAP) e até 70 centímetros em grandes árvores. Apresenta acúleos resistentes, folhas compostas, bipinadas de 10 a 15 centímetros, com 3 a 7 pinas e de 8 a 21 folíolos (Cunha & Lima 1992, Lorenzi 1992, Lewis 1998, Rocha 2004).

A espécie tem distribuição natural restrita à costa oriental atlântica (floresta pluvial tropical atlântica) e ocorre de Pernambuco, segundo Lewis (1998) ou Rio Grande do Norte, de acordo com Cunha & Lima (1992) e Rocha (2004), ao Rio de Janeiro.

O período de floração, de uma forma geral em áreas *in situ* e *ex situ*, ocorre entre setembro e novembro, mas pode em algumas áreas naturais se estender até janeiro (Cunha & Lima 1992, Rocha 2004 e observações pessoais não publicadas). Essas variações podem estar relacionadas a diferenças ambientais específicas em cada região como temperatura e fotoperíodo ou, ainda, à variabilidade genética de cada população (Summerfield *et al.* 1997).

A espécie possui inflorescências com 15 a 40 flores (Lewis 1998). Os frutos, com 6 a 8 centímetros de comprimento e 2 a 3 centímetros de largura, são oblíquos, podendo ser mais largos no ápice. Suas sementes de coloração acastanhada, são normalmente planas e irregularmente orbiculares,

com 1 a 1,5 cm de diâmetro (Cunha & Lima 1992), presentes entre 1 a 2 sementes por fruto (Lewis 1998).

O pau-brasil pode ser considerada uma planta heliófila e resistente ao sol (Baroni 2005), mesmo em condições de clima seco e solo diferente do encontrado em seu bioma original, como no bosque plantado há 25 anos na região de Mogi-Guaçu, SP, em área de Cerrado, que apresenta indivíduos bem estabelecidos.

As primeiras experimentações científicas registradas sobre esta espécie datam de 1648, realizadas pelos holandeses Guillaume Piso e Georg Marcgrave (Cunha & Lima 1992). O seu uso medicinal é pouco conhecido, mas de acordo com Ramalho (1978) apud Cunha & Lima (1992), sua casca cozida pode aliviar flatulências e, em pó, pode fortalecer as gengivas.

Com relação a preservação ou conservação da espécie, iniciativas públicas e privadas foram feitas através da implantação de bosques homogêneos ou de unidades de conservação por toda a sua área de ocorrência natural e fora desta. Neste último caso, o Estado de São Paulo apresenta grande importância para a conservação *ex situ* de pau-brasil, pois dos oito jardins botânicos existentes no estado, seis conservam a espécie, além de outras instituições públicas e áreas privadas onde podem ser encontrados aglomerados de indivíduos jovens ou adultos da espécie. Estes locais não somente realizam a conservação da espécie mas, também, têm importância do ponto de vista botânico, histórico e simbólico (Rocha 2004).

Contudo, apesar de iniciativas para a conservação *ex situ* de uma espécie, como por exemplo, o cultivo dos próprios indivíduos em parques, jardins botânicos, agências internacionais, empresas, grupos comunitários ou outras áreas privadas, bem como o armazenamento de sementes em bancos de germoplasma (Frankel & Soulé 1992), são ainda insuficientes (Paiva 1999). A conservação *ex situ* pode e deve ser utilizada como reforço mútuo, complementando a conservação *in situ* (Botanic Gardens Conservation International 2001).

### *Maturação, qualidade inicial, armazenamento e carboidratos de sementes*

As sementes de *C. echinata* são consideradas de difícil manutenção da viabilidade durante o armazenamento, não suportando períodos superiores a três meses, mesmo quando armazenadas sob baixa temperatura (Aguiar & Barbosa 1985). Contudo, a partir de um lote selecionado e com teor de água reduzido a 7,6%, Barbedo *et al.* (2002) conseguiram armazenar estas sementes por até 18 meses e obter 80% de germinação. Hellmann *et al.* (2006) obtiveram resultados ainda superiores, mantendo sementes armazenadas por 24 meses e obtendo 67% de plântulas normais.

Além das condições do ambiente nas quais as sementes são armazenadas, outros fatores interferem na manutenção da viabilidade e na sua capacidade de conservação, dentre os quais, a qualidade fisiológica inicial assume especial importância. Esta qualidade depende, entre outros fatores, do estágio de maturação, que influencia a capacidade de armazenamento por períodos prolongados (Carvalho & Nakagawa 2000).

Assim, o reconhecimento da maturidade fisiológica das sementes, ou seja, o momento no qual as sementes atingem o máximo acúmulo de matéria seca, bem como maiores germinabilidade e vigor, torna-se fundamental para a obtenção de sementes de elevada qualidade (Piña-Rodrigues & Aguiar 1993, Carvalho & Nakagawa 2000). A colheita prévia a maturidade das sementes pode gerar lotes com sementes mal formadas e, conseqüentemente, com baixo vigor. Estas podem ter sua manutenção da viabilidade durante o armazenamento prejudicada ou, até, apresentar problemas durante a germinação, quer pelo incompleto desenvolvimento do eixo embrionário, quer pela falta de acúmulo de compostos de reserva necessários à germinação. Sementes de pepino (*Cucumis sativus*), por exemplo, mantiveram melhor viabilidade durante o armazenamento quando foram colhidas próximo a maturidade fisiológica, em relação às imaturas ou às armazenadas algum tempo no próprio fruto (Barbedo *et al.* 1999).

A maturidade fisiológica pode variar em diferentes populações de uma mesma espécie, visto que fatores genéticos, bióticos e abióticos são determinantes na maturação de sementes, sendo a temperatura um dos principais (Carvalho e Nakagawa 2000, Piña-Rodrigues & Aguiar 1993) e as vezes, devido a antese das flores de algumas espécies não ocorrer uniformemente na época de florescimento, são geradas sementes com diferentes graus de maturação em um mesmo indivíduo (Marcos Filho 2005).

Condições ambientais adversas em uma pequena população de cedro (*Cedrela fissilis*), por exemplo, podem ter sido determinantes no prolongamento do período de maturação das sementes segundo Corvello *et al.* (1999). Daws *et al.* (2004), por sua vez, observaram diferenças no tamanho final de sementes de *Aesculus hippocastanum* (castanheira da Índia) quando as plantas foram desenvolvidas sob diferentes temperaturas.

Quando a semente atinge máximo acúmulo de matéria seca e não mais recebe produtos da planta mãe, “desligando-se” desta, os níveis de água ainda estão elevados, podendo ocorrer rápida deterioração ou, em alguns casos, germinação na própria planta mãe (viviparidade). Para evitar estas ocorrências, a planta pode acionar vários mecanismos, que visam à redução na quantidade de água na semente (Carvalho & Nakagawa 2000, Marcos Filho 2005). Para frutos de pau-brasil, como em outras espécies que possuem frutos secos, a deiscência é o mecanismo utilizado (Lewis 1998).

A maturidade fisiológica pode ser identificado ou associado a índices práticos como coloração e dimensões de frutos e de sementes, teor de água e conteúdo de matéria seca de sementes (Piña-Rodrigues & Aguiar 1993, Carvalho & Nakagawa 2000). Alguns destes foram considerados eficientes, por exemplo, para sementes de *Dalbergia nigra* (Martins & Silva 1997), *Miconia cinnamomifolia* (Pereira & Mantovani 2001), *Calendula officinalis* (Silveira *et al.* 2002), *Tibouchina granulosa* (Lopes *et al.* 2005) e *Mimosa caesalpinifolia* (Alves *et al.* 2005).

Embora muitos autores concordem que o conteúdo de matéria seca das sementes seja um indicativo rápido e eficiente da maturidade fisiológica, nem sempre ele é eficiente, como verificado

para sementes de *Copaifera langsdorffii* (Barbosa *et al.* 1992), para a qual o teor de água nas sementes, os índices de velocidade de germinação e a mudança na coloração dos frutos para marrom escuro foram mais eficientes. Esta mudança na coloração poderia ser um indicador para dispersores pois, de acordo com Lorenzi (1992), esta espécie é dispersa por pássaros que se alimentam do arilo nutritivo que envolve parcialmente a semente.

A associação com a germinabilidade também é uma ferramenta interessante, conforme verificado por Astolfi *et al.* (1981) para sementes de *Coffea arabica* (café). Contudo, em algumas espécies são instalados um ou mais tipos de dormência nas sementes durante o processo de maturação e, por essa razão, pode haver dificuldades para avaliar e definir, corretamente, o momento em que as sementes adquirem a máxima capacidade de germinação (Carvalho & Nakagawa 2000, Castro *et al.* 2004). Aliás, características visuais como morfologia e mudanças na coloração dos frutos, para espécies florestais nativas, também têm sido apontadas como associações interessantes à maturidade fisiológica das sementes (Piña-Rodrigues & Aguiar 1993).

Durante a evolução das espécies tropicais algumas adquiriram a característica de sincronizar a maturidade fisiológica de suas sementes, com mudanças nas cores dos frutos, sugerindo uma ligação com a síndrome de dispersão, uma vez que poderia atrair potenciais animais dispersores (Piña-Rodrigues & Aguiar 1993). Em consenso a esta associação, verificam-se os dados obtidos por Hung (2003) para sementes de *Dalbergia cochichiensis* que apresentaram níveis diferentes de vigor para cada estágio de desenvolvimento, sendo sempre possível a associação a diferentes cores.

Corvello *et al.* (1999) verificaram em sementes de *Cedrella fissilis* (cedro) que a maturidade fisiológica, entre 29 e 31 semanas após a antese, coincidiu com a mudança na coloração dos frutos, que deixaram de ser verdes e tornaram-se marrom-esverdeados. No entanto, o momento ideal de coleta para obtenção de sementes foi próximo a deiscência natural (32 semanas), quando as sementes tiveram maior redução no seu teor de água.

O surgimento da camada negra nas sementes de milho doce aos 55 dias após a floração foi um excelente parâmetro para identificação da maturidade (Araújo 2006), assim como o surgimento de um anel lilás na calaza e o funículo na cor marrom em frutos de *Bixa orellana* (urucum), concomitantemente ao momento no qual a semente atingiu o máximo de matéria seca (Mendes *et al.* 2006).

Segundo Silva & Aguiar (1999), a mudança na coloração dos frutos de *Ocotea catharinensis* (canela-preta), ocorre antes da maturidade fisiológica das sementes, a qual é caracterizada pelo teor de água e conteúdo de matéria seca, indicativos estes práticos e confiáveis. Por outro lado, em frutos de *Eugenia pyriformis* (uvaia) e *E. involucrata* (cereja-do-mato), a mudança na coloração dos frutos ocorre após a maturidade das sementes, mesmo para estas espécies com frutos muito nutritivos e que são visitadas por diversos pássaros (Pratavieira *et al.* 2005).

Outros métodos alternativos e não destrutivos também são encontrados na literatura, como a utilização de gradientes de fluorescência da clorofila do tegumento em sementes de *Brassica oleracea* para a identificação de diferentes estádios de desenvolvimento da semente (Jalink *et al.* 1998).

Na semente em desenvolvimento ocorrem ainda modificações quantitativas e qualitativas nos carboidratos, proteínas e lipídeos, sintetizados e acumulados durante as fases de histodiferenciação e acúmulo de matéria seca no desenvolvimento e que constituirão as reservas nutritivas consumidas desde a manutenção, o desenvolvimento e a germinação do embrião, até o completo estabelecimento da plântula de forma autotrófica (Buckeridge *et al.* 2004a). Carboidratos como amido, alguns polissacarídeos de parede celular, sacarose e oligossacarídeos da série da rafinose (RFO), são os principais compostos de reserva das sementes, podendo ainda estes dois últimos grupos e mais os ciclitóis, estarem associados com a capacidade de tolerância a dessecação de sementes ortodoxas (Lin & Huang 1994, Obendorf 1997, Peterbauer & Richter 2001, Buckeridge *et al.* 2004b), adquirida durante o desenvolvimento e maturação da semente (Kermode 1990, Hoekstra *et al.* 2001), ou ainda no final deste processo (Castro *et al.* 2004).

A sacarose e oligossacarídeos da série da rafinose acumulados durante o desenvolvimento das sementes são propostos como importantes estabilizadores de membrana durante o processo de dessecação das sementes (Caffrey *et al.* 1988).

Sementes maduras de pau-brasil, tolerantes a dessecação, são compostas de 30-40% de amido e 10-15% de carboidratos solúveis, com predominância de sacarose, glicose, frutose, *myo*-inositol, galactosil ciclítóis e traços de rafinose e estaquiase (Garcia *et al.* 2006, Hellmann 2006). Reduções nos níveis de germinabilidade destas sementes submetidas a diferentes tipos de armazenamento podem estar relacionadas com a queda nos níveis de glicose e frutose em relação a sacarose (Garcia *et al.* 2006), mas ainda é desconhecido o momento no qual estes diversos tipos de açúcares são armazenados ou sintetizados na semente em desenvolvimento e quais poderiam de alguma forma estar relacionados com tolerância à dessecação de sementes de *Caesalpinia echinata*.

Estudos comparativos da maturação de sementes dessa espécie em diferentes regiões são também importantes, pois podem fornecer maiores subsídios à identificação do melhor momento de colheita de sementes de *C. echinata* e, ainda, verificar influências de diferentes fatores ambientais na formação dessas sementes.

## **OBJETIVO GERAL**

Analisar as modificações físicas e fisiológicas em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. durante o processo de maturação em bosques plantados no Estado de São Paulo sob condições ambientais diferentes, buscando estabelecer parâmetros para a identificação da maturidade fisiológica e comparar as principais diferenças e semelhanças entre estas modificações, bem como a composição de alguns carboidratos não estruturais durante o desenvolvimento destas sementes.

**CAPÍTULO 1**

**Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest**

Artigo publicado no periódico “Brazilian Archives of Biology and Technology”

Vol. 48, n. 6: pp. 851-861, November 2005

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

# Maturation of Seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an Endangered Leguminous Tree from the Brazilian Atlantic Forest

Igor F. Borges, João Del Giudice Neto, Denise A. C. Bilia, Rita de Cássia L. Figueiredo-Ribeiro and Claudio J. Barbedo\*

*Instituto de Botânica, Caixa Postal 4005, 01061-970, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: semente@estadao.com.br*

## ABSTRACT

*The present work describes changes during the maturation process of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. Individual flowers were tagged in the day of their anthesis and the pods were collected directly from the branches from 32 to 65 days after flowering (DAF). Results obtained suggested that physiological maturity of *C. echinata* seeds occurred ca. 60-65 DAF, immediately before shedding, when seeds had 30-40% water content.*

**Key words:** Harvesting, pau-brasil, pernambuco, physiological maturity, seed germination

## INTRODUCTION

*Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil, brazilwood, pernambuco) is one of the most important plant species in Brazil and has been included in the list of the Brazilian flora species at risk of extinction (Ibama, 1992), mainly due to its exploitation in the past. More recently, the idea of extremely predatory forest logging based on the brazilwood exploitation in the colonial period was not confirmed (Castro, 2002; Rocha, 2004).

Besides its current economical value for the violin bow manufacturing, this species is also an ornamental tree, commonly cultivated in streets or parks (Corrêa, 1974). It belongs to Leguminosae (Caesalpinioideae) and measures between 5 and 15m height (Lewis, 1998). The natural distribution of the species is restricted to the Atlantic Forest in the coast of Brazil, between Rio Grande do Norte and Rio de Janeiro (Aguiar and Aoki, 1983; Cunha and Lima, 1992; Rocha, 2004). Currently, the size of

---

\* Corresponding author

natural populations of this species is small (Cardoso et al., 1998; Rocha, 2004).

The flowering period of *C. echinata* growing in an experimental area in the state of São Paulo, Brazil, for about 24 years, is in August/September (at the beginning of the rainy season), the maturation of the fruits occurring in the spring and summer, as previously reported (Aguiar, 2001). The fruits are oblique, spiny, with 6-8cm length and 2-3cm width, sublunate dehiscent woody (Lewis, 1998) and contain 2-3 brownish seeds, with 1-1.5cm in diameter (Cunha and Lima, 1992). The valves of the pods twist after dehiscence, and their surfaces are pubescent with 5mm long woody spines intermixed (Lewis, 1998).

The seeds of *C. echinata* are chartaceous and exfoliate (Teixeira et al., 2004) and have been considered of short life span, not tolerating storage longer than 3 months, either under natural or controlled conditions (Aguiar and Barbosa, 1985). The presumably short life span had several technical implications in the past concerning seedling production (Ramalho, 1978; Aguiar and Barbosa, 1985). More recently, Barbedo et al. (2002) showed that it was possible to obtain up to 80% of germination after 18 months of storage under low temperatures, if the seeds were properly selected before storage and dried under controlled conditions. Teixeira et al. (2004) reported the presence of macrosclereides, fibres and paracytic stomata in the developing seed coat of *C. echinata*, the last feature being rarely found in legume seeds. According to these authors, the seed coat features may account for the low longevity of *C. echinata* seeds and their behaviour under storage.

Several factors may interfere in the maintenance of both seed viability and conservation, mainly its initial physiological quality. Among other factors, this quality depends on the maturation stage, being important to identify the physiological maturity to determine the best time for harvesting (Carvalho and Nakagawa, 1983). Early harvesting can result in immature and low vigour seeds. Thus, the conservation of the viability of such seeds can be harmed, either due to the incomplete development of the embryonic axis and/or to the availability of reserve compounds necessary for the germination and for the initial development of the seedlings. On the other hand, the harvesting of seeds after the point of physiological maturity can also result in accelerated seed deterioration, as the environmental conditions are often unfavorable to storage (Carvalho and Nakagawa, 1983; Mayer and Poljakoff-Mayber, 1982).

Considering the variations observed in the behaviour of seeds under storage and the little conclusive information about the best time for harvesting the seeds of *C. echinata*, the present work describes morphological and physiological changes during the maturation process of these seeds, in order to characterize their physiological maturity.

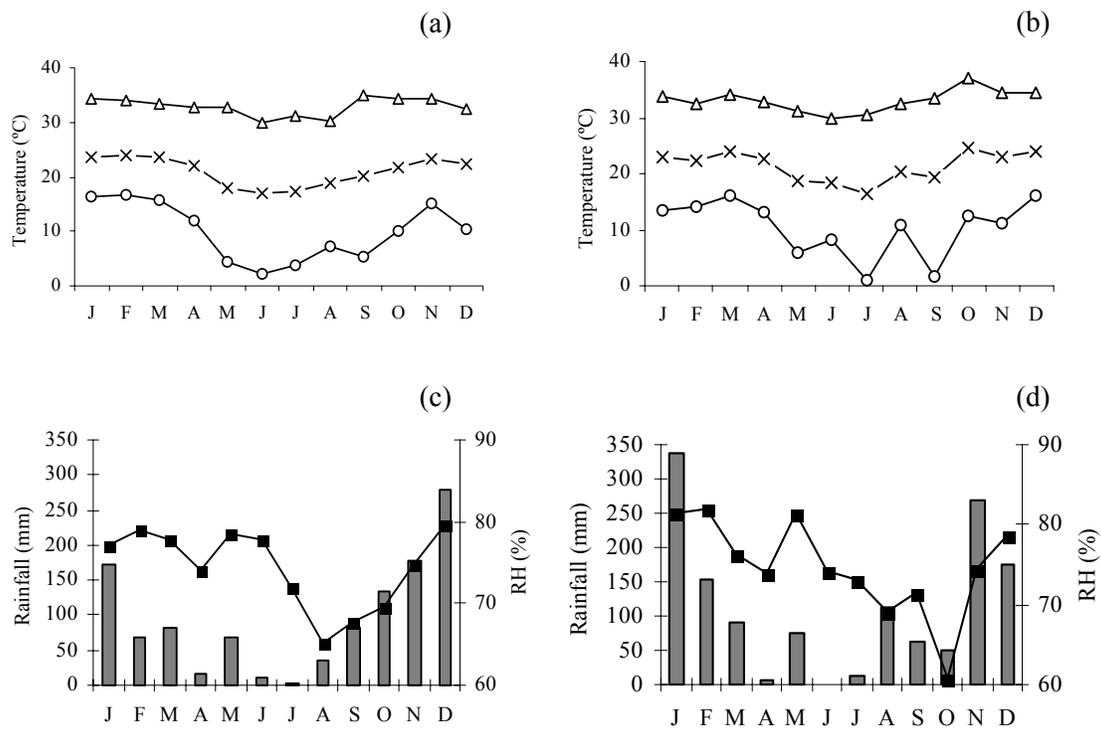
## MATERIAL AND METHODS

The collects were carried out during 2001 and 2002 in a homogeneous plantation (ca. 250 trees) located at the Biological Reserve and Experimental Station in Moji-Guaçu (22°15-16' S and 47°8-12' W), state of São Paulo, Brazil. Environmental data of the area are shown in Figure 1. During the flowering period (August/September), in both years, individual flowers were tagged on the day of their anthesis (9/Sep to 14/Sep and 21/Aug to 2/Sep, in 2001 and 2002, respectively). To analyse the main phases of seed development (Kermode, 1990), the pods were collected directly from the branches at 32, 40, 48, 52 and 59 days after flowering (DAF) in 2001 and at 40, 50, 60 and 65 DAF in 2002. Each sampling period was considered as a different stage of the seed development. Additionally, seeds were collected directly from the ground, not exceeding 24 hours after shedding, and were named recently-dispersed seeds.

Fruits (four replicates of 10) were analysed for external characteristics that included size (length, width and thickness) and aspects of spines and colour. The seeds (four replicates of 10) were removed from the pods by hand and their length, width and thickness were also registered before submitting them to evaluation of their physiological quality. Water content (% on a fresh weight basis) and the dry matter ( $\text{mg seed}^{-1}$ ) for each stage of maturity were determined (four replicates of 10 seeds) after oven drying at  $103^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  for 24h (Ista, 1985).

Germination tests were carried out by placing four replicates of 16 seeds in 11 x 11 x 3cm plastic boxes each containing two thick germination papers, moistened previously with distilled water, in germination chambers (Marconi MA400) at  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , under continuous light. Germination was evaluated every two days from the sowing day, by registering the protrusion of the primary root (until in the least 5 mm). After 20 days, the number of seedlings with both normal radicular system and shoots was registered.

The results were analysed by applying F-test (0.05) in an entirely randomized design, with four replications, adjusted for polynomial regression equations (Steel and Torrie, 1980).



**Figure 1.** Environmental data registered in Moji-Guaçu, SP, Brazil, in 2001 (*a* and *c*) and 2002 (*b* and *d*); *a* and *b*: Maximum (Δ), medium (X) and minimum (O) temperatures; *c* and *d*: rainfall (columns) and relative humidity (■). September: started the flowering; October: started the collects; November: finished the collectts.

## RESULTS AND DISCUSSION

Anthesis in 2002 started ca. 15 days earlier than in 2001. This could be related to differences in rainfall distribution between these years, from August to October (Fig 1). The first phase of seed development, which was characterized by histodifferentiation or embryogenesis, was studied in *C. echinata* by Teixeira et al. (2004). This phase was likely to have occurred before the first period analysed in the present work (32 DAF).

The external characteristics of fruits and seeds from phase II to III are shown in Table 1 and were based on Kermode (1990) that described development/dry mass accumulation of seeds, as phase II, and final maturation/drying, as phase III. From the initial stages of development (32 DAF) until 48 DAF, fruits were green-coloured and no substantial alterations were found during the whole period of observation. Fruits started turning brown-stained at 59 and at 60 days in 2001 and 2002, respectively. The natural dehiscence of the fruits occurred a few days after 59 DAF in 2001 and after 65 DAF in 2002, when they were brownish. Thus, dehiscence in 2002 took place a few days later than in 2001 and could be associated to environmental conditions, mainly the reduction in rainfall, relative humidity and minimum temperature in 2002 (Fig 1). These results corroborated general information of Lima et al. (2002), for which the period between flowering and shedding of *C. echinata* seeds was 60-70 days (one month from flowering to fruit and 30-40 days for ripening and seed dispersion).

