

**Tolerância ao congelamento e armazenamento de sementes de**  
***Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil)**

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

**Tolerância ao congelamento e armazenamento de sementes de**  
***Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil)**

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

ORIENTADOR: DR. CLAUDIO JOSÉ BARBEDO

*“Nunca abandone seu ideal. A semente foi plantada em sua mente. Acompanhe com paciência e confiança, seu germinar, crescer, florescer e frutificar”*

À Denise, minha adorável  
esposa, amiga e companheira,  
dedico

## **Agradecimentos**

A minha esposa Denise, que sempre esteve ao meu lado durante este período, me apoiando, incentivando e inúmeras vezes me auxiliando.

A minha mãe, Maria Elena, que sempre me apoiou nos meus estudos, não financeiramente, mas com palavras de incentivo.

Ao meu pai, Rufino e meus familiares Goret, Neide, Zenaide, Marcio, Julia, Ana Carolina e Nicolas, que compreenderam os momentos em que não foi possível visitá-los no interior.

Ao meu sogro e minha sogra, Sidney e Deolinda, que também compreenderam a ausência da filha que não os visitava para poder me ajudar.

Ao Dr. Claudio José Barbedo pela amizade sincera, orientação, dedicação e paciência durante os ensinamentos científicos, além de incentivar-me profissionalmente.

À Adeliana, Laís e Artur pelo “empréstimo” do marido e pai (Dr. Claudio) nos momentos de revisão desta pesquisa.

Agradecimento especial à Dra. Rita de C.L. Figueiredo Ribeiro pela amizade sincera, orientação, compreensão em momentos difíceis e “muita” paciência nos ensinamentos de bioquímica, além da confiança e incentivo profissional.

À Dra. Denise Bília, que me acolheu com muito carinho e simpatia no Instituto de Botânica, além de ser a responsável pelo meu primeiro contato científico com as sementes.

À Dra. Sonia M. de Campos Dietrich (Coordenadora do Programa de Pós-Graduação) e Dra. Solange C. Mazzoni-Viveiros (Vice-coordenadora), por ter proporcionado, por meio do curso de pós-graduação, oportunidades aos futuros cientistas botânicos.

Ao Odair (Mr. Oda) pela atenção e contribuição na revisão dos abstracts.

Aos companheiros do Index Seminum Igor, Marcio, Juliana (Juzinha), Juliana (Iura), Cristina, Liliana, Paulo, Carmen, Nestor e João Paulo pela amizade e auxílio durante a realização dos experimentos, além do Rodrigo da Fisiologia.

Às amigas Amanda Souza, Amanda Assega, Vanessa, Maitê, Patrícia Gaya, Mary, Sirlei e todas as pessoas do laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas que me auxiliaram direta ou indiretamente na realização das análises bioquímica.

À Simone e Eduardo Leduc, pela amizade incontestável, simpatia, incentivo e confiança no meu trabalho.

Aos funcionários da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu pela gentileza e cordialidade. Ao Dr. João Giudice Neto e ao Dr. Marcos Mecca Pinto pela receptividade e apoio na Fazenda Campininha.

Aos funcionários do Instituto de Botânica que contribuíram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste projeto: Márcia (secretária da Pós-graduação), às bibliotecárias, às senhoras do Xerox, aos motoristas Mazinho, Wilson e Zanqueta.

A FAPESP, pelo auxílio financeiro do projeto temático Processo 2000/06422-4, ao qual este trabalho estava inserido e a CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

Àqueles que, involuntariamente, omiti.

## Índice

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução Geral.....                                                                                                                      | 1  |
| 2. Objetivo Geral.....                                                                                                                        | 8  |
| 3. Capítulo 1 – Tolerância ao congelamento de sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. (pau-brasil).....                                  | 10 |
| Abstract.....                                                                                                                                 | 11 |
| Resumo.....                                                                                                                                   | 12 |
| Introdução.....                                                                                                                               | 13 |
| Material e Métodos.....                                                                                                                       | 15 |
| Resultados e Discussão.....                                                                                                                   | 16 |
| Literatura Citada.....                                                                                                                        | 18 |
| 4. Capítulo 2 - Congelamento e armazenamento de sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. (pau-brasil).....                                | 23 |
| Abstract.....                                                                                                                                 | 24 |
| Resumo.....                                                                                                                                   | 25 |
| Introdução.....                                                                                                                               | 26 |
| Material e Métodos.....                                                                                                                       | 28 |
| Resultados e Discussão.....                                                                                                                   | 30 |
| Literatura Citada.....                                                                                                                        | 33 |
| 5. Capítulo 3 - Armazenamento, teor de água e carboidratos não estruturais em sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. (Leguminosae)..... | 41 |
| Abstract.....                                                                                                                                 | 42 |
| Resumo.....                                                                                                                                   | 43 |
| Introdução.....                                                                                                                               | 44 |
| Material e Métodos.....                                                                                                                       | 46 |
| Resultados e Discussão.....                                                                                                                   | 48 |

|                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------|----|
| Literatura Citada.....                                    | 55 |
| 5. Discussão Geral.....                                   | 68 |
| 6. Literatura Citada na Introdução e Discussão Geral..... | 72 |
| 7. Resumo.....                                            | 78 |
| 8. Abstract.....                                          | 80 |

## Introdução Geral

Áreas com grande diversidade biológica e alto índice de devastação, conhecidas mundialmente como *hotspots*, devem ter prioridade de conservação. A classificação dessas áreas é feita principalmente com base nas plantas vasculares, pois representam a grande maioria das espécies vegetais e são essenciais para as demais formas de vida, além de serem mais conhecidas cientificamente. Para ser classificada como *hotspot* uma área deve conter pelo menos 0,5% das 300.000 espécies endêmicas de plantas do mundo e já ter sido intensamente devastada, com descaracterização de pelo menos 70% da vegetação nativa (Myers *et al.* 2000).

No Brasil, dois biomas são considerados como *hotspots*: a Floresta Atlântica, da qual restam apenas 7,5% de sua área original e o Cerrado, com cerca de 20% do total original, ambos com alta porcentagem de espécies endêmicas (Myers *et al.* 2000).

A Mata Atlântica é um dos biomas tropicais com maior diversidade biológica, não possui fisionomia uniforme e apresenta muitas espécies vegetais consideradas endêmicas (Peixoto 1991, 1992). Dentre estas, destaca-se o pau-brasil, *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinoideae), ou ibirapitanga dos indígenas brasileiros, considerada uma das árvores mais raras nesse bioma devido à exploração excessiva e ao desmatamento em grande escala ocorrido nos últimos 500 anos. Esta árvore foi muito valorizada como madeira de tintura e, de 1501 até cerca de 1850, enormes quantidades foram extraídas da costa oriental brasileira. Em função dessa ampla exploração, sua distribuição original resume-se, atualmente, a pequenos remanescentes (Cunha & Lima 1992, Mello-Filho 1991, 1992, Cardoso *et al.* 1998, Lima 2003).

A extração, o comércio e o tráfico dessa madeira iniciaram-se no século XVI com os europeus, principalmente portugueses, logo no início da colonização do Brasil, constituindo-se o primeiro ciclo econômico da colônia recém formada. O principal interesse na época pelo pau-brasil era para extração do corante encontrado em seu cerne, a brasilina, incolor naturalmente, mas quando em contato com soluções alcalinas e em reação com o oxigênio do ar se torna vermelha e

transforma-se em outro composto denominado brasileína, utilizado para tingir penas e algodão (Vianna 1944 apud Rocha 2004).

Inicialmente o pau-brasil era encontrado naturalmente na porção de Mata Atlântica dos Estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte (Rocha, 2004). Atualmente ainda há suspeita de corte ilegal de pau-brasil para a confecção de arcos de instrumentos musicais, devido à qualidade de sua madeira para este fim (Rocha 2004, Longui 2005).

O pau-brasil pode ser considerado uma planta heliófila e resistente ao sol (Baroni 2005). Informações obtidas em arboreto experimental plenamente estabelecido desde sua implantação, há cerca de 25 anos na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, em área de cerrado, na cidade de Mogi-Guaçu (SP), comprovam a perfeita adaptação da espécie ao cultivo em áreas abertas e de clima seco (Rocha 2004).

O avanço das ações antrópicas sobre áreas naturais vem ocasionando o desaparecimento de muitas espécies e levando outras a ocuparem pequenos remanescentes, reduzindo a variabilidade genética, tal como ocorre com o pau-brasil.

Uma alternativa para a manutenção da variabilidade genética de plantas é o cultivo de mudas em viveiros ou implantação de bosques, métodos que apresentam várias dificuldades, tais como material, custo financeiro e mão-de-obra qualificada. Também são necessários cuidados periódicos, como irrigação, adubação, controle de pragas e doenças, pois estão susceptíveis a riscos bióticos e abióticos e, ainda, deve-se dispor de amplo espaço físico para o cultivo e manutenção dos exemplares.

Outra alternativa é a utilização das espécies no espaço urbano. A árvore de pau-brasil, por exemplo, é indicada para arborização urbana devido ao seu porte elegante, entre outros atributos favoráveis (Barbedo *et al.* 2005), apesar de ser sensível, enquanto jovem, aos poluentes aéreos de grandes cidades (Bulbovas 2005).

Iniciativas públicas e privadas para a conservação do pau-brasil foram feitas através de implantação de bosques homogêneos, algumas vezes em áreas de ocorrência não natural da espécie (Rocha 2004), como os mantidos pelo Instituto de Botânica, no Estado de São Paulo, no Parque Estadual Fontes do Ipiranga, São Paulo e na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu.

Uma outra forma para a preservação de plantas é a criopreservação, que consiste na conservação de materiais biológicos a -196 °C, empregando-se nitrogênio líquido, buscando-se a paralisação dos processos metabólicos. Essa técnica foi eficiente, por exemplo, para a conservação das sementes ortodoxas de *Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl. (Medeiros & Cavallari 1992) e para embriões de *Araucaria hunsteinii* K. Schum (Pritchard & Prendergast 1986). No entanto, tal técnica é muitas vezes inviável devido ao alto custo do material utilizado.

Contudo, a maneira mais comum, simples, viável e econômica de conservar e preservar os genótipos de plantas *ex situ* é através do armazenamento de sementes. Porém, algumas espécies não apresentam condições para armazenamento por períodos prolongados em condições de ambiente natural e outras necessitam serem conservadas em bancos de germoplasma a -20 °C (Salomão 2002).

A perda de valiosos germoplasmas de plantas torna importante a preservação de sementes em bancos de germoplasma. Embora *Caesalpinia echinata* apresente grande importância histórica e econômica e figure entre as espécies ameaçadas de extinção ou, ao menos, entre as que sofreram grande erosão genética - o que deveria despertar preocupação com a manutenção de bancos de germoplasma - ainda há necessidade de conhecer diversos aspectos relacionados à obtenção e manutenção de suas sementes.

A casca das sementes, em geral, oferece proteção ao embrião contra a perda de água e ataques de patógenos e herbívoros. Além disso, as sementes são indivíduos independentes da planta mãe, podendo se desenvolver em outro local com suas próprias reservas nutritivas, armazenadas principalmente na forma de carboidratos, lipídeos e proteínas. Tais reservas são consumidas durante

a manutenção e o desenvolvimento do embrião até a formação de uma plântula capacitada a se manter de forma autotrófica, ou seja, capaz de retirar do ambiente os nutrientes necessários para seu estabelecimento e desenvolvimento (Buckeridge *et al.* 2004a).

Os carboidratos estão entre os principais compostos de reserva das sementes, incluindo a sacarose, os oligossacarídeos da série da rafinose, o amido e alguns polissacarídeos da parede celular. A sacarose é encontrada em praticamente todas as sementes e os oligossacarídeos da série da rafinose também são encontrados entre os carboidratos solúveis de sementes de várias espécies de dicotiledôneas. O amido é um dos compostos de reserva de maior ocorrência nos vegetais superiores, já os polissacarídeos de parede celular podem atuar como reserva, mas preservam funções estruturais importantes no controle de absorção e de distribuição da água nos diferentes tecidos das sementes (Takaki & Dietrich 1980, Buckeridge *et al.* 2004b).

De acordo com Roberts (1973), as sementes podem apresentar dois comportamentos distintos em relação à água ao final da maturação: as ortodoxas reduzem o seu teor de água até valores próximos a 10% impedindo, com isso, sua imediata germinação; as recalcitrantes, além de manterem elevado teor de água, facilitando o processo germinativo que muitas vezes ocorre na planta-mãe (viviparidade), não suportam secagem.

Sementes ortodoxas toleram dessecação ao final da maturação, o que lhes confere maior longevidade, permitindo armazenamento por períodos prolongados (Barbedo & Marcos Filho 1998). Contudo, há necessidade de controle da redução do teor de água das sementes, pois para cada espécie há um valor específico ideal.

Quando se trata de armazenamento de sementes, elevados teores de água podem reduzir a longevidade das mesmas, alterando o metabolismo e favorecendo o crescimento de patógenos prejudiciais à manutenção de sua capacidade germinativa. Por outro lado, a viabilidade do material biológico é aumentada quando armazenado após secagem e em ambiente frio (Vertucci & Roos 1990).

Sementes com alto teor de água também não podem ser armazenadas em temperaturas abaixo de zero, porque o rápido declínio da temperatura pode conduzir ao super-resfriamento das soluções aquosas celulares, acarretando a formação de gelo intracelular, com várias conseqüências como a formação de cristais de gelo e seus distúrbios na integridade do protoplasma, que são instantaneamente letais (Burke *et al.* 1976).

O gelo ocupa maior volume que a água líquida, mas nas plantas forma-se principalmente em espaços vazios. Se o teor de água dos tecidos vegetais for elevado, o excesso de água levará ao congelamento extracelular e intracelular, podendo ocasionar vários distúrbios nas células, tecidos e nas plantas como um todo (Guy 2003).

A sobrevivência das células após o congelamento-descongelamento é acentuadamente maior se o resfriamento for lento. Isto é atribuído ao efeito de formação de gelo intracelular. O congelamento intracelular deve ser evitado por meio do controle da perda da água intracelular. Então o congelamento extracelular deve ocorrer antes, para permitir a sobrevivência celular e da planta quando submetida à exposição em temperaturas negativas. Isto significa que ali deve haver uma barreira entre o interior da célula e o gelo extracelular, função talvez exercida pela membrana plasmática (Guy 2003).

Yamada *et al.* (2002) sugerem que as respostas ao congelamento das células de plantas resistentes ao resfriamento não são devidas apenas às propriedades da membrana plasmática, mas também às propriedades da parede celular, servindo como barreiras contra a propagação de gelo extracelular. Portanto, o teor de água das sementes exerce função essencial na sua sobrevivência quando são submetidas ao congelamento.

Sementes de *Coffea arabica* L. apresentaram respostas positivas ao armazenamento a -20 °C, apenas quando o seu teor de água era de 0,12 g H<sub>2</sub>O/g massa seca. Acima desse valor houve menor porcentagem de germinação em sementes expostas às mesmas condições térmicas (Eira *et al.* 1999).

Além do controle do teor de água, é necessário também o conhecimento de alterações bioquímicas ocorridas nas sementes durante o armazenamento (Kermode 1990, Carvalho & Nakagawa 2000).

Em sementes ortodoxas, a resistência à dessecação é desenvolvida durante a fase de acúmulo de reservas (Kermode 1995, Pammenter & Berjak 1999). Aparentemente os carboidratos solúveis e os ciclitóis estão diretamente relacionados com esse processo, principalmente durante a maturação e o armazenamento das sementes (Obendorf 1997). Há suspeitas de que os mesmos carboidratos relacionados com a tolerância a dessecação das sementes estejam também envolvidos na tolerância ao congelamento.

Nas sementes, assumem importante papel a rafinose e a estaquiase, mas o principal açúcar solúvel encontrado é a sacarose (Castilho *et al.* 1990), como já mencionado. Recentemente foi demonstrado que a sacarose exógena, quando em baixas concentrações, atua como substrato para as alterações metabólicas em plantas submetidas a baixas temperaturas; em altas concentrações, esse açúcar tem um efeito crioprotetor direto sobre as membranas celulares (Uemura & Steponkus 2003).

Klotke *et al.* (2004) indicaram um possível papel indireto da sacarose na aclimação ao frio em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* (Linnaeus) Heynhold, servindo como um substrato metabólico para a síntese de compostos crioprotetores em vez de, ou além de, um efeito crioprotetor direto do dissacarídeo.

Em sementes de algumas espécies, principalmente de Leguminosae, ocorre acúmulo de ciclitóis livres e, principalmente, galactosil ciclitóis. Estes, juntamente com a sacarose, poderiam contribuir para a estabilidade estrutural de organelas, membranas, enzimas e outras macromoléculas e para a formação do estado vítreo, fundamental na tolerância das sementes à dessecação (Obendorf 1997, Peterbauer & Richter 2001).

Estudando sementes de várias espécies, Steadman *et al.* (1996) encontraram conteúdo de sacarose maior nos eixos embrionários que nos cotilédones quando as sementes foram submetidas à

secagem, porém não se pode afirmar que este fato seja um indicio de tolerância à dessecação ou ao congelamento.

Em sementes ortodoxas, os oligossacarídeos da série da rafinose têm sido relacionados com a tolerância à dessecação (Lin & Huang 1994) e, conseqüentemente, com a longevidade das sementes (Bernal-Lugol & Leopold 1992). A presença de rafinose previne a cristalização da sacarose durante a secagem, protegendo a membrana (Caffrey *et al.* 1988). O papel crioprotetor da rafinose também sugere que a sua presença pode ser um bom indicador de tolerância ao congelamento em *Arabidopsis thaliana* (Linnaeus) Heynhold (Klotke *et al.* 2004).

Sementes de pau-brasil foram consideradas ortodoxas, tolerando redução do teor de água até 7,6%. Através dessa redução, associada ao armazenamento a 6-8 °C foi possível conservar a viabilidade dessas sementes por até 18 meses (Barbedo *et al.* 2002). Contudo, ao final desse período, já apresentavam sinais de perda de vigor, indicando que a completa perda da capacidade germinativa poderia estar próxima. Sem a secagem associada à redução da temperatura de armazenamento, essas sementes perderam completamente a viabilidade após cerca de seis meses de armazenamento.

Sementes maduras de pau-brasil apresentam altos níveis de sacarose, sugerindo estarem relacionados com a tolerância a dessecação e supostamente ao congelamento. Todavia, nestas sementes, rafinose e estaquiose foram encontradas em baixíssimas concentrações (Garcia *et al.* 2006), indicando que outros compostos, com funções similares, poderiam estar atuando, juntamente com a sacarose, na proteção das membranas durante a secagem e ou congelamento.

Apesar dos avanços obtidos na conservação da viabilidade de sementes de *C. echinata* durante o armazenamento, deve-se salientar que o período de armazenamento máximo possível demonstrado (18 meses) é ainda relativamente curto quando se considera a manutenção de bancos de germoplasma.

## OBJETIVO GERAL

Avaliar a tolerância ao congelamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), visando à manutenção da capacidade germinativa por períodos prolongados, através do armazenamento em temperaturas abaixo de zero, bem como avaliar as relações entre essa tolerância e a composição de carboidratos não estruturais.



Figura 1 - Aspectos da espécie *Caesalpinia echinata* LAM. (pau-brasil) – **A** – Árvore, **B** – Folha, **C** – Caule com acúleos, **D** – Corte transversal do caule (cerne com cor vermelha; brasileína), **E** – Inflorescência (flor em destaque), **F** – Frutos, **G** – Sementes.