The identification and characterization of the stage of maturation just before dehiscence of the fruits is important to obtain seeds of high vigour. Collecting seeds after dehiscence, when they have been subjected to uncontrolled environmental conditions, can result in seeds of low quality. Results presented in this work suggested that the colour of the fruits was a good indication of dehiscence. In both years 2001 and 2002, the change in the colour of the fruits occurred around 60 days after anthesis (Table 1), just before the dehiscence. Information concerning the association between the colour of the fruits and the stage of seed maturity, in tree species, is found in the literature, as reported for *Dalbergia cochichinensis* Pierre (Hung, 2003).

**Table 1.** External characteristics of pods and seeds of *Caesalpinia echinata* during maturation in 2001 and 2002.

Phase <sup>1</sup>	DAF <sup>2</sup>	Fruit characteristics	Seed characteristics
II	32-48	light green (pale green), spines green and flexible	light green, shining and with high flexibility
II	50-60	dark green to brownish green, brownish green woody spines	dark green to brownish green, brown or purple spots and with low flexibility
III	65-sh	brownish green to brown, brown to purple spots, dark brown woody spines	brownish green to brown, brown or purple spots, non-flexible

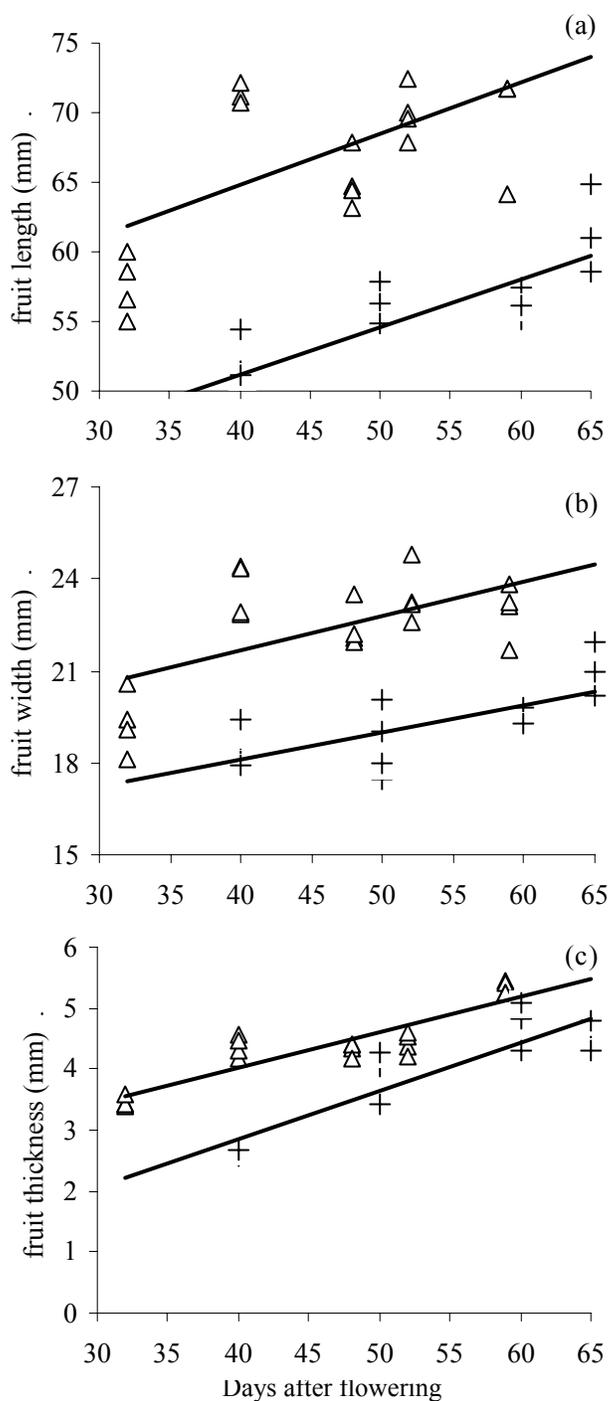
<sup>1</sup> Phase I: histodifferentiation (see Teixeira et al., 2004); phase II: development/dry mass accumulation; phase III: final maturation/drying. <sup>2</sup> Days after flowering (sh=shedding within 24 h).

The size of the pods, including length, width and thickness, in both 2001 and 2002 increased gradually during the analyzed period (Fig 2), being smaller in 2002, especially concerning to their length and width. This could be related to differences in environmental conditions, mainly the rainfall distribution and minimal temperatures in September and October, with both parameters being lower in 2002 than in 2001 (Fig 1). Even so, in both years of analysis, the length and the width of the fruits reached values reported by Lewis (1998) for *C. echinata*, which were 6-8cm and 2-3cm, respectively. The colour of the seeds followed the same pattern of changes observed in fruits, remaining greenish during most of the period of fruit development, and becoming brownish at 59-60 DAF (Table 1). At the end of the maturation period, some seeds presented purple spots on the surface.

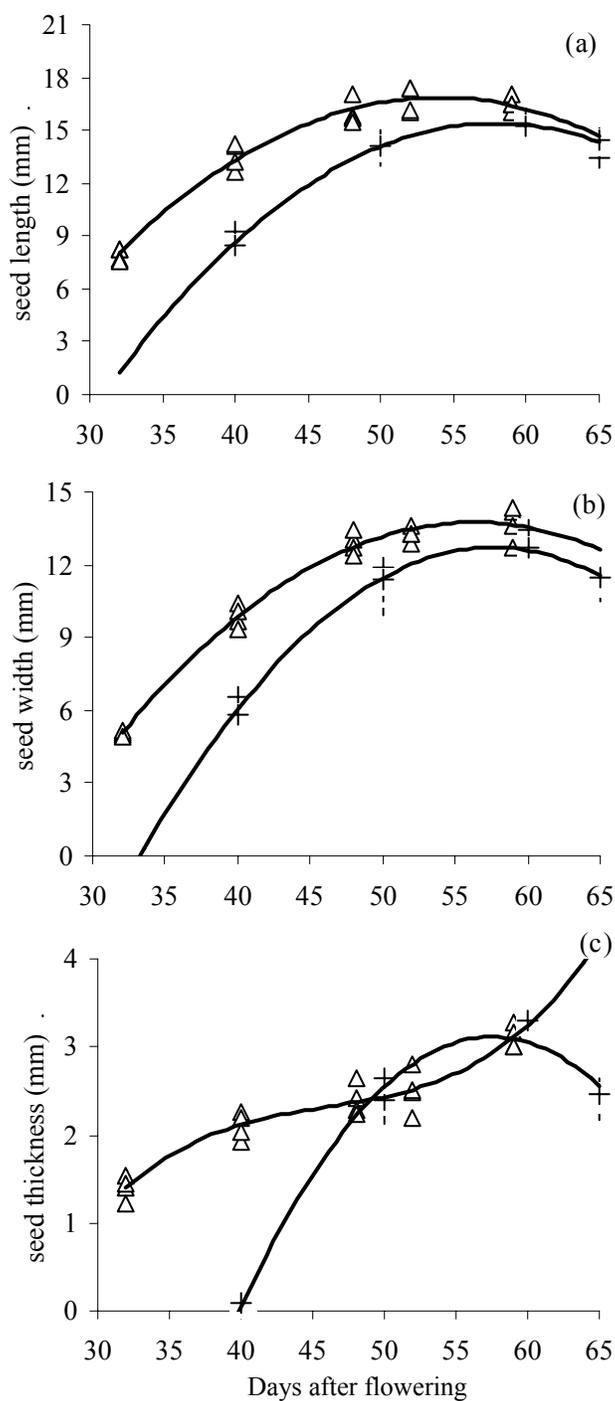
The size of the seeds presented similar pattern of development found in fruits. The width and the length reached maximal values at ca. 55 DAF (Fig 3, a and b) and thickness increased up to 59 DAF (Fig 3c). Differently from the fruits, the size of the seeds was very similar concerning both years of analysis, indicating a lower influence of environmental conditions. The influence of temperature on the development of seeds has been shown for several species. For example, the temperate woody perennial *Aesculus hippocastanum* growing under warmer conditions presented seeds larger than those under cooler temperatures (Daws et al., 2004). The physiological features analysed during maturation of *C. echinata* seeds followed the classical pattern described for orthodox seeds (Kermode, 1990).

The water content of seeds in both years of analysis (Fig 4a) decreased gradually from the beginning to the end of the maturation process. In 2001, the water content of the seeds was 76.8% (equivalent to 3.35g of water.g<sup>-1</sup> of dry mass) at 32 DAF, decreasing to 45.4% (0.82 g of water.g<sup>-1</sup> of dry mass) at 59 DAF (Fig 4a). The water content of recently-dispersed seeds (not exceeding 24 hours after shedding) was 13.7% (0.16 g of water.g<sup>-1</sup> of dry mass), a typical value for orthodox seeds (Roberts, 1973). Results suggest that as the seeds undergo maturing drying, there was a period of fresh weight loss as estimated by a decline in the values of the seed water content. In 2002, 40 DAF seeds presented water content of 72.2% (2.85 g of water.g<sup>-1</sup> of dry mass), a value that was reduced to 30.6% (0.45 g of water.g<sup>-1</sup> of dry mass) at 65 DAF (Fig 4a).

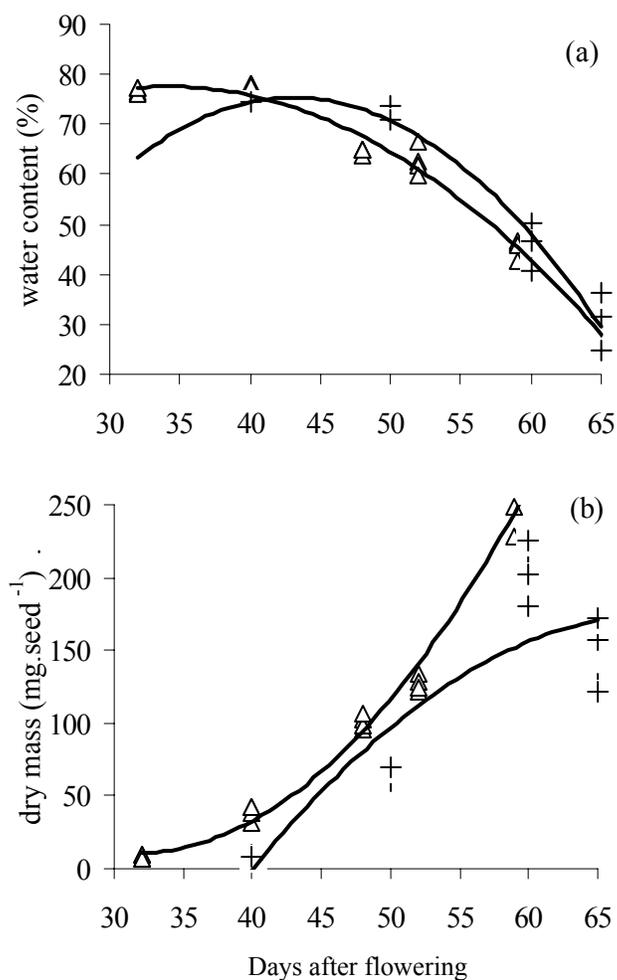
It was interesting to note that the values of water content in seeds from both years were very close at 59-60 DAF (0.83 and 0.84g.g<sup>-1</sup>, corresponding to 45.0% and 45.8%, Fig 4a). The regression analysis performed allowed to estimate the water content for seeds just before shedding, in both years, being ca. 30%. Thus, it could be assumed that the natural dehiscence of *C. echinata* pods, in Moji-Guaçu, took place just after the seeds reached 30% of water content on wet basis (0.43g.g<sup>-1</sup>).



**Figure 2.** Dimensions of fruits (a: length; b: width; c: thickness) of *Caesalpinia echinata* during the development and maturation in 2001 ( $\Delta$ ) and 2002 (+). Regressions ( $p < 0.05$ ):  $Y_{(a)\Delta} = 0.370X + 50.025$ ,  $r^2 = 0.34$ ,  $CV = 4.1\%$ ;  $Y_{(a)+} = 0.341X + 37.504$ ,  $r^2 = 0.59$ ,  $CV = 5.7\%$ ;  $Y_{(b)\Delta} = 0.113X + 17.150$ ,  $r^2 = 0.36$ ,  $CV = 4.5\%$ ;  $Y_{(b)+} = 0.089X + 14.511$ ,  $r^2 = 0.53$ ,  $CV = 4.2\%$ ;  $Y_{(c)\Delta} = 0.058X + 1.70$ ,  $r^2 = 0.81$ ,  $CV = 2.9\%$ ;  $Y_{(c)+} = 0.080X + 0.344$ ,  $r^2 = 0.77$ ,  $CV = 7.3\%$ .



**Figure 3.** Dimensions of *Caesalpinia echinata* seeds (a: length; b: width; c: thickness) during the development and maturation in 2001 ( $\Delta$ ) and 2002 (+).  $Y_{(a)\Delta} = -0.018X^2 + 1.968X - 36.266$ ,  $r^2 = 0.97$ ,  $CV = 4.4\%$ ;  $Y_{(a)+} = -0.021X^2 + 2.451X - 55.538$ ,  $r^2 = 0.96$ ,  $CV = 3.1\%$ ;  $Y_{(b)\Delta} = -0.0147X^2 + 1.658X - 32.915$ ,  $r^2 = 0.98$ ,  $CV = 4.3\%$ ;  $Y_{(b)+} = -0.021X^2 + 2.451X - 55.538$ ,  $r^2 = 0.98$ ,  $CV = 4.5\%$ ;  $Y_{(c)\Delta} = 0.0002X^3 - 0.028X^2 + 1.310X - 18.547$ ,  $r^2 = 0.93$ ,  $CV = 7.6\%$ ;  $Y_{(c)+} = -0.01X^2 + 1.147X - 29.877$ ,  $r^2 = 0.98$ ,  $CV = 5.2\%$ .

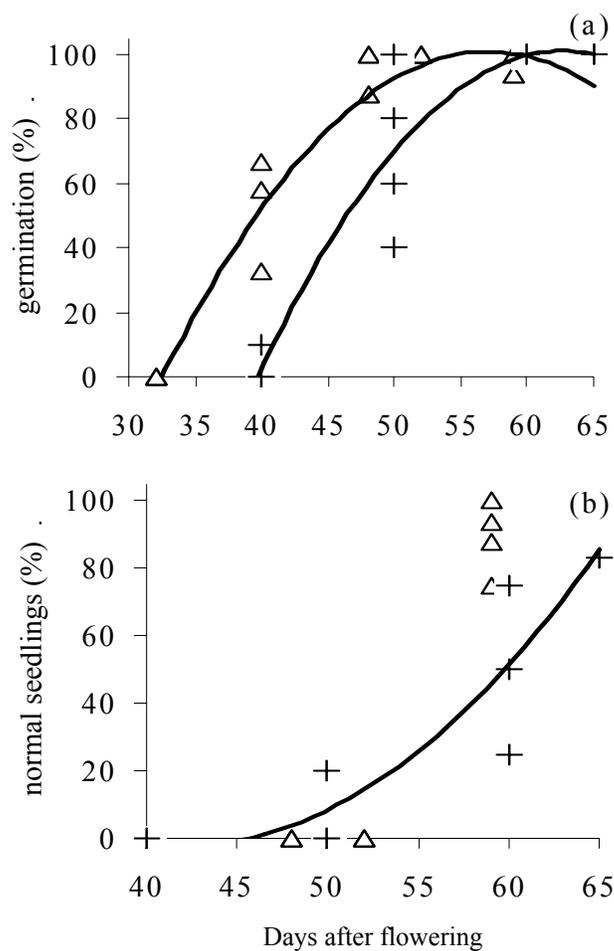


**Figure 4.** Water content (a) and dry matter (b) of *Caesalpinia echinata* seeds during the development and maturation in 2001 ( $\Delta$ ) and 2002 (+).  $Y_{(a)\Delta} = -0.052X^2 + 3.530X + 17.418$ ,  $r^2 = 0.96$ ,  $CV = 2.3\%$ ;  $Y_{(a)+} = -0.096X^2 + 8.243X - 102.32$ ,  $r^2 = 0.97$ ;  $CV = 14.0\%$ ;  $Y_{(b)\Delta} = 0.313X^2 - 19.811X + 324.340$ ,  $r^2 = 0.98$ ,  $CV = 8.0\%$ ;  $Y_{(b)+} = -0.194X^2 + 27.277X - 780.790$ ,  $r^2 = 0.78$ ,  $CV = 15.0\%$ .

Based on the results showed in this work, the colour of the fruits and both dimensions and water content of the seeds could be used to indicate the beginning of the dehiscence phase. This information might improve current technical recommendation for harvesting seeds of *C. echinata*, a practical management previously based exclusively on the natural dehiscence (Lorenzi, 1992). At the same time water content decreased, seed dry matter increased up to 59 DAF in 2001, reaching  $250.3\text{mg}\cdot\text{seed}^{-1}$ , and up to 65 DAF in 2002, reaching  $170.9\text{mg}\cdot\text{seed}^{-1}$  (Fig 4b). The wide variation found in seed dry matter between both years could be related to differences in environmental conditions, mainly rainfall and temperature (Fig 1), as discussed above. Indeed, Ellis et al. (2000) showed that ending irrigation early in rapid-cycling brassica plants resulted in earlier mass maturity, altered the time course of maturation drying and reduced final seed weight. Similar changes seemed to have occurred in *C. echinata* seeds in 2002, the lower rainfall and lower temperature probably reducing the final dry mass of the seeds.

The regression analysis performed to seed dry matter revealed an increase in both years 2001 and 2002, especially in the former. According to several authors, seeds can reach the physiological maturity when maximum values of dry matter are achieved (Carvalho and Nakagawa, 1983). In 2001 recently-dispersed seeds of *C. echinata* (collected up to 24 hours after dehiscence) presented dry matter content ( $295.5\text{mg}\cdot\text{seed}^{-1}$ , data not shown) higher than those found at 60 DAF (pre-dehiscence phase, Fig 4b), indicating that seed dry matter increased gradually up to the dehiscence of the fruits.

Seeds began to be able to germinate around 30-35 DAF in 2001 and 40 DAF in 2002. Germinability increased from these points to 55-60 DAF in 2001 and to 60-65 DAF in 2002 (Fig 5a). Normal seedlings have developed from seeds at 50 DAF in 2002, reaching maximum values at the end of the maturation period, that was 65 DAF (Fig 5b). In 2001 the percentage of normal seedlings from seeds collected at 59 DAF was higher than that observed in 2002 at the same stage of development (Fig 5b). The influence of water availability to development of seeds was shown by Ellis et al. (2000). They found that in rapid-cycling brassica plants, the reduction of irrigation diminished the time course of seed maturation, increasing the maximal quality of the seeds. The normal development of *C. echinata* seeds could be affected by the irregular distribution of rainfall recorded in 2002.



**Figure 5.** Germination (a) and normal seedling growth (b) of *Caesalpinia echinata* during the development and maturation in 2001 ( $\Delta$ ) and 2002 (+).  $Y_{(a)\Delta} = -0.168X^2 + 19.123X - 444.23$ ,  $r^2 = 0.91$ ,  $CV = 18.6\%$ ;  $Y_{(a)+} = -0.191X^2 + 23.972X - 650.700$ ,  $r^2 = 0.92$ ,  $CV = 19.3\%$ ;  $Y_{(b)+} = 0.169X^2 - 14.314X + 300.690$ ,  $r^2 = 0.90$ ,  $CV = 36.0\%$ .

Corroborating previous observations of Barbedo et al. (2002), recently-dispersed seeds presented lower germinability (77% and 91% of germination in 2001 and 2002, respectively, data not shown) and vigour (59% of normal seedlings, in both years, data not shown) than seeds collected before shedding (Fig 5). It is important to emphasize the fact that in both years, seeds at 40 DAF, presenting less than a third part of the amount of the final dry matter content (Fig 4b), were capable to germinate (40% in 2001 and 2% in 2002, Fig 5a). However, although seeds of *C. echinata* acquired the germination capacity very early in the maturation process, they were able to develop normal seedlings only very close to dehiscence.

According to Teixeira et al. (2004) the endosperm of *C. echinata* seeds is completely consumed during embryogenesis, thus characterizing an exendospermic seed. This process occurred probably during the histodifferentiation phase of the embryo that preceded the first stage of seed maturation (32 DAF) analysed in the present work. Therefore, the capacity to produce normal seedlings, not found in the early stages of seed maturation, was more related to the reserve deposition, in the expansion phase (Kermode, 1990), than to the histodifferentiation of the embryo. The analysis of the reserve compounds in cotyledons and embryo axis during maturation could contribute significantly to understand the process of seedling development from seeds at different stages of maturation.

One of the major factors influencing vigour and viability is physiological maturity of the seeds at harvest (Śliwińska, 2000) and this process is markedly affected by environmental factors, mainly temperature and water availability. Experiments with the leguminous white lupin and yellow lupin seeds indicated that the response of maturing seeds to environmental changes in temperature was associated to changes in the content and composition of soluble carbohydrates stored in those seeds (Górecki et al., 2001).

Results obtained for seed dimensions, water and dry matter contents, germination and seedling development suggested that physiological maturity of *Caesalpinia echinata* seeds occurred ca. 60-65 DAF, immediately before shedding. This short period between maturity and shedding is critical for obtaining lots of seeds with high physiological quality, affecting further the germinability and storability of the seeds (Barbedo et al., 2002). Conversely, harvesting premature seeds led to lower seed quality although they germinated (Fig 5a). Therefore, the precise characterization of the physiological maturity stage is crucial to define the best time for harvesting *C. echinata* seeds. In Moji-Guaçu, SP, Brazil, this time was reached when seeds had 30-40% water content, ca. 60-65 days after flowering.

Data reported in this article increase the information about an endangered species of the

Atlantic Forest and contribute to the protection of this environment, particularly concerning the Leguminosae flora, that is one of the richest and most important families of the tropics (Lewis, 1987 and 1998).

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

Thanks are due to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support (00/06422-4) and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for a scholarship to I.F. Borges, and fellowships to R.C.L. Figueiredo-Ribeiro and C.J. Barbedo. Thanks are also due to Mr O. Vieira for helpful advices in the English, to Dr M.A.M. Carvalho for the critical revision of the manuscript and to E. Pires, S. Barnuevo, A. Nogueira, S.J. Tonetti, J.A. Diniz and A.M. Barbosa for the help in taggeting flowers and collecting seeds.

## RESUMO

Sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. têm sido consideradas como de curta longevidade. Contudo, quando lotes são submetidos à seleção prévia ao armazenamento, é possível conservar sua viabilidade por até 18 meses. Considerando a falta de informações conclusivas quanto à melhor época de colheita dessas sementes, o presente trabalho descreve as modificações que ocorrem durante o processo de maturação das sementes. Flores foram etiquetadas no dia de sua antese e os frutos foram colhidos diretamente dos ramos dos 32 aos 65 dias após a antese (DAA). Sementes dispersas naturalmente por período não superior a 24 horas também foram coletadas, sendo designadas sementes recém-dispersas. As características externas e as dimensões (comprimento, largura e espessura) de frutos e sementes foram registradas. A avaliação da qualidade fisiológica das sementes foi baseada no teor de água, no conteúdo de matéria seca e na germinação. Os resultados sugerem que a maturidade fisiológica das sementes de *C. echinata* ocorreu por volta de 60-65 DAA, imediatamente antes da deiscência, quando as sementes tinham 30-40% de água.