## CAPÍTULO 1

**Tolerância ao Congelamento de Sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.)**

**Título resumido: Congelamento de sementes de pau-brasil**

ABSTRACT – (Freezing tolerance in seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood)). Many species of tropical and subtropical ecosystems have orthodox seeds, in which, it is possible to reduce the water content until levels *ca.* 10%, keeping their viability and when associated to cold temperatures the longevity in some species can be improved. It is important to control the reduction of water during storage at sub-zero temperatures, because excess of water can create ice crystals which might induce cell damage and consequently the reduction in their viability. The purpose of this work was to analyze freezing tolerance in seeds of brazilwood. Seeds containing 12,7% and 22,6% of initial water content were stored at 25 °C, 7 °C and -18 °C and analyzed after 15, 30 and 90 days. The results showed that water content has great influence in the storage of these seeds mainly in negative temperature. There was reduction in the water content of the seeds during storage, depending on the relative humidity of the environment. When seeds were stored at 25 °C, they lost totally viability at 90 days. As for storage at 7 °C the seeds maintained viability throughout the experimental period, also independent of water content. However, when stored at freezing temperatures the seeds with low water content survived, as far as germination and normal seedlings were concerned, while seeds with high water content lost completely the viability at the end of the experiment. Based on these results we concluded that seeds of brazilwood are freezing tolerant as long as their water content is about 12%.

Key words: freezing sensitive, tropical tree, water content, viability

RESUMO – (Tolerância ao congelamento em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam (pau-brasil)).

Em ecossistemas tropicais e subtropicais muitas espécies possuem sementes consideradas ortodoxas, ou seja, aquelas que toleram redução do teor de água até níveis próximos a 10%. Essa tolerância à dessecação é importante quando se pretende armazenar as sementes a temperaturas sub-zero, pois o excesso de água pode formar cristais de gelo que causarão danos às células e, conseqüentemente, redução da viabilidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a tolerância das sementes de pau-brasil ao congelamento. Sementes com 22,6% e 12,7% de água, obtidas por diferentes processos de coleta foram armazenadas a 25 °C, 7 °C e -18 °C e avaliadas após 15, 30 e 90 dias. Os resultados demonstraram que houve redução do teor de água das sementes durante o armazenamento, de acordo com a umidade relativa do ambiente onde foram armazenadas. Quando armazenadas a 25 °C, as sementes perderam totalmente a viabilidade aos 90 dias, independentemente do teor de água. Em relação ao armazenamento a 7 °C, não houve diferença entre os lotes e as sementes mantiveram a viabilidade. Todavia, quando congeladas, somente as sementes com baixo teor de água permaneceram viáveis durante o período de armazenamento, tanto em relação à germinação quanto ao desenvolvimento de plântulas normais, enquanto as sementes com alto teor de água inicial perderam totalmente a viabilidade ao final do experimento. De acordo com os resultados obtidos conclui-se que sementes de pau-brasil são tolerantes ao congelamento desde que seu teor de água esteja por volta de 12%.

Palavras chave: sensibilidade ao congelamento, árvore tropical, teor de água, viabilidade

## Introdução

Ecossistemas tropicais e subtropicais possuem muitas espécies arbóreas e arbustivas com sementes consideradas recalcitrantes, ou seja, não toleram secagem a níveis baixos, bem como sementes de comportamento considerado intermediário, que toleram secagem, mas perdem a viabilidade quando são armazenadas em baixa temperatura. Contudo, várias espécies possuem sementes consideradas ortodoxas, nas quais é possível a redução do teor de água até níveis próximos a 10%, o que pode aumentar sua viabilidade (Roberts 1973, Ellis *et al.* 1990, 1991).

Em uma semente seca a solução celular assume comportamento de um sistema viscoso e a taxa de reações químicas é reduzida para níveis insignificantes (Vertucci & Roos 1990).

Além da redução do teor de água, muitas espécies têm a capacidade de armazenamento ampliada quando essa redução está associada à diminuição da temperatura (Walters *et al.* 1998), devido à redução do metabolismo.

Durante o desenvolvimento das sementes, muitos compostos bioquímicos são acumulados, e alguns deles têm suposto envolvimento com a tolerância à dessecação (Blackman *et al.* 1991). Entretanto, pouco se conhece em relação à aquisição da tolerância ao congelamento de sementes.

A criopreservação é uma técnica que vem sendo utilizada para a manutenção de sementes em bancos de germoplasma. Tal técnica compreende a conservação de material biológico a temperaturas ultrabaixas, geralmente em nitrogênio líquido a -196 °C, nas quais todos os processos metabólicos são essencialmente paralisados e mantidos em estado latente, proporcionando preservação praticamente indefinida (Medeiros & Cavallari 1992). Contudo, durante a exposição ao nitrogênio líquido sementes de algumas espécies podem ter considerável redução da sua viabilidade (Barbour & Parresol 2003).

Outra técnica que requer cuidados não tão tecnificados e custos não tão elevados, utilizada por muitos bancos de germoplasma de sementes ortodoxas, é o congelamento e armazenamento das

sementes a aproximadamente -18 °C (Roberts 1973). Com isso, a longevidade pode ser prolongada por décadas, muitas vezes de forma previsível.

A capacidade dos tecidos vegetais sobreviverem a temperaturas sub-zero depende da sua tolerância não apenas à temperatura negativa, mas também à dessecação. Muitas espécies apresentam limites nessas tolerâncias (Chin *et al.* 1989), tornando necessário o conhecimento do grau de tolerância à secagem associado com a resposta dos tecidos ao congelamento.

Durante o congelamento ocorre o super-resfriamento da célula e de seu meio externo e, posteriormente, ocorre formação de gelo extracelular. O meio intracelular permanece descongelado, provavelmente devido à presença de barreiras celulares impostas pela parede celular e membrana plasmática, prevenindo a formação de cristais de gelo no citoplasma (Mazzur 1963).

Quando a redução da temperatura é lenta ocorre perda de água do interior da célula para a solução extracelular, sendo então convertida em gelo na superfície das células ou entre o protoplasto e a parede celular. Com isso, a célula desidrata-se, reduzindo a um mínimo ou removendo completamente a água livre, evitando assim a formação de gelo em seu interior. Se a temperatura for mantida constante ocorre equilíbrio e não haverá desidratação adicional (Santos 2000).

As sementes de pau-brasil quando mantidas em ambiente de laboratório (25 °C) mantêm a viabilidade por no máximo três meses. Contudo, Barbedo *et al.* (2002) demonstraram que sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. têm comportamento característico de sementes ortodoxas, uma vez toleraram redução do teor de água para 7,6%, mantendo a viabilidade por até 18 meses quando armazenadas a 7 °C. Porém, após esse período de armazenamento o desenvolvimento de plântulas normais foi cerca de 21%, considerado insatisfatório.

Não se conhece a resistência destas sementes a temperaturas sub-zero, o que poderia aumentar o período de armazenamento. Visto que as sementes de diferentes espécies se comportam de forma diferente em relação às temperaturas negativas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a

tolerância das sementes de pau-brasil ao congelamento, com vistas a ampliar sua longevidade durante o armazenamento.

### Material e métodos

Sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) foram obtidas de aproximadamente 20 árvores em bosque homogêneo implantado na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, Município de Mogi-Guaçu, SP (22°15-16'S, 47°8-12'W). Três procedimentos para obtenção de sementes foram realizados: 1) colheita de frutos maduros com coloração totalmente castanha (Borges *et al.* 2005) e com remoção manual das sementes em laboratório (denominadas sementes não dispersas); 2) coleta de sementes recém-dispersas (menos de 24 horas da dispersão) em época sem ocorrência de chuva nas 24 horas anteriores à colheita (denominadas sementes dispersas em época seca); 3) coleta de sementes recém-dispersas em época de ocorrência de chuva nas 24 horas anteriores à colheita (denominadas sementes dispersas após chuva).

As sementes assim obtidas foram inicialmente avaliadas quanto a teor de água e germinação. O teor de água foi avaliado pelo método da estufa a 103 °C/ 17 horas (Ista 1996), com quatro repetições de três sementes cada. O teste de germinação foi realizado em germinadores com circulação interna de água, regulados para 25 °C (Mello *et al.* 2004), com as sementes colocadas em rolos de papel (Brasil 1992), com quatro repetições de dez sementes cada. Neste teste avaliaram-se, a cada três dias, as sementes germinadas (protrusão da raiz primária de, no mínimo, 2 cm) e o desenvolvimento de plântulas normais (Barbedo *et al.* 2002).

As sementes de cada procedimento de colheita foram, então, armazenadas em câmaras com três temperaturas distintas,  $25 \pm 1$  °C (umidade relativa do ar, UR,  $72\% \pm 3\%$ ; potencial hídrico,  $\Psi$ , -39,5 MPa),  $7 \pm 3$  °C (UR  $45\% \pm 7\%$ ; potencial hídrico,  $\Psi$ , -101,9 MPa) e  $-18 \pm 5$  °C (UR  $84\% \pm 10\%$ ; potencial hídrico,  $\Psi$ , -20,3 MPa). Após 15, 30 e 90 dias de armazenamento, as sementes foram novamente avaliadas quanto ao teor de água e germinação.

As sementes dispersas após chuva (procedimento 3) não foram incluídas no delineamento experimental e nas análises estatísticas por terem perdido totalmente a capacidade germinativa já após os primeiros 15 dias, em quaisquer das câmaras. Dessa forma, constituiu-se um experimento fatorial 2 x 3 (procedimento de coleta x condições de armazenamento), em delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (Gomes 1982). Para realização das análises estatísticas, os valores de porcentagem, quando necessário para ajuste da normalidade, foram transformados para  $\text{arc sen } (\%)^{0,5}$ .

### **Resultados e discussão**

As sementes dispersas após chuva estavam com 21,9% de água e apresentavam 25% de germinação. Nos primeiros 15 dias de armazenamento essas sementes perderam a capacidade germinativa, independentemente da condição de armazenamento, confirmando, dessa forma, a importância da qualidade inicial das sementes de pau-brasil para a conservação de sua viabilidade em armazenamento (Barbedo *et al.* 2002).

O teor de água das sementes dispersas em época seca foi 12,7%, sua germinação 78%, com 70% das sementes apresentando capacidade de desenvolver plântulas normais. As sementes não dispersas apresentavam 22,6% de água, 78% de germinação e 62% de sementes desenvolvendo plântulas normais. Excetuando a diferença do teor de água, as sementes dos dois procedimentos de colheita possuíam semelhante qualidade fisiológica inicial.

Os resultados de teor de água das sementes armazenadas nas diferentes câmaras (tabela 1) evidenciaram a relação diretamente proporcional entre o teor de água e a umidade relativa do ar (UR) da câmara, como já descrito por Carvalho & Nakagawa (2000). Assim, sementes mantidas a 45% de UR (7 °C) tiveram teor de água entre 6,8% e 9,3%, as mantidas a 72% de UR (25 °C)

tiveram entre 10,2% e 11,9% de água e as mantidas a 84% de UR (-18 °C) tiveram teor de água entre 11,3% e 18,3%.

A diferença no teor de água entre as sementes dispersas e as não dispersas foi aparentemente fundamental para a tolerância ao congelamento, principalmente por não terem sido empregados processos artificiais de secagem. O teor de água das sementes dispersas manteve-se relativamente baixo (inferior aos 12,7% iniciais) durante os 90 dias de armazenamento, independentemente do ambiente e chegando a 7,7% nas mantidas a 7 °C (tabela 1).

Nas sementes não dispersas houve rápida redução do teor de água nas armazenadas em temperaturas superiores a zero grau (7 °C e 25 °C), chegando a valores entre 6,8% e 11,9% (tabela 1). Contudo, as sementes não dispersas mantidas a -18 °C tiveram redução dos 22,6% iniciais para 18,3% aos 15 dias, 15,5% aos 30 dias e 13,4% aos 90 dias (tabela 1). Dessa forma, essas sementes permaneceram pelo menos por 15 dias em temperatura sub-zero com teor de água superior a 17% (ou seja, acima de 0,20 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> massa seca), valor considerado crítico para a tolerância ao congelamento de sementes de algumas espécies do gênero *Coffea* (Dussert *et al.* 1998, Eira *et al.* 1999).

O congelamento de sementes de pau-brasil com teor de água elevado resultou na expressiva redução da capacidade germinativa, com apenas 10% das sementes germinando e 8% produzindo plântulas normais após 30 dias de armazenamento e culminando com a perda total da germinação aos 90 dias de armazenamento (tabela 2). A quantidade de água congelável presente nas sementes foi provavelmente o fator mais crítico em relação à sobrevivência a temperaturas sub-zero. Estes resultados indicam que sementes de pau-brasil são tolerantes ao congelamento, desde que seu teor de água não seja elevado. Quando a semente se encontra excessivamente hidratada, pode ocorrer a formação de gelo intracelular durante o congelamento, isto é, formação de cristais de gelo a partir da água livre presente no interior das células (Santos 2000), acarretando injúrias e causando a perda da capacidade germinativa, como foi o caso das sementes de pau-brasil. Sementes com baixo teor de água armazenadas a -18 °C mantiveram tanto a capacidade germinativa quanto a de produção de

plântulas normais após 90 dias de armazenamento (tabela 2). Vertucci (1989) mencionou que a faixa de teor de água na qual a semente suporta baixas temperaturas é estreita e, se excedida, instantaneamente resulta em morte durante o resfriamento e reaquecimento dos tecidos.

Os resultados de germinação e de desenvolvimento de plântulas normais (tabela 2) das sementes de pau-brasil armazenadas sob diferentes temperaturas permitiram confirmar, também, a importância da redução da temperatura para a manutenção da viabilidade dessas sementes, conforme já mostrado por Barbedo *et al.* (2002). Novamente se constatou que a manutenção das sementes em ambiente com temperatura elevada (25°C) acarreta a rápida perda do vigor e da capacidade germinativa já nos primeiros 30 dias de armazenamento (tabela 2), ainda que as sementes não possuam elevado teor de água (tabela 1).

De acordo com os dados obtidos pode-se concluir que o teor de água tem grande influência no armazenamento de sementes de pau-brasil. Em temperatura ambiente,  $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , as sementes perdem a capacidade germinativa rapidamente, porém quando armazenadas a  $7\text{ }^{\circ}\text{C}$  mantém a germinabilidade, independentemente do teor de água inicial. Porém, houve um melhor desenvolvimento de plântulas normais quando o teor de água inicial era mais baixo. A exposição a temperaturas sub-zero evidenciou que sementes de pau-brasil suportam congelamento desde que armazenadas com baixo teor de água inicial, em torno de 12%.

### **Literatura citada**

- 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). Revista Brasileira de Botânica 25: 431-439.
- Barbour, J.R. & Parresol, B.R.** 2003. Effect of liquid nitrogen storage on seed germination of 51 tree species. Seed Technology 2: 183-190.

- Blackman, S.A., Wettlaufer, S.H., Obendorf, R.F. & Leopold, A.C.** 1991. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. *Plant Physiology* 96: 86-874.
- Borges, I.F., Giudice, 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: 851-861.
- Brasil** 1992. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. SNDA/DNDV/CLAV, Brasília, p. 365.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J.** 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4 ed. Funep, Jaboticabal, p. 424.
- Chin, H.F., Krishnapillay, B. & Stanwood, P.C.** 1989. Seed moisture: recalcitrant vs. orthodox seeds. *In* Seed moisture (P.C. Stanwood & M.B. McDonald, eds.). Crop Science Society of America, Madison. pp.15-22.
- Dussert, S., Chabrillange, N., Engelmann, F., Anthony, F., Louarn, J. & Hamon, S.** 1998. Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. *Seed Science Research* 8: 9-15.
- Eira, M.T.S., Walters, C., Caldas, L.S., Fazuoli, L.C., Sampaio, J.B. & Dias, M.C.L.L.** 1999. Tolerance of *Coffea* spp. seeds to desiccation and low temperature. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 11: 97-105.
- Ellis, R.H., Hong, T.D., Roberts, E.H.** 1990. An intermediate category of seed storage behavior? I. Coffee. *Journal of Experimental Botany* 41: 1167-1174.
- Ellis, R.H., Hong, T.D., Roberts, E.H.** 1991. An intermediate category of seed storage behaviour? II. Effects of provenance, immaturity, and imbibition on desiccation tolerance in coffee. *Journal of Experimental Botany* 42: 653-657.
- Gomes, F.P.** 1982. Curso de estatística experimental. 10<sup>a</sup> ed. Nobel, Piracicaba, p. 468.

- Ista.** International Seed Testing Association. 1996. International rules for seed testing, rules 1996. Seed Science and Technology 24 (supplement): 1-335.
- Mazzur, M.L.** 1963. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. Journal of Genetics and Physiology 47: 347-369.
- Medeiros, A.C.S. & Cavallari, D.A.N.** 1992. Conservação de germoplasma de aroeira (*Astronium urundeuva* FR. ALL.) ENGL. I. Germinação de sementes após imersão em nitrogênio líquido (-196 °C). Revista Brasileira de Sementes 14: 73-75.
- 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.
- Roberts, E.H.** 1973. Predicting the storage life of seeds. Seed Science and Technology 1: 499-514.
- Santos, I.R.I.** 2000. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 12: 70-84.
- Vertucci, C.W. & Roos, E.E.** 1990. Theoretical basis of protocols for seed storage. Plant Physiology 94: 1019-1023.
- Vertucci, C.W.** 1989. Effects of cooling rate on seeds exposed to liquid nitrogen temperatures. Plant Physiology 90: 1478-1485.
- Walters, C.** 1998. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. Seed Science Research 8: 223-244.

Tabela 1. Teor de água (%) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) não dispersas e de sementes dispersas em época seca, armazenadas por 15, 30 e 90 dias a  $25 \pm 1$  °C (umidade relativa do ar, UR,  $72\% \pm 3\%$ ; potencial hídrico,  $\Psi$ , -39,5 MPa),  $7 \pm 3$  °C (UR  $45\% \pm 7\%$ ;  $\Psi$  -101,9 MPa) e  $-18 \pm 5$  °C (UR  $84\% \pm 10\%$ ;  $\Psi$  -20,3 MPa).

| Tempo de armazenamento<br>(dias) | Processo de obtenção das sementes / Temperatura de armazenamento |         |          |                         |          |          |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------|----------|-------------------------|----------|----------|
|                                  | Não dispersas                                                    |         |          | Dispersas em época seca |          |          |
|                                  | 25 °C                                                            | 7 °C    | -18 °C   | 25 °C                   | 7 °C     | -18 °C   |
| 0 (inicial)                      | 22,6                                                             | 22,6    | 22,6     | 12,7                    | 12,7     | 12,7     |
| 15                               | 10,9 bBa <sup>1</sup>                                            | 9,3 aCa | 18,3 aAa | 10,2 bBb                | 8,7 aCb  | 12,1 aAb |
| 30                               | 10,9 bBa                                                         | 6,8 cCb | 15,5 bAa | 10,7 bAa                | 8,2 abBa | 11,2 bAb |
| 90                               | 11,9 aBa                                                         | 8,3 bCa | 13,4 cAa | 11,4 aAa                | 7,7 bBb  | 11,3 bAb |
| Coef. variação                   | 3,73 %                                                           |         |          |                         |          |          |

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade; minúsculas para comparação entre tempos de armazenamento, maiúsculas entre temperaturas dentro de cada processo de obtenção, em itálico para comparação entre processos de obtenção dentro de cada temperatura.