## REFERENCES

- Aguiar, F. F. A. (2001), Fenologia do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) em Moji-Guaçu, SP. *Ecossistema*, **26**, 107-112.
- Aguiar, F. F. A. and Aoki, H. (1983), Regiões de ocorrência natural do Pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). *Silvicultura*, **28**, 1-5.
- Aguiar, F. F. A. and Barbosa, J. M. (1985), Estudo de conservação e longevidade de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). *Ecossistema*, **10**, 145-150.
- Barbedo, C. J.; Bilia, D. A. C. and 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**, 431-440.
- Cardoso, M. A.; Provan, J.; Powell, W.; Ferreira, C. G. and Oliveira, D. E. (1998), High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Molecular Ecology*, **7**, 601-608.
- Carvalho, N. M. and Nakagawa, J. (1983), *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. 2.ed. Fundação Cargill, Campinas.
- Castro, C. F. A. (2002), Gestão florestal no Brasil Colônia. PhD Thesis, University of Brasília, Brasília, Brasil.
- Corrêa, M. P. (1974), *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. v.5. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Brasília.
- Cunha, M. W. and Lima, H. C. (1992), *Viagem a terra do pau-brasil*. Agência Brasileira de Cultura, Rio de Janeiro.
- Daws, M. I., Lydall, E., Chmielarz, P., Leprince, O., Matthews, C. A., Thanos, C. A. and Pritchard, H. W. (2004), Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastanum* across Europe. *New Phytologist*, **162**, 157-166.
- Ellis, R. H., Sinniah, U. R. and John, P. (2000), Irrigation and seed quality development in rapid-cycling brassica. In-*Seed biology: advances and applications* ed. M. Black, K. J. Bradford and J. Vázquez-Ramos. CABI Publishing, Wallingford, pp.113-121.
- Górecki, R. J. (2001), Seed physiology and biochemistry. In-*Carbohydrates in grain and legume seeds* ed. C. L. Hedley. CABI Publishing, Wallingford, pp.117-143
- Hung, L.Q. (2003), Effect of maturation on seed germination of *Dalbergia cochichinensis* Pierre. *Seed Technology*, **25**, 124-127.

- Ibama (1992), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Brasil). Portaria 37N, de 3 de abril de 1992 ([www.ibama.gov.br](http://www.ibama.gov.br)).
- ISTA. (1985), International Seed Testing Association. International Rules for Seed Testing. *Seed Science and Technology*, **13**, 356-513.
- Kermode, A. R. (1990), Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **9**, 155-195.
- Lewis, G. P. (1987), *Legumes of Bahia*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Lewis, G. P. (1998), *Caesalpinia. A Revision of the Poincianella-Erythrostemon group*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Lima, H. C., Lewis, G. P. and Bueno, E. (2002), Pau-brasil: uma biografia. In-*Pau-brasil* ed. E. Bueno. Axis Mundi, São Paulo, pp.39-76.
- Lorenzi, H. (1992), *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Plantarum, Nova Odessa.
- Mayer, A. M. and Poljakoff-Mayber, A. (1982), *The germination of seeds*. 3.ed. Pergamon Press, Oxford.
- Ramalho, R. S. (1978), *Pau-brasil (Caesalpinia echinata Lam.)*. Imprensa Universitária da UFV, Viçosa. (Boletim de Extensão, 12)
- 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. PhD Thesis, University of São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Śliwińska, E. (2000), Analysis of the cell cycle in sugarbeet seed during development, maturation and germination. In-*Seed biology: advances and applications* ed. M. Black, K. J. Bradford and J. Vázquez-Ramos. CABI Publishing, Wallingford, pp.133-139.
- Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. (1980), *Principles and procedures of statistics*. 2ed. McGraw Hill, New York.
- Teixeira, S. P., Carmello-Guerreiro, S. M. and Machado, S. R. (2004). Fruit and seed ontogeny related to the seed behavior of two tropical *Caesalpinia* species (Leguminosae). *Bot. J. Linn. Soc.* (in press).

## CAPÍTULO 2

**Maturação de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) em três bosques  
plantados no Estado de São Paulo**

**ABSTRACT**

Maturation of Seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood) in three plantations in state of São Paulo - *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil, brazilwood, pernambuco) is one of the most important plant species in Brazil. Several factors may interfere in the maintenance of both seed viability and seed storage conservation, mainly its initial physiological quality. Among other factors, the quality of the seed depends on the maturation stage, being important to identify the physiological maturity to determine the best time for harvesting. The present work describes changes during the maturation process of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. in three different plantations in state of São Paulo. Individual flowers were tagged in the day of their anthesis and the pods were collected directly from the branches until 65 days after anthesis (DAA). Results obtained suggested that physiological maturity of *C. echinata* seeds occurred ca. 60-65 DAA, immediately before shedding, when seeds had 30-40% water content.

Key words: Harvesting, pau-brasil, pernambuco, physiological maturity, seed germination

## RESUMO

*Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) é uma das mais importantes espécies vegetais do Brasil. Muitos fatores podem interferir na manutenção da viabilidade e na conservação das sementes, principalmente sua qualidade fisiológica inicial. Entre outros fatores, esta qualidade depende do grau de maturação, sendo importante identificar a maturidade fisiológica com vistas a determinar o melhor momento para a colheita das sementes. O presente trabalho descreve as modificações que ocorrem durante o processo de maturação das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. em três diferentes locais do Estado de São Paulo, em bosques plantados. Flores foram etiquetadas no dia de sua antese e os frutos foram colhidos diretamente dos ramos até os 65 dias após a antese (DAA). Os resultados sugerem que a maturidade fisiológica das sementes de *C. echinata* ocorreu por volta de 60-65 DAA, imediatamente antes da deiscência, quando as sementes tinham 30-40% de água.

Palavras chave: pau-brasil, maturação de sementes, germinação de sementes.

## INTRODUÇÃO

*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae/Caesalpinioideae (pau-brasil) é espécie ameaçada de extinção (IBAMA 1992) devido à exploração de sua madeira, para extração de pigmentos durante a fase de colônia do Brasil e para a confecção de arcos de violino recentemente (Rocha 2004, Angyalossy 2005).

Com ocorrência natural restrita à floresta pluvial tropical atlântica (Mata Atlântica), entre os Estados do Rio Grande do Norte e Rio de Janeiro, a situação atual desta espécie é um dos exemplos de distúrbios causados a este bioma, pois atualmente é encontrada em seu habitat somente em algumas pequenas e poucas áreas da Mata Atlântica (Cunha & Lima 1992, Rocha 2004).

O florescimento ocorre entre setembro e janeiro (Rocha 2004), apresentando 15 a 40 flores por inflorescência (Lewis 1998), que produzem frutos oblíquos com 1 a 2 sementes de coloração acastanhada, normalmente planas e irregularmente orbiculares, que são dispersas devido a secagem das valvas dos frutos (Cunha & Lima 1992, Lewis 1998).

Suas sementes toleram redução do teor de água até 7,6% de água e, uma vez colhidas com elevada qualidade fisiológica e sanitária, podem ser armazenadas por até dois anos (Barbedo *et al.* 2002, Hellmann *et al.* 2006); assim há a possibilidade de inserção das sementes de pau-brasil em bancos de germoplasma, que é importante mecanismo para eventual reposição de espécies em seu bioma natural (Botanic Gardens Conservation International 2001).

Contudo, a obtenção de lotes de sementes com elevada qualidade depende de estudos de maturação, que possibilitam a identificação do momento ideal de colheita das sementes, freqüentemente quando a maturidade fisiológica é atingida (máximo acúmulo de matéria seca, alta germinabilidade e elevado vigor - Carvalho & Nakagawa 2000).

A colheita em momento anterior à maturidade fisiológica pode gerar sementes mal formadas e com baixo vigor, com reflexos na capacidade de armazenamento ou problemas na germinação, quer

pelo incompleto desenvolvimento do eixo embrionário, quer pela falta de acúmulo de compostos de reserva necessários à germinação. Por outro lado, a colheita após a maturidade fisiológica pode acarretar sua deterioração pela exposição a patógenos e a intempéries do campo (Popinigis 1977, Carvalho & Nakagawa 2000).

Apesar da utilização de índices práticos como, por exemplo, a aparência visual de frutos e de sementes, o teor de água e o conteúdo de matéria seca das sementes, sua porcentagem de germinação e seu vigor (Piña-Rodrigues & Aguiar 1993, Carvalho & Nakagawa 2000), diferenças decorrentes de fatores genéticos, bióticos e abióticos tais como temperatura, disponibilidade hídrica e fotoperíodo, são determinantes durante a maturação de sementes (Piña-Rodrigues & Aguiar 1993, Summerfield *et al.* 1997, Carvalho e Nakagawa 2000, Ellis *et al.* 2000, Daws *et al.* 2004).

Desta forma, considerando a ausência de informações conclusivas sobre o momento ideal de coleta de sementes de *Caesalpinia echinata*, o estudo avaliou as modificações físicas e fisiológicas destas sementes durante o processo de maturação em três bosques plantados no Estado de São Paulo, sob condições ambientais distintas, buscando caracterizar a maturidade fisiológica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Obtenção do material de estudo*

As sementes e frutos de *Caesalpinia echinata* Lam. utilizadas neste estudo foram coletadas em bosques homogêneos plantados e já estabelecidos, nos seguintes locais do Estado de São Paulo, conforme levantamento prévio desenvolvido por Rocha (2004):

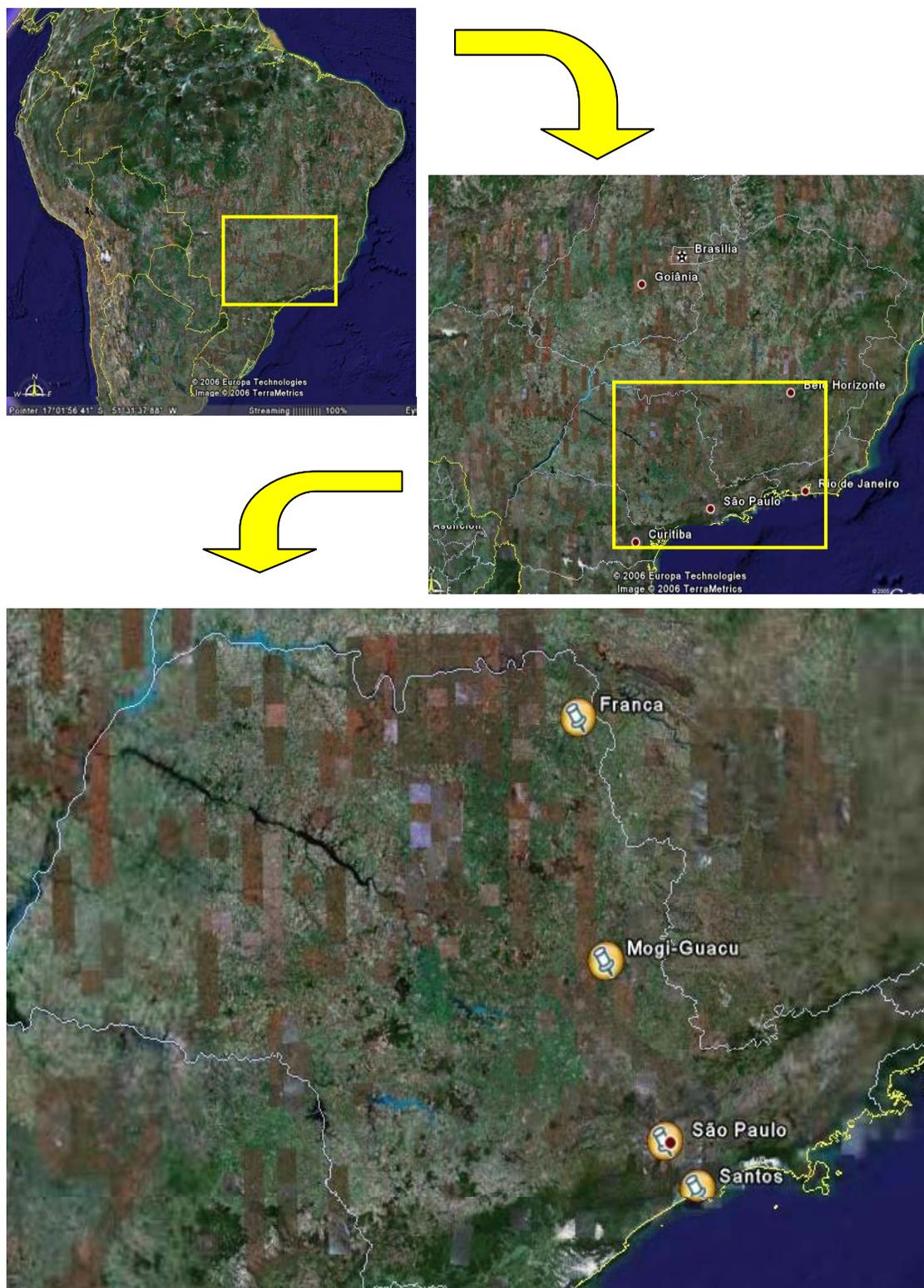
- *Jardim Botânico Municipal "Chico Mendes"*, no município de Santos (23°56'18,8"S e 46°22'21,7"W, altitude 0 metros), que tem 31 árvores com idade entre 15-21 anos e altura estimada entre 4-9 metros, das quais 7 foram utilizadas neste trabalho;

- *Jardim Botânico de São Paulo*, no município de São Paulo. (23°38'26,7"S e 46°37'26,5"W, altitude 792 metros), que tem 72 árvores com cerca de 7 anos e altura estimada entre 3-5 metros, das quais 12 foram utilizadas neste trabalho;

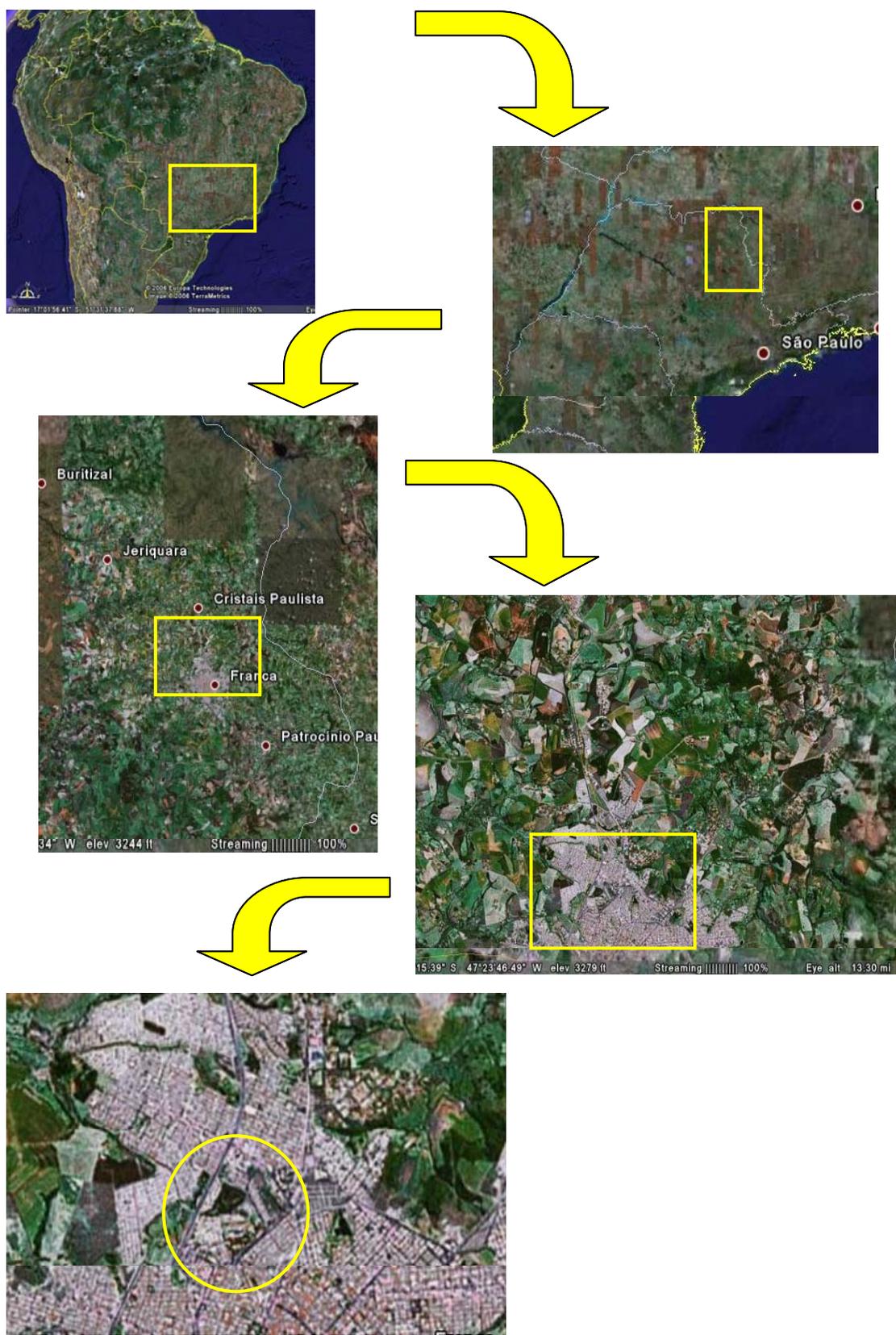
- *Jardim Zoobotânico de Franca*, no município de Franca (20°28'33,4"S e 47°24'18,5"W, altitude 923 metros), que tem 350 árvores com cerca de 5 anos e altura estimada entre 1,5-3,5 metros, das quais 30 foram utilizadas neste trabalho.

A localização geográfica no estado destes 3 municípios é apresentada na figura 1 e as localizações destas populações nas respectivas regiões são apresentadas nas figuras 2, 3 e 4.

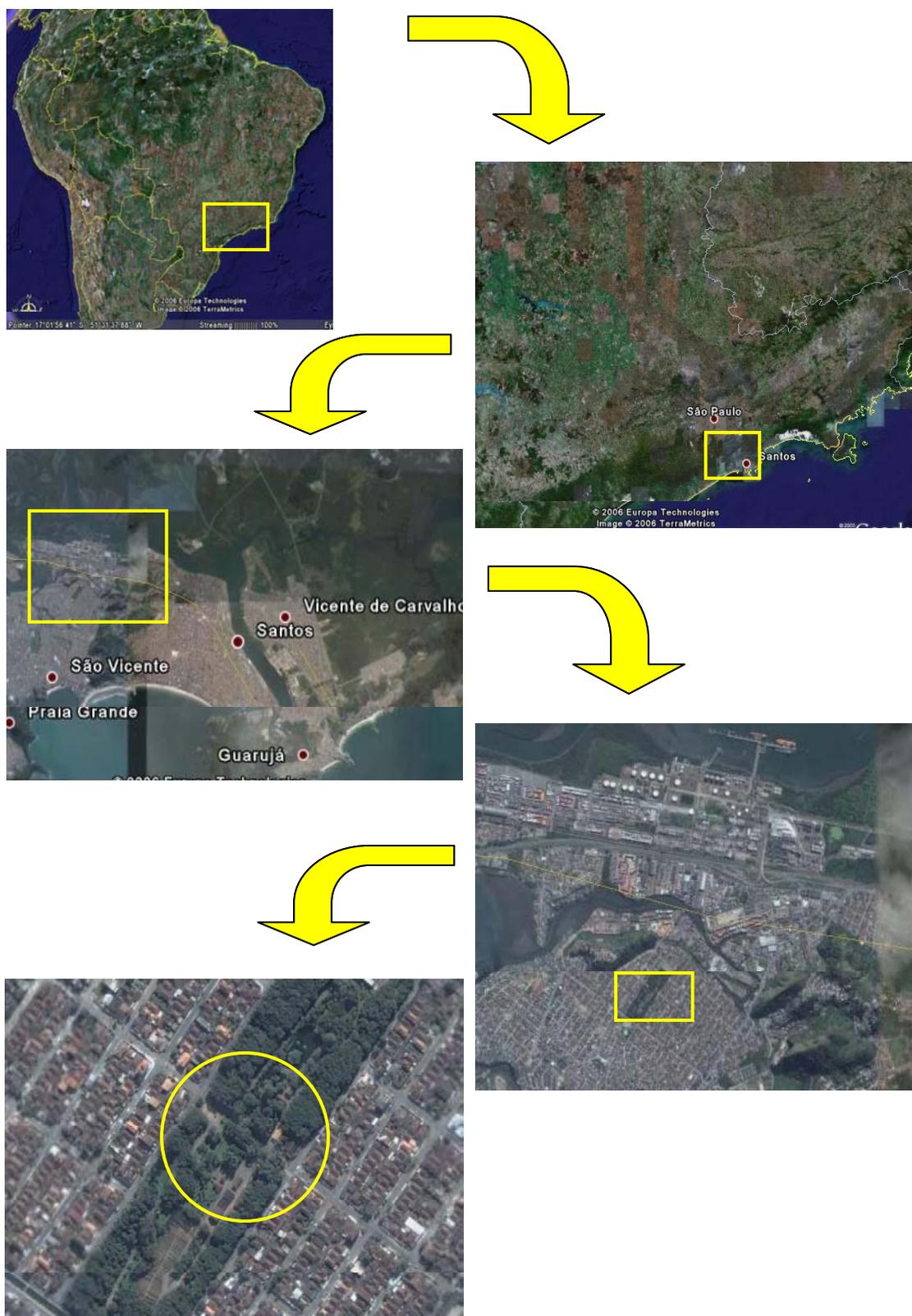
No ano de 2004, em São Paulo e Santos, e no ano de 2005, em Franca, durante 20 dias no período de máximo florescimento da espécie, foram marcadas inflorescências que apresentavam a maior parte das flores em antese.



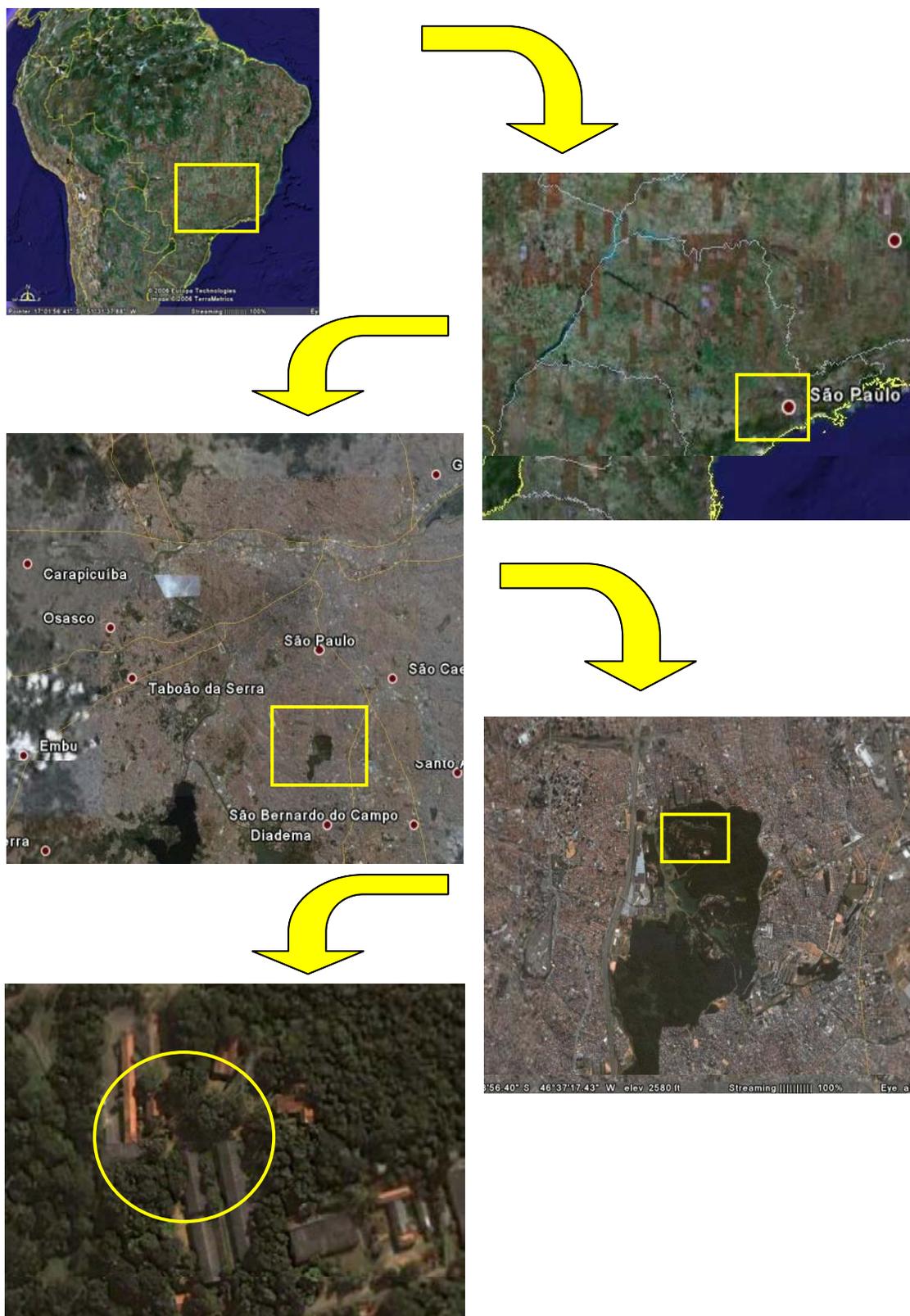
**Figura 1.** Foto de satélite das localizações geográficas dos municípios com bosques plantados de *Caesalpinia echinata* utilizados no presente estudo (Mogi-Guaçu, bosque utilizado no capítulo 1). Fonte: Google Earth, 2005.



**Figura 2.** Foto de satélite do Jardim Zoológico de Franca com bosque plantado de *Caesalpinia echinata*. Fonte: Google Earth, 2005.



**Figura 3.** Foto de satélite do Jardim Botânico Municipal “Chico Mendes” com destaque para o local com bosque plantado de *Caesalpinia echinata*. Fonte: Google Earth, 2005.



**Figura 4.** Foto de satélite do Jardim Botânico de São Paulo com destaque para o local com bosque plantado de *Caesalpinia echinata*. Fonte: Google Earth, 2005.

Os frutos foram colhidos aos 43, 50 e 60 dias após a antese (daa), em Santos aos 33, 41, 50 e 60 daa, em São Paulo, e aos 28, 35, 44, 53 e 60 daa, em Franca, que foram consideradas as idades de frutos e de sementes para as análises realizadas posteriormente. Para o estudo em São Paulo também foram obtidas, após cerca de 65-70 daa, sementes dispersas naturalmente sobre sombrite disposto sobre o substrato do bosque, por um período inferior a 24 horas, denominadas sementes recém-dispersas (rd).

Após as coletas o material vegetal foi transportado para o laboratório da Seção de Sementes e Melhoramento Vegetal do Instituto de Botânica de São Paulo, onde se realizou, imediatamente após a chegada, a abertura manual dos frutos (exceto para as sementes rd de São Paulo) e obtenção das sementes.

#### *Análise das características externas de frutos e sementes*

Durante o estudo de maturação registraram-se as características visuais externas dos frutos e de sementes e, com paquímetro digital, tomaram-se as dimensões de frutos (comprimento, largura medial, espessura medial e maior espessura – ponto com a maior semente) e de sementes (comprimento, largura e espessura), em quatro repetições de 10 unidades cada.

#### *Determinações da qualidade fisiológica das sementes*

O teor de água (expresso em porcentagem, com base na massa úmida, %<sub>bu</sub>) dos frutos e das sementes e o conteúdo de matéria seca das sementes (mg.semente<sup>-1</sup>) foram obtidos, para cada estágio de maturação através do método de estufa à 103 °C por 17 horas (Ista 1996), em quatro repetições de cinco a dez sementes cada, dependendo da disponibilidade de sementes em cada idade. Adicionalmente, para os materiais obtidos em Franca, também analisaram-se o teor de água e o conteúdo de matéria seca de cotilédones, de eixos embrionários e de tegumentos das sementes, separadamente.

O teste de germinação foi realizado em germinadores Marconi tipo MA400 com circulação interna de água, a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas e 100% UR, baseando-se em informações de Mello *et al.* (2004). As sementes foram colocadas em rolo de papel para germinação (Germitest), umedecidas previamente com água até sua saturação e escorrendo-se o excesso (Brasil 1992), em quatro repetições de 10 a 16 sementes cada, dependendo da disponibilidade de sementes em cada estágio. As leituras para este teste foram iniciadas a partir do segundo dia, em dias alternados, registrando-se as sementes germinadas (protrusão da raiz primária de no mínimo 5 mm), as plântulas com desenvolvimento normal (presença de sistema radicular e de parte aérea, ambos sem defeitos aparentes) (Barbedo *et al.* 2002) e plântulas vigorosas (plântulas com desenvolvimento normal e com mais de 5 cm do colo à extremidade do primeiro par de folhas primárias, no 20º dia contado a partir do início do teste). Foi calculado também o Índice de Velocidade de Germinação (IVG), através da adaptação da fórmula de Índice de Velocidade de Emergência (Maguire 1962), obtendo-se:  $IVG = (G_1/N_1) + (G_2/N_2) + \dots + (G_n/N_n)$ , onde  $G_1, G_2, G_n$  = número de novas sementes germinadas no dia de avaliação,  $N_1, N_2, N_n$  = número de dias após a sementeira.

Para análise comparativa entre o teor de água dos frutos e das sementes e a real energia e disponibilidade da água nestes tecidos, analisou-se também o potencial hídrico ( $\Psi$ , em MPa) dos frutos e das sementes nos diferentes estágios de maturação, por meio de medidor WP4 Dewpoint Potentiometer, da Decagon, o qual se baseia na temperatura do ponto de orvalho do ar quando em equilíbrio higroscópico com a amostra avaliada. Foram utilizadas quatro repetições de cinco a dez sementes cada. Adicionalmente, para os materiais obtidos em Franca, também se analisou o  $\Psi$  dos cotilédones, eixos embrionários e tegumentos das sementes, separadamente.

*Delineamento experimental e análise estatística*

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições em todos os testes. Os resultados foram submetidos à análise de variância empregando-se o teste F ao nível de 5%. Em seguida, para os resultados obtidos em Franca e São Paulo foram ajustadas regressões polinomiais (Steel & Torrie 1980), enquanto que para os resultados provenientes de Santos, devido ao menor número de estádios de maturação obtidos, compararam-se apenas as médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (Gomes 1982). Quando necessário para correção da normalidade e da heterogeneidade, os dados em porcentagem foram transformados para  $\text{arc sen } \sqrt{\%}$  (Santana & Ranal 2004).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Análise das características externas de frutos e sementes*

O início do florescimento de *Caesalpinia echinata* ocorreu primeiro em Franca, na segunda quinzena de agosto, seguido por São Paulo, na primeira quinzena de setembro e em Santos, na primeira quinzena de outubro. A diferença observada pode estar relacionada às variações das condições ambientais como, por exemplo, a pluviosidade, umidade relativa do ar e as temperaturas máxima, mínima e média.

A variação no início do florescimento de *C. echinata* pode ocorrer até em uma mesma região, de um ano para outro, conforme observaram Borges *et al.* (2005) em uma população de *C. echinata* plantada em área de cerrado. Segundo os autores a diferença observada de 15 dias no início do florescimento entre dois anos consecutivos pode estar relacionada à precipitação pluvial, pois no período com menor quantidade de chuvas o florescimento ocorreu 15 dias mais cedo.

A formação e a maturação das sementes podem ser agrupadas, didaticamente, em três fases: I - histodiferenciação ou embriogênese; II - desenvolvimento e acúmulo de matéria seca; III - maturação propriamente dita e a secagem da semente (Kermode 1990, Carvalho & Nakagawa 2000, Marcos Filho 2005). A fase I, identificada no primeiro mês após a formação do zigoto para *C. echinata*, foi estudada por Teixeira *et al.* (2004). No presente estudo verificou-se que as modificações morfológicas e fisiológicas ocorreram nas fases II e III.

Durante as fases II e III, predominou a coloração verde dos frutos de todas as populações avaliadas, com tonalidade mais clara e com acúleos flexíveis entre os 28 e 44 daa e mais escura, algumas vezes com pequenas manchas de coloração castanho claro, a partir dos 50 daa. No entanto, aos 60 daa os frutos já apresentavam grandes áreas com manchas castanhas ou estavam totalmente pigmentados por esta cor, inclusive seus acúleos que já se apresentavam rígidos (tabela 1).

**Tabela 1.** Características externas de frutos e de sementes de *Caesalpinia echinata* obtidos nos municípios de Franca, São Paulo e Santos durante o desenvolvimento e maturação.

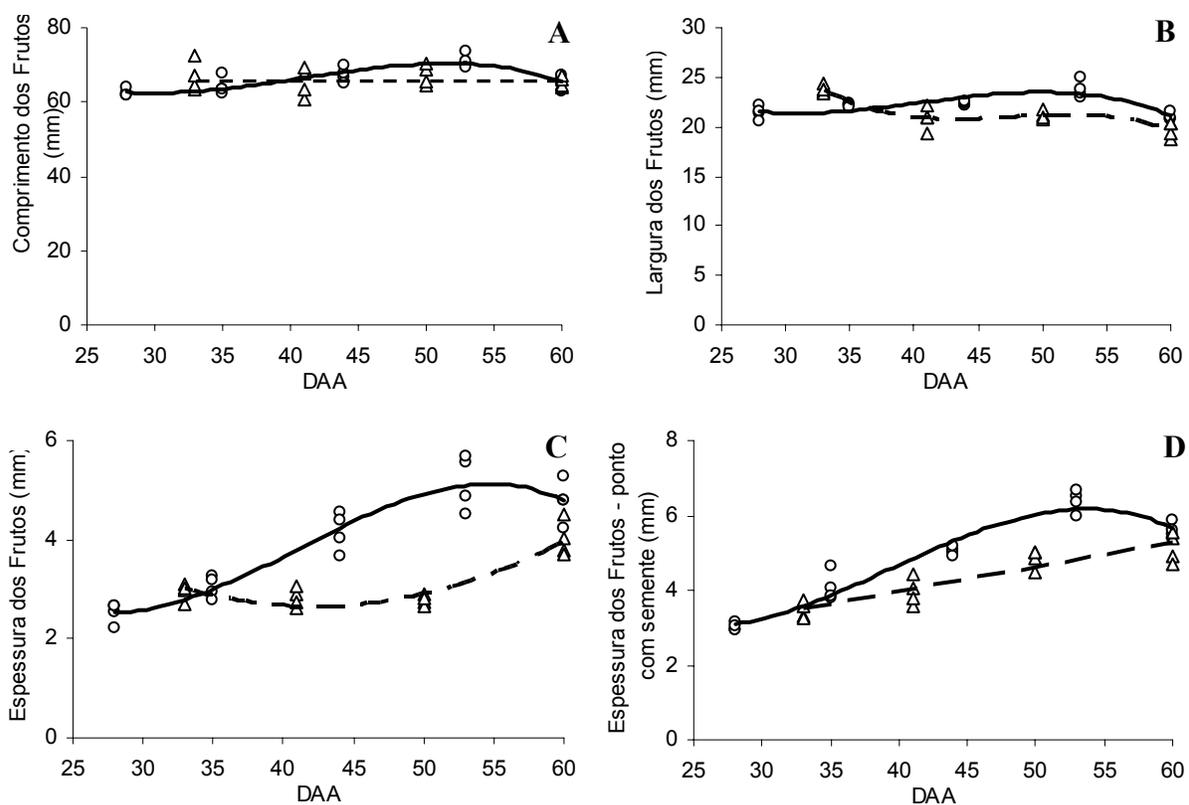
DAA <sup>1</sup>	Fase <sup>3</sup>	Características dos Frutos	Características das Sementes
28-44	II	Verde-claros, flexíveis, acúleos verdes e flexíveis	Verde-claras, brilhantes e bem flexíveis
50-60	II	Verde-escuros, pouco flexíveis, algumas manchas castanhas, acúleos verde-escuros ou castanhos e pouco flexíveis	Verde-escuras, pouco flexíveis e algumas vezes com manchas púrpuras ou castanhas
60-dn <sup>2</sup>	III	Castanhos, rígidos e com acúleos castanhos e rígidos	Pardas ou marrons, algumas vezes ainda com resquícios de verde-escuro, rígidas e com manchas púrpuras

<sup>1</sup> DAA: dias após a antese. <sup>2</sup> dn: dispersão natural em período inferior a 24 horas. <sup>3</sup> Fase I: Histodiferenciação (Teixeira *et al.* 2004); Fase II: desenvolvimento/acúmulo de matéria seca; Fase III: final da maturação/dessecação.

Em todas as populações avaliadas o comprimento dos frutos manteve-se constante desde os primeiros estádios avaliados (28 daa em Franca) até o momento anterior a dispersão, com valores entre 63 a 69 mm (figura 5 e tabela 2). Apesar de no final da maturação a largura dos frutos tenha sido próxima a 22,50 mm, esta característica apresentou variações entre as populações, pois, enquanto os frutos provenientes de Santos atingiram esta marca por aumento progressivo dos 43 aos 60 daa (tabela 2), em São Paulo ocorreu o comportamento inverso dos 33 aos 60 daa (figura 5), e em Franca a largura manteve-se praticamente inalterada. Contudo, apesar das diferenças significativas, as alterações em largura foram pouco pronunciadas desde a primeira época de coleta (28 daa). Estas dimensões dos frutos são concomitantes às reportadas por Lewis (1998) para a espécie, ou seja, 6-8 cm de comprimento e 2-3 cm de largura.

De uma forma geral, comparando-se a espessura medial em relação a espessura onde se alojava a maior semente, o comportamento entre estas duas variáveis foi praticamente o mesmo para cada uma das populações, variando cerca de 2,00 mm (figura 5 e tabela 2). Considerando esta similaridade, a espessura final dos frutos foi semelhante entre as populações, ou seja, aproximadamente 5,60 mm. No entanto, enquanto em Santos esta dimensão não apresentou mudanças no comportamento, para as outras duas populações, o máximo de espessura foi atingido após constante aumento do início ao final da maturação.

O fato das dimensões dos frutos atingirem valores máximos logo no início do processo de maturação, observado também em outras espécies como *Bixa orellana* (Mendes *et al.* 2006), poderia estar relacionado a um maior direcionamento de reservas da planta para a formação rápida do fruto, visto que em uma segunda etapa, esta estrutura formará as sementes em seu interior (Figueiredo 1996).



**Figura 5.** Dimensões (A: comprimento; B: largura; C: espessura; D: espessura no ponto com semente) dos frutos de *Caesalpinia echinata* obtidos nos municípios de Franca (○, linha cheia) e São Paulo (△, linha tracejada) durante o desenvolvimento e maturação. Regressões ( $p < 0,05$ ):  $Y_{(a)\circ} = -0,0016X^3 + 0,195X^2 - 7,394X + 151,642$ ,  $r^2 = 0,73$ ,  $CV = 2,75\%$ ;  $Y_{(a)\triangle} = 66,20$ ;  $Y_{(b)\circ} = -0,0006X^3 + 0,073X^2 - 2,792X + 55,560$ ,  $r^2 = 0,63$ ,  $CV = 2,49\%$ ;  $Y_{(b)\triangle} = -0,0012X^3 + 0,172X^2 - 8,116X + 147,74$ ,  $r^2 = 0,83$ ,  $CV = 3,58\%$ ;  $Y_{(c)\circ} = -0,0003X^3 + 0,032X^2 - 1,200X + 16,343$ ,  $r^2 = 0,90$ ,  $CV = 9,89\%$ ;  $Y_{(c)\triangle} = 0,004X^2 - 0,345X + 9,931$ ,  $r^2 = 0,82$ ,  $CV = 7,33\%$ ;  $Y_{(d)\circ} = -0,0003X^3 + 0,033X^2 - 1,122X + 14,973$ ,  $r^2 = 0,94$ ,  $CV = 5,08\%$ ;  $Y_{(d)\triangle} = 0,065X + 1,343$ ,  $r^2 = 0,83$ ,  $CV = 7,17\%$ .

**Tabela 2.** Dimensões (mm) de frutos e sementes de *Caesalpinia echinata*, obtidos no município de Santos durante o desenvolvimento e maturação.

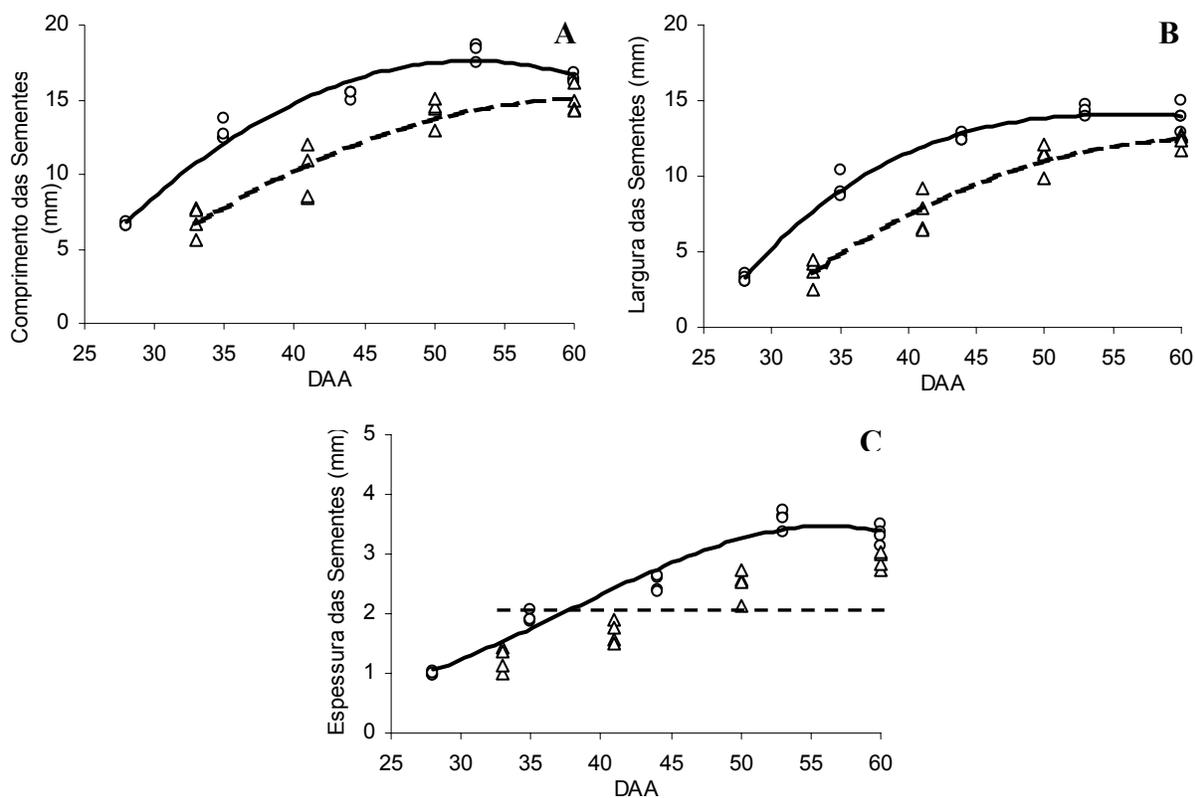
Variáveis	DAA			C.V. (%)
	43	50	60	
Comprimento dos frutos (mm)	63,97b	65,10b	68,83a	2,74
Largura dos frutos (mm)	21,27c	22,31b	23,52a	2,25
Espessura dos frutos (mm)	3,38b	4,32a	4,26ab	10,40
Esp. dos frutos - ponto com semente (mm)	5,35a	5,80a	5,60a	5,00
Comprimento das sementes (mm)	16,39a	17,07a	17,17a	3,16
Largura das sementes (mm)	14,06a	14,26a	13,47a	3,07
Espessura das sementes (mm)	3,23b	3,59a	3,32b	4,03

Médias dentro de cada variável, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

A mudança na coloração das sementes acompanhou, em todas as populações, o mesmo padrão encontrado nos frutos, mantendo-se verde claras durante quase todo o período de desenvolvimento, iniciando-se o escurecimento e o surgimento de algumas manchas violáceas somente a partir dos 50 daa, seguido da passagem para a coloração parda apenas aos 60 daa (tabela 1). A presença destas manchas violáceas não encontra, ainda, explicação conclusiva na literatura.

As sementes das populações de São Paulo e de Franca apresentaram evolução do comprimento e da largura semelhantes, com aumento progressivo nestas dimensões durante a maior parte do processo seguido por uma estabilização do crescimento na fase final da maturação, atingido aproximadamente 15,50 mm em comprimento e 13,00 mm em largura aos 60 daa (figura 6). Contudo, em Santos, apesar das sementes apresentarem valores um pouco superiores, ou seja, 17,17 mm em comprimento e 13,47 mm em largura, não houve diferenças significativas entre os diferentes estádios analisados (tabela 2). A espessura das sementes no final do processo de maturação não variou consideravelmente entre as populações e atingiu, em média, 3,00 mm. Contudo, em Santos e São Paulo essa dimensão final foi observada logo nas primeiras idades estudadas, em Franca houve aumento das primeiras às últimas épocas de coleta, quando então atingiram-se os mesmos níveis das outras duas populações (figura 6 e tabela 2).

A temperatura inadequada durante o processo de desenvolvimento das sementes tem sido apresentada como um fator estressante para a maioria das espécies vegetais. Daws *et al.* (2004), por exemplo, observaram a produção de sementes maiores de *Aesculus hippocastanum* quando estas plantas foram desenvolvidas dentro de condições mais quentes em relação a outras plantas sob condições mais frias. No entanto, as semelhanças observadas nas dimensões nas sementes de *C. echinata*, mesmo quando obtidas de diferentes populações sujeitas a condições climáticas diversificadas, indicam que o seu tamanho final foi pouco influenciado por estes fatores.

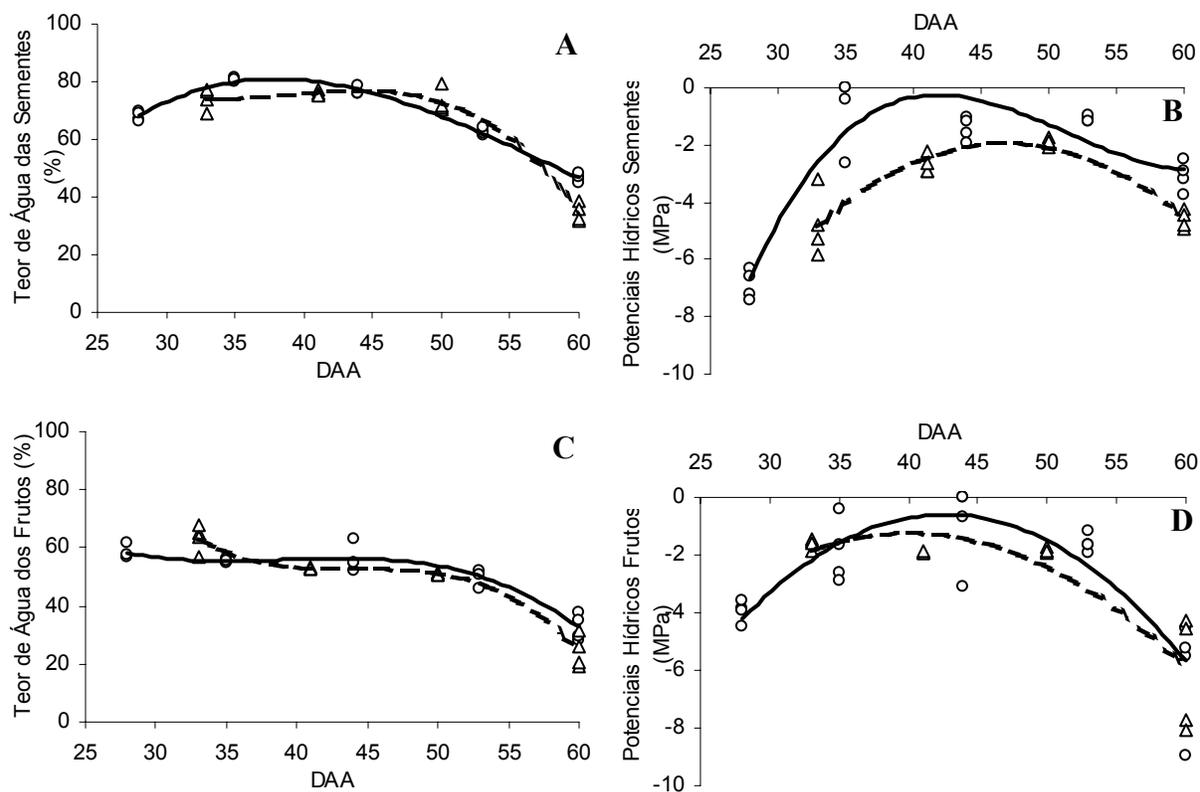


**Figura 6.** Dimensões (A: comprimento; B: largura; C: espessura) das sementes de *Caesalpinia echinata* obtidas nos municípios de Franca (○, linha cheia) e São Paulo (△, linha tracejado) durante o desenvolvimento e maturação. Regressões ( $p < 0,05$ ):  $Y_{(a)○} = -0,018X^2 + 1,873X - 31,659$ ,  $r^2 = 0,97$ ,  $CV = 3,00\%$ ;  $Y_{(a)△} = -0,010X^2 + 1,236X - 23,371$ ,  $r^2 = 0,89$ ,  $CV = 10,38\%$ ;  $Y_{(b)○} = 0,0003X^3 - 0,059X^2 + 3,564X - 57,470$ ,  $r^2 = 0,98$ ,  $CV = 5,20\%$ ;  $Y_{(b)△} = -0,010X^2 + 1,312X - 28,202$ ,  $r^2 = 0,94$ ,  $CV = 11,10\%$ ;  $Y_{(c)○} = -0,0001X^3 + 0,012X^2 - 0,343X + 3,498$ ,  $r^2 = 0,96$ ,  $CV = 4,84\%$ ;  $Y_{(c)△} = 2,07$ .