Tabela 2. Germinação (%) e desenvolvimento de plântulas normais (%) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) não dispersas (teor de água inicial de 22,6%) e sementes dispersas em época seca (teor de água inicial de 12,7%), armazenadas por 15, 30 e 90 dias a  $25 \pm 1$  °C (umidade relativa do ar, UR,  $72\% \pm 3\%$ ; potencial hídrico,  $\Psi$ , -39,5 MPa),  $7 \pm 3$  °C (UR  $45\% \pm 7\%$ ;  $\Psi$  -101,9 MPa) e  $-18 \pm 5$  °C (UR  $84\% \pm 10\%$ ;  $\Psi$  -20,3 MPa).

| Tempo de armazenamento               | Processo de obtenção das sementes / Temperatura de armazenamento |        |         |                   |         |        |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------|---------|-------------------|---------|--------|
| (dias)                               | Não dispersas                                                    |        |         | Dispersas em seca |         |        |
|                                      | 25 °C                                                            | 7 °C   | −18 °C  | 25 °C             | 7 °C    | −18 °C |
| Germinação                           |                                                                  |        |         |                   |         |        |
| 0 (inicial)                          | 78                                                               | 78     | 78      | 78                | 78      | 78     |
| 15                                   | 58 aAa <sup>1</sup>                                              | 65 aAa | 12 aBb  | 60 aAa            | 58 aAa  | 62 aAa |
| 30                                   | 18 bBa                                                           | 50 aAa | 10 abBb | 18 bCa            | 52 aBa  | 82 aAa |
| 90                                   | 2 cBa                                                            | 58 aAa | 0 bBb   | 0 cBa             | 65 aAa  | 60 aAa |
| Coef. variação                       | 20,19 %                                                          |        |         |                   |         |        |
| Desenvolvimento de plântulas normais |                                                                  |        |         |                   |         |        |
| 0 (inicial)                          | 62                                                               | 62     | 62      | 70                | 70      | 70     |
| 15                                   | 35 aAa                                                           | 30 aAa | 5 aBb   | 40 aAa            | 18 bAa  | 38 bAa |
| 30                                   | 8 bAa                                                            | 22 aAa | 8 aAb   | 12 bBa            | 32 abBa | 75 aAa |
| 90                                   | 0 bBa                                                            | 25 aAb | 0 aBb   | 0 cBa             | 50 aAa  | 28 bAa |
| Coef. variação                       | 28,06 %                                                          |        |         |                   |         |        |

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade; minúsculas para comparação entre tempos de armazenamento, maiúsculas entre temperaturas dentro de cada processo de obtenção, em itálico para comparação entre processos de obtenção dentro de cada temperatura.

## **CAPÍTULO 2**

**Congelamento e Armazenamento de Sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil)**

**Título resumido: Congelamento e armazenamento de sementes de pau-brasil**

**ABSTRACT** - (Freezing and storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood)).

*Caesalpinia echinata* Lam., a brazilian tropical woody species, is at risk of extinction due to the economic exploitation of its heartwood. In natural environment, under warm temperatures, seeds of *C. echinata* germinate immediately after shedding, keeping their viability under storage only up to three months after harvesting. These seeds are tolerant to desiccation (until 7.6% wet basis) maintaining their viability (more than 80%) until 18 months when stored at 7 °C, but the final percentage of seedlings produced from those seeds is low. In the present work the effect of freezing temperatures on the storability of *C. echinata* seeds was evaluated, aiming to increase the period in which seeds are capable to produce vigorous seedlings. Results showed that seeds stored under –18 °C for 12 months produced *ca.* 35% of vigorous seedlings while those stored at 7 °C produced, as reported previously, lower percentage of vigorous seedlings. These data add new information to the seed physiology of *C. echinata* and can be useful to improve seedling production and germplasm conservation of this important species native from the Brazilian Atlantic Forest.

Key words - cold storage, germination, legume seeds, Leguminosae, tropical tree

**RESUMO** – (Congelamento e armazenamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.)). *Caesalpinia echinata* Lam. é espécie lenhosa tropical brasileira que, devido à sua intensa exploração econômica, foi incluída na lista de espécies em risco de extinção. No ambiente natural, em temperaturas elevadas, as sementes de *C. echinata* germinam imediatamente após a dispersão, mantendo a viabilidade por no máximo três meses quando armazenadas em temperatura ambiente. Essas sementes são tolerantes a dessecação até 7,6% (base úmida), mantendo mais de 80% de viabilidade até 18 meses quando armazenadas a 7 °C. Contudo, a porcentagem final de plântulas produzidas a partir dessas sementes é baixa. No presente trabalho foi estudado o efeito do congelamento sobre a manutenção da viabilidade de sementes de *C. echinata* visando ampliar o período no qual essas sementes são capazes de produzir plântulas normais. Os resultados obtidos mostraram que sementes armazenadas a -18 °C por 12 meses produziram *ca.* 35% de plântulas vigorosas, enquanto as armazenadas a 7 °C produziram, como previamente descrito, menor porcentagem de plântulas normais. Os dados obtidos acrescentam informações novas sobre a fisiologia da germinação de sementes de *C. echinata* e são relevantes para a produção de mudas e para a conservação de germoplasma dessa importante espécie nativa da Mata Atlântica.

Palavras-chave - armazenamento a frio, germinação, Leguminosae, planta arbórea tropical, semente de leguminosa

## Introdução

Manter a biodiversidade é uma das principais preocupações da humanidade na atualidade, devido aos efeitos negativos da degradação ambiental e do crescente aumento do número de espécies ameaçadas de extinção. A Mata Atlântica é um dos biomas com maior biodiversidade de espécies, muitas endêmicas, que vem sofrendo constante perda de sua área e, conseqüentemente, de suas espécies (Peixoto 1991, 1992).

A exploração descontrolada de *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae - Caesalpinioideae), o pau-brasil, é um dos clássicos exemplos de distúrbio causado à Mata Atlântica, restando pequenos remanescentes dessa espécie na atualidade (Rocha 2004). De valor histórico e econômico para o Brasil, o pau-brasil já foi incluído na lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção e é utilizado, atualmente, para a confecção de arcos de violino e para o paisagismo (Cunha & Lima 1992, Rocha 2004, Longui 2005).

O uso e conservação dos recursos atuais e potenciais das florestas tropicais, ou o seu manejo sustentável, vem sendo o atual desafio para os pesquisadores, profissionais e ambientalistas que se preocupam com esses sistemas (Kageyama 2000).

A preservação *ex situ* e a utilização racional do pau-brasil demandam informações conclusivas, entre outros aspectos, quanto ao armazenamento por períodos prolongados de sementes com elevado potencial fisiológico. O armazenamento de sementes é de fundamental importância em espécies que apresentam dificuldades para propagação e que, como o pau-brasil, estejam ameaçadas de extinção, além de garantir pureza genética do lote (Barbedo *et al.* 2002, Theilade & Petri 2003). De maneira geral, a capacidade de armazenamento das sementes está associada à sua qualidade inicial, ao seu nível de dessecação e às condições do local do armazenamento (Roberts 1973, Barbedo & Marcos Filho 1998, Carvalho & Nakagawa 2000).

A colheita de sementes próxima ao ponto de maturidade fisiológica é fundamental para a obtenção de lotes com elevada qualidade inicial (Carvalho & Nakagawa 2000). Mudanças físicas e

fisiológicas durante a maturação de frutos e sementes de pau-brasil foram descritas por Borges *et al.* (2005), sendo demonstrada a importância da colheita de frutos diretamente nas árvores, em momento próximo à maturidade fisiológica das sementes, ou imediatamente após sua deiscência. Contudo, o tipo, o local e a época de dispersão das sementes de pau-brasil apresentam características que nem sempre permitem, na prática, a obtenção de lotes de sementes com elevada qualidade física, fisiológica e sanitária.

A redução do teor de água imediatamente após a colheita também é um aspecto importante quando as sementes apresentam teor de água inadequado ao armazenamento. De maneira geral, a secagem pode ampliar a longevidade das sementes, dificultando a ação de reações metabólicas e de microrganismos e insetos prejudiciais à sua conservação (Carvalho & Nakagawa 2000, Villela & Peres 2004).

Nas sementes foram descritos cinco tipos de água e os intervalos correspondentes de potenciais hídricos e de teores de água, de acordo com a mobilidade da molécula e as propriedades termodinâmicas da água (Vertucci & Farrant 1995). A água tipo 1 é encontrada geralmente em sementes muito secas (inferior a 7,5%, na base úmida), onde a atividade metabólica é restrita e, sua remoção pode causar deterioração dos tecidos. A água tipo 2 (teor de água de 7,5% a 20% e potencial hídrico de -11 a -150 MPa) passa a ter papel de solvente, mas apresenta-se ainda como água não congelável dentro do tecido, mas a partir da água tipo 3 (20% a 33% de água) começa a ocorrer a presença de água congelável e a atividade fisiológica da semente se altera dramaticamente com a presença desse tipo de água. Já a água tipo 4 (33% a 41% de água) apresenta características de solução concentrada e nesta fase pode dar início a germinação, enquanto a água tipo 5 (acima de 41% de água) tem as características apresentadas por uma solução diluída e a germinação somente se completa quando esta água está presente (Marcos-Filho 2005).

Barbedo *et al.* (2002) avaliaram a tolerância das sementes de pau-brasil à dessecação e o seu potencial de armazenamento e obtiveram melhores resultados com o armazenamento das sementes secas (7,6% de água, em relação à sua massa fresca) a 7 °C. Contudo, apesar de terem ampliado o

período de armazenamento para 18 meses, com 81% de germinação, o vigor dessas sementes foi reduzido e apenas 21% delas produziram plântulas normais.

A capacidade de armazenamento é ampliada, para muitas espécies, quando a redução do teor de água das sementes está associada à diminuição da temperatura (Walters *et al.* 1998). Temperaturas baixas conservam melhor componentes celulares como as enzimas, permitindo a disponibilização de glicose para a respiração da semente, através da hidrólise de sacarose ou outros oligossacarídeos, podendo ainda agir em enzimas sintetizadoras de outros componentes responsáveis pela integridade das membranas (Peterbauer & Richter 2001). Contudo, há espécies que não toleram grande redução da temperatura, principalmente o congelamento (Chin *et al.* 1989). Nestas condições, a quantidade de água torna-se mais importante, pois a água contida nas sementes pode propiciar a formação de cristais de gelo, acarretando rupturas mecânicas na parede celular e no sistema de membranas, promovendo a desagregação celular e conseqüente perda da viabilidade das sementes (Roberts 1973, Andrade & Pereira 1997).

Uma vez que a conservação de sementes de pau-brasil a 7 °C é, ainda, insatisfatória, ainda que seu teor de água seja reduzido para valores próximos a 7,6%, há suspeita de que alterações metabólicas ocorram mesmo com o resfriamento do ambiente. Assim, no presente trabalho objetivou-se avaliar a capacidade de armazenamento das sementes de pau-brasil quando congeladas com diferentes teores de água.

### **Material e métodos**

O experimento foi realizado com sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) recém dispersas, procedentes de aproximadamente 20 árvores cultivadas em bosque homogêneo implantado na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, Município de Mogi-Guaçu, SP (22°15-16'S, 47°8-12'W). Após a coleta, as sementes foram selecionadas descartando-se as consideradas imaturas (Borges *et al.* 2005) e as danificadas por insetos ou microrganismos. As

sementes assim obtidas foram armazenadas em câmara fria ( $7 \pm 3$  °C) em embalagem permeável (sacos de papel Kraft) até a instalação dos experimentos.

Inicialmente as sementes apresentavam 11% de água, sendo então distribuídas igualmente em três grupos. Dois destes foram submetidos à secagem controlada em estufa a 50 °C, procurando-se reduzir seu teor de água para valores próximos a 10% e 7%, enquanto o terceiro foi mantido em ambiente com elevada umidade relativa do ar, procurando-se obter sementes com valores próximos a 12% de água.

Ao final de cada processo, o teor de água foi novamente avaliado, pelo método da estufa a 103 °C/ 17 horas (Ista 1996), com quatro repetições de três sementes cada, bem como o potencial hídrico das sementes. Para este, utilizou-se medidor de potencial hídrico WP4, da Decagon.

O teste de germinação foi realizado em germinadores com circulação interna de água, regulados para 25 °C (Mello *et al.* 2004), com as sementes colocadas em rolos de papel (Brasil, 1992), com quatro repetições de dez sementes cada. Neste teste avaliaram-se, a cada três dias, as sementes germinadas (protrusão da raiz primária de, no mínimo, 2 cm) e o desenvolvimento de plântulas normais (Barbedo *et al.* 2002).

A seguir, foram armazenadas em sacos de papel permeável, em quatro câmaras com temperaturas reguladas para  $7 \pm 3$  °C (umidade relativa do ar, UR  $45\% \pm 7\%$ ; potencial hídrico,  $\Psi$ , -101,9 MPa),  $2 \pm 2$  °C (UR  $29\% \pm 2\%$ , potencial hídrico,  $\Psi$ , -155,2 MPa),  $-5 \pm 4$  °C (UR  $73\% \pm 5\%$ , potencial hídrico,  $\Psi$ , -38,4 MPa) e  $-18 \pm 5$  °C (UR  $84\% \pm 10\%$ , potencial hídrico,  $\Psi$ , -20,3 MPa), além disso, uma amostra das sementes foi mantida em temperatura ambiente de laboratório ( $22 \pm 7$  °C,  $80\% \pm 15\%$ ).

Após seis e 12 meses, as sementes foram novamente avaliadas quanto ao teor de água e germinação, conforme descrito anteriormente.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade. As sementes armazenadas em ambiente natural de laboratório já não estavam viáveis após os primeiros seis meses de armazenamento e, por esse motivo, não foram incluídas nas

análises estatísticas. Dessa forma, constituiu-se um esquema fatorial 2x4x3 (tempo de armazenamento x tipo de armazenamento x teor inicial de água). As médias foram analisadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, visando à avaliação de alterações nesses parâmetros nas sementes armazenadas nas diferentes câmaras (Gomes 1982). Para realização das análises estatísticas, os valores de porcentagem, quando necessário para ajuste da normalidade, foram transformados para  $\arcsin(\%)^{0,5}$  ou, na existência de grande quantidade de valores nulos, para  $\arcsin(\%+0,5)^{0,5}$ .

### Resultados e discussão

Dos três grupos formados inicialmente, um teve o teor de água das sementes reduzido para 6,9% (apresentando 58% germinação e 40% plântulas normais), outro para 10,3% (54% germinação e 50% plântulas normais) e o terceiro atingiu 12,4% de água (50% germinação e 40% plântulas normais), conforme observado na tabela 1. Os valores iniciais de teor de água e de potencial hídrico (-79,7 MPa para as sementes com 6,9% água, -53,6 MPa para as que tinham 10,3% de água e -52,0 MPa para as de 12,4% de água) são correspondentes à água tipo 2, não congelável, descrita por Vertucci & Farrant (1995).

A análise de variância dos dados de teor de água das sementes identificou interação significativa entre os três fatores estudados, período de armazenamento x teor inicial de água x temperatura de armazenamento. Houve tendência de equilíbrio higroscópico entre as sementes e a umidade relativa do ar do ambiente de armazenamento após os primeiros seis meses de armazenamento, independentemente do teor de água inicial. A umidade relativa do ar condiciona, muitas vezes, a longevidade das sementes de algumas espécies, como ocorreu com as de *Azadirachta indica* (Sacandé *et al.* 2000).

Na tabela 1 verifica-se que sementes armazenadas a  $7 \pm 3$  °C (UR de  $45\% \pm 7\%$ ) atingiram valores próximos a 6% de água aos seis meses, não se alterando muito após 12 meses. Nas sementes

armazenadas a  $2 \pm 2$  °C (UR de  $29\% \pm 2\%$ ), o teor de água variou entre 6% e 8% durante o período de armazenamento, enquanto aquelas armazenadas a  $-5 \pm 4$  °C (UR de  $73\% \pm 5\%$ ) e  $-18 \pm 5$  °C (UR de  $84\% \pm 10\%$ ) apresentaram valores próximos a 10% de água, não oscilando muito ao final dos 12 meses de armazenamento.

As análises de variância dos resultados de germinação (tabela 2) e de plântulas normais (tabela 3) demonstraram que não houve efeito significativo para a interação envolvendo os três fatores estudados e, tampouco, para as interações dos fatores aos pares. Contudo, a análise dos resultados de germinação identificou efeito isolado do período de armazenamento (A) e da temperatura de armazenamento (C), conforme a tabela 2 e a análise do desenvolvimento de plântulas normais identificou efeito isolado do teor inicial de água (B) e da temperatura de armazenamento (C), conforme a tabela 3.

Os resultados dos fatores que apresentaram efeito significativo sobre a germinação das sementes estão apresentados na tabela 4, evidenciando a importância do armazenamento das sementes de pau-brasil em temperaturas abaixo de zero grau centígrado, ou seja, congelando as sementes, mesmo quando sua qualidade inicial não é elevada. Embora a porcentagem inicial de germinação não fosse elevada (54%), com o congelamento as sementes mantiveram esse patamar de germinação por até 12 meses (tabela 4). Também ficou evidente que, dentro da faixa de 6,9% a 12,4%, o teor de água das sementes pouco interferiu na sua capacidade de manutenção da viabilidade em armazenamento.

Por sua vez, o desenvolvimento de plântulas normais foi afetado pelo teor de água inicial e apenas as sementes armazenadas com os menores teores de água (10,3% e 6,9%) mantiveram vigor semelhante ao inicial (tabela 5). Apesar do teor de água inicial dos três grupos pertencer a água tipo 2, deve-se salientar que acima de 10% muitas reações de deterioração podem ocorrer em vários constituintes celulares ocasionando degradação, enquanto abaixo desse valor a água apresenta características vítreas e as reações são reprimidas (Marcos-Filho 2005).

É interessante observar, ainda, que não houve efeito do período de armazenamento (6 e 12 meses) sobre a produção de plântulas normais. Tal fato, aliado aos valores semelhantes de plântulas normais entre as sementes armazenadas e as não armazenadas e a queda nos valores de germinação com o armazenamento, sugere que apenas as sementes inicialmente vigorosas suportaram o armazenamento por 12 meses, ainda que armazenadas congeladas.

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam dados reportados por Barbedo *et al.* (2002) quanto à redução nos valores de germinação e de produção de plântulas normais de sementes armazenadas a 7 °C por 12 meses resultando, ao final desse período numa média de 12% de germinação e 8% de plântulas normais (tabelas 4 e 5). Observou-se, ainda, que a redução de 7 °C para 2 °C pouco modificou esta tendência.

Os resultados de armazenamento de sementes de pau-brasil em temperaturas sub-zero indicam a possibilidade do armazenamento de sementes de pau-brasil por períodos prolongados, como estratégia para conservação *ex situ*, semelhantemente ao observado por Cochrane *et al.* (2002) para armazenamento, a -18 °C, de sementes de espécies do gênero *Dryandra* (R.Br.), também ameaçadas de extinção.

A longevidade de sementes é bastante influenciada tanto pelo seu teor de água quanto pela temperatura do ambiente. Em geral, na faixa de 5% a 15% de água, a cada 1% de diminuição desse valor pode-se duplicar a longevidade de sementes (Villela & Peres 2004). No presente trabalho, contudo, verificou-se que a redução na temperatura influenciou muito mais a longevidade das sementes de pau-brasil, praticamente anulando os efeitos das diferenças no teor de água dessas sementes (tabelas 1, 2, 3, 4 e 5).

O armazenamento de sementes ortodoxas a -18 °C é adotado pela maioria dos bancos de sementes, permitindo prolongar a longevidade das sementes por muitas décadas (Santos 2000). Contudo, freqüentemente esta temperatura está associada com baixos teores de água nas sementes, entre 3% a 7% (Theilade & Petri 2003) diferentemente, portanto, do teor de água das sementes de

pau-brasil, observado nos melhores resultados de desenvolvimento de plântulas normais presentes nesse trabalho, que oscilou de 11,2% até 10,1% ao final dos 12 meses.

Atualmente cerca de 10.000 espécies de plantas ameaçadas estão preservadas em coleções vivas (jardins botânicos, bancos de sementes e coleções de cultura de tecidos), representando cerca de 30% das espécies ameaçadas conhecidas (Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2002).

Pesquisas que conduzam ao desenvolvimento de tecnologias conservacionistas são fundamentais para a preservação da diversidade de plantas. Até o momento, os resultados do presente trabalho permitem recomendar o armazenamento de sementes de pau-brasil em embalagem permeável e a -18 °C, desde que o teor de água esteja entre 7% e 10% dessa forma mantendo-se a viabilidade e o vigor dessas sementes.

Os dados apresentados neste trabalho acrescentam informações novas sobre a fisiologia da germinação de sementes de *C. echinata* e são relevantes para a produção de mudas e para a conservação de germoplasma dessa importante espécie nativa da Mata Atlântica.

### **Literatura citada**

- Andrade, A.C.S. & Pereira, T.S.** 1997. Comportamento de armazenamento de sementes de palmito (*Euterpe edulis* Mart.). Pesquisa Agropecuária Brasileira 32: 987-991.
- Barbedo, C.J. & Marcos Filho, J.** 1998. Tolerância à dessecação em sementes. Acta Botanica Brasílica.
- 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). Revista Brasileira de Botânica 25: 431-439.
- Borges, I.F., Giudice, 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: 851-861.
- Brasil** 1992. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. SNDA/DNDV/CLAV, Brasília, p. 365.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J.** 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4a ed. Funep, Jaboticabal, p. 424.
- Chin, H.F., Krishnapillay, B. & Stanwood, P.C.** 1989. Seed moisture: recalcitrant vs. orthodox seeds. *In* Seed moisture (P.C. Stanwood & M.B. McDonald, eds.). Crop Science Society of America, Madison. p.15-22.
- Cochrane, A., Brown, K. & Kelly, A.** 2002. Low temperature and low moisture storage of seeds of rare and threatened taxa in the endemic Western Australian genus *Dryandra* (R.Br.) (Proteaceae). *Conservation Science of Western Australia* 4: 1-12.
- Cunha, & Lima, H.C.L.** 1992. Viagem à terra do Pau-brasil. Agência Brasileira de Cultura, Rio de Janeiro.
- Gomes, F.P.** 1982. Curso de estatística experimental. 10<sup>a</sup> ed. Nobel, Piracicaba, p. 468.
- Ista.** International Seed Testing Association. 1996. International rules for seed testing, rules 1996. *Seed Science and Technology* 24 (supplement): 1-335.
- Longui, E.L.** 2005. Pau-brasil e outras espécies nativas empregadas na fabricação de arcos para instrumentos de corda: um estudo comparativo. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica, São Paulo.
- 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.
- Kageyama, P.Y.** 2000. Uso e conservação de florestas tropicais: Qual Paradigma? . *In*: V Simpósio de ecossistemas brasileiros: Conservação, Vitória.

- Peixoto, A.L.** 1991, 1992. A vegetação da Costa Atlântica. *In* Floresta Atlântica – textos científicos (S. Monteiro & L. Kaz, coord.) Edições Alumbamento, Rio de Janeiro. 33-42
- Peterbauer, T. & Richter, A.** 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research* 11: 185-197.
- 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.
- Sacandé, M., Buitink, J. & Hoekstra, F.A.** 2000. A study of water relations in neem (*Azadirachta indica*) seed that is characterized by complex storage behaviour. *Journal of Experimental Botany* 51 (344): 635-643.
- Santos, I.R.I.** 2000. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12 (especial): 70-84.
- Secretariat Of The Convention On Biological Diversity.** 2002. Global Strategy for Plant Conservation. Section C: 6-11. Hague.
- Theilade, I. & Petri, L.** 2003. Conservation of tropical trees *ex situ* through storage and use. Guidelines and Technical Notes 65, Danida Forest Seed Centre, Humlebaek.
- Vertucci, C.W., Farrant, J.M.** 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. *In*: Seed development and germination (Kiegel, J., Galili, G.). Marcel Dekker Inc. New York. P. 237-271.
- Villela, F.A. & Peres, W.B.** 2004. Coleta, beneficiamento e armazenamento. *In* Germinação: do básico ao aplicado (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre. p.265-281.
- Walters, C., Rao, N.K. & Hu, X.** 1998. Optimizing seed water content to improve longevity in *ex situ* genebanks. *Seed Science Research* 8: 15-22.

Tabela 1. Teor de água (%) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) armazenadas por 6 e 12 meses a  $7\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  ( $45\% \pm 7\%$  UR; -101,9 MPa),  $2\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  ( $29\% \pm 2\%$  UR; -155,2 MPa),  $-5\text{ °C} \pm 4\text{ °C}$  ( $73\% \pm 5\%$  UR; -38,4 MPa) e  $-18\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$  ( $84\% \pm 10\%$  UR; -20,3 MPa).

| Temperatura de armazenamento     | Teor de água inicial |           |          |
|----------------------------------|----------------------|-----------|----------|
|                                  | 6,9%                 | 10,3%     | 12,4%    |
| <i>6 meses de armazenamento</i>  |                      |           |          |
| $7 \pm 3\text{ °C}$              | 6,1 cBa              | 6,6 cAa   | 6,4 cABa |
| $2 \pm 2\text{ °C}$              | 5,1 dBb              | 5,4 dABb  | 5,6 dAb  |
| $-5 \pm 4\text{ °C}$             | 9,9 bBa              | 10,7 bAa  | 10,9 bAa |
| $-18 \pm 5\text{ °C}$            | 10,8 aBa             | 11,2 aABa | 11,6 aAa |
| <i>12 meses de armazenamento</i> |                      |           |          |
| $7 \pm 3\text{ °C}$              | 5,6 cAb              | 5,7 cAb   | 5,6 dAb  |
| $2 \pm 2\text{ °C}$              | 7,2 bBa              | 8,0 bAa   | 6,2 cCa  |
| $-5 \pm 4\text{ °C}$             | 10,0 aAa             | 9,8 aAb   | 10,2 bAb |
| $-18 \pm 5\text{ °C}$            | 10,4 aBb             | 10,1 aBb  | 11,1 aAb |
| C.V. (%)                         | 1,81                 |           |          |

<sup>†</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade; minúsculas para comparação entre temperaturas, maiúsculas teor de água inicial dentro de cada período de armazenamento e itálico período de armazenamento dentro de cada teor de água inicial.

Tabela 2. Resultado da análise de variância obtida para os dados de germinação (dados transformados para arco seno  $(\%/100)^{0,5}$  de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam., com três diferentes teores iniciais de água (12,4%, 10,3% e 6,9%), armazenadas em quatro temperaturas (7°C, 2°C, -5°C e -18°C) por dois períodos (6 e 12 meses).

| Causas da variação               | G.L.  | Quadrado Médio | F        |
|----------------------------------|-------|----------------|----------|
| (Tratamentos)                    | (23)  | -              | -        |
| Armazenamento (A)                | 1     | 647,30         | 5,68 *   |
| Teor inicial de água (B)         | 2     | 147,81         | 1,30     |
| Temperatura de armazenamento (C) | 3     | 3.564,96       | 31,28 ** |
| Interação A x B                  | 2     | 42,50          | 0,37     |
| Interação A x C                  | 3     | 299,68         | 2,63     |
| Interação B x C                  | 6     | 62,78          | 0,55     |
| Interação A x B x C              | 6     | 152,52         | 1,34     |
| Resíduo                          | 72    | 113,97         | -        |
| Total                            | 95    | -              | -        |
| Coeficiente de variação (%)      | 30,02 |                |          |

\* = significativo ao nível de 5%; \*\* = significativo a 1%

Tabela 3. Resultado da análise de variância obtida para os dados de plântulas normais (dados transformados para arco seno  $(\%/100)^{0,5}$ ) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam., com três diferentes teores iniciais de água (12,4%, 10,3% e 6,9%), armazenadas em quatro temperaturas (7°C, 2°C, -5°C e -18°C), por dois períodos (6 e 12 meses).

| <b>Causas da variação</b>        | <b>G.L.</b> | <b>Quadrado Médio</b> | <b>F</b> |
|----------------------------------|-------------|-----------------------|----------|
| (Tratamentos)                    | (23)        | -                     | -        |
| Armazenamento (A)                | 1           | 94,93                 | 0,77     |
| Teor inicial de água (B)         | 2           | 739,72                | 5,97 **  |
| Temperatura de armazenamento (C) | 3           | 2.775,87              | 22,39 ** |
| Interação A x B                  | 2           | 191,45                | 1,54     |
| Interação A x C                  | 3           | 8,52                  | 0,07     |
| Interação B x C                  | 6           | 100,71                | 0,81     |
| Interação A x B x C              | 6           | 165,01                | 1,33     |
| Resíduo                          | 72          | 123,96                | -        |
| Total                            | 95          | -                     | -        |
| Coefficiente de variação (%)     | 30,02       |                       |          |

\*\* = significativo ao nível de 1%

Tabela 4. Germinação (%) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) armazenadas por 6 e 12 meses a 7 °C (-101,9 MPa), 2 °C (-155,2 MPa), -5 °C (-38,4 MPa) e -18 °C (-20,3 MPa).

| Temperatura de<br>armazenamento | Período de armazenamento |         |          | Médias |
|---------------------------------|--------------------------|---------|----------|--------|
|                                 | inicial                  | 6 meses | 12 meses |        |
| 7 ± 3 °C (45% ± 7% UR)          | 54                       | 29      | 12       | 20,5 b |
| 2 ± 2 °C (29% ± 2% UR)          | 54                       | 26      | 18       | 22,1 b |
| -5 ± 4 °C (73% ± 5% UR)         | 54                       | 52      | 50       | 51,4 a |
| -18 ± 5 °C (84% ± 10% UR)       | 54                       | 51      | 53       | 52,3 a |
| Médias                          | 54,0                     | 39,7 A  | 33,4 B   |        |
| C.V. (%)                        |                          | 30,02   |          |        |

<sup>†</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade; minúsculas para comparação entre temperaturas e maiúsculas entre tempos de armazenamento.

Tabela 5. Desenvolvimento de plântulas normais (%) a partir de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) armazenadas por 6 e 12 meses a 7 °C (-101,9 MPa), 2 °C (-155,2 MPa), -5 °C (-38,4 MPa) e -18 °C (-20,3 MPa).

| Temperatura de<br>armazenamento | Teor inicial de água (%) |        |        |        | Médias |
|---------------------------------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|
|                                 | inicial                  | 12,4   | 10,3   | 6,9    |        |
| 7 ± 3 °C (45% ± 7% UR)          | 43                       | 1      | 11     | 12     | 8,2 b  |
| 2 ± 2 °C (29% ± 2% UR)          | 43                       | 7      | 11     | 8      | 9,0 b  |
| -5 ± 4 °C (73% ± 5% UR)         | 43                       | 18     | 27     | 34     | 26,3 a |
| -18 ± 5 °C (84% ± 10% UR)       | 43                       | 23     | 46     | 36     | 34,8 a |
| Médias                          | 43,0                     | 12,2 B | 23,9 A | 22,6 A |        |
| C.V. (%)                        | 47,39                    |        |        |        |        |

<sup>†</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade; minúsculas para comparação entre temperaturas e maiúsculas entre teor de água inicial.

### **CAPÍTULO 3**

**Armazenamento, teor de água e carboidratos não estruturais em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae)**

**Título resumido: Teor de água e carboidratos em sementes de pau-brasil**

ABSTRACT – (Storage, water content and non-structural carbohydrates in seeds of *Caesalpinia echinata* (Leguminosae)). Among the major reserve carbohydrates of leguminous seeds are starch, sucrose and galactosyl oligosaccharides, also contributing to the structural stability of membranes during desiccation and embryo growth. Seeds of *Caesalpinia echinata* were collected and analyzed as for water content, germination, content of sugars and starch, before and after storage at 25 °C, 7 °C and -18 °C, for 15 and 90 days. The main compounds of the embryonic axis were free sugars, while starch represented 30-40% of the dry mass of the cotyledons. Seeds with 12% of water content kept their germination capacity and carbohydrate contents when stored at cold temperatures. Seeds with 22% of water content only germinated when stored at 7 °C; in this condition soluble carbohydrates decreased in the axis and starch increased in the cotyledons. Seeds with 7% of water content lost germination capacity and carbohydrates content remained unchanged. Chromatographic analysis showed that seeds with 12% and 22% of water content had the hexose levels decreased during storage, except for the cotyledons of seeds stored at -18 °C. Hexoses and cyclitols increased at cold temperatures in seeds with 7% of water content, but did not show any germination. The results suggest that sucrose metabolism in seeds of *C. echinata* is affected by cold temperature, independently of water content and germination capacity.

Key words: sugars, water content, reserve compounds, cold temperature, starch

RESUMO – (Armazenamento, teor de água e carboidratos não estruturais em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae)). Dentre os compostos de reserva de sementes destacam-se amido, sacarose e oligossacarídeos galactosilados, que também atuam na estabilidade das membranas durante a dessecação e retomada do crescimento embrionário. Sementes de *Caesalpinia echinata* foram coletadas e avaliadas quanto ao teor de água, germinação, composição de açúcares solúveis e amido, sendo em seguida armazenadas a 25 °C, 7 °C ou –18 °C, e avaliadas novamente aos 15 e 90 dias. A principal reserva dos eixos embrionários foram os açúcares livres, enquanto o amido representou 30-40% da massa seca dos cotilédones. Sementes com 12% de água mantiveram a capacidade germinativa e o teor de carboidratos quando armazenadas em temperaturas baixas. Sementes com 22% de água somente mantiveram a germinação quando armazenadas a 7 °C; nesta condição os açúcares solúveis diminuíram nos eixos e o amido aumentou nos cotilédones. Sementes com 7% de água perderam a capacidade germinativa quando armazenadas em qualquer condição térmica e o conteúdo de carboidratos ficou inalterado. Análises cromatográficas mostraram que sementes com 22% e 12% de água apresentaram redução nas hexoses, exceto nos cotilédones de sementes armazenadas a –18 °C. Hexoses e ciclitóis aumentaram sob temperaturas baixas em sementes com 7% de água, mas não houve germinação. Os resultados sugerem que o metabolismo de sacarose das sementes de *C. echinata* é afetado pela temperatura baixa e aparentemente não está relacionado ao teor de água e à capacidade germinativa das sementes.

Palavras chave: açúcares, teor de água, compostos de reserva, baixa temperatura, amido

## Introdução

Os métodos atualmente utilizados para o armazenamento de sementes nem sempre levam em consideração a composição química das sementes, seu estado fisiológico e o estado físico da água em seu interior (Vertucci & Roos 1990). Variações na temperatura e nas propriedades da água, dentre outros fatores, atuam no metabolismo das sementes, interferindo no controle endógeno da mobilização de reservas (Buckeridge *et al.* 2004).

A manutenção da viabilidade das sementes, durante o armazenamento, depende diretamente do teor de água e esta dependência está relacionada à intensidade das reações químicas que caracterizam a atividade fisiológica.

As relações entre atividade metabólica e teor de água ainda não estão perfeitamente esclarecidas, mas já se tem conhecimento, para sementes consideradas ortodoxas, de que a redução do teor de água para valores próximos a 10% é necessária ao final da fase de maturação (Roberts 1973, Barbedo & Marcos Filho 1998).

Uma semente com baixo teor de água pode se apresentar como um sistema altamente viscoso, conhecido como cristal líquido. Um cristal é definido como um estado auto-estável, semelhante ao sólido, mas que retém a desordem e as propriedades físicas da fase líquida (Franks *et al.* 1991). Em tal condição o metabolismo da semente é minimizado e a longevidade durante o armazenamento é maximizada, principalmente quando associada a baixas temperaturas. Em contraste, quando a água está em grande quantidade e na fase líquida há uma acelerada deterioração física e química das sementes (Sun & Leopold 1993, Sun *et al.* 1994), provavelmente como resultado de elevada mobilidade molecular (Buitink *et al.* 1998).

Algumas proteínas, açúcares e oligossacarídeos específicos são sintetizados de forma tardia no desenvolvimento da semente e podem estar associados ao desenvolvimento da tolerância à dessecação ou à longevidade da semente (Castro *et al.* 2004).

Em sementes ortodoxas, a sacarose geralmente está presente em maior quantidade. Em muitas espécies, porém, as sementes acumulam oligossacarídeos da série rafínosica, tais como rafinose, estaquiose, verbascose e ajugose, aos quais tem sido atribuída a tolerância à dessecação das sementes ortodoxas, por agirem na estabilização das membranas (Buckeridge *et al.* 2004).

Acredita-se que a rafinose contribua para a prevenção da cristalização da sacarose, promovendo com isso a formação do estado vítreo intracelular, essencial para a sobrevivência dos tecidos das sementes devido ao aumento da viscosidade (Sun & Leopold 1993).

O conhecimento de variações do teor de água é de fundamental importância para o armazenamento de sementes, especialmente quando o metabolismo de carboidratos destas é afetado pela temperatura, como parece ser o caso das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). Tais sementes, quando maduras, são compostas por 40-50% de carboidratos não estruturais, 8-10% de proteínas e 20% de lipídeos (Garcia *et al.* 2006). Dentre os carboidratos, a maior porção é constituída por amido, enquanto os carboidratos solúveis representam *ca.* 10% do peso seco, sendo compostos principalmente por sacarose, glicose e frutose e, em menores proporções, ciclitóis, rafinose e estaquiose (Garcia *et al.* 2006).

Recentemente foi demonstrado que a sacarose exógena, em baixas concentrações, serve como um substrato para alterações metabólicas que ocorrem em temperaturas baixas, enquanto em maiores concentrações esse açúcar pode ter um efeito crioprotetor direto sobre as membranas celulares (Uemura & Steponkus 2003). Sementes de pau-brasil que foram armazenadas sob temperatura baixa (7 °C) por 18 meses mantiveram a viabilidade (Barbedo *et al.* 2002) mas os oligossacarídeos da série da rafinose foram detectados em baixas concentrações nessas sementes, enquanto a sacarose era o componente principal e estava presente em altas concentrações (Garcia *et al.* 2006).

Carboidratos solúveis acumulados em sementes estão supostamente envolvidos nos mecanismos de tolerância à dessecação e longevidade. Sementes de pau-brasil são tolerantes a dessecação e mantêm a capacidade germinativa quando armazenadas por até 18 meses em câmara

fria, como já informado. Visto que muitos desses carboidratos envolvidos na tolerância à dessecação também estão relacionados com a tolerância ao congelamento, pretendeu-se com este trabalho analisar a relação entre a manutenção da capacidade germinativa e as mudanças no teor de água e nos carboidratos não estruturais das sementes de pau-brasil armazenadas em diferentes temperaturas.

### **Material e métodos**

Sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) foram obtidas de aproximadamente 20 árvores em bosque homogêneo implantado na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, Município de Mogi-Guaçu, SP (22°15-16'S, 47°8-12'W).

Três procedimentos para obtenção de sementes foram realizados: 1) colheita de frutos maduros com coloração totalmente castanha (Borges *et al.* 2005) e com remoção manual das sementes em laboratório (denominadas sementes não dispersas); 2) coleta de sementes recém-dispersas (menos de 24 horas da dispersão) em época sem ocorrência de chuva nas 24 horas anteriores à colheita (denominadas sementes dispersas em época seca); 3) coleta de frutos maduros e remoção manual das sementes, sendo em seguida submetidas à secagem artificial em estufa a 50 °C (denominadas sementes não dispersas e secas).

As sementes assim obtidas foram inicialmente avaliadas quanto a teor de água e germinação. O teor de água foi avaliado pelo método da estufa a 103 °C por 17 horas (Ista 1996), com quatro repetições de três sementes cada. O teste de germinação foi realizado em germinadores com circulação interna de água, regulados para 25 °C (Mello *et al.* 2004), com as sementes colocadas em rolos de papel (Brasil 1992), com quatro repetições de dez sementes cada. Neste teste avaliaram-se, a cada três dias, as sementes germinadas (protrusão da raiz primária com, no mínimo, dois cm) e o desenvolvimento de plântulas normais (Barbedo *et al.* 2002).

Para a extração dos carboidratos não estruturais, os eixos embrionários e os cotilédones foram isolados manualmente a partir de cinco sementes, com três repetições.