### *Determinações da qualidade fisiológica das sementes*

As características fisiológicas das sementes de *C. echinata* permitem classificá-las como sementes ortodoxas (Barbedo *et al.* 2002, Borges *et al.* 2005). Corroborando tal comportamento, o teor de água das sementes, em todas as populações avaliadas, reduziu lentamente do início da maturação até aproximadamente 45-50 daa, quando então apresentou queda mais rápida e contínua até o final do processo de maturação (figura 7 e tabela 3). Os teores de água atingidos pouco antes da dispersão natural das sementes, ao final da maturação, foram 46,4%, 36,5% e 34,7%, respectivamente para Franca, Santos e São Paulo. Esses valores reforçam a afirmação de Borges *et al.* (2005) de que as sementes de *C. echinata* são dispersas aos 65-70 daa, quando estão com teor de água próximo a 35-40%. Em São Paulo, único local onde foi possível obter sementes recém-dispersas, estas estavam com teor de água bem menor (16,7%), provavelmente pela exposição ao ar (Roberts 1973), ainda que por curto período.

Em virtude da obtenção de maior quantidade de sementes na população de Franca, os teores de água, e também potenciais hídricos e matéria seca, dos tegumentos, dos cotilédones e dos eixos embrionários, entre os 35 e 60 daa, também foram analisados (figura 8). O teor de água nestes três tecidos reduziu constantemente do primeiro estágio com 73,7%, 88,3% e 80,4% respectivamente para tegumentos, cotilédones e eixos embrionários, até o último, com 38,5%, 34,6% e 44,4 %. É interessante observar que o eixo embrionário mantém níveis mais altos de água em relação aos tecidos de reserva (cotilédone) e de proteção (tegumento).

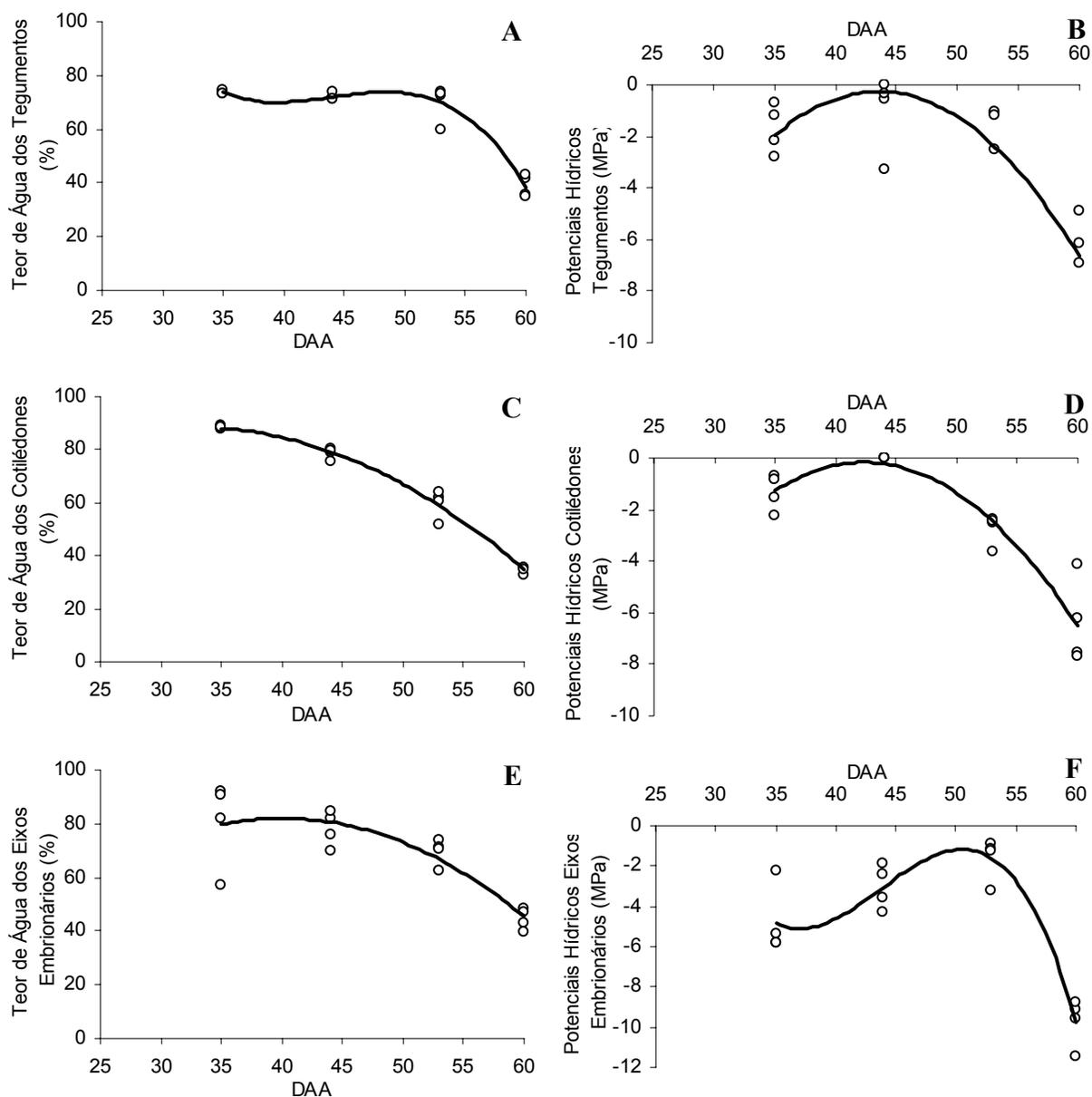


**Figura 7.** Teor de água de sementes (A) e frutos (C) e potenciais hídricos de sementes (B) e frutos (D) de *Caesalpinia echinata* obtidos nos municípios de Franca (O, linha cheia) e São Paulo ( $\Delta$ , linha tracejada) durante o desenvolvimento e maturação. Regressões ( $p < 0,05$ ):  $Y_{(a)O} = 0,0019X^3 - 0,324X^2 + 16,556X - 182,114$ ,  $r^2 = 0,99$ , CV = 2,05%;  $Y_{(a)\Delta} = -0,0055X^3 + 0,648X^2 - 25,004X + 391,587$ ,  $r^2 = 0,97$ , CV = 5,19%;  $Y_{(b)O} = -0,0029X^3 + 0,337X^2 - 13,049X + 222,099$ ,  $r^2 = 0,91$ , CV = 6,85%;  $Y_{(b)\Delta} = -0,0073X^3 + 0,977X^2 - 43,371X + 693,952$ ,  $r^2 = 0,95$ , CV = 7,62%;  $Y_{(c)O} = -0,0008X^3 + 0,121X^2 - 6,007X + 97,075$ ,  $r^2 = 0,84$ , CV = 25,16%;  $Y_{(c)\Delta} = 0,015X^2 - 1,410X + 34,987$ ,  $r^2 = 0,82$ , CV = 17,85%;  $Y_{(d)O} = 0,017X^2 - 1,439X + 31,287$ ,  $r^2 = 0,71$ , CV = 42,43%;  $Y_{(d)\Delta} = 0,012X^2 - 0,957X + 20,463$ ,  $r^2 = 0,77$ , CV = 35,07%.

**Tabela 3.** Teores de água (% BU) e potenciais hídricos (MPa) de frutos e sementes e conteúdo de matéria seca (mg.semente<sup>-1</sup>) de sementes de *Caesalpinia echinata*, obtidos no município de Santos durante o desenvolvimento e maturação.

Variáveis	DAA			C.V. (%)
	43	50	60	
Teor de água das sementes (% BU)	63,5a	62,3a	36,5b	4,94
Teor de água dos frutos (% BU)	48,7a	48,5a	22,1b	2,34
Potencial hídrico das sementes (MPa)	-2,1b	-2,0b	-7,5a	43,92
Potencial hídrico dos frutos (MPa)	-2,4b	-2,3b	-13,7a	12,18
Matéria seca das sementes (mg.semente <sup>-1</sup> )	161,75b	194,00b	308,67a	11,83

Médias dentro de cada variável, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 8.** Teor de água de tegumentos (A), cotilédones (C) e eixos embrionários (E) e potenciais hídricos de tegumentos (B), cotilédones (D) e eixos embrionários (F) de sementes de *Caesalpinia echinata* obtidas no município de Franca (O) durante o desenvolvimento e maturação. Regressões ( $p < 0,05$ ):  $Y_{(a)} = -0,0105X^3 + 1,384X^2 - 60,166X + 934,205$ ,  $r^2 = 0,95$ ,  $CV = 6,21\%$ ;  $Y_{(b)} = -0,072X^2 + 4,702X + 11,574$ ,  $r^2 = 0,98$ ,  $CV = 4,64\%$ ;  $Y_{(c)} = -0,092X^2 + 7,392X - 66,264$ ,  $r^2 = 0,74$ ,  $CV = 13,56\%$ ;  $Y_{(d)} = 0,023X^2 - 2,048X + 44,850$ ,  $r^2 = 0,73$ ,  $CV = 52,19\%$ ;  $Y_{(e)} = 0,020X^2 - 1,727X + 36,737$ ,  $r^2 = 0,89$ ,  $CV = 36,23\%$ ;  $Y_{(f)} = 0,0032X^3 - 0,419X^2 + 17,916X - 245,459$ ,  $r^2 = 0,88$ ,  $CV = 27,07\%$ .

O período de dessecação nas sementes ortodoxas ao final do processo de maturação, na Fase III, é importante, pois a redução do metabolismo da semente a torna menos susceptível à deterioração e ao ataque de patógenos. Sua viabilidade é prolongada, além de permitir que processos fisiológicos anteriormente voltados ao acúmulo de reservas durante o desenvolvimento sejam modificados para processos voltados ao estabelecimento da capacidade germinativa ou dormência na semente. Durante o processo evolutivo esta característica provavelmente foi selecionada nas sementes que deveriam atravessar períodos com condições ambientais inadequadas ao crescimento de suas plântulas e, desta forma, deveriam entrar em um processo de redução máxima do metabolismo (Barbedo & Marcos Filho 1998 e referências incluídas).

O teor de água dos frutos apresentou o mesmo comportamento de perda de água observado nas sementes, mas com valores inferiores, ou seja, partindo de 50,0 % de água e terminado com 25,0 % de água em média para os três locais (figura 7 e tabela 3).

As modificações nos teores de água de sementes e de frutos têm sido utilizadas como parâmetros adequados para caracterizar o estágio de maturação (Carvalho & Nakagawa 2000). No entanto, a quantidade de água presente na semente não necessariamente representa o estado energético dessa água (Vilela & Marcos Filho 1998). De fato, no presente estudo, os resultados observados para potencial hídrico, tanto das sementes quanto dos frutos das populações avaliadas, não acompanharam a mesma tendência dos valores de teor de água durante as diferentes fases de desenvolvimento (figura 7 e tabela 3).

Apesar do teor de água elevado das sementes no início da maturação (figura 7 e tabela 3), os potenciais hídricos encontravam-se inicialmente a -6,9, -4,8 e -2,1 MPa para Franca, São Paulo e Santos, respectivamente (figura 7 e tabela 3). Nas sementes de Franca, que apresentaram mais elevados teores de água (80,4 %), também apresentaram valores mais negativos no potencial hídrico. Verifica-se assim que, para sementes de *C. echinata*, durante o período de maturação, a grande quantidade de água no início do desenvolvimento não implica, necessariamente, em grande

disponibilidade de água livre para a semente, talvez pelas constantes reações com diversos solutos durante a formação dessas sementes.

A população de Santos novamente apresentou valores iniciais diferentes em relação às outras duas populações, mas que novamente podem ser justificados pelo estágio de desenvolvimento mais avançado (43 daa). Observando-se o mesmo período em Franca e São Paulo, de acordo com as regressões, verificamos valores também bastante elevados, chegando próximos a 0 MPa (Franca). Modificações nos potenciais hídricos das sementes, de valores mais negativos no início da maturação em sentido a valores menos negativos entre os 40-50 daa, indicam maior quantidade de água disponível para as reações metabólicas neste estágio de maturação, momento este que o teor de água nas sementes encontra-se também elevado, mas com valores ainda próximos ao observado no início da maturação (figura 7). Avançando na maturação, o potencial hídrico decai para valores novamente mais negativos, atingindo nos últimos estádios analisados os valores de -7,5, -4,6 e -3,1 MPa em Santos, São Paulo e Franca, respectivamente (figura 7 e tabela 3), acompanhando, concomitantemente, a acentuada dessecação das sementes na Fase III. Em São Paulo, sementes recém-dispersas que apresentavam 16,7 % de água possuíam potencial hídrico extremamente negativo, ou seja, -54,5 MPa. Delgado (2006) verificou em sementes maduras de diferentes espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) a mesma correlação positiva entre os potenciais hídricos e os teores de água, reduzidos por processo de secagem.

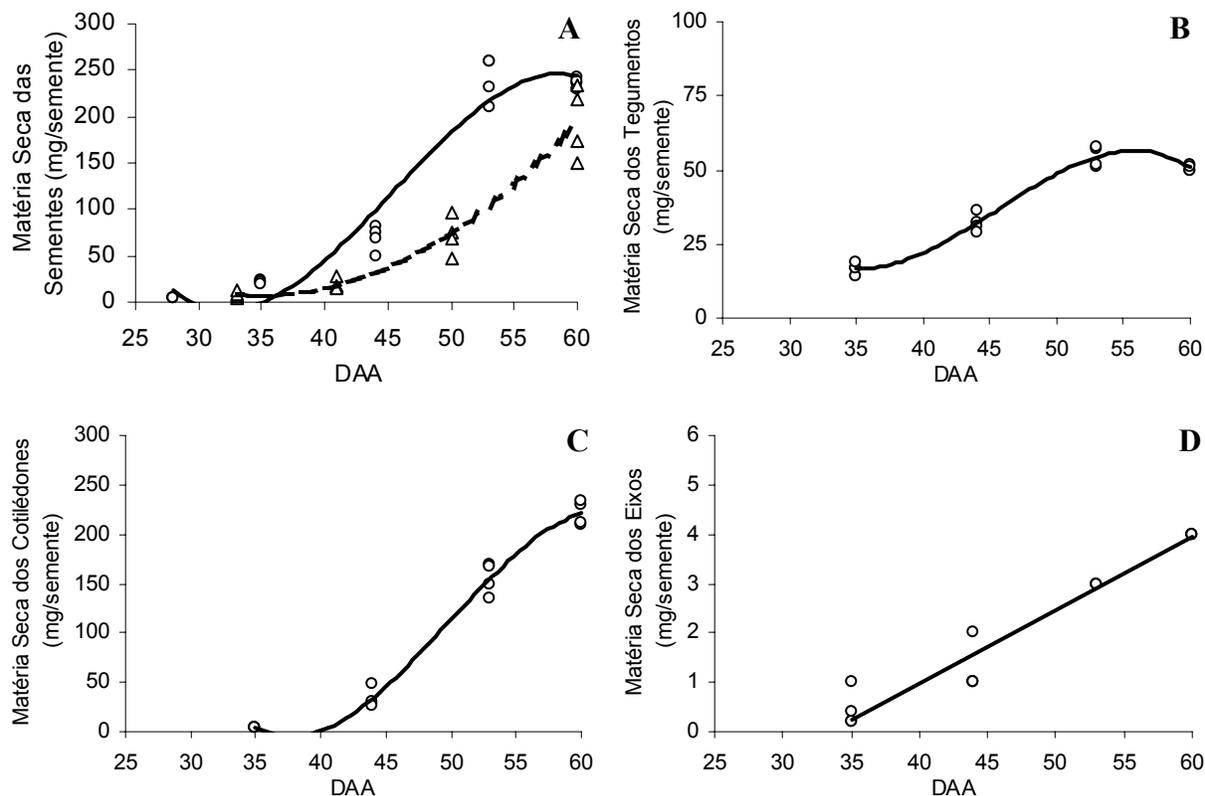
Em Franca, de uma forma geral, os potenciais hídricos dos tegumentos, cotilédones e eixos embrionários, no período analisado, apresentaram o mesmo comportamento observado nas sementes íntegras, ou seja, inicialmente menor disponibilidade hídrica, seguida por maior disponibilidade hídrica entre os 40-50 daa e, novamente, a posterior redução até o final da maturação (figura 8). No entanto, a fase de maior disponibilidade hídrica para o eixo-embrionário ocorreu 5 dias após (45-55 daa) em relação aos outros dois tecidos. Estes tecidos também apresentaram ao final do processo de

maturação, valores mais negativos de potencial hídrico em relação às sementes íntegras, chegando a -9,7 MPa nos eixos embrionários.

Nos frutos, de acordo com as regressões polinominais, os potenciais hídricos repetiram o comportamento anteriormente descrito, para as populações (figura 7). Contudo, os valores iniciais dos potenciais hídricos foram menos negativos em relação aos mesmos estádios avaliados nas sementes, mas aos 40-50 daa iniciou-se uma inversão nesta relação que se manteve até o final do processo de maturação em todas as populações, ficando os frutos com valores mais negativos de potencial hídrico (figura 7 e tabela 3).

Quanto mais negativo é o potencial hídrico em um sistema aquoso, menor será também a disponibilidade de água nesse sistema. Quando dois sistemas aquosos são separados por uma membrana permeável, ocorrerá sempre a migração da água do potencial hídrico mais elevado para o mais baixo ou negativo, buscando-se o equilíbrio energético entre os sistemas (Larcher 2000, Castro *et al.* 2004). A inversão nos potenciais hídricos entre os frutos e sementes a partir dos 40-50 daa, pode permitir a perda de água das sementes (figura 7 e tabela 3), com base no princípio acima descrito, através da migração desta para os frutos de forma passiva, uma vez que ao apresentar potencial hídrico inferior à semente neste período, o fruto poderia absorver a água das sementes por diferenças no potencial hídrico.

O conteúdo de matéria seca das sementes aumentou progressivamente do início ao final do processo de maturação, entretanto com valores finais bem distintos entre as 3 populações (figura 9 e tabela 3). Em Santos foram observadas aos 60 daa, sementes mais pesadas, com 308,67 mg.semente<sup>-1</sup>. Com sementes menores, Franca atingiu o máximo acúmulo de matéria seca aos 60 daa com cerca de 236,25 mg.semente<sup>-1</sup> e, em São Paulo, segundo a regressão de 2º grau que não permitiu verificar-se o máximo acúmulo de matéria seca, mas este deve estar próximo ao valor encontrado aos 60 daa que foi cerca de 193,26 mg.semente<sup>-1</sup>.



**Figura 9.** Conteúdo de matéria seca de sementes de *Caesalpinia echinata* durante o desenvolvimento e maturação: sementes íntegras (A) para Franca (O, linha cheia) e São Paulo (Δ, linha tracejada) e tegumentos (B), cotilédones (C) e eixos embrionários (D) somente para Franca (O, linha cheia). Regressões ( $p < 0,05$ ):  $Y_{(a)O} = -0,028X^3 + 3,809X^2 - 158,054X + 2065,930$ ,  $r^2 = 0,95$ ,  $CV = 11,07\%$ ;  $Y_{(a)\Delta} = 0,299X^2 - 20,972X + 374,775$ ,  $r^2 = 0,93$ ,  $CV = 30,54\%$ ;  $Y_{(b)} = -0,0094X^3 + 1,283X^2 - 55,557X + 791,911$ ,  $r^2 = 0,98$ ,  $CV = 6,64\%$ ;  $Y_{(c)} = -0,033X^3 + 4,889X^2 - 229,092X + 3437,221$ ,  $r^2 = 0,99$ ,  $CV = 10,86\%$ ;  $Y_{(d)} = 0,147X - 4,896$ ,  $r^2 = 0,94$ ,  $CV = 14,42\%$ .

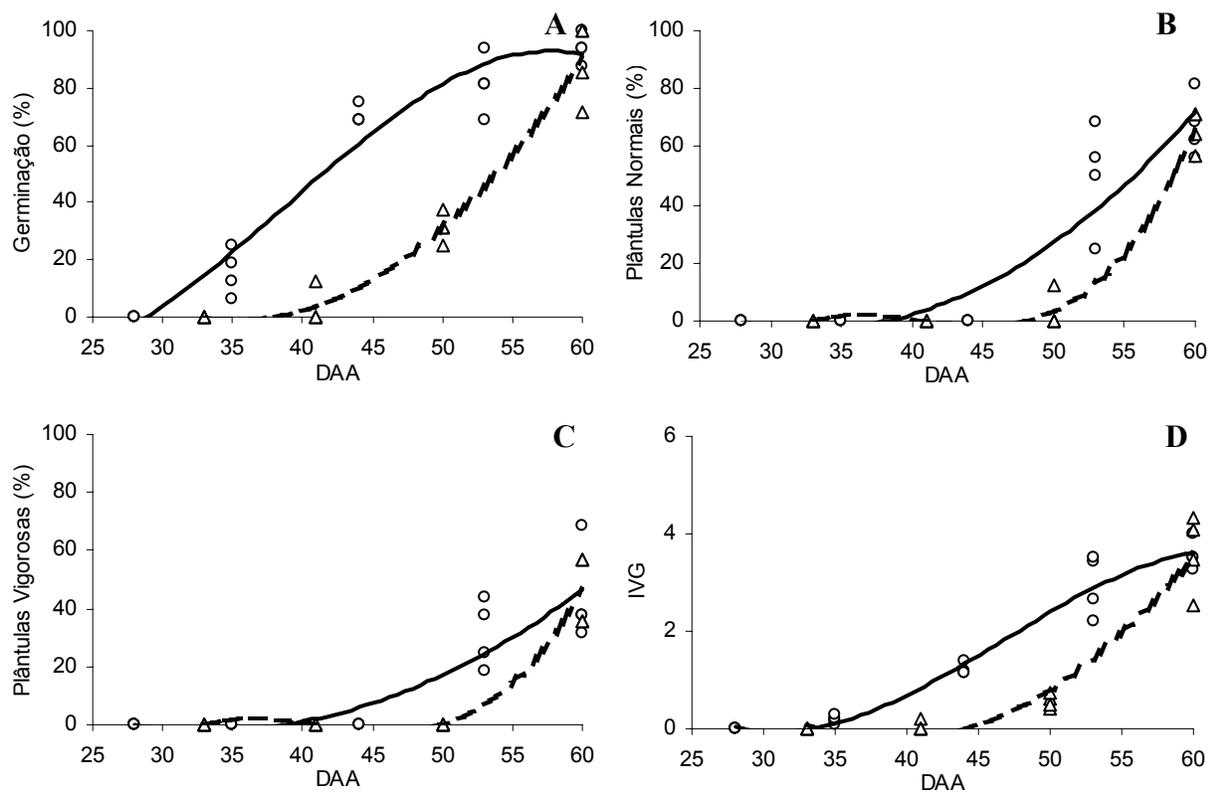
Estas diferenças poderiam, novamente, ser explicadas pelas diferenças no volume de chuvas entre estes locais, uma vez que em Santos, com possíveis índices pluviométricos maiores, foram constatadas sementes com maiores quantidades de matéria seca. O fato também foi observado por Borges *et al.* (2005) para a produção de sementes da mesma espécie, durante dois anos consecutivos, atribuindo-se à diferenças na precipitação durante o período de desenvolvimento das sementes. Ellis *et al.* (2000) verificaram redução no período de acúmulo de matéria seca em sementes de brassicas e conseqüentemente redução no acúmulo de matéria seca, quando da redução da irrigação das plantas. Da mesma forma, Daws *et al.* (2004) demonstraram influencia no peso final de sementes de *Aesculus hippocastanum* em decorrência de mudanças no regime hídrico durante o período de sua formação. Todas estas reduções poderiam estar relacionadas a diminuições na atividade fotossintética, resultado da menor quantidade de água e desta forma, menor produção de assimilados (Larcher 2000).