Em seguida foram adicionados 20 mL e 1 mL de etanol 80% aos cotilédones e eixos embrionários, respectivamente, seguindo-se fervura por 5 min para inativação das enzimas. As amostras foram então homogeneizadas em graal e centrifugadas por 10 min a 1000 g. O precipitado foi re-extraído duas vezes com etanol 80% e os sobrenadantes juntados. Estes foram concentrados em evaporador rotatório a 40 °C, até pequeno volume, sendo considerados os extratos brutos.

O açúcar total foi quantificado pelo método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956), usando glicose como padrão. Os resultados foram expressos em mg por g de massa fresca ( $\text{mg g}^{-1}\text{MF}$ ) e em mg por g de massa seca ( $\text{mg g}^{-1}\text{MS}$ ).

Após deionização dos extratos brutos em coluna de troca iônica Dowex - 1 (forma  $\text{Cl}^-$ ) e Dowex - 50W (forma  $\text{H}^+$ ), os carboidratos solúveis neutros foram novamente concentrados e analisados por cromatografia de troca aniônica de alta performance, acoplada a um detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD), usando coluna CarboPac PA-1 (4 x 250 mm) em um sistema Dionex Mod. DX 300 (USA). Para a eluição dos carboidratos, utilizou-se um gradiente de mistura do eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de NaOH) ao eluente A (150 mM de NaOH), com fluxo de  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , por meio da seguinte programação: 0-1 min, 25mM; 1-2 min 25-50 mM; 2-14 min, 50-500 mM; 14-22 min, 500 mM; 22-30 min, 25mM, de acordo com Itaya *et al.* (1997). Os açúcares foram identificados por co-cromatografia com padrões autênticos.

Os resíduos resultantes das extrações dos carboidratos solúveis dos cotilédones e dos eixos embrionários foram liofilizados e processados para a quantificação do amido. A extração foi realizada através de fervura dos resíduos por 5 min, duas vezes, com água deionizada, seguidas por centrifugação a 1000 g, sendo o amido quantificado com o reagente de Lugol (Waghorn *et al.* 2003), utilizando amido solúvel (Sigma) como padrão. Os resultados foram expressos em mg por g de massa seca do resíduo ( $\text{mg g}^{-1}\text{MS}$ ).

As sementes de cada procedimento de colheita foram, então, armazenadas em câmaras com

três temperaturas distintas,  $25 \pm 1$  °C (umidade relativa do ar, UR,  $72\% \pm 3\%$ ; potencial hídrico,  $\Psi$ , -39,5 MPa),  $7 \pm 3$  °C (UR  $45\% \pm 7\%$ ; potencial hídrico,  $\Psi$ , -101,9 MPa) e  $-18 \pm 5$  °C (UR  $84\% \pm 10\%$ ; potencial hídrico,  $\Psi$ , -20,3 MPa). Após 15, 30 e 90 dias de armazenamento, as sementes foram novamente avaliadas quanto ao teor de água e germinação. Após 15 e 90 dias de armazenamento as sementes foram novamente avaliadas quanto ao teor de água, germinação e composição bioquímica.

Dessa forma, constituiu-se um experimento fatorial  $3 \times 3 \times 2$  (procedimentos de coleta x condições de armazenamento x tempo de armazenamento), em delineamento inteiramente casualizado. Os resultados de teor de água e germinação foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (Gomes 1982).

### **Resultados e discussão**

Sementes maduras não-dispersas (22,6% de água) tiveram seu teor de água reduzido para 10,9% nos primeiros 15 dias de armazenamento a 25 °C, pouco se alterando posteriormente (tabela 1). Quando armazenadas a 7 °C, tiveram redução deste teor para 9,3% aos 15 dias e nova redução aos 90 dias (8,3%). Contudo, quando armazenadas a -18 °C, a redução do teor de água foi lenta, atingindo 18,3% aos 15 dias e, ao final dos 90 dias, 13,4%, (tabela 1).

As sementes dispersas em época seca (12,7% de água) e as não-dispersas (22,6%) atingiram teores de água próximos, nos primeiros 15 dias de armazenamento sob temperaturas positivas (25 °C e 7 °C, tabela 1), alterando pouco aos 90 dias. A -18 °C houve redução lenta da água e as sementes dispersas em época seca tiveram seu teor de água diminuído para 11,3% aos 90 dias de armazenamento (tabela 1), indicando que, provavelmente, estavam em equilíbrio higroscópico com o ambiente. Em temperaturas negativas ocorre geralmente perda gradativa de

água do meio intracelular para o extracelular, evitando assim que ocorra o congelamento intracelular (Santos 2000).

As sementes não-dispersas e secas (7,5% água), quando armazenadas a 7°C apresentaram redução muito pequena do teor de água, atingindo 6,4% aos 90 dias de armazenamento. Quando armazenadas a 25 °C, porém, tiveram elevação do teor de água para 10,3% aos 15 e 12,2% aos 90 dias (tabela 1). A -18 °C também houve aumento no teor de água dessas sementes, porém de forma mais lenta que nas sementes armazenadas a 25 °C, com 8,8% aos 15 dias e 10,6% aos 90 dias (tabela 1).

Quando comparados os diferentes lotes dentro da mesma temperatura, observa-se que o teor de água oscilou de acordo com a umidade relativa do ar do local de armazenamento, conforme descrito por Carvalho e Nakagawa (2000), para outras sementes. Assim, as sementes que foram armazenadas a  $7 \pm 3$  °C (umidade relativa do ar, UR de  $45\% \pm 7\%$ ) apresentaram redução maior no teor de água durante o armazenamento do que as sementes mantidas sob elevada umidade relativa,  $25 \pm 1$  °C (UR, de  $72\% \pm 3\%$ ), e  $-18 \pm 5$  °C (UR de  $84\% \pm 10\%$ ), que não apresentaram alterações tão acentuadas (tabela 1).

A germinação inicial das sementes não dispersas, das não dispersas submetidas à secagem artificial e das dispersas foi, respectivamente 78%, 25% e 78%. O desenvolvimento de plântulas normais, por sua vez, foi 62%, 2% e 70%, respectivamente para aqueles lotes. A grande incidência de fungos nas sementes secas artificialmente resultou em baixa porcentagem de germinação inicialmente (dados não apresentados), fato observado também por Santos *et al.* (1997), em sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.) que apresentaram redução de germinação e formação de sintomas de pós-emergência em plântulas desta espécie.

As sementes armazenadas a 25 °C perderam a viabilidade aos 90 dias (tabela 2), conforme já havia sido previamente observado por Barbedo *et al.* (2002). Na temperatura de 7 °C as sementes não dispersas (22,6% água) e as dispersas em época seca (12,7%) não apresentaram diferença significativa na germinação (tabela 2). Contudo, após 90 dias de armazenamento as sementes

dispersas em época seca apresentaram maior vigor, analisado pelo desenvolvimento de plântulas normais. Já as sementes não dispersas e secas (7,5% água) perderam totalmente a capacidade de produzir plântulas normais nos primeiros 15 dias de armazenamento (tabela 2).

O armazenamento a -18 °C foi letal para as sementes não dispersas, provavelmente pelo seu alto teor de água inicial (22,6%), considerado como água tipo 3, congelável (Vertucci & Farrant 1995), que provavelmente conduziu à formação de cristais de gelo e conseqüente perda da viabilidade. As sementes não dispersas e secas apresentaram baixo vigor, mas a temperatura negativa de armazenamento provavelmente inibiu a ação de grande parte dos fungos presentes inicialmente, uma vez que houve redução da incidência dos mesmos no teste de germinação, após 15 dias de armazenamento, permitindo maior porcentagem de germinação em relação aos valores iniciais (tabela 2). As sementes dispersas em época seca, por sua vez, mantiveram a capacidade germinativa inicial e de produção de plântulas normais até os 90 dias, quando armazenadas a -18 °C.

Os resultados de análise de amido nos cotilédones e nos eixos embrionários das sementes dos diferentes lotes avaliados estão apresentados, respectivamente, nas figuras 1 e 2. As sementes não dispersas (22,6% água), que apresentaram porcentagem de germinação inicial semelhante à das sementes dispersas em época seca (12,7% água), não apresentaram grande diferença nos teores de amido dos cotilédones (232 mg g<sup>-1</sup> MS e 284 mg g<sup>-1</sup> MS, respectivamente) (figuras 1A e B). Por outro lado, as sementes secas artificialmente apresentaram teor de amido significativamente maior (414 mg g<sup>-1</sup> MS, figura 1C). Provavelmente esses valores maiores sejam devidos à baixa concentração de água nessas sementes tratadas em estufa a 50 °C antes do armazenamento.

Em relação ao amido nos eixos embrionários, observou-se que a quantidade é cerca de 10-20 vezes inferior ao teor de amido dos cotilédones (figuras 2A, B e C). Nas sementes não dispersas com ou sem secagem artificial o valor inicial foi cerca de 1% da massa seca do resíduo e nas sementes dispersas em época seca foi cerca de 1,5%.

Nas sementes não dispersas houve tendência à redução do conteúdo de amido durante o armazenamento, com exceção das sementes armazenadas a 7 °C.

Em sementes dispersas a redução do teor de amido nos eixos ocorreu em todos os tratamentos, porém foi mais rápida nas sementes armazenadas a -18 °C (figura 2B).

Também houve redução de amido nas sementes não dispersas e secas, sendo mais rápida quando armazenadas a -18 °C, chegando a pouco menos que 0,5% da massa seca do resíduo e mantendo-se praticamente inalterado até os 90 dias. Aos 90 dias de armazenamento a 25 °C, o aumento do teor de amido foi grande, atingindo cerca de 1,8% da massa seca, enquanto a 7 °C reduziu para valores próximos a 0,2% da massa seca (figura 2C). Várias explicações para o estímulo da degradação do amido e acúmulo de açúcares a baixas temperaturas foram propostas. Uma possibilidade é que baixas temperaturas conduzem ao aumento da atividade de uma ou mais enzimas degradadoras de amido (Krause *et al.* 1998).

Comparando os resultados das análises fisiológicas e bioquímicas das sementes dos três lotes estudados, aparentemente não houve relação causal do teor de amido com a manutenção da capacidade germinativa das sementes de pau-brasil.

As figuras 3, 4 e 5 mostram as variações encontradas no conteúdo de carboidratos solúveis (A, em relação à massa fresca - MF e B, em relação à massa seca - MS) nas sementes não dispersas com e sem secagem artificial e nas sementes dispersas em época seca. Como pode ser observado, nas sementes não dispersas e sem secagem artificial (figura 3) os carboidratos solúveis totais encontravam-se em maiores quantidades nos eixos embrionários (*ca.* 270 mg.g<sup>-1</sup> MF e *ca.* 335 mg.g<sup>-1</sup> MS), do que nos cotilédones (*ca.* 170 mg.g<sup>-1</sup> MF e *ca.* 215 mg.g<sup>-1</sup> MS), antes do armazenamento. Esta diferença foi também notada nos eixos e cotilédones de sementes de outras espécies (Steadman *et al.* 1996) e aparentemente poderia estar relacionada à viabilidade do embrião, através da disponibilidade de substratos para respiração e emergência radicular (Leprince *et al.* 1992).

Com o armazenamento em diferentes condições térmicas houve redução inicial desse teor em ambos, eixos e cotilédones nos primeiros 15 dias, seguido de aumento ao final do armazenamento, porém sem atingir os valores iniciais para a maioria delas (figura 3).

Comparando os dados de açúcar total com a porcentagem de germinação das sementes não dispersas e armazenadas a 7 °C (*ca.* 58%, tabela 2) observa-se que não houve relação do teor de carboidratos solúveis com a germinabilidade destas sementes. Aparentemente o que mais influenciou a capacidade germinativa foi a temperatura de armazenamento e o teor de água inicial (tabela 1).

A figura 4 mostra as variações nos carboidratos solúveis de eixos e cotilédones de sementes dispersas em época seca (12,7% de água) evidenciando que as diferenças nestas foram menores do que nas sementes não dispersas. Os teores de açúcares variaram de *ca.* 80 mg g<sup>-1</sup> MF a *ca.* 170 mg g<sup>-1</sup> MF (correspondendo a *ca.* 100 a 200 mg g<sup>-1</sup> MS) e foram maiores nos cotilédones do que nos eixos embrionários.

Como ocorreu com o lote anterior, exceto para eixos nas temperaturas positivas, houve redução do teor de carboidratos no início do armazenamento, seguido de aumento em todas as condições de armazenamento, havendo uma uniformização nos valores encontrados nos eixos e nos cotilédones inicialmente (178 e 175 mg g<sup>-1</sup> MF, respectivamente), especialmente nas sementes armazenadas em temperaturas baixas (7 °C e -18 °C, figura 4). As temperaturas baixas possivelmente mantiveram a estabilidade de enzimas, como a invertase, responsável pelo metabolismo de carboidratos solúveis.

As sementes não-dispersas e secas (7,5% de água) apresentaram maiores proporções de carboidratos solúveis nos eixos que nos cotilédones antes do armazenamento (figura 5), como já mostrado anteriormente para aquelas que não foram submetidas à secagem artificial (figura 3). Ao contrário destas, contudo, nas sementes secas houve uma alteração inversa durante o armazenamento, sendo observado um aumento significativo no teor de carboidratos solúveis tanto nos eixos quanto nos cotilédones nos primeiros 15 dias (figura 5). Sabe-se que os carboidratos

acumulam-se em resposta a estresses, podendo apresentar várias funções além do fornecimento de energia, agindo também como crio- e osmoprotetores (Leslie *et al.* 1995). O aumento dos carboidratos nos eixos e cotilédones das sementes secas artificialmente foi aparentemente devido ao estresse da secagem, levando a uma desorganização celular e conseqüente aumento da solubilização dos carboidratos.

Em sementes maduras de *C. echinata*, os carboidratos solúveis são compostos principalmente por sacarose, glicose e frutose. Ciclitóis, rafinose e estaquiose também estão presentes, mas em menores proporções, além do amido, que é o componente majoritário (Garcia *et al.* 2006). Nas sementes não dispersas, antes do armazenamento, foram encontrados nos eixos embrionários e cotilédones, sacarose, glicose, frutose, alguns polióis e ciclitóis galactosilados não identificados, além de rafinose e estaquiose em baixíssimas proporções (figura 6).

Independentemente da temperatura de armazenamento, aos 90 dias houve decréscimo nas proporções de todos os carboidratos nos cotilédones, sendo a sacarose o único que se manteve relativamente com alta proporção. Glicose e frutose praticamente desapareceram e os polióis reduziram muito (figura 6).

Nos eixos embrionários a redução ocorreu principalmente nas proporções de glicose e frutose, em todas as temperaturas igualmente, enquanto a sacarose e os polióis praticamente mantiveram as proporções iniciais (figura 6). Nas sementes dispersas em época seca os cotilédones apresentavam apenas alta proporção de sacarose, enquanto glicose, frutose e polióis foram encontrados em baixas proporções, rafinose e estaquiose não sendo sequer detectadas nos extratos purificados e cromatografados por HPAEC/PAD (figura 7).

Durante o armazenamento dessas sementes houve aumento nas proporções dos polióis em todas as temperaturas, no entanto nos cotilédones das sementes armazenadas a -18 °C ocorreu ainda aumento nas proporções de glicose e frutose. Variações semelhantes para os polióis foram observadas nos eixos embrionários, tanto antes quanto após o armazenamento por 90 dias (figura 7).

Nos cotilédones das sementes não dispersas e com secagem artificial foram observadas inicialmente baixas proporções de glicose, frutose e polióis, destacando-se apenas a sacarose (figura 8). Contudo, durante o armazenamento por 90 dias, especialmente a 7 °C e -18 °C, houve aumento nas proporções de glicose e frutose nos cotilédones (figura 8). Por outro lado, nos eixos embrionários foram detectadas inicialmente altas proporções de sacarose e polióis, que assim se mantiveram durante o armazenamento por 90 dias, especialmente em temperaturas baixas (figura 8).

As análises dos carboidratos solúveis das sementes de pau-brasil armazenadas sob diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar permitiram constatar que esses compostos geralmente decresceram no início do armazenamento e aumentaram novamente aos 90 dias, tanto nos eixos quanto nos cotilédones, sendo ligeiramente maiores em temperaturas baixas (7 °C e -18 °C), conforme já observado por Garcia *et al.* (2006). O principal açúcar solúvel encontrado nessas sementes foi a sacarose, presente em grande quantidade em todos os extratos analisados. Glicose e frutose destacaram-se inicialmente apenas nos eixos e cotilédones das sementes com alto teor de água, enquanto os polióis estavam sempre presentes em quantidades apreciáveis na maioria dos extratos, não estando, aparentemente relacionados com a condição de armazenamento.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que as mudanças no teor e na composição dos carboidratos solúveis e amido não seriam a causa da perda da viabilidade dessas sementes, mas sim, que esses compostos estariam sendo afetados diferentemente durante o armazenamento por vários fatores iniciais, como grau de maturidade e teor de água das sementes, os quais são profundamente influenciados pela umidade relativa do ar e pela temperatura.

Pode-se sugerir, portanto, que a qualidade fisiológica inicial do lote e principalmente o teor de água inicial foram os fatores principais que determinaram a manutenção da viabilidade das sementes de pau-brasil durante o armazenamento por 90 dias a -18 °C.

**Literatura citada**

- Barbedo, C.J. & Marcos-Filho, J.** 1998. Tolerância à dessecação de sementes. *Acta Botânica Brasílica* 12: 145-164.
- Barbedo, C.J., Bilia, D.A.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *Revista Brasileira de Botânica* 25: 431-439.
- Borges, I.F., Giudice, 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: 851-861.
- Brasil** 1992. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. SNDA/DNDV/CLAV, Brasília, p. 365.
- Buckeridge, M.S., Aidar, M.P.M., Santos, H.P., Tiné, M.A.S.** 2004. Acúmulo de reservas. *In* Germinação: do básico ao aplicado (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre. pp.31-50.
- Buitink, J. Claessens, M.M.A.E., Hemminga M.A., Hoekstra, F.A.** 1998. Influence of water content and temperature on molecular mobility and intracellular glasses in seed and pollen. *Plant Physiology* 118: 531-541.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J.** 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4º ed. Funep, Jaboticabal, p. 424.
- Castro, R.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.M.** 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. *In* Germinação: do básico ao aplicado (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre. pp.51-67.
- Dubois, N., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.

- Franks F., Hatley, R.H.M., Mathias S. 1991.** Materials science and the production of shelf-stable biologicals. *Bio Pharm* 4: 38-42.
- 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 seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Biology* 66: prelo.
- Gomes, F.P. 1982.** Curso de estatística experimental. 10<sup>a</sup> ed. Nobel, Piracicaba, p. 468.
- Ista.** International Seed Testing Association. 1996. International rules for seed testing, rules 1996. *Seed Science and Technology* 24 (supplement): 1-335.
- Itaya, N.M., Buckeridge, M.S. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 1997.** Biosynthesis *in vitro* of high molecular mass fructan by cell-free extracts from tuberous roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). *New Phytologist* 136: 53-60.
- Krause, K.P., Hill, L., Reimholz, R., Hamborg Nielsen, T., Sonnewald, U. & Stitt, M. 1998.** Sucrose metabolism in cold-stored potato tubers with decreased expression of sucrose phosphate synthase. *Plant, Cell and Environment* 21: 285-299.
- Leprince, O., Van Der Werf, A., Deltour R., Lambers, H. 1992.** Respiratory pathways in germinating maize radicles correlated with desiccation tolerance and soluble sugars. *Physiologia Plantarum* 85: 581-588.
- Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H., Crowe, L.M. 1995.** Threulose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Env microbial* 61: 3592-3597.
- 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.
- Roberts, E.H. 1973.** Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1: 499-514.

- Santos, I.R.I.** 2000. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 70-84.
- Santos, M. Fátima, Ribeiro, W.R.C., Faiad, M.G.R. & Sano, S.M.** 1997. Fungos associados às sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.). *Revista Brasileira de Sementes* 19: 135-139.
- Steadman, K.J, Pritchard, H.W. & Dey, P.M.** 1996. Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. *Annals of Botany Company* 77: 667-674.
- Sun, W.Q., Irving, T.C., Leopold, A.C.** 1994. The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. *Physiologia Plantarum* 90: 621-628.
- Sun, W.Q., Leopold, A.C.** 1993. The glassy state and accelerated aging of soybeans. *Physiologia Plantarum* 89: 767-774.
- Uemura, M. & Steponkus, P.L.** 2003. Modification of the intracellular sugar content alters the incidence of freeze-induced membrane lesions of protoplasts isolated from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant, Cell and Environment* 26: 1083-1096.
- Vertucci, C.W. & Roos, E.E.** 1990. Theoretical basis of protocols for seed storage. *Plant Physiology* 94: 1019-1023.
- Vertucci, C.W., Farrant, J.M.** 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. *In: Seed development and germination* (Kiegel, J., Galili, G.). Marcel Dekker Inc. New York. P. 237-271.
- Waghorn, J.J., Pozo, T., Acevedo, E.A. & Cardemil, L.A.** 2003. The role of two isoenzymes of alfa-amilase of *Araucaria araucana* (Araucariaceae) on the digestion of starch granules during germination. *Journal of Experimental Botany*. 54: 901-911.

Tabela 1. Teor de água (%) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) não dispersas (22,6% de água inicial), dispersas em época seca (12,7%) e não dispersas e secas artificialmente (7,5%), armazenadas por 15 e 90 dias a 25 °C (umidade relativa do ar, UR 72% ± 3%; potencial hídrico,  $\Psi$ , -39,5 MPA), 7 °C (UR 45% ± 7%;  $\Psi$ , -101,9 MPA) e -18 °C (UR 84% ± 10%;  $\Psi$ , -20,3 MPA). ND – sementes não dispersas, DES – sementes dispersas em época seca, NDS – sementes não dispersas e secas artificialmente.

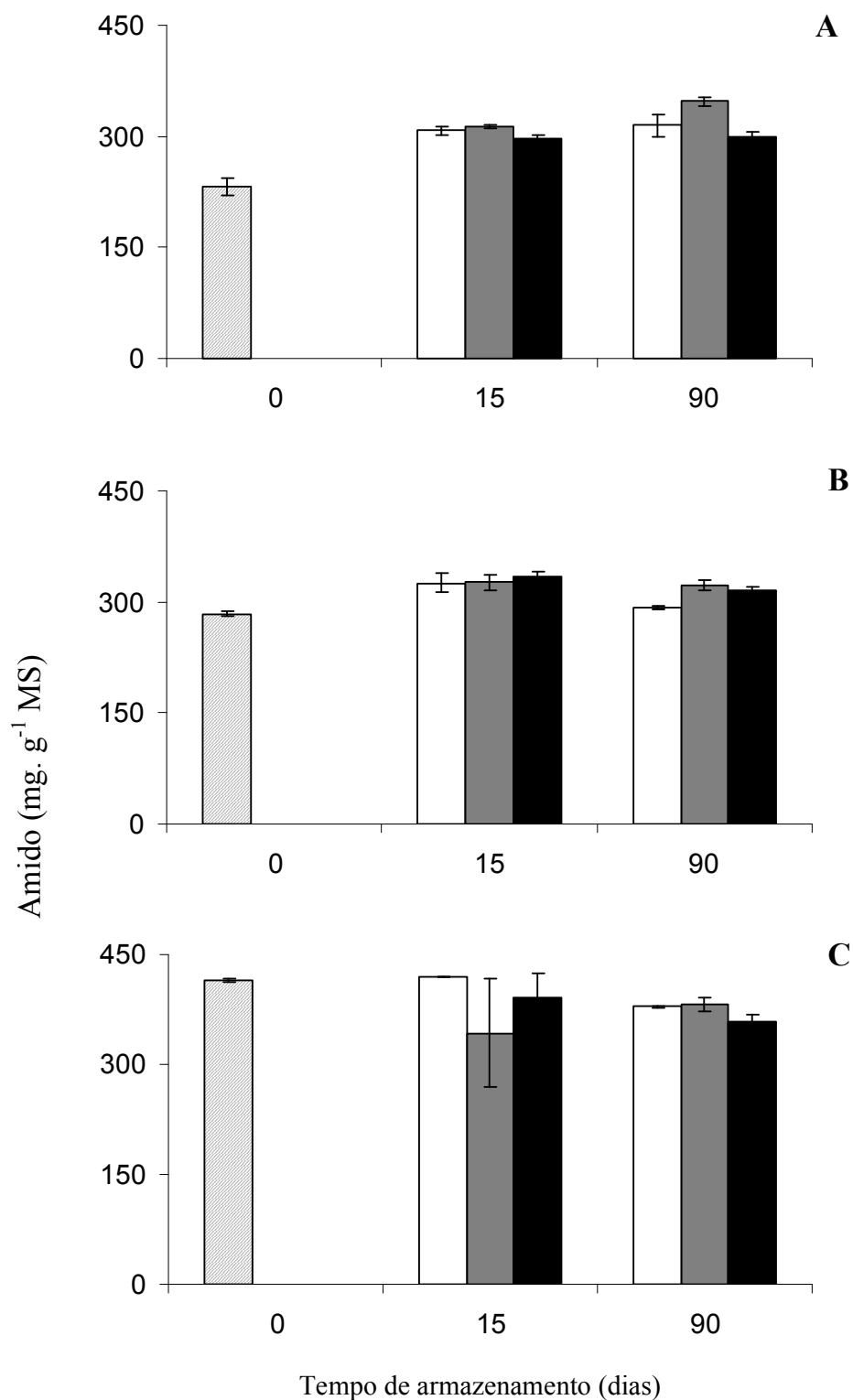
| Período<br>de<br>armazenamento | Temperatura de armazenamento / Processo de coleta |          |           |         |         |         |          |          |          |
|--------------------------------|---------------------------------------------------|----------|-----------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|
|                                | 25 °C                                             |          |           | 7 °C    |         |         | -18 °C   |          |          |
|                                | ND                                                | DES      | NDS       | ND      | DES     | NDS     | ND       | DES      | NDS      |
| Inicial (%)                    | 22,6                                              | 12,7     | 7,5       | 22,6    | 12,7    | 7,5     | 22,6     | 12,7     | 7,5      |
| 15 dias                        | 10,9 bAb                                          | 10,2 bBb | 10,3 bABa | 9,3 aAc | 8,7 aAc | 6,8 aBc | 18,3 aAa | 12,1 aBa | 8,8 bCb  |
| 90 dias                        | 11,9 aABb                                         | 11,4 aBa | 12,2 aAa  | 8,3 bAc | 7,7 bAb | 6,4 aBc | 13,4 bAa | 11,3 bBa | 10,6 aBc |
| C. V. (%)                      | 1,99                                              |          |           |         |         |         |          |          |          |

<sup>†</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%; minúsculas para comparação entre tempos de armazenamento, maiúsculas entre processo de obtenção dentro de cada temperatura, em itálico para comparação entre as temperaturas dentro de cada processos de obtenção.

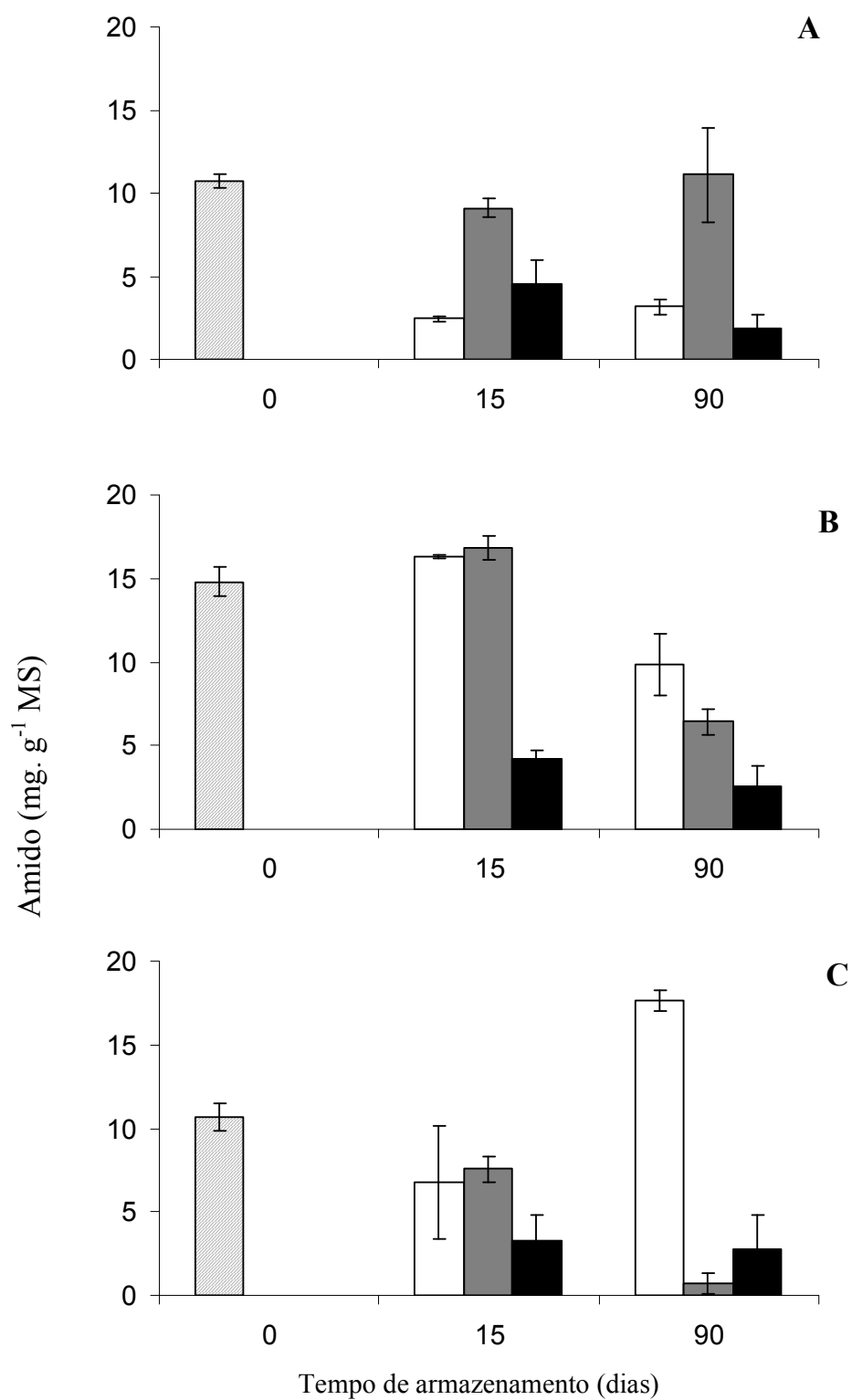
Tabela 2. Germinação (%) e desenvolvimento de plântulas normais (%) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) não dispersas e sementes dispersas em época seca, armazenadas por 15 e 90 dias a 25 °C (umidade relativa do ar, UR 72% ± 3%; potencial hídrico,  $\Psi$ , -39,5 MPA), 7 °C (UR 45% ± 7%;  $\Psi$ , -101,9 MPA) e -18 °C (UR 84% ± 10%;  $\Psi$ , -20,3 MPA). ND – sementes não dispersas, DES – sementes dispersas em época seca, NDS – sementes não dispersas e secas artificialmente.

| Período<br>de<br>armazenamento       | Temperatura de armazenamento / Processo de coleta |        |        |        |        |        |        |         |        |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|
|                                      | 25 °C                                             |        |        | 7 °C   |        |        | -18 °C |         |        |
|                                      | ND                                                | DES    | NDS    | ND     | DES    | NDS    | ND     | DES     | NDS    |
| Germinação                           |                                                   |        |        |        |        |        |        |         |        |
| Inicial (%)                          | 78                                                | 78     | 25     | 78     | 78     | 25     | 78     | 78      | 25     |
| 15 dias                              | 48 aAa                                            | 58 aAa | 25 aBb | 54 aAa | 48 aAa | 10 aBc | 10 aBb | 52 aAa  | 46 aAa |
| 90 dias                              | 2 bAb                                             | 0 bAb  | 0 bAb  | 48 aAa | 54 aAa | 15 aBa | 0 bBb  | 50 aAa  | 6 bBab |
| C.V. (%) 4,56                        |                                                   |        |        |        |        |        |        |         |        |
| Desenvolvimento de plântulas normais |                                                   |        |        |        |        |        |        |         |        |
| Inicial (%)                          | 62                                                | 70     | 2,5    | 62     | 70     | 2,5    | 62     | 70      | 2,5    |
| 15 dias                              | 29 aAa                                            | 33 aAa | 12 aBb | 25 aAa | 14 bAb | 0 aBc  | 4 aBb  | 32 aAab | 31 aAa |
| 90 dias                              | 0 bAb                                             | 0 bAb  | 0 bAb  | 21 aBa | 42 aAa | 0 aCa  | 0 aBb  | 23 aAa  | 0 bBa  |
| C.V. (%) 36,42                       |                                                   |        |        |        |        |        |        |         |        |

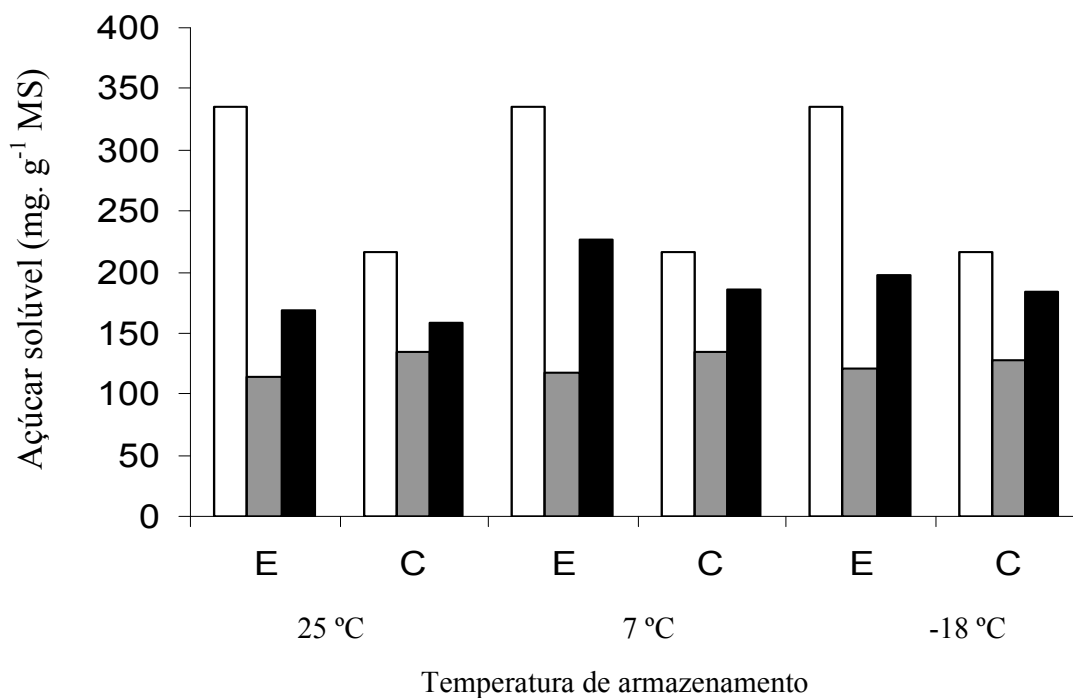
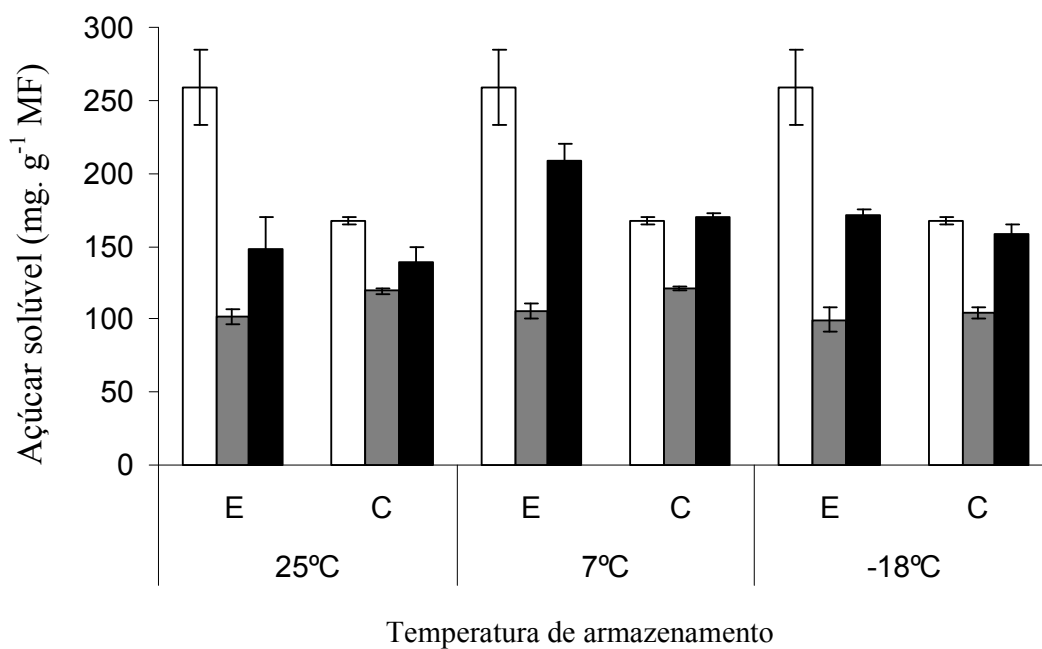
<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%; minúsculas para comparação entre tempos de armazenamento, maiúsculas para temperatura dentro de cada processo de coleta, em itálico para comparação entre processos de coleta dentro de cada temperatura.