Para a população em Franca, as análises realizadas separadamente do conteúdo de matéria seca dos tegumentos, dos cotilédones e dos eixos embrionários indicaram comportamento similar ao observado para sementes íntegras (figura 9).

O período de máximo acúmulo de matéria seca verificado entre as 3 populações foi atingido entre os 60-65 daa, momento que poderia ser definido como “ponto de maturidade de massa” Ellis & Pieta Filho (1992). No entanto, outros autores (Piña Rodrigues & Aguiar 1993, Carvalho & Nakagawa 2000), apesar de concordarem com a importância deste momento no desenvolvimento da semente, não adotam uma terminologia específica para ele, mas definem o termo “ponto de maturidade fisiológica” no qual, além do máximo acúmulo de matéria seca, outros parâmetros também importantes como, por exemplo, o máximo de germinabilidade e vigor das sementes, devem ser considerados como parâmetros para a identificação de sementes de excelente qualidade.

Sementes de *C. echinata* são capazes de germinar já no início da Fase II de desenvolvimento (figura 10 e tabela 4), quando as sementes possuem menos de 1/3 da matéria seca final e apresentam alto teor de água (figuras 7 e 9 e tabela 3). Desta forma, a germinação dessas sementes, que podem suportar até 7% de secagem (Barbedo *et al.* 2002), ocorreu mesmo sem as sementes passarem pelo processo de secagem ao final da maturação, o qual é fundamental para muitas espécies com sementes classificadas como ortodoxas (Kermode 1990). Com 16 % de germinação aos 35 daa, as sementes de Franca foram as primeiras a adquirirem germinabilidade. Em todas as populações, a germinação aumentou progressivamente durante todo o processo de maturação, com valores máximos e muito próximos atingidos aos 58-60 daa em Franca (94%), 60 daa em Santos (93%) e por volta dos 60-65 daa em São Paulo (90%). Mesmo com altos valores de germinação obtidos, segundo Aguiar & Barbosa (1985) e Barbedo *et al.* (2002), sementes de *C. echinata* com elevado vigor atingem valores superiores a 95% de germinação.

Apesar da semente adquirir condições de germinar ainda muito cedo no processo de desenvolvimento, possivelmente as reservas acumuladas ainda sejam insuficientes para a produção de plântulas ou os processos metabólicos necessários para a formação da semente madura, ainda não estejam concluídos, pois plântulas com desenvolvimento normal foram verificadas, de uma forma geral nas três populações analisadas, somente a partir dos 50 daa (figura 10 e tabela 4) e aumentou progressivamente, atingindo o máximo entre os 60-65 daa de acordo com as regressões obtidas. Momento este coincidente também aos máximos de matéria seca e germinação (figuras 9 e 10 e tabela 3 e 4).



**Figura 10.** Germinação (A), plântulas com desenvolvimento normal (B), plântulas vigorosas (C) e índice de velocidade de germinação (D) para sementes de *Caesalpinia echinata* obtidas nos municípios de Franca (O, linha cheia) e São Paulo (Δ, linha tracejada) durante o desenvolvimento e maturação. Regressões ( $p < 0,05$ ):  $Y_{(a)O} = -0,0041X^3 + 0,477X^2 - 14,285X + 113,164$ ,  $r^2 = 0,95$ ,  $CV = 12,27\%$ ;  $Y_{(a)\Delta} = 0,149X^2 - 10,554X + 185,707$ ,  $r^2 = 0,96$ ,  $CV = 26,16\%$ ;  $Y_{(b)O} = 0,102X^2 - 6,701X + 107,420$ ,  $r^2 = 0,87$ ,  $CV = 40,81\%$ ;  $Y_{(b)\Delta} = 0,011X^3 - 1,305X^2 + 52,458X - 694,613$ ,  $r^2 = 0,98$ ,  $CV = 27,06\%$ ;  $Y_{(c)O} = 0,068X^2 - 4,537X + 73,489$ ,  $r^2 = 0,80$ ,  $CV = 60,77\%$ ;  $Y_{(c)\Delta} = 0,009X^3 - 1,124X^2 + 45,802X - 613,202$ ,  $r^2 = 0,93$ ,  $CV = 52,15\%$ ;  $Y_{(d)O} = -0,0002X^3 + 0,033X^2 - 1,387X + 17,820$ ,  $r^2 = 0,96$ ,  $CV = 19,87\%$ ;  $Y_{(d)\Delta} = 0,0087X^2 - 0,678X + 13,042$ ,  $r^2 = 0,93$ ,  $CV = 38,57\%$ .

**Tabela 4.** Germinação (%) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes, plântulas com desenvolvimento normal (%) e plântulas vigorosas de *Caesalpinia echinata*, obtidas no município de Santos durante o desenvolvimento e maturação.

Variáveis	DAA			C.V. (%)
	43	50	60	
Germinação (%)	30c	60b	93a	22,43
Plântulas com desenvolvimento normal (%)	0b	20b	80a	31,62
Plântulas vigorosas (%)	0b	0b	67a	12,52
IVG	0,40c	0,90b	2,88a	12,89

Médias dentro de cada variável, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Plântulas vigorosas foram verificadas apenas aos 60 daa em São Paulo e Santos, com, em média, 46% e 67% de plântulas, respectivamente, momento este muito próximo a dispersão das sementes. Em Franca, estas foram verificadas já aos 53 daa e aumentou até os 60 daa, quando atingiu, em média, somente 41% (figura 10 e tabela 4). Desta forma, apesar de valores consideravelmente altos de germinação que poderiam sugerir a elevada qualidade de um lote, as sementes de *C. echinata* das populações avaliadas, apresentaram baixa produção de plântulas com alto vigor.

Considerando o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) verificou-se que quando as sementes adquirem a capacidade germinativa e nos momentos seguintes a esta, a velocidade de germinação ainda é bastante baixa e aumentará somente momentos antes da dispersão, podendo então ocorrer protrusão da raiz primária (figura 10 e tabela 4). Nas populações de Franca e de São Paulo foi verificado o mesmo valor máximo de IVG (3,60), enquanto que na de Santos, mesmo produzindo as sementes mais pesadas e com potenciais germinativos e de produção de plântulas semelhantes aos das outras duas populações, apresentou IVG inferior (2,88). Desta forma, este índice mostrou-se pouco eficaz para a identificação da qualidade de sementes de *C. echinata* durante o processo de maturação em bosques plantados no Estado de São Paulo.

Os resultados obtidos neste estudo para matéria seca, germinação e produção de plântulas normais ou vigorosas, sugerem que a maturidade fisiológica, segundo Piña Rodrigues & Aguiar (1993) e Carvalho & Nakagawa (2000), para as sementes de *C. echinata* nas populações aqui avaliadas no Estado de São Paulo, ocorre ao redor dos 60-65 daa, momento próximo, à dispersão natural das sementes pelos frutos.

Este curto período entre a maturidade fisiológica e a dispersão é crítico para a obtenção de sementes com elevada qualidade fisiológica, afetando diretamente o futuro armazenamento e germinabilidade, fatores estes importantes para a inclusão das sementes desta importante espécie, sob risco de extinção, em bancos de germoplasma (Barbedo *et al.* 2002, Rocha 2004). Contudo, a presença

de manchas castanhas ou a total pigmentação dos frutos por esta cor, bem como o enrijecimento dos acúleos, ocorre concomitantemente aos 60-65 daa, quando as sementes apresentam teor de água ao redor de 30-40 %. Estas características podem, portanto, auxiliar na identificação do melhor ponto de colheita de sementes de pau-brasil nas populações avaliadas neste estudo.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Aguiar, F.F. & Barbosa, J.M.** 1985. Estudo da conservação e longevidade de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). *Ecosistema* 10: 145-150.
- Angyalossy, V., Amano, E. & Alves, E.S.** 2005. Madeiras utilizadas na fabricação de arcos para instrumentos de corda: aspectos anatômicos. *Acta Botânica Brasileira* 19(4): 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 em sementes. *Acta Botânica Brasileira* 12(2): 145-164.
- Borges, I.F., Giudice Neto, J.D., 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(6): 851-861.
- Botanic Gardens Conservation International.** 2001. Normas internacionais de conservação para jardins botânicos. Conselho Nacional do Meio Ambiente/Rede Brasileira de Jardins Botânicos/Instituto de Pesquisas e Jardim Botânico do Rio de Janeiro/EMC, Rio de Janeiro.
- Brasil.** 1992. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília.
- Carvalho, E.M. & Nakagawa, J.** 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4ª ed. Ed. Funep, Jaboticabal.
- Castro, R.D., Bradford, K.J. & Hilhorst, H.W.M.** 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. *In Germinação: do básico ao aplicado* (A.G. Ferreira & F. Borghetti, eds.). Ed. Artmed, Porto Alegre. p. 51-67.
- Cunha, M.W. & Lima, H.C.** 1992. Viagem à terra do pau-brasil. Agência Brasileira de Cultura, Rio de Janeiro.

- Daws, M.I., Lydall, E., Chmielarz, P., Leprince, O., Matthews, C.A., Thanos, C.A. & Pritchard, H.W.** 2004. Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastanum* across Europe. *New Phytologist* 162: 157-166.
- Delgado, L.F.** 2006. Tolerância à dessecação em sementes de espécies brasileiras de *Eugenia*. Dissertação de mestrado, Curso de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica, São Paulo. 96 p.
- Ellis, R.H. & Pieta Filho, C.** 1992. Seed development and cereal seed longevity. *Seed Science Research* 2: 9-15.
- Ellis, R.H., Sinniah, U.R. & John, P.** 2000. Irrigation and seed quality development in rapid-cycling brassica. *In* Seed biology: advances and applications (M. Black, K.J. Bradford & J. Vázquez-Ramos – eds.). CABI Publishing, Wallingford. p. 113-121.
- Figueiredo, A.F.** 1996. Maturação fisiológica e análise de crescimento das sementes de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) em Manaus – Amazonas. Tese de doutorado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 178 p.
- Gomes, F.P.** 1982. Curso de estatística experimental. 10ª ed. Ed. Nobel, Piracicaba.
- 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 inicial. *Revista Brasileira de Botânica* 29(1): 93-101.
- IBAMA.** Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Brasil). Portaria 37-N, de 3 de abril de 1992) Disp. *In*: [http:// www.ibama.gov.br](http://www.ibama.gov.br)
- Ista.** International Seed Testing Association. 1996. International rules for seed testing, rules 1996. *Seed Science and Technology* 24 (supplement): 1-335.
- Kermode, A.R.** 1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Reviews in Plant Sciences* 9: 155-195.
- Larcher, W.** 2000. *Ecofisiologia Vegetal*. Ed. Rima, São Carlos.

- Lewis, G.P.** 1998. *Caesalpinia*: a revision of the *Poincianella*-*Erythrostemon* group. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Maguire, J.D.** 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence vigor. *Crop Science*, 2(2): 176-7.
- Marcos Filho, J.** 2005. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. FEALQ, Piracicaba.
- Mello, J.I.O., Massuda, K. & Barbedo, C.J.** 2004. Temperatura, umidade e substratos para germinação de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *In Anais do XV Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo*. SBSP/UNITAU, Ubatuba. CD-ROM.
- Mendes, A.M.S., Figueiredo, A.F. & Silva, J.F.** 2006. Crescimento e maturação dos frutos e sementes de urucum. *Revista Brasileira de Sementes* 28(1): 133-141.
- Piña-Rodrigues, F.C.M. & Aguiar, I.B.** 1993. Maturação e dispersão de sementes. *In Sementes florestais tropicais* (I.B. Aguiar, F.C.M. Piña-Rodrigues & M.B. Figliolia). ABRATES, Brasília. cap. 5.
- Popinigis, F.** 1977. *Fisiologia da semente*. AGIPLAN, Brasília.
- 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. 396 p.
- Santana, D.G. & Ranal, M.A.** 2004. *Análise da germinação: um enfoque estatístico*. Ed. UnB, Brasília.
- Steel, R.G.D & Torrie, J.H.** 1980. *Principles and procedures of statistics*. 2<sup>a</sup> ed. McGraw Hill, New York.
- Summerfield, R.J., Ellis, R.H., Craufurd, P.Q., Aiming, Q., Roberts, E.H. & Wheeler, T.R.** 1997. Environmental and genetic regulation of flowering of tropical annual crops. *Euphytica* 96: 83-91.

**Teixeira, S.P., Carmello-Guerreiro, S.M., Machado, S.R.** 2004. Fruit and seed ontogeny related to the seed behavior of two tropical species of *Caesalpinia* (Leguminosae). Botanical Journal of the Linnean Society 146: 57-70.

**Villela, F.A. & Marcos Filho, J.** 1998. Estados energéticos e tipos de água na semente. Revista Brasileira de Sementes 20(2): 317-321.

**CAPÍTULO 3****Variations in sugars and cyclitols during development and maturation of seeds of seeds  
of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae)**

Artigo submetido ao periódico “Brazilian Journal of Plant Physiology” em outubro de 2006. Em  
política editorial. Número de identificação: BJPP-0131f2006

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

## Variations in sugars and cyclitols during development and maturation of seeds of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae)

Igor Ferrari Borges<sup>1</sup>, Claudio José Barbedo<sup>2</sup>, Andreas Anatol Richter<sup>3</sup> and Rita de Cássia Leone Figueiredo-Ribeiro<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> BASF S.A., Agricultural Products, Estr. Samuel Aizemberg, 1707. Bloco C, CEP 09851-550, São Bernardo do Campo, SP, Brazil;

<sup>2</sup> Instituto de Botânica, C.P. 4005, CEP 01061-970 São Paulo, SP, Brazil;

<sup>3</sup> Department of Chemical Ecology and Ecosystem Research, University of Vienna, A-1090 Wien, Austria;

\* Corresponding author: ritarib@usp.br

**Abstract: Variations in sugars and cyclitols during development and maturation of seeds of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae).** Seeds of *Caesalpinia echinata* are tolerant to desiccation, keeping their viability up to 0.08 gH<sub>2</sub>O gDM<sup>-1</sup>. When they are stored under laboratory conditions lose their viability within one month, while under low temperatures the ability to germination is maintained for two years of storage. Here, we report on the variations of soluble carbohydrates, cyclitols and cyclitol galactosides in seeds of *C. echinata* during development and maturation, aiming at a better understanding of the involvement of these compounds in the maturation process and seed quality. Individual flowers were tagged in the day of anthesis and pods were collected directly from the branches from 32 to 59 days after anthesis (DAA). Seeds were also collected after shedding. The physiological maturity of *C. echinata* seeds occurred 60-65 DAA, immediately before shedding, when seeds had 0.43-0.67 gH<sub>2</sub>O gDW<sup>-1</sup>. Soluble carbohydrates made up for about 10% of the seed dry mass. Gas chromatography and mass spectrometry allowed the identification and quantification of 12 soluble carbon compounds in both axis and cotyledons of

developing *C. echinata* seeds. These included fructose, glucose, sucrose, raffinose, the cyclitols *myo*-inositol, *D-chiro*-inositol, *D*-pinitol, and the cyclitol galactosides, galacto-pinitol A, galacto-pinitol B and ciceritol. Sucrose was present in high proportions in both tissues during seed development. Traces of raffinose were also detected, mainly in immature seeds. *D-chiro*-inositol and *myo*-inositol were found in low amounts and pinitol transiently increased in both axis and cotyledons. Ciceritol, galacto-pinitol A and galacto-pinitol B accumulated from 40 DAA to the end of seed maturation, representing along with sucrose the major carbon reserves of *C. echinata* seeds. These results allowed to conclude that variations in soluble carbon reserves of *C. echinata* seeds were related with the maturation process and seed quality.

**Key words:** pernambuco, seed development seed viability, soluble carbohydrates.

**Resumo: Variações nos açúcares e ciclitóis durante o desenvolvimento e maturação de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae).** Sementes de *Caesalpinia echinata* são tolerantes à dessecação, mantendo sua viabilidade com níveis de 0,08 gH<sub>2</sub>O gMS<sup>-1</sup>. Quando armazenadas sob condições de laboratório perdem a viabilidade em um mês, enquanto sob baixas temperaturas a capacidade germinativa é mantida por 2 anos. O conteúdo e a composição de açúcares solúveis, ciclitóis livres e ciclitóis galactosilados durante o desenvolvimento e a maturação destas sementes foram analisados no presente trabalho com o propósito de compreender o envolvimento desses compostos na maturação e qualidade da semente. Inflorescências foram marcadas na antese e posteriormente coletadas dos 32 aos 59 dias após antese (DAA) e após a deiscência. A maturidade fisiológica de sementes de *C. echinata* ocorreu entre 60-65 DAA, imediatamente antes da dispersão, quando as sementes apresentavam 0.43-0.67 gH<sub>2</sub>O gMS<sup>-1</sup>. Carboidratos solúveis totais corresponderam a cerca de 10% da matéria seca das sementes. Análises por cromatografia gasosa e espectroscopia de massas permitiram quantificar 12 compostos presentes nos eixos e cotilédones durante o desenvolvimento destas sementes. Estes incluem frutose, glicose, sacarose, rafinose, os

ciclitóis *mio*-inositol, *D-chiro*-inositol, *D*-pinitol e os ciclitóis galactosilados, galacto-pinitol A, galacto-pinitol B e ciceritol. Sacarose foi detectada em grandes proporções durante todo o processo de desenvolvimento das sementes. Traços de rafinose foram detectados, principalmente em sementes imaturas. *D-chiro*-inositol e *mio*-inositol foram encontrados em baixas quantidades e pinitol aumentou de forma contínua nos eixos e nos cotilédones. Ciceritol, galacto-pinitol A e galacto-pinitol B foram acumulados de 40 DAA até o final da fase de maturação, representando com a sacarose, as maiores reservas de carboidratos solúveis das sementes de *C. echinata*. Esses resultados permitem concluir que o acúmulo de reservas solúveis de carbono está relacionado com o grau de maturação das sementes de *C. echinata*, podendo influenciar na qualidade final dessas sementes.

**Palavras-chave:** carboidratos solúveis, desenvolvimento de sementes, viabilidade de sementes.

## INTRODUCTION

*Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood, pernambuco-wood) is a tree species native from the Brazilian Atlantic coast and occurs mainly in areas of dry seasonal forests (Lira et al., 2003). It is an endangered species (Ibama, 1992), used as dyestuff in the past and currently it is still utilized for the manufacturing of high-quality bows of string instruments (Lewis, 2001; Rocha, 2004). Various proteinase inhibitors, including trypsin, elastase and human plasma kallikrein inhibitors (Oliveira et al., 2002 ; Cruz-Silva et al., 2004) were isolated from seeds of *C. echinata* suggesting that these seeds could also be used to study the role of important enzymes in pathophysiological processes.

Mature seeds of *C. echinata* contain 30-40% starch and 10-15% of soluble carbohydrates, predominantly sucrose and trace amounts of raffinose and stachyose (Garcia et al., 2006). These seeds are tolerant to desiccation, keeping their viability up to  $0.08 \text{ gH}_2\text{O.gDW}^{-1}$  after drying at 40-50°C. However, when these seeds are stored in laboratory environmental conditions ( $26\pm 4^\circ\text{C}$ ) they lose their viability within one month. When stored under low temperatures ( $7^\circ\text{C}$ ), however, germination is maintained for 18 months of storage (Barbedo et al., 2002). Changes in soluble sugars during storage suggested that the loss of germinability of *C. echinata* seeds could be associated with low levels of glucose and fructose in relation to sucrose (Garcia et al., 2006).

Among other cell compounds, soluble carbohydrates are involved in desiccation tolerance during seed development and maturation (Obendorf, 1997; Hoekstra et al., 2001). Accumulation of sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFO) during seed development has been proposed as a key factor in membrane stabilization (Caffrey et al., 1988) besides other physiological roles (Horbowicz et al., 1998 and refs. therein). Free cyclitols and galactosyl cyclitols are also accumulated in some seeds, and they have also been proposed to contribute to the structural stability of organelles, membranes, enzymes and other macromolecules, and the glassy state (Obendorf, 1997; Peterbauer and Richter, 2001).

The potential interactions among cyclitols and RFO during seed maturation and their role in seed quality and storability have been proposed for a number of legume species (Obendorf, 1997; Peterbauer and Richter, 2001). However, their precise role during seed development has not been reported yet. Here we report on the composition of soluble carbohydrates, cyclitols and cyclitol galactosides in cotyledons and in the embryonic axis of *Caesalpinia echinata* seeds during development and maturation, aiming at a better understanding of their role in the quality of seeds of this species and its conservation.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Plant material**

The collects were carried out during 2001 in a homogeneous plantation (*ca.* 250 trees) located at the Biological Reserve and Experimental Station in Moji-Guaçu (22°15-16' S and 47°8-12' W), state of São Paulo, Brazil. During the flowering period (August/September), individual flowers were tagged on the day of their anthesis (9 to 14 Sep). At the main phases of seed development (Borges et al., 2005), the pods were collected directly from the branches at 32, 40, 48, 52 and 59 days after anthesis (DAA) just before shedding (60-65 DAA). Seeds were also collected directly from the ground, not exceeding 24 hours after shedding, and these were named recently-dispersed seeds (RDS).

### **Analysis of seed quality**

The water content (% on a fresh mass basis) and dry mass (mg seed<sup>-1</sup>) for each stage of development was determined by weight loss after drying for 24 h at 103 ± 3°C (Ista, 1985) using four replicates from 3 to 10 seeds each. The results were expressed as gH<sub>2</sub>O.g dry mass<sup>-1</sup> (g.g<sup>-1</sup>). Germination (protrusion of the primary root until in the least 5 mm) tests were carried out at 25±1 °C under continuous light, in germination boxes (11x11x3.5 cm) on two thick germination paper saturated with distilled water using four replicates of 16 seeds. Germination was evaluated every two days from the sowing day and after 20 days the number of seedlings with both normal roots and shoots was registered.

### **Extraction and analysis of soluble carbohydrates and cyclitols**

From five to eight embryos of seeds harvested at 32, 40, 48, 52 and 59 DAA were separated into axis and cotyledons and analyzed for soluble carbohydrates and cyclitols. Immediately after excision both tissues were boiled in 80% ethanol (v/v), homogenized with a mortar and pestle, and heated at 80 °C for 10 min. After centrifugation for 5 min at 1000 g, the residue was re-extracted twice with 80% ethanol for 5 min at 80 °C and one time with water for 5 min at 60 °C. The ethanolic and

aqueous extracts were pooled, evaporated to dryness and stored above  $P_2O_5$ . Gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS) of soluble carbohydrates and cyclitols was performed for axis and cotyledons after derivatization with trimethylsilyl trifluoro acetamide as previously described (Richter et al., 1990), excepting 32 DAA.

Neutral soluble carbohydrates were additionally analyzed by high performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (HPAEC/PAD) after deionization through a column consisting of equal amounts of Dowex-1 ( $Cl^-$  form) and Dowex-50W ( $H^+$  form). The HPAEC/PAD system (Dionex DX-300) used consisted of a 4 x 250 mm CarboPac PA-1 column, with linear gradient of 25 mol.m<sup>-3</sup> to 500 mol.m<sup>-3</sup> sodium acetate in 150 mol.m<sup>-3</sup> sodium hydroxide at a flow rate of 1 cm<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup> as established by Garcia et al. (2006). Sugars were identified by co-chromatography with authentic standards purchased from Sigma/Aldrich Co. (USA).

Overall carbohydrates in the extracts were estimated colorimetrically by the phenol-sulfuric method (Dubois et al., 1956) using glucose as standard and were expressed as mg per g of fresh mass (mg.g<sup>-1</sup> FM).

### **Statistical analysis**

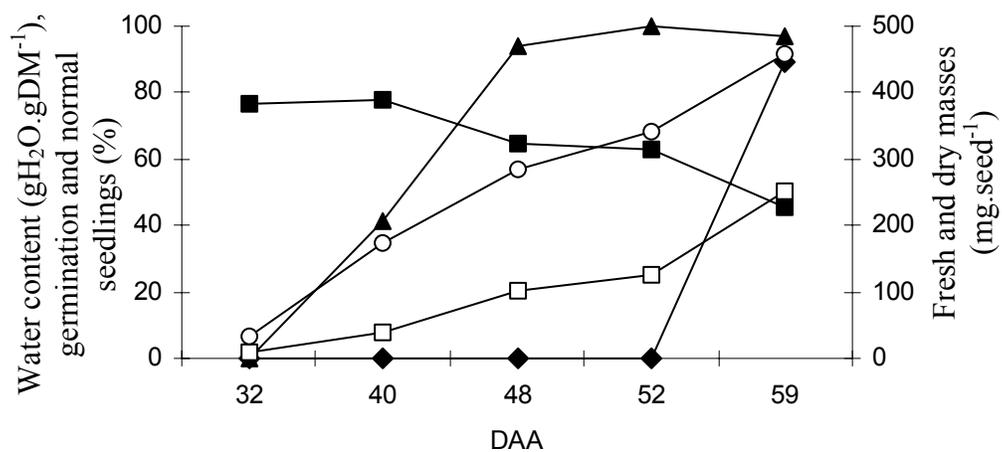
The factorial analysis was done in an entirely randomized design, with three replications, by F test and Tukey's test ( $P < 0.05$ ) to determine the interaction and significant differences of age and tissue origin (axes and cotyledons) to sugars and cyclitols after gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS) analysis.

## RESULTS

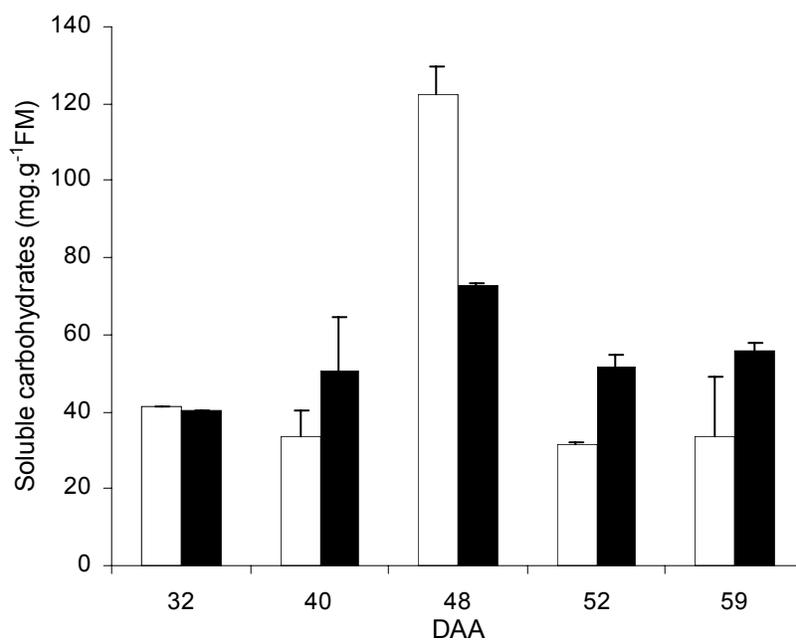
The patterns of development and maturation in field conditions of *Caesalpinia echinata* seeds were described recently (Borges et al., 2005). Figure 1 indicates that maximum seed fresh and dry masses were reached nearly 59 DAA, the water content remaining practically constant during the early growth phase (till 40 DAA) and then declining slowly during the desiccation phase. Germinability of these seeds began at 40 DAA, reaching a maximum at 52 DAA, remaining high from this phase on. However, normal seedling development was observed only at 59 DAA (Figure 1), next to seed shedding (Borges et al., 2005). This indicates that the last desiccation phase (from 48 DAA till 59 DAA) is crucial to improve seed vigor.

During seed development and maturation the total content of soluble carbohydrates was higher in the cotyledons than in the axis, excepting at 48 DAA, when the amount of sugars increased significantly in the embryonic axis (Figure 2). This could be related to variations in the axis dry matter (data not shown). Maximal germination capacity was observed from this growth phase on, indicating the beginning of the embryo maturation.

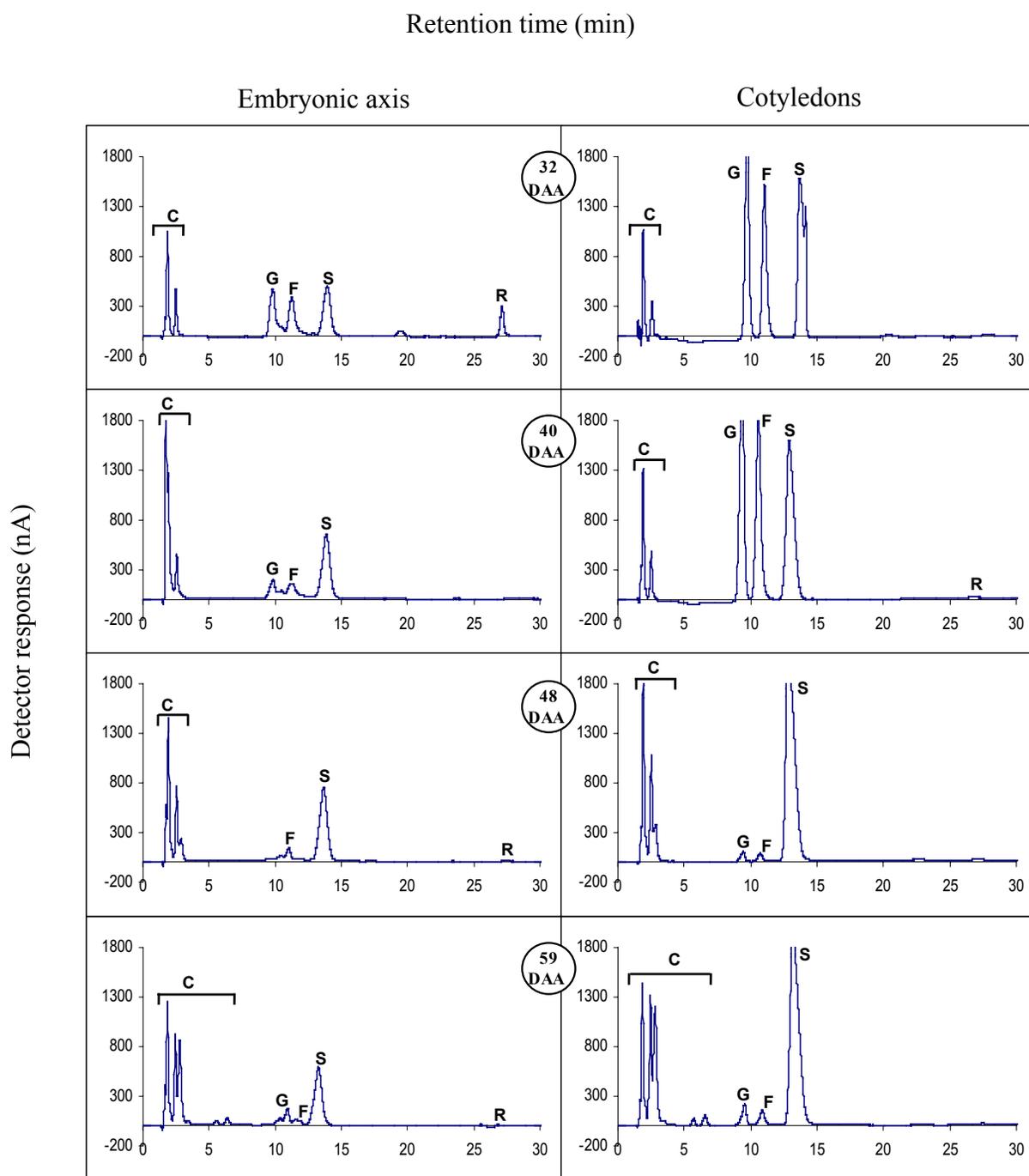
HPAEC/PAD analysis showed that sucrose, glucose and fructose were the major neutral soluble carbohydrates present in both axis and cotyledons of *C. echinata* seeds (Figure 3). Raffinose was detected mainly in the axis at the beginning of seed growth (32 DAA). During seed development, the proportion of sucrose remained unchanged in the axis, while glucose and fructose, and raffinose decreased substantially from 40 DAA to 59 DAA. Hence, the proportion of sucrose in the axis was higher than that of monosaccharides during the maturation phase of *C. echinata* seeds (Figure 3). Similar variations were observed in the cotyledons, except at the beginning of seed growth (32 DAA till 40 DAA), when the proportions of glucose and fructose were higher than that of sucrose. A sharp decrease in monosaccharides was observed from 48 DAA on. HPAEC/PAD also showed the presence of *myo*-inositol (identified by co-chromatography with authentic standard) and other non-identified compounds in both axis and cotyledons of *C. echinata* seeds in all developmental phases (Figure 3).



**Figure 1.** Physiological data of *C. echinata* seeds during development and maturation from 32 to 59 days after anthesis (DAA). Water content (■, gH<sub>2</sub>O.gDM<sup>-1</sup>), germination (▲, %), normal seedlings (◆, %), fresh (○) and dry (□) masses (mg.seed<sup>-1</sup>).



**Figure 2.** Soluble carbohydrates (mg.g FM<sup>-1</sup>) in the embryonic axis (□) and cotyledons (■) of *Caesalpinia echinata* seeds during development and maturation from 32 to 59 days after anthesis (DAA). Bars indicate the standard error.



**Figure 3.** HPAEC/PAD profile of neutral soluble carbohydrates from axes (left) and cotyledons (right) of seeds of *Caesalpinia echinata* during development and maturation from 32 to 59 days after anthesis (DAA). C - cyclitols; G - glucose; F - fructose; S - sucrose; R - raffinose. Samples contained 260  $\mu\text{g}$  and 800  $\mu\text{g}$  total sugar/mL to embryonic axis and cotyledons, respectively.

Gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS) allowed to identify and quantify 12 soluble carbon compounds in both axis and cotyledons of developing *C. echinata* seeds. These included fructose, glucose, sucrose, raffinose, the free cyclitols *myo*-inositol, D-pinitol, D-*chiro*-inositol, and the galactosyl cyclitols ciceritol, galacto-pinitol A and galacto-pinitol B (Tables 1-3).

Confirming HPAEC/PAD, the GC/MS analysis in general showed that fructose and glucose were present in low amounts mainly in immature seeds both in axes and cotyledons (Table 1). In the axes fructose increased until 52 DAA and decreased from this age on, while glucose remained unchanged. In the cotyledons, the amount of both sugars decreased from 40 to 48 DAA. Sucrose was presented in high amounts in both tissues during seed development. Traces of raffinose were also detected without significant changes during the analysed period (Table 1).

D-*chiro*-Inositol and *myo*-inositol were found in lower amounts than pinitol (Table 2). This free cyclitol was present in higher concentrations, mainly embryonic axes, increasing consistently until 52 DAA (Table 2), when the germination reached 100% (Figure 1).

Galactosyl cyclitols were present in large amounts in maturing *C. echinata* seeds and accumulated consistently from 40 DAA to the end of seed maturation, both in axis and cotyledons, mainly galacto-pinitol A, B and ciceritol (Table 3). These compounds represented along with sucrose the major carbon reserves of *C. echinata* seeds, mainly after shedding. The accumulation of these galactosyl cyclitols, mainly ciceritol was accompanied by a decline of pinitol after 52 DAA (Tables 2 and 3).

**Table 1.** Soluble carbohydrates (mg.gFM<sup>-1</sup>) in axes and cotyledons of *C. echinata* during different developmental phases (days after anthesis – DAA) and in recently-dispersed seeds (RDS). Values with the same letter, small for columns and capital for lines, did not differ by Tukey's Test ( $P < 0.05$ ).

Plant material	DAA				RDS	Means
	40	48	52	59		
<i>Fructose</i>						
Axis	1.70bC	5.56aAB	7.69aA	3.00aBC	2.81aC	4.15
Cotyledons	5.64aA	1.87bB	3.91bAB	1.69aB	2.96aB	3.21
Means	3.67	3.72	5.80	2.34	2.88	
<i>Glucose</i>						
Axis	0.11bA	0.04aA	0.04aA	0.04aA	0.07aA	0.06
Cotyledons	2.79aA	0.03aB	0.03aB	0.03aB	0.02aB	0.58
Means	1.45	0.04	0.03	0.03	0.04	
<i>Sucrose</i>						
Axis	5.59	20.67	20.07	10.69	24.43	16.29a
Cotyledons	21.90	21.65	20.10	18.15	25.73	21.50a
Means	13.74A	21.16A	20.08A	14.42A	25.08A	
<i>Raffinose</i>						
Axis	0.13	0.26	0.27	0.19	0.37	0.24a
Cotyledons	0.12	0.19	0.19	0.18	0.30	0.20a
Means	0.13A	0.22A	0.23A	0.18A	0.33A	

**Table 2.** Free-cyclitols (mg.gFM<sup>-1</sup>) in axes and cotyledons of *C. echinata* during different developmental phases (days after anthesis – DAA) and in recently-dispersed seeds (RDS). Values with the same letter, small for columns and capital for lines, did not differ by Tukey's Test ( $P < 0.05$ ).

Plant material	DAA				RDS	Means
	40	48	52	59		
	<i>Pinitol</i>					
Axis	1.08	3.66	7.49	2.01	3.24	3.49a
Cotyledons	1.05	1.50	3.19	1.38	1.63	1.75b
Means	1.06B	2.58AB	5.34A	1.70B	2.43AB	
	<i>D-chiro-Inositol</i>					
Axis	0.21	0.48	0.45	0.24	0.18	0.31a
Cotyledons	0.13	0.26	0.17	0.12	0.13	0.16b
Means	0.17AB	0.37A	0.31AB	0.18AB	0.16B	
	<i>myo-Inositol</i>					
Axis	0.20	0.51	0.41	0.20	0.15	0.29a
Cotyledons	0.48	0.32	0.22	0.12	0.08	0.24a
Means	0.34A	0.41A	0.31A	0.16A	0.12A	

**Table 3.** Galactosil-cyclitols ( $\text{mg.gFM}^{-1}$ ) in axes and cotyledons of *C. echinata* during different developmental phases (days after anthesis – DAA) and in recently-dispersed seeds (RDS). Values with the same letter, small for columns and capital for lines, did not differ by Tukey’s Test ( $P < 0.05$ ).

Plant material	DAA				RDS	Means
	40	48	52	59		
<i>Galacto-pinitol A</i>						
Axis	0.06	3.71	12.13	14.77	14.21	8.98a
Cotyledons	0.83	3.24	5.50	10.02	5.70	5.06a
Means	0.44A	3.48A	8.82A	12.40A	9.96A	
<i>Galacto-pinitol B</i>						
Axis	0.04	0.94	2.95	6.13	11.29	4.27a
Cotyledons	0.03	0.60	1.29	4.26	6.09	2.45a
Means	0.04B	0.77B	2.12AB	5.20AB	8.69A	
<i>Ciceritol</i>						
Axis	0.04	5.41	21.74	53.57	45.59	25.27a
Cotyledons	0.22	5.38	13.13	33.76	29.66	16.43a
Means	0.13B	5.40AB	17.43AB	43.67A	37.63AB	

## DISCUSSION

Maturation proteins, sucrose and the raffinose series oligosaccharides (RFO) have been proposed to be the most important factors in the acquisition of desiccation tolerance (Blackmann et al., 1992). According to Han et al. (1997) desiccation tolerance is acquired during development of orthodox seeds when not only sugars are accumulated but also dehydrin-related polypeptides. RFO are present in legume seeds in relatively large quantities (Horbowicz and Obendorf, 1994). However, these sugars were practically absent in mature whole seeds of *C. echinata*, accumulating 10-15% of their dry mass as soluble carbohydrates. Analysis of sugars during storage under different temperature conditions showed low levels of glucose and fructose in relation to sucrose in seeds of *C. echinata* that have lost germinability (Garcia et al., 2006). The decline in the vigor of *Zea mays* embryo was associated with a marked decline in monosaccharides and in raffinose. In these seeds sucrose content remained relatively stable (Bernal-Lugo and Leopold, 1992), similarly to what was found in *C. echinata* seeds. However, the decline in monosaccharides found during seed maturation of *C. echinata* seeds apparently was not associated with the germination capacity.

In *Fagopyrum esculentum* (buckwheat), instead of RFO, the seeds accumulate  $\alpha$ -galactosyl D-*chiro*-inositols which may play a role in storability (Horbowicz et al., 1998; Steadman et al., 2000). Analysis of maturing seeds of *C. echinata* by CG/MS revealed the presence of substantial amounts of various cyclitols as pinitol, ciceritol, and galacto-pinitol A and B, which could have similar functions of the RFO. Galactosyl cyclitols are frequently found in similar or even higher amounts than RFO in seeds of many important grain legumes, such as lentil, chickpea and soybean (Peterbauer and Richter, 1998) and share some common functions, including participation in the acquisition of desiccation tolerance (Peterbauer and Richter, 2001 and ref. therein).

RFO and galactosyl cyclitols accumulated during seed drying and maturation may play a key protective role, replacing water and thus stabilizing membranes and other sensitive systems in the cell (Peterbauer and Richter, 2001). In the present study, pinitol and galactosyl cyclitols, in addition to

sucrose were identified in seeds of *C. echinata* (which are not sensitive to desiccation) being accumulated mainly during the maturation phase.

A question that arises is whether these soluble carbon compounds are involved in the embryo viability and seed vigor after shedding. In some seeds that have very low levels of RFO, as exemplified by *C. echinata*, galactosyl cyclitols may replace the role of those sugars. Loss of RFO and cyclitols in the axes of several leguminous seeds precede germination (Gorécki et al., 1997). The significant increase of galactosil cyclitols at the end of the maturation phase of *C. echinata* seeds could be associated with the germination capacity and vigor of seeds (Table 3 and Figure 1), indicating a nutritive role for these compounds to seedling growth.

As recently reported (Hellmann et al., 2006), seeds of brazilwood are also freezing tolerant depending on their water content. In seeds of *Erythrina caffra* the high contents of inositols and monosaccharides were associated to the protection of plasma membranes from the effects of low temperatures (Nkang, 2002). Interesting variations in buckwheat embryos of seeds grown in cooler temperatures were reported by Horbowicz et al. (1998), sucrose being decreased and stachyose and the galactosyl cyclitol fagopyritol B1 increased. The effect of low temperatures in the content and composition of soluble carbohydrates and cyclitols in cotyledons and axes of *C. echinata* seeds could be important to an understanding of the involvement of these compounds with their behavior during storage under different temperatures. The effect of low temperatures on individual polypeptides and lipids should not be unconsidered. Additionally, as emphasized by Borges et al. (2005), the role of the environment during development and maturation of seeds of *C. echinata* needs further investigation. However, results from the present study allow to conclude that the variation in soluble carbon reserves of *C. echinata* seeds are related with the maturation process and seed quality and might contribute to an understanding of the involvement of these compounds in the conservation of the seeds.

**Acknowledgements:** This work is part of I.F. Borges Master Thesis in the Plant Biodiversity and Environment Program/Instituto de Botânica, SEMASP, São Paulo and was supported by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP), Grants 00/06422-4 and 05/04139-7. C.J. Barbedo and R.C.L. Figueiredo-Ribeiro are researchers associated with CNPq. Thanks are due to Mr O. Vieira for helpful advices in the English.

**REFERENCES**

- Barbedo CJ, Bilia DA, Figueiredo-Ribeiro RCL (2002) Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. Rev. Bras. Bot. 25:431-439.
- Bernal-Lugo I, Leopold AC (1992) Changes in soluble carbohydrates during seed storage. Plant. Physiol. 98:1207-1210.
- Blackman SA, Obendorf RL, Leopold AC (1992) Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. Plant Physiol. 100:225-230.
- Borges IF, Del Giudice Neto J, Bilia DAC, Figueiredo-Ribeiro RCL, Barbedo CJ (2005) Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. Braz. Arch. Biol. Technol. 48:851-861.
- Caffrey M, Foseca V, Leopold AC (1988) Lipid-sugar interactions: Relevance to anhydrous biology. Plant. Physiol. 86:754-758.
- Cruz-Silva I, Gozzo AJ, Nunes VA, Neuhof C, Neuhof H, Araújo, MS (2004) Effect of inhibitors from *Caesalpinia echinata* on pulmonary edema. Proc. Braz. Soc. Biochem. Mol. Biol. 33:1.
- Dubois N, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28:350-356.
- Garcia IS, Souza A, Barbedo CJ, Dietrich SMC, Figueiredo-Ribeiro, RCL (2006) Changes in soluble carbohydrates during storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. Braz. J. Biol. 66(2B):739-745.
- Górecki RJ, Piotrowicz-Cieslak AI, Lahuta LB, Obendorf, RL (1997) Soluble carbohydrates in desiccation tolerance of yellow lupin seeds during maturation and germination. Seed Sci. Res. 7:107-115.
- Han B, Berjak P, Pammenter N, Farrant J, Kermode AR (1997) The recalcitrant plant species, *Castanospermum australe* and *Trichilia dregeana*, differ in their ability to produce dehydrin-related

- polypeptides during seed maturation and in response to ABA or water-deficit-related stresses. *J. Exp. Bot.* 48:1717-1726.
- Hellmann ME, Mello JIO, Figueiredo-Ribeiro RCL, Barbedo CJ (2006). Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água inicial. *Rev. Bras. Bot.* 29(1):93-101.
- Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.* 6:431-438.
- Horbowicz M, Obendorf RL (1994) Seed desiccation tolerance and storability: dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols – review and survey. *Seed Sci. Res.* 4: 385-405.
- Horbowicz M, Brenac P, Obendorf RL (1998) Fagopyritol B1, O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-D-*chiro*-inositol, a galactosyl cyclitol in maturing buckwheat seeds associated with desiccation tolerance. *Planta* 205:1-11.
- IBAMA (1992) Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Portaria 37N, de 3 de abril de 1992 ([www.ibama.gov.br](http://www.ibama.gov.br)).
- ISTA (1985) International Seed Testing Association. International Rules for Seed Testing. *Seed Sci. Technology* 13: 356-513.
- Lewis GP (2001) *Caesalpinia*: a revision of the *Poincianella*-*Erythrostemon* group. Kew, Royal Botanical Gardens, UK.
- Lira CF, Cardoso SRS, Ferreira PCG, Cardoso MA, Provan J (2003) Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. *Mol. Ecol.* 12:3219-3225.
- Nkang A (2002) Carbohydrate composition during seed development and germination in two subtropical tree species (*Erythrina caffra* and *Guilfoylia monostylis*). *J. Plant Physiol.* 159:473-483.
- Obendorf RL (1997) Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Sci. Res.* 7:63-74.