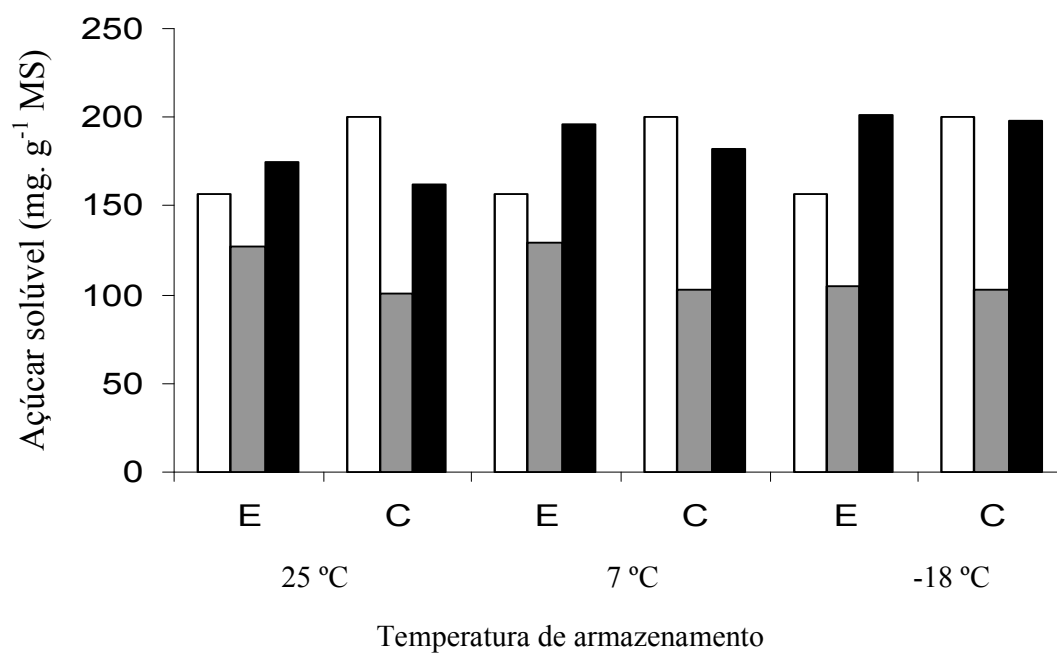
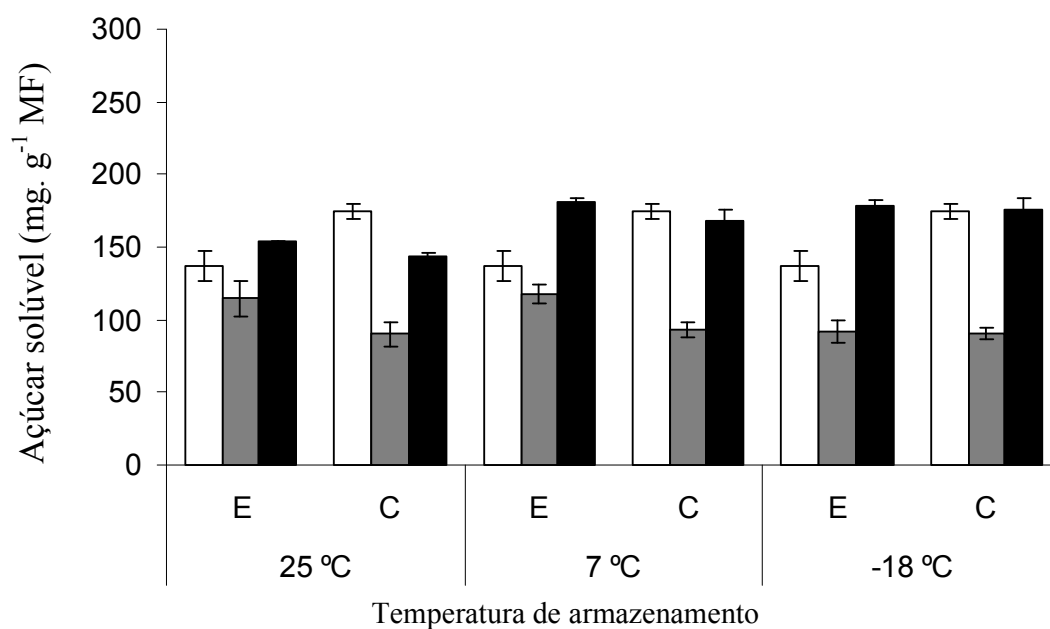
**Figura 1** - Valores médios do teor de amido nos cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* não dispersas (A), dispersas em época seca (B) e não dispersas e secas (C), armazenadas a 25 °C (□), 7 °C (■) e -18 °C (■) por 15 e 90 dias. Barras indicam o desvio padrão.



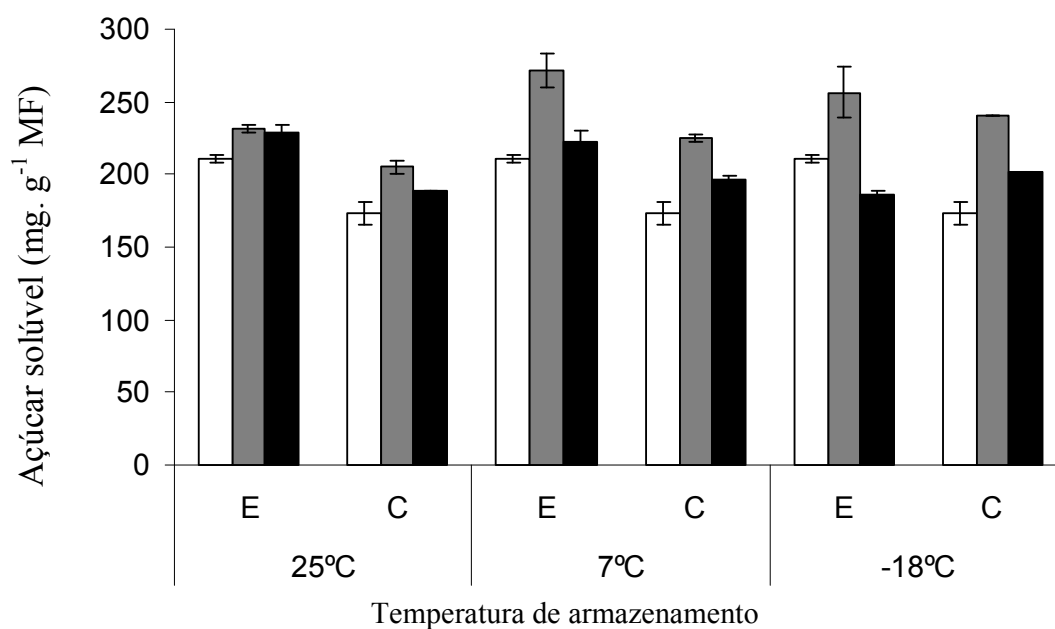
**Figura 2** – Valores médios do teor de amido nos eixos embrionários de sementes de *Caesalpinia echinata* não dispersas (A), dispersas em época seca (B) e não dispersas e secas (C), armazenadas a 25 °C (□), 7 °C (■) e -18 °C (■) por 15 e 90 dias. Barras indicam o desvio padrão.



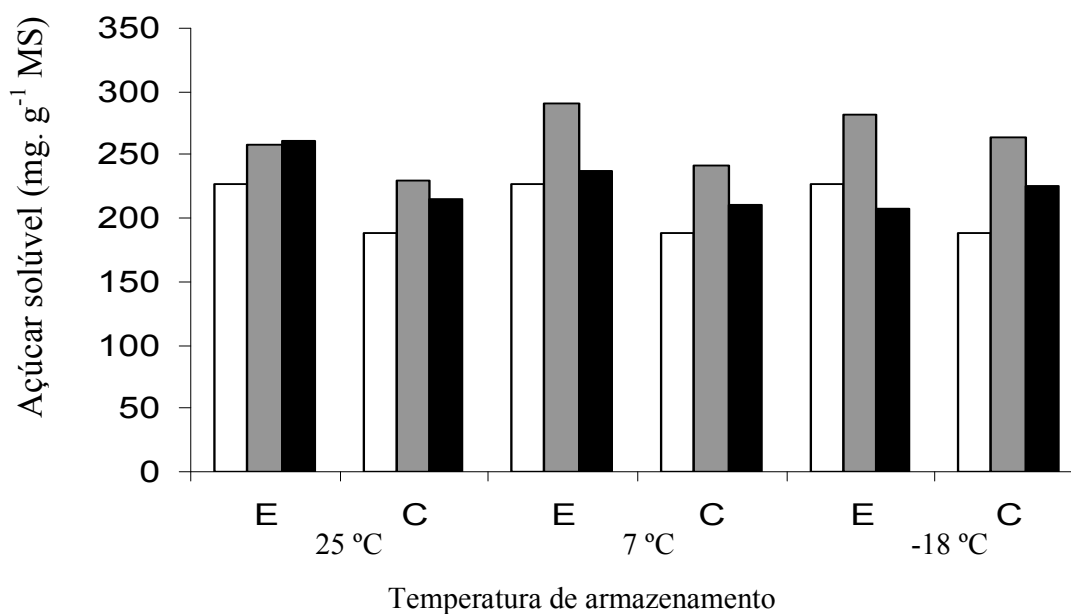
**Figura 3** - Teor de carboidratos solúveis (mg g<sup>-1</sup> massa fresca - A; e mg g<sup>-1</sup> massa seca - B) nos eixos embrionários (E) e cotilédones (C) de sementes de *Caesalpinia echinata* não dispersas (22% de água inicial), armazenadas a 25 °C, 7 °C e -18 °C por 0 (□), 15 (■) e 90 (■) dias.



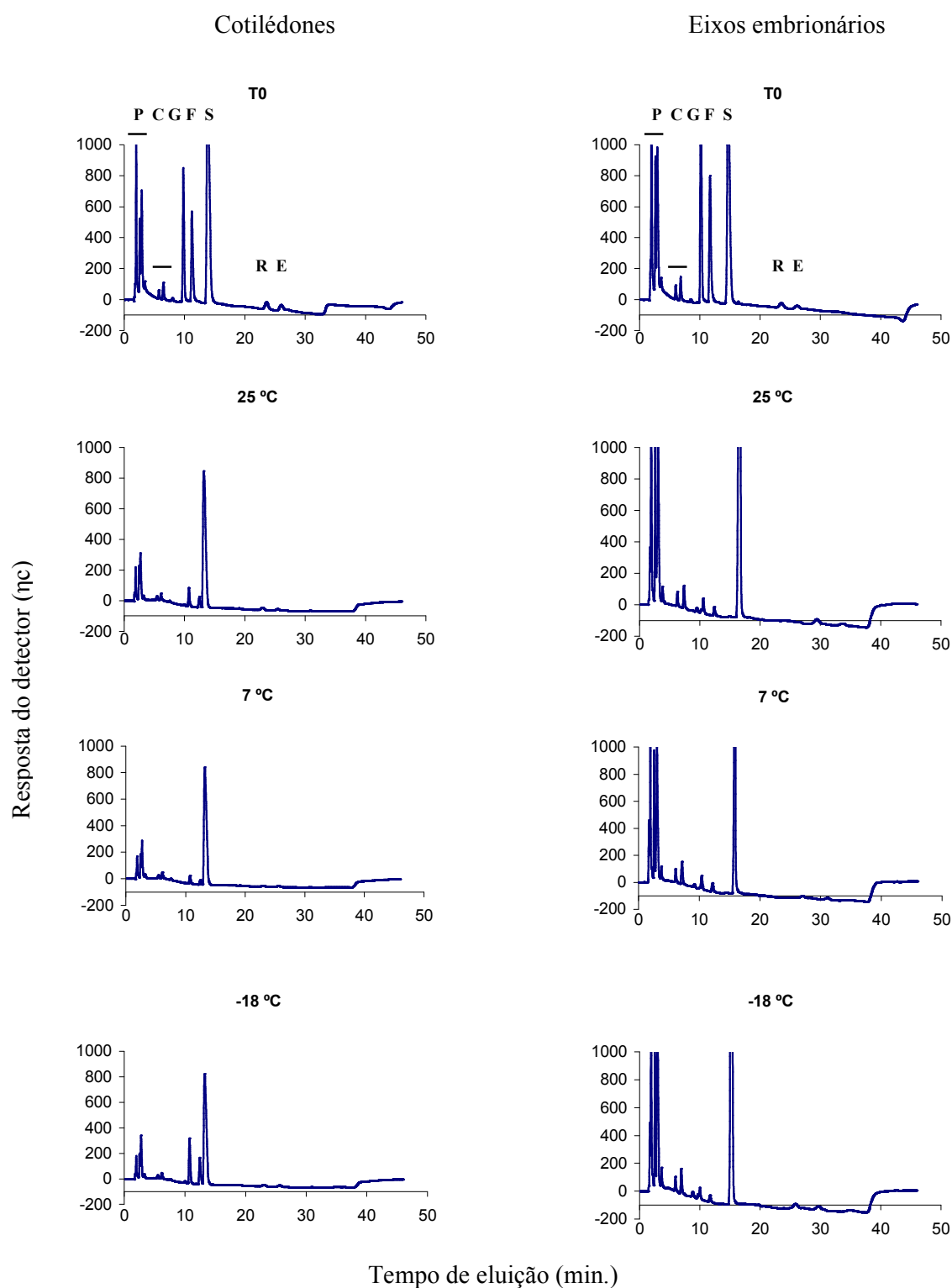
**Figura 4** - Teor de carboidratos solúveis (mg g<sup>-1</sup> massa fresca - A; e mg g<sup>-1</sup> massa seca - B) nos eixos embrionários (E) e cotilédones (C) de sementes de *Caesalpinia echinata* dispersas em época seca (12% de água inicial), armazenadas a 25 °C, 7 °C e -18 °C por 0 (□), 15 (■) e 90 (■) dias.



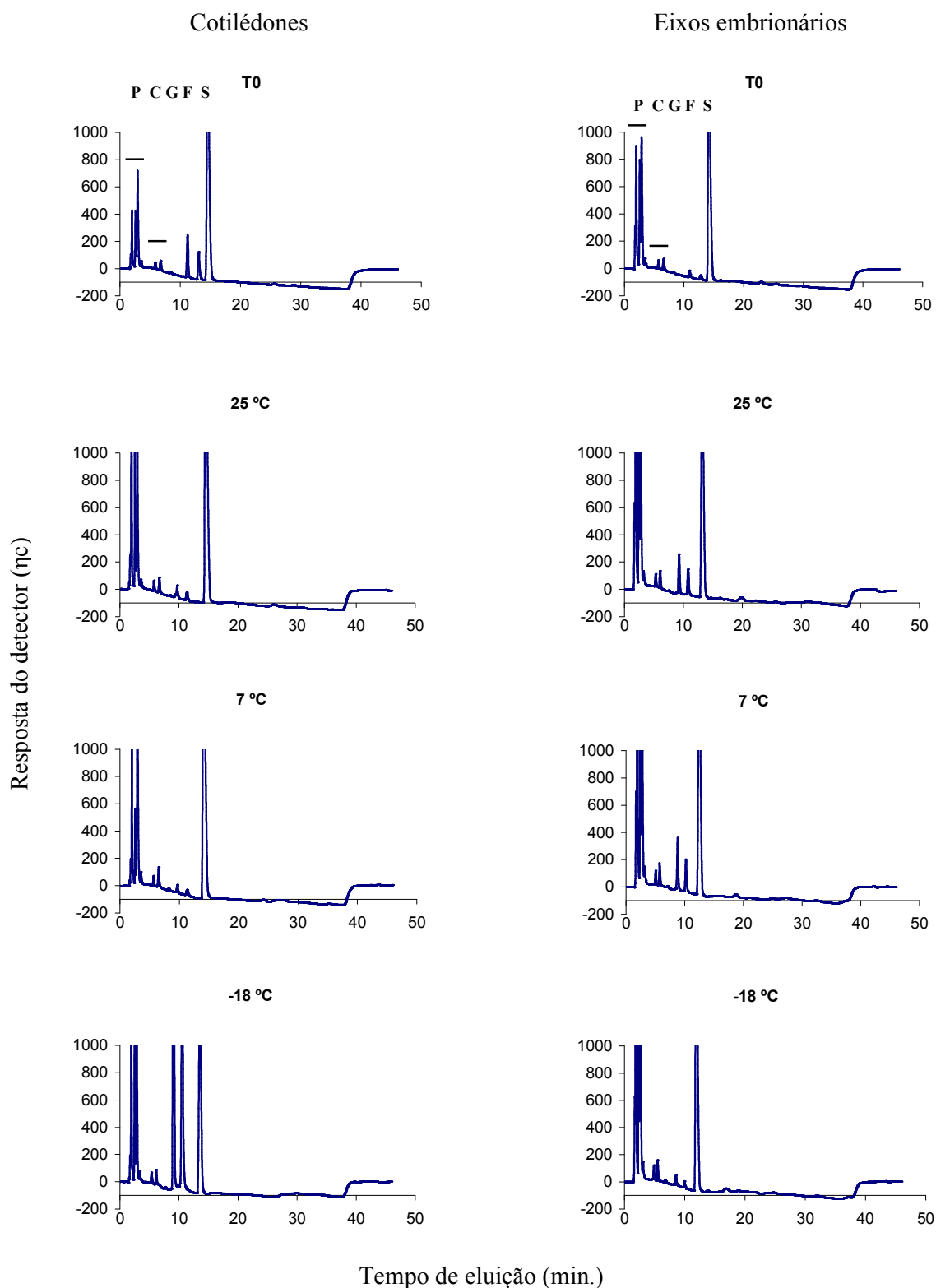
B



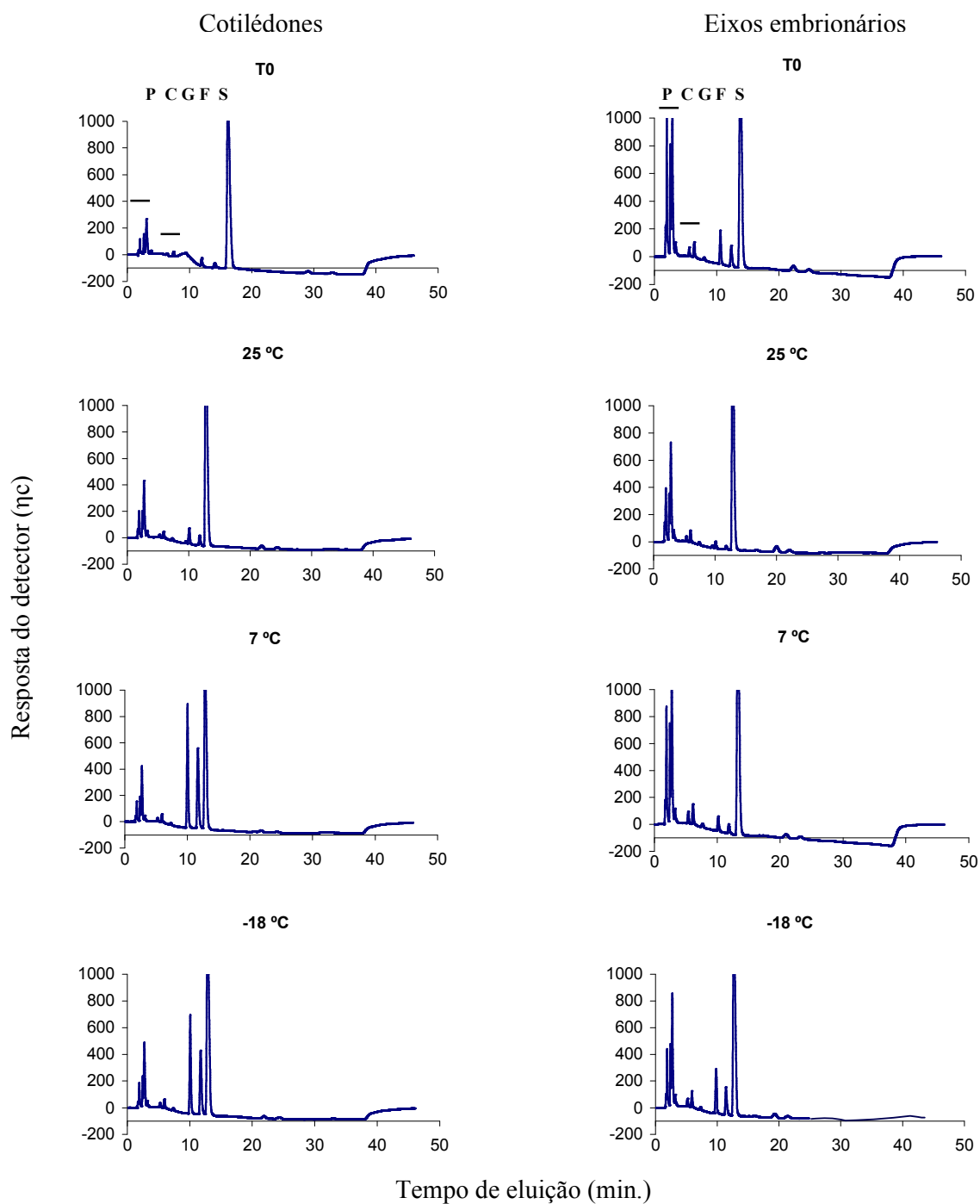
**Figura 5** - Teor de carboidratos solúveis (mg g<sup>-1</sup> massa fresca - A; e mg g<sup>-1</sup> massa seca - B) nos eixos embrionários (E) e cotilédones (C) de sementes de *Caesalpinia echinata* não dispersas e secas (7% de água inicial), armazenadas a 25 °C, 7 °C e -18 °C por 0 (□), 15 (▒) e 90 (■) dias.



**Figura 6** - Composição dos carboidratos solúveis nos cotilédones e eixos embrionários de sementes de *Caesalpinia echinata* não dispersas (22% de teor de água inicial) no momento da coleta (T0) e após armazenamento em diferentes temperaturas por 90 dias. P - Polióis, C – Galactosil ciclitóis, G - Glicose, F - Frutose, S – Sacarose, R – Rafinose, E – Estaquiiose.