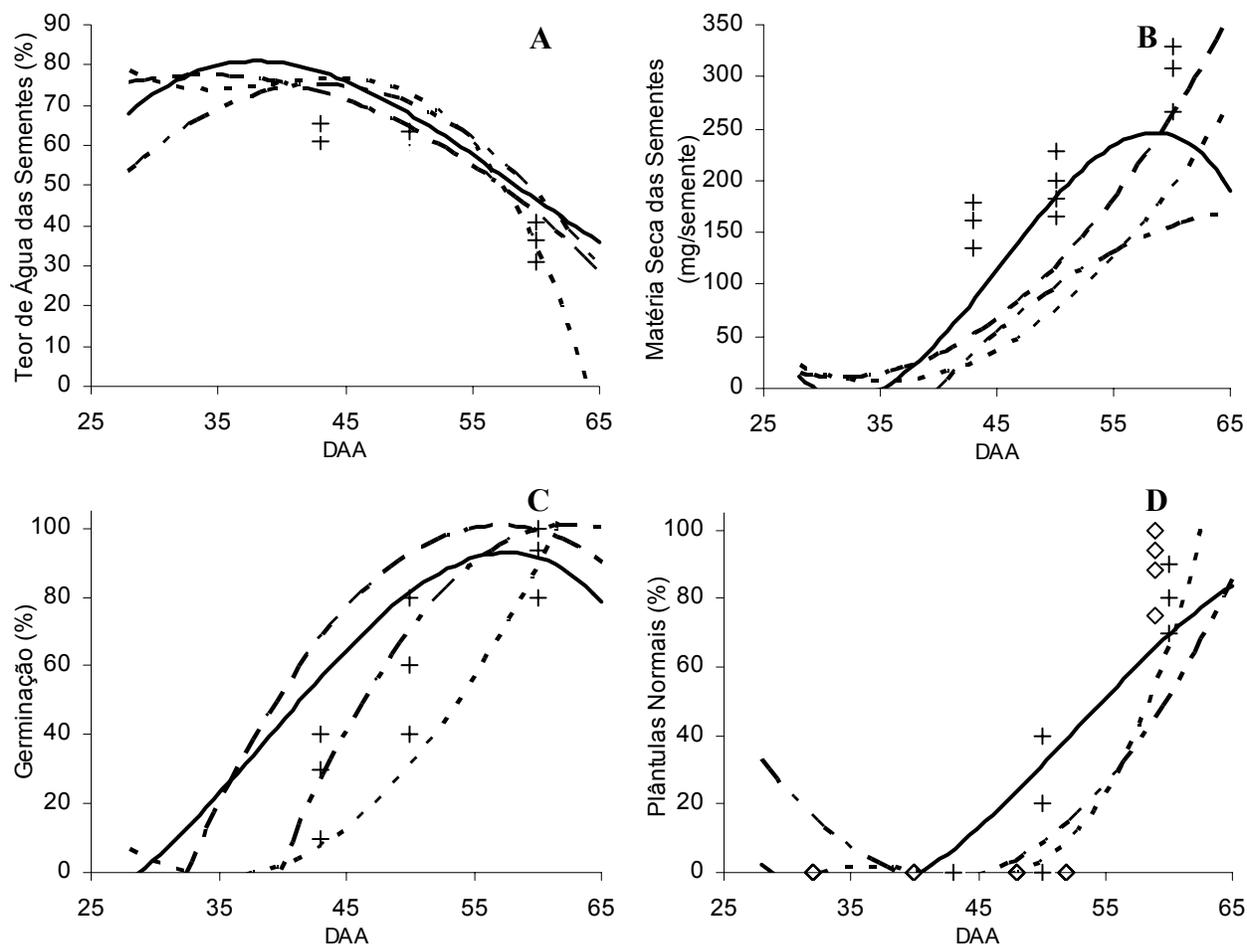
- Oliveira LG, Gozzo AJ, Nunes VA, Cruz-Silva I, Sampaio MU, Sampaio CAM, Araújo MS (2002) Inibidores de proteases encontrados em sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) – isolamento e caracterização do inibidor de tripsina. *Rev. Brasil. Farmac.* 12:72-74.
- Peterbauer T, Richter A (1998) Galactosyl ononitol and stachyose synthesis in seeds of adzuki bean. Purification and characterization of stachyose synthase. *Plant Physiol.* 117:165-172.
- Peterbauer T, Richter A (2001) Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Sci. Res.* 11:185-197.
- Richter AA, Thonke B, Popp M (1990) 1D-1-*O*-methyl-*muco*-inositol in *Viscum album* and members of the Rhizophoraceae. *Phytochemistry* 29:1785-1786.
- Rocha YT (2004) Ibirapitanga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) do descobrimento à atualidade. São Paulo, University of São Paulo. PhD Thesis.
- Steadman KJ, Burgoon MS, Schuster RL, Lewis BA, Edwardson SE, Obendorf RL (2000) Fagopyritols, *D-chiro*-inositol and other soluble carbohydrates in buckwheat seed milling fractions. *J. Agric. Food Chem.* 48:2843-2847.

## DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho, a maturação de sementes de *Caesalpinia echinata* foi avaliada em quatro populações, localizadas em diferentes regiões do Estado de São Paulo, com expressivas variações de latitude (20°S a 24°S) e de altitude (0 a 900 metros). Estas variações poderiam refletir diferenças na evolução das características avaliadas no presente estudo, que são as principais indicadoras do grau de maturação das sementes. De fato, o início do florescimento foi uma característica que variou entre as populações estudadas, ocorrendo dentro de um intervalo de aproximadamente 60 dias, entre a segunda quinzena de agosto e primeira quinzena de outubro. No entanto, foi constatada que a maturação de frutos e sementes de *C. echinata* apresentou, de forma geral, comportamento padrão, mesmo em condições ambientais diferentes, inclusive com a dispersão ocorrendo entre 65-70 dias após a antese das flores em todas as regiões estudadas (capítulos 1 e 2).

Desta forma, considerando inicialmente, as características externas de frutos, há o aparecimento de coloração característica (castanha) momentos antes da dispersão, quando as sementes adquirem coloração parda ou castanha. O tamanho final dos frutos também apresentou uniformidade entre as populações, variando de 6,0 a 7,5 cm de comprimento, 2,0 a 2,5 cm de largura e com aproximadamente 0,5 cm de espessura. Por sua vez, as sementes também apresentaram uniformidade, com valores próximos a 15 mm de comprimento, 13 mm de largura e 3 mm de espessura, quando maduras (capítulos 1 e 2).

Considerando que os principais indicadores do grau de maturação fisiológica das sementes são o seu teor de água, o seu conteúdo de matéria seca e a sua capacidade germinativa, quer pela simples protrusão da raiz primária ou pela capacidade de produzir plântulas normais, na figura a seguir procurou-se agrupar as variações destas características de todas as populações em um mesmo gráfico.



Regressões populacionais para Moji-Guaçu em 2001 (—, ◇) e 2002 (-.-), Franca (—), São Paulo (---) e Santos (+), para teor de água (A), conteúdo de matéria seca (B), germinação (C) e desenvolvimento de plântulas normais (D) de sementes de *Caesalpinia echinata* durante o desenvolvimento e maturação.

Redução lenta do teor de água das sementes foi observada, do início da maturação até aproximadamente 40-50 daa, seguida de queda rápida até o final do processo de maturação, indicativo de comportamento ortodoxo de sementes de pau-brasil (Kermode 1990), conforme já sugerido anteriormente (Barbedo *et al.* 2002, Hellmann *et al.* 2006) e que, próximo à sua dispersão, estas sementes têm 30-40% de água.

Segundo Hellmann (2006) sementes de *C. echinata* com alto teor de água, têm maiores concentrações de sacarose, glicose, frutose e polióis em relação às submetidas a secagem em estufa. Contudo, reduções nos teores de água das sementes durante a maturação, não foram acompanhadas, concomitantemente, por reduções nos níveis destes mesmos açúcares nos eixos embrionários e cotilédones das sementes (capítulo 3).

Essas reduções nos teores de água foram acompanhadas por acréscimos nos conteúdos de matéria seca que não atingiram, de forma geral, valores máximos até o final do processo.

Dois aspectos interessantes puderam ser observados em todas as populações, durante a maturação das sementes: o primeiro, a precocidade na aquisição da capacidade germinativa, aos 30-40 daa, ou seja, próximo à metade do ciclo total; a segunda, a tardia aquisição da capacidade de produção de plântulas normais, ou seja, no final do processo de maturação, ao redor dos 60-65 daa. Assim, apesar da semente germinar muito cedo, esta característica é ineficaz na identificação de sementes maduras pois, possivelmente, as reservas acumuladas ainda são insuficientes ou não ocorreram todas as reações metabólicas necessárias para a completa maturação da semente, impedindo assim, o desenvolvimento de plântulas.

Um terceiro aspecto interessante diz respeito às análises bioquímicas, pois os compostos galacto-pinitol A e B, assim como ciceritol, tiveram comportamento de elevação dos valores semelhante ao observado para matéria seca e germinação (capítulo 3). Apesar da ausência de informações conclusivas na literatura sobre o real papel destes compostos na maturação de sementes,

os mesmos também poderiam ser utilizados como indicativos do grau de maturação, embora os resultados aqui apresentados sejam referentes a uma única região, sendo necessários maiores estudos.

Finalizando, ficou evidente a necessidade do desenvolvimento de tecnologia que facilite a colheita de sementes de pau-brasil e permita a obtenção de lotes de elevada qualidade que, com o presente estudo, tem elucidado importantes aspectos quanto à fisiologia do desenvolvimento de sementes de pau-brasil.

## CONCLUSÕES GERAIS

- A maturidade fisiológica de sementes de *Caesalpinia echinata* em árvores plantadas no Estado de São Paulo ocorre aos 60-65 dias após a antese;
- Frutos com coloração externa castanha e sementes com 30-40% de teor de água, são indicativos da maturidade fisiológica de sementes de *C. echinata*.
- Os carboidratos solúveis, ciclitóis e ciclitóis galactosilados variam quantitativamente e qualitativamente durante o processo de maturação de sementes de *C. echinata*, com a sacarose e o ciceritol como os compostos de reserva em maior quantidade nestas sementes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CITADAS NA INTRODUÇÃO GERAL E DISCUSSÃO GERAL

- Aguiar, F.F. & Barbosa, J.M.** 1985. Estudo da conservação e longevidade de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). *Ecosistema* 10: 145-150.
- Alves, E.U., Sader, R., Bruno, R.L.A. & Alves, A.U.** 2005. Maturação fisiológica de sementes de sabiá. *Revista Brasileira de Sementes* 27(1): 01-08.
- Angyalossy, V., Amano, E. & Alves, E.S.** 2005. Madeiras utilizadas na fabricação de arcos para instrumentos de corda: aspectos anatômicos. *Acta Botânica Brasileira* 19(4): 819-834.
- Araujo, E.F., Araujo, R.F., Sofiatti, V. & Silva, R.F.** 2006. Maturação de sementes de milho-doce – grupo super doce. *Revista Brasileira de Sementes* 28(2): 69-76.
- Astolfi, P.T., Pedroso, P.A.C., Carvalho, N.M. & Sader, R.** 1981. Maturação de sementes de café (*Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo). *Científica* 9(2): 289-294.
- Barbedo, C.J., Barbedo, A.S.C., Nakagawa, J. & Sato, O.** 1999. Efeito da idade e do repouso pós-colheita de frutos de pepino na semente armazenada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34(5): 839-847.
- 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.
- Barbosa, J.M., Aguiar, I.B. & Santos, S.R.G.** 1992. Maturação de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. *Anais 2º Congresso Nacional sobre Essências Nativas, Instituto Florestal* 2: 665-674.
- Baroni, A.M.** 2005. Caracterização do sistema fotossintético em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica, São Paulo. 67 p.

- Botanic Gardens Conservation International.** 2001. Normas internacionais de conservação para jardins botânicos. Conselho Nacional do Meio Ambiente/Rede Brasileira de Jardins Botânicos/Instituto de Pesquisas e Jardim Botânico do Rio de Janeiro/EMC, Rio de Janeiro.
- Buckeridge, M.S., Aidar, M.P.M., Santos, H.P. & Tiné, M.A.S.** 2004a. Acúmulo de reservas. *In* Germinação: do básico ao aplicado (A.G. Ferreira & F. Borghetti, eds.). Ed. Artmed, Porto Alegre. p. 31-50.
- Buckeridge, M.S., Santos, H.P., Tiné, M.A.S. & Aidar, M.P.M.** 2004b. Mobilização de reservas. *In* Germinação: do básico ao aplicado (A.G. Ferreira & F. Borghetti, eds.). Ed. Artmed, Porto Alegre. p. 164-185.
- Bueno, E., Roquero, A., Fernandes, F.L., Lewis, G.P., Lima, H.C., Montaigne, J.M., Guedes, M.J. & Manzano, N.** 2002. Pau-brasil. Ed. Axis Mundi, São Paulo. 279 p.
- Bulbovas, P.** 2005. Defesas antioxidativas em plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) como indicadores de resistência da espécie à poluição atmosférica na cidade de São Paulo, SP. Tese de Doutorado, Curso de Pós-graduação em Ecologia, Instituto de Biociências, USP, São Paulo. 108 p.
- Caffrey, M., Fonseca, V., Leopold, A.C.** 1988. Lipid-sugar interactions. Relevance to anhydrous biology. *Plant Physiology* 86: 754-758.
- Carvalho, E.M. & Nakagawa, J.** 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4ª ed. Ed. Funep, Jaboticabal.
- Castro, R.D., Bradford, K.J. & Hilhorst, H.W.M.** 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. *In* Germinação: do básico ao aplicado (A.G. Ferreira & F. Borghetti, eds.). Ed. Artmed, Porto Alegre. p. 51-67.
- Corvello, W.B.V., Villela, F.A., Nedel, J.L. & Peske, S.T.** 1999. Maturação fisiológica de sementes de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.). *Revista Brasileira de Sementes* 21(2): 23-27.

- Cunha, M.W. & Lima, H.C.** 1992. Viagem à terra do pau-brasil. Agência Brasileira de Cultura, Rio de Janeiro.
- Daws, M.I., Lydall, E., Chmielarz, P., Leprince, O., Matthews, C.A., Thanos, C.A. & Pritchard, H.W.** 2004. Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastanum* across Europe. *New Phytologist* 162: 157-166.
- Frankel, O.H. & Soulé, M.E.** 1992. Conservation and evolution. Cambridge University Press, Cambridge.
- Garay, I. & Dias, B.** (org.). 2001. Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento. Ed. Vozes, Petrópolis.
- Garcia, I.S., Souza, A., Barbedo, C.J., Dietrich, S.M.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2006. Changes in soluble carbohydrates during storage of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood) seeds, an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Biology* 66(2B): 739-745.
- Hellmann, M.E.** 2006. Tolerância ao congelamento e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). Dissertação de mestrado, Curso de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica, São Paulo. 81 p.
- 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 inicial. *Revista Brasileira de Botânica* 29(1): 93-101.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A. & Buitink, J.** 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 431-438.
- Hung, L.Q.** 2003. Effect of maturation on seed germination of *Dalbergia cochichinensis* Pierre. *Seed Technology* 25: 124-127.
- IBAMA.** Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Brasil). Portaria 37-N, de 3 de abril de 1992) Disp. In: [http:// www.ibama.gov.br](http://www.ibama.gov.br)

- Jalink, H. Frandas, A. Van der Schoor & Bino, J.B.** 1998. Chlorophyll fluorescence of the testa of *Brassica oleracea* seeds as an indicator of seed maturity and seed quality. *Scientia Agricola* 55: 88-93.
- Kermode, A.R.** 1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Reviews in Plant Sciences* 9: 155-195.
- Lewis, G.P.** 1998. *Caesalpinia*: a revision of the *Poincianella-Erythrostemon* group. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Lin, T.P. & Huang, N.H.** 1994. The relationship between carbohydrate composition of some tree seeds and their longevity. *Journal of Experimental Botany* 278(45): 1289-1294.
- Lopes, J.C., Dias, P.C. & Pereira, M.D.** 2005. Maturação fisiológica de sementes de quaresmeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40(8): 811-816.
- Lorenzi, H.** 1992. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Ed. Plantarum, Nova Odessa.
- Marcos Filho, J.** 2005. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. FEALQ, Piracicaba.
- Martins, CC, Silva, DD.** 1997. Maturação e época de colheita de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. Ex Benth. *Revista Brasileira de Sementes* 19(1): 96-99.
- Mendes, A.M.S., Figueiredo, A.F. & Silva, J.F.** 2006. Crescimento e maturação dos frutos e sementes de urucum. *Revista Brasileira de Sementes* 28(1): 133-141.
- Mittermeier, R.A., Myers, N., Gil, P.R. & Mittermeier, C.G.** 1999. Hotspots: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. CEMEX.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B. & Kent, J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Obendorf, R.L.** 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Science Research* 7: 63-74.
- Paiva, J.** 1999. *Relíquias vegetais de Portugal*. Câmara Municipal de Leiria, Leiria.

- Pereira, T.S. & Mantovani, W.** 2001. Maturação e dispersão de *Miconia cinnamomifolia* (DC.) Naud. na reserva biológica do poço das antas, município de Silva Jardim, RJ, Brasil. *Acta Botânica Brasileira* 15(3): 335-348.
- Peterbauer, T., Richter, A.** 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science. Research* 11: 185-197.
- Piña-Rodrigues, F.C.M. & Aguiar, I.B.** 1993. Maturação e dispersão de sementes. *In* Sementes florestais tropicais (I.B. Aguiar, F.C.M. Piña-Rodrigues & M.B. Figliolia). ABRATES, Brasília. cap. 5.
- Pratavieira, J.S., Borges, I.F. & Barbedo, C.J.** 2005. Maturação de sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess, E. e *E. involucrata* DC. (Myrtaceae). 12ª Reunião Anual do Instituto de Botânica. Painel.
- 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. 396 p.
- Silva, A. & Aguiar, I.B.** 1999. Época de colheita de sementes de *Ocotea catharinensis* Mez. (canela-preta) – Lauraceae. *Revista do Instituto Florestal* 11(1): 43-51.
- Silveira, M.A.M., Villela, F.A. & Tillmann, M.A.A.** 2002. Maturação fisiológica de sementes de calêndula (*Calendula officinalis* L.). *Revista Brasileira de Sementes* 24(2): 31-37.
- Summerfield, R.J., Ellis, R.H., Craufurd, P.Q., Aiming, Q., Roberts, E.H. & Wheeler, T.R.** 1997. Environmental and genetic regulation of flowering of tropical annual crops. *Euphytica* 96: 83-91.

## RESUMO GERAL

*Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) é uma das espécies mais importantes do Brasil. Entretanto, foi incluída na lista de espécies da flora brasileira em risco de extinção. Com valor econômico devido à utilização de sua madeira para a construção de arcos de violino, a espécie também é ornamental, sendo cultivada em parques e ruas.

Suas sementes já foram consideradas de baixa longevidade em armazenamento, entretanto, é possível se obter até 80% de germinação após 18 meses de armazenamento em temperaturas baixas, desde que as sementes sejam previamente selecionadas e secas em condições controladas.

Diversos fatores podem interferir na manutenção da viabilidade e conservação da semente, principalmente a qualidade fisiológica inicial. Esta qualidade depende, entre outros fatores, do estágio de maturação das sementes, sendo importante a identificação da maturidade fisiológica que determina o melhor momento de colheita.

Considerando as variações observadas no comportamento destas sementes armazenadas e a ausência de informações conclusivas sobre o melhor momento de sua colheita, o presente trabalho descreve modificações morfológicas e fisiológicas de sementes de *C. echinata* durante o processo de maturação em quatro diferentes regiões do estado de São Paulo (latitude variando de 20° S a 24° S, altitude de 0m a 900m), com o objetivo de identificar a maturidade fisiológica.

Durante o período de máximo florescimento, flores foram marcadas no dia de sua antese e posteriormente foram coletados frutos diretamente das árvores com diferentes dias após o florescimento (DAF) e também sementes provenientes de dispersão natural.

Frutos e sementes foram analisados quanto as suas características externas e dimensões (comprimento, largura e espessura). Das sementes também foram analisados o teor de água, matéria seca, germinação, vigor e variações nos carboidratos solúveis, ciclitóis e galactosil ciclitóis.

Resultados mostram que a coloração dos frutos, as dimensões e o teor de água de sementes

podem ser utilizados para indicar o início da fase de deiscência. Sementes adquirem a capacidade germinativa aproximadamente aos 30-40 DAF e plântulas normais atingem máximos valores somente ao final do processo de maturação, que foi aos 65 DAF. Variações nos carboidratos solúveis, ciclitóis e galactosil ciclitóis foram relacionados com o processo de maturação e a qualidade das sementes.

Foi possível concluir que a maturidade fisiológica das sementes de *Caesalpinia echinata* ocorre ao redor de 60-65 DAF no estado de São Paulo, imediatamente antes da dispersão. O período entre a maturação e a dispersão é crítico para a obtenção de sementes de elevada qualidade, afetando a sua germinação e o armazenamento. Contudo, a coleta prematura das sementes leva à obtenção de sementes de baixa qualidade e vigor. A caracterização precisa do estágio de maturação é crucial para definir o melhor momento de colheita de sementes de *C. echinata*.

Os resultados apresentados neste trabalho acrescentam informações sobre uma espécie da Mata Atlântica em risco de extinção e contribuem para a proteção desse ambiente, em especial a flora de Leguminosae, uma das mais ricas e importantes famílias dos trópicos.

**ABSTRACT OF DISSERTATION**

Maturation of Seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood)

in plantations located in State of São Paulo

*Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood) is one of the most important plant species in Brazil and has been included in the list of the Brazilian flora species at risk of extinction. Besides its current economical value for the violin bow manufacturing, this species is also an ornamental tree, commonly cultivated in streets or parks.

The seeds of *C. echinata* was considered of short life span in the past. However, it is possible to obtain up to 80% of germination after 18 months of storage under low temperatures, if the seeds were properly selected before storage and dried under controlled conditions.

Several factors may interfere in the maintenance of both seed viability and conservation, mainly its initial physiological quality. Among other factors, this quality depends on the maturation stage, being important to identify the physiological maturity to determine the best time for harvesting. Considering the variations observed in the behaviour of seeds under storage and the little conclusive information about the best time for harvesting the seeds of *C. echinata*, the present work describes morphological and physiological changes during the maturation process of these seeds, in four different regions of the state of São Paulo (latitudes varying from 20° S to 24° S, altitude from 0m to 900m), in order to characterize their physiological maturity.

During the flowering period individual flowers were tagged on the day of their anthesis and the pods were collected directly from the branches at different days after flowering (DAF) until natural dispersion.

Fruits and seeds were analysed for external characteristics that included size (length, width and thickness). The seeds were also analysed for water content, dry matter, germination, vigour and

variations of soluble carbohydrates, cyclitols and cyclitol galactosides.

Results showed that the colour of the fruits and both dimensions and water content of the seeds could be used to indicate the beginning of the dehiscence phase. Seeds began to be able to germinate around 30-40 DAF and normal seedlings reached maximum values at the end of the maturation period, that was 65 DAF. Variations in soluble carbohydrates, cyclitols and cyclitol galactosides of *C. echinata* seeds were related with the maturation process and seed quality.

It was possible to conclude that physiological maturity of *Caesalpinia echinata* seeds occurred ca. 60-65 DAF in all regions of the State of São Paulo, immediately before shedding. This short period between maturity and shedding is critical for obtaining lots of seeds with high physiological quality, affecting further the germinability and storability of the seeds. Conversely, harvesting premature seeds led to lower seed quality although they germinated. Therefore, the precise characterization of the physiological maturity stage is crucial to define the best time for harvesting *C. echinata* seeds.

Data reported in this article increase the information about an endangered species of the Atlantic Forest and contribute to the protection of this environment, particularly concerning the Leguminosae flora, that is one of the richest and most important families of the tropics.