**Figura 7** - Composição dos carboidratos solúveis nos cotilédones e eixos embrionários de sementes de *Caesalpinia echinata* dispersas em época seca (12% de teor de água inicial) no momento da coleta (T0) e após armazenamento em diferentes temperaturas por 90 dias. P - Polióis, C – Galactosil ciclitóis, G - Glicose, F - Frutose, S – Sacarose, R – Rafinose, E – Estaquiose.



**Figura 8** - Composição dos carboidratos solúveis nos cotilédones e eixos embrionários de sementes de *Caesalpinia echinata* não dispersas e secas (7% de teor de água inicial) no momento da coleta (T0) e após armazenamento em diferentes temperaturas por 90 dias. P - Poliois, C – Galactosil ciclitóis, G - Glicose, F - Frutose, S – Sacarose, R – Rafinose, E – Estaquiase.

## Discussão Geral

Práticas de conservação *ex situ* figuram entre os procedimentos prioritários para assegurar a preservação de fontes genéticas, especialmente através de repositores de germoplasma como os bancos de armazenamento a -20 °C (Salomão 2002).

O armazenamento de sementes é uma das principais formas de garantir a variabilidade genética das espécies. Neste caso, o teor de água e a temperatura exercem grande influência sobre a viabilidade das sementes. Sementes ortodoxas suportam secagem até níveis próximos a 10% de água (Roberts 1973), ampliando substancialmente sua capacidade de armazenamento. Barbedo *et al.* (2002) concluíram que sementes de pau-brasil são tolerantes à secagem e ao resfriamento, podendo ser consideradas ortodoxas.

Além do teor de água e da temperatura, outro fator importante para conservar a viabilidade das sementes é a qualidade inicial do lote, que pode ser elevada quando a colheita é realizada em momento próximo ao ponto de maturidade fisiológica das sementes (Carvalho e Nakagawa 2000). Tal fato pôde ser comprovado quando as sementes de pau-brasil foram coletadas após a dispersão e em época chuvosa, perdendo a capacidade germinativa nos primeiros 15 dias de armazenamento, (dados não apresentados).

Observou-se também (Capítulos 1, 2 e 3) oscilação do teor de água das sementes em função da umidade relativa do ar, como descrito anteriormente por Carvalho e Nakagawa (2000) para outras espécies e ainda a influência do teor de água inicial sobre a tolerância ao congelamento das sementes de pau-brasil. Este fato também foi reportado por Sacandé *et al.* (1998) para as sementes de neem (*Azadirachta indica*), que foram sensíveis ao congelamento, quando o teor de água era superior a 9% da massa fresca inicial (0,09 g g<sup>-1</sup> de massa seca). As sementes de pau-brasil, quando armazenadas a -18 °C e com teor de água superior a 17% em base úmida (0,20 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> massa seca), reduziram substancialmente sua capacidade germinativa aos 15 dias, perdendo totalmente a

viabilidade aos 90 dias de armazenamento, enquanto as sementes armazenadas com baixo teor de água, 12% em base úmida ( $0,14 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}$  massa seca), resistiram ao congelamento.

A redução na germinabilidade ou no nível de sobrevivência, como resultado do conteúdo inadequado de água, associado a temperaturas baixas, já foi amplamente documentada na literatura para varias espécies como *Glycine max* e *Helianthus annuus* (Verttuci 1989), *Populus deltoides* (Pence 1996), *Coffea costatifructa*, *Coffea sessiliflora* e *Coffea arabica* (Dussert *et al.* 1998).

Segundo Salomão (2002), além do próprio conteúdo de água, o congelamento e descongelamento são decisivos para evitar algum efeito prejudicial sobre os tecidos e células da semente. As sementes de pau-brasil armazenadas em temperaturas negativas foram mantidas durante três dias em ambiente de laboratório, a  $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ , para aclimação. Possivelmente este processo tenha também influenciado positivamente no resultado final da germinabilidade destas sementes.

Os resultados de germinação e desenvolvimento de plântulas normais indicam que o teor de água alto foi o fator determinante para a redução da viabilidade das sementes de pau-brasil armazenadas a  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  (Capítulos 1 e 3, tabela 2).

O limite de teor de água é variável de espécie para espécie, mas corresponde sempre ao conteúdo de água não congelável na semente (Vertucci & Roos 1990), sugerindo que a sobrevivência da semente depende estritamente em se evitar a formação de gelo intracelular (Hor *et al.* 2005). Os resultados sugerem que o limite de teor de água para sementes de pau-brasil, quando armazenadas sob temperatura negativa, esteja entre 12% e 22% (Capítulos 1, 2 e 3, tabela 1), ou seja, sem a presença de água congelável (água tipo 2 descrita por Vertucci & Farrant 1995).

Em resumo, com os resultados obtidos no presente trabalho é possível afirmar que sementes de pau-brasil são tolerantes ao congelamento e mantém a viabilidade e o vigor iniciais durante o armazenamento a  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ , desde que observados alguns fatores, como a qualidade fisiológica do lote, que envolve o grau de maturidade do embrião e o teor de água inicial das sementes.

Sementes de pau-brasil com elevada qualidade fisiológica normalmente apresentam coloração parda com manchas púrpuras bem definidas (Borges *et al.* 2005). Quando armazenadas a -5 °C e -18 °C, por até 12 meses, mantiveram estas características, enquanto nas sementes armazenadas a 7 °C e 2 °C, as manchas púrpuras desapareceram devido o escurecimento do tegumento, sugerindo que o congelamento preserva o sistema anti-oxidante da semente, contribuindo para sua viabilidade e vigor.

A redução da porcentagem de germinação e desenvolvimento de plântulas normais também foi evidente nas sementes armazenadas em temperaturas positivas, 7 °C e 2 °C, chegando próximo a 20% de germinação e 8% de plântulas normais, em ambas temperaturas, durante os 12 meses de armazenamento (dados não mostrados).

Apesar de não haver grande diferença em relação à porcentagem de germinação e plântulas normais entre as sementes armazenadas nestas duas condições, foi possível observar que as sementes mantidas a 2 °C, apresentavam um aspecto visual melhor, em relação às armazenadas a 7 °C.

Além do teor de água, muitos compostos estão supostamente envolvidos na tolerância das sementes ao congelamento, podendo ser destacados dentre eles, os lipídeos, as proteínas e os carboidratos. Os principais carboidratos presentes em sementes são a sacarose, os oligossacarídeos da série da rafinose, o amido e os polissacarídeos de parede celular. Segundo Garcia *et al.* (2006), sementes maduras de pau-brasil são compostas por 40-50% de carboidratos não estruturais, 8-10% proteínas e 20% lipídeos. Entre os carboidratos não estruturais, o amido representa cerca de 30-40% do peso seco e os carboidratos solúveis representam cerca de 10% do peso seco e são compostos principalmente por sacarose, glicose e frutose e em menores proporções ciclitóis livres, rafinose e estaquiose.

Os resultados da análise de amido mostraram que a proporção deste polissacarídeo é de 10-20 vezes maior nos cotilédones que nos eixos embrionários (Capítulo 3, figuras 1 e 2). De acordo com Leslie *et al.* (1995), os carboidratos podem apresentar múltiplos papéis tais como fonte de

energia para o metabolismo em geral e participar como substrato para síntese de outros compostos, podendo ainda agir como crio- e osmo- protetores.

A análise da composição dos carboidratos mostrou que sementes coletadas com maior teor de água apresentavam maiores concentrações de sacarose, glicose, frutose e polióis, além de traços de rafinose e estaquiose (Capítulo 3, figuras 6, 7 e 8).

Segundo Buitink *et al.* (2000), os oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose isoladamente não estariam envolvidos na estabilização da matriz citoplasmática e dessa forma não protegeriam as células durante o armazenamento das sementes. É provável que todo o conjunto de carboidratos solúveis no citoplasma contribua para evitar a cristalização da sacarose. Apesar de todo o conhecimento acumulado com relação ao papel dos carboidratos na estabilidade das proteínas e das membranas celulares durante os processos de dessecação e congelamento, muitos aspectos ainda necessitam ser esclarecidos.

Os resultados referentes à germinação e desenvolvimento de plântulas normais foram totalmente diferentes entre os lotes analisados e temperaturas de armazenamento (Capítulos 1, 2 e 3, tabela 2). Apesar de haver diferenças nos lotes de sementes de pau-brasil quando comparados quanto ao teor de amido e teor e composição de carboidratos solúveis, não foi possível estabelecer uma relação entre a presença destes compostos com a capacidade germinativa das sementes desta espécie. Os estudos feitos por Steadman *et al.* (1996) demonstraram que os teores de açúcares totais encontrados nos embriões de diversas espécies não sustentam qualquer relação aparente para as respostas ao armazenamento das diferentes categorias de sementes.

No presente trabalho, o que parece ter influenciado mais a viabilidade das sementes de pau-brasil durante o armazenamento em diferentes temperaturas foi o teor de água inicial e a qualidade fisiológica das sementes. Os resultados reforçam observações anteriores (Garcia *et al.* 2006) e permitem sugerir que o metabolismo de sacarose, tanto nos eixos embrionários quanto nos cotilédones, independentemente da viabilidade ou teor de água das sementes, parece ser afetado pelas temperaturas baixas (7 °C e -18 °C).

Com os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que sementes de *Caesalpinia echinata* são tolerantes ao congelamento, desde que o teor de água inicial seja aproximadamente 12%. Nessa condição, a conservação *ex situ* pode ser utilizada como estratégia para preservar a espécie, fornecendo sementes com elevada qualidade por período de até 12 meses.

### Literatura citada

- Barbedo, A.S.C., Bianchi, C.G., Keller L.R., Ortega, M.G. & Ortega, S.E.H.** 2005. Manual técnico de arborização urbana. Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente p.45.
- Barbedo, C.J. & Marcos-Filho, J.** 1998. Tolerância à dessecação de sementes. *Acta Botanica Brasilica* 12: 145-164.
- Barbedo, C.J., Bilia, D.A.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. *Revista Brasileira de Botânica* 25: 431-439.
- 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. p.67.
- Bernal-Lugol, I., Leopold, A.C.** 1992. Changes in soluble carbohydrates during storage. *Plant Physiology* 98:1207-1210.
- Borges, I.F., Giudice, 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: 851-861.
- 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, orgs.). 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, orgs.). Artmed, Porto Alegre. p.164-185.
- Buitink, J., Hemminga M.A., Hoekstra, F.A.** 2000. Is there a role for oligosaccharides in seed longevity? An assessment of the intracellular glass stability. *Plant Physiology* 122: 1217-1224.
- Bulbovas, P.** 2005. Defesas antioxidativas em plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) como indicadoras 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. p.108.
- Burke, M.J., Gusta, L.V., Quamme, H.A., Weiser, C.J. And Li, P.H.** 1976. Freezing injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology* 27: 507-528.
- Caffrey, M., Fonseca, V., Leopold, A.C.** 1988. Lipid-sugar interactions. Relevance to anhydrous biology. *Plant Physiology* 86: 754-758.
- Cardoso, M. A., Provan, J., Powell, W., Ferreira, C. G. & Oliveira, D. E.** 1998. Hight genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinoideae). *Molecular Ecology* 7: 601-608.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J.** 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4º ed. Funep, Jaboticabal, p. 424.
- Castilho, E.M., Lumen B.O.D, Reyers, P.S. & Lumen, H.Z.D.** 1990. Raffinose synthase and galactinol synthase in developing seeds and leaves of legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 351-355.
- Cunha, M.W. & Lima, H.C.** 1992. Viagem à terra do pau-brasil. Agência Brasileira de Cultura, Rio de Janeiro.
- Dussert, S., Chabrillange, N., Engelmann, F., Anthony, F., Louarn, J., Hamon, S.,** 1998. Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa*

- and *C. sessiflora*): importance of water content and cooling rate. Seed Science Research 8: 9-15.
- Eira, M.T.S., Walters, C., Caldas, L.S., Fazuoli, L.C., Sampaio, J.B. And Dias, M.C.L.L.** 1999, Tolerance of *Coffea* spp. seeds to desiccation and low temperature. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 11: 97-105.
- Ellis, R.H., Hong, T.D., Roberts, E.H.** 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? I Coffee. Journal of Experimental Botany 41: 1167-1174.
- 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 seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. Brazilian Journal of Biology 66: prelo.
- Guy, C.L.** 2003. Freezing tolerance of plants: current understanding and selected emerging concepts. Canadian Journal of Botany 81: 1216-1223.
- Hor, Y.L., Kim, Y.J., Ugap, A., Chabrillange, N., Sinniah, U.R., Engelmann, F. & Dussert, S.** 2005. Optimal hydration status for cryopreservation of intermediate oily seeds: *Citrus* as a case study. Annals of Botany 95: 1153-1161.
- Kermode, A.R.** 1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. Critical Reviews in Plant Sciences 9: 155-195.
- Kermode, A.R.** 1995. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination: interactions between the embryo and the seed environment. In: Kigel J. Galili G, eds. Seed development and germination. New York: Marcel Dekker, 273-332.
- Klotke, J., Kopka, J., Gatzke, N. & Heyer, A.G.** 2004. Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of *Arabidopsis thaliana* with contrasting cold adaptation – evidence for a role of raffinose in cold acclimation. Plant, Cell and Environment, 27: 1395-1404.

- Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H., Crowe, L.M.** 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied Environmental Microbiology* 61: 3592-3597.
- Lima, H.** 2003. Taxonomia e distribuição geográfica atual de *Caesalpinia echinata* Lam. Simpósio "Pau-brasil: ciência e arte". São Paulo, 12 a 14 de março de 2003. São Paulo: FAPESP/Instituto de Botânica/SBSP, 2003. CD-ROM.
- 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.
- Longui, E.L.** 2005. Pau-brasil e outras espécies nativas empregadas na fabricação de arcos para instrumentos de corda: um estudo comparativo. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica, São Paulo. p.
- Marcos-Filho, J.** 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. FEALQ, Piracicaba.
- Medeiros, A.C.S. & Cavallari, D.A.N.** 1992. Conservação de germoplasma de aroeira (*Astronium urundeuva* FR. ALL.) ENGL. I. Germinação de sementes após imersão em nitrogênio líquido (-196 °C). *Revista Brasileira de Sementes* 14: 73-75.
- Mello-Filho, L.E.** 1991, 1992. A Floresta Atlântica. *In Floresta Atlântica/textos científicos*. (S>Monteiro & L Kaz, coord.) Edições Alumbramento, Rio de Janeiro. 17-21.
- Myers, N., Mittermeyer, R.A., Mittermeyer, 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.
- Pammenter, N.W. & Berjak, P.** 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* 9: 13-37.
- Peixoto, A.L.** 1991/1992. A vegetação da Costa Atlântica. *In Floresta Atlântica – textos científicos* (S. Monteiro & L. Kaz, coord.) Edições Alumbramento, Rio de Janeiro. 33-42

- Pence, V.C.** 1996. Germination, desiccation and cryopreservation of seed of *Populus deltoides* Barr. Seed Science and Technology 24: 151-157.
- Peterbauer, T. & Richter, A.** 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. Seed Science Research 11: 185-197.
- Pritchard, H.W. & Prendergast, F.G.** 1986. Effects of desiccation and cryopreservation on the *in vitro* viability of embryos of the recalcitrant seed species *Araucaria hunsteinii* K. Schum. Journal of Experimental Botany 37: 1388-1397.
- 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.
- Sacandé, M., Hoekstra, F.A., Van Pijlen, J.G., Groot, S.P.C.** 1998. A multifactorial study of conditions influencing neem (*Azadirachta indica*) seed storage longevity. Seed Science Research 8: 473-482.
- Salomão, A.N.,** 2002. Tropical seed species responses to liquid nitrogen exposure. Brazilian Journal Plant Physiology 14: 133-138.
- Steadman, K.J, Pritchard, H.W. & Dey, P.M.** 1996. Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. Annals of Botany 77: 667-674.
- Takaki, M. & Dietrich, S.M.C.** 1980. Effect of GA and light on polysaccharide levels and metabolism in germinating coffee seeds. Journal of Experimental Botany 31: 1643-1649.
- Uemura, M. & Steponkus, P.L.** 2003. Modification of the intracellular sugar content alters the incidence of freeze-induced membrane lesions of protoplasts isolated from *Arabidopsis thaliana* leaves. Plant, Cell and Environment 26: 1083-1096.
- Vertucci, C.W., Farrant, J.M.** 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: Seed development and germination (Kiegel, J., Galili, G.). Marcel Dekker Inc. New York. P. 237-271.

- Vertucci, C.W. & Roos, E.E.** 1990. Theoretical basis of protocols for seed storage. *Plant Physiology* 94: 1019-1023.
- Vertucci, C.W.** 1989. Effects of cooling rate on seeds exposed to liquid nitrogen temperatures. *Plant Physiology* 90: 1478-1485.
- Vianna, A.** O romance do pau-brasil. O campo, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 14-15, 1944. In. Ibirapitanga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) do descobrimento à atualidade. (ROCHA, Y.T.) Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Walters, C.** 1998. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Science Research* 8: 223-244.
- Yamada, T., Kuroda, K., Jitsuyama, Y., Takezawa, K., Arakawa, K. & Fujikawa, S.** 2002. Roles of the plasma membrane and the cell wall in the responses of plant cells to freezing. *Planta* 215: 770-778.

## Resumo geral

A crescente exploração dos recursos naturais sem o devido controle ocorre há muito tempo e manter a biodiversidade é uma das principais preocupações da atualidade, principalmente em função dos efeitos negativos da degradação ambiental e do crescente aumento do número de espécies ameaçadas de extinção. Muitos biomas tiveram sua área original reduzida e com isso ocorreram perdas irreparáveis de suas espécies, muitas vezes endêmicas.

A Mata Atlântica é um exemplo destes biomas e é neste domínio que se encontra *Caesalpinia echinata* Lam., pau-brasil, incluída na lista de espécies ameaçadas de extinção.

Uma das maneiras de se preservar o genótipo de plantas é através do armazenamento de sementes em bancos de germoplasma, mantendo-se a variabilidade genética.

As sementes, de uma forma geral, apresentam comportamentos diferentes em relação ao armazenamento, muitas das quais não podem ser mantidas por períodos prolongados por não suportarem redução do teor de água ou temperaturas baixas. Estas condições, via de regra, diminuem o metabolismo das sementes e reduzem a proliferação de microrganismos prejudiciais à sua conservação.

Muitas espécies acumulam compostos como oligossacarídeos e proteínas, dentre outros, que supostamente estão relacionados com a tolerância à dessecação e ao congelamento, porém muitas são desprovidas de tais compostos.

A redução do teor de água associada a temperaturas baixas tem sido um procedimento usado por muitos bancos de germoplasma para manter sementes armazenadas por períodos indeterminados.

Sementes de pau-brasil suportam secagem a níveis baixos, no entanto não há tecnologia apropriada para manter a viabilidade com elevada qualidade destas sementes. Em vista disto o propósito deste trabalho foi desenvolver mecanismos para armazenamento de sementes de pau-brasil que permitam manter um lote de elevada qualidade por períodos prolongados.

Em temperaturas positivas (25 °C e 7 °C) as sementes de pau-brasil perderam a viabilidade durante o armazenamento, independente do teor de água inicial, confirmando trabalho anterior. Todavia, apresentaram tolerância ao congelamento, quando armazenadas com 12,7% de água, enquanto com 22,6% de água perderam a capacidade germinativa, possivelmente pela formação de gelo intracelular e conseqüente danificação das células.

Quando armazenadas por 12 meses a -5 °C e -18 °C, as sementes com 12,7% de água mantiveram a capacidade germinativa, mas apenas nesta última temperatura foi possível manter o elevado vigor inicial.

Em sementes de pau-brasil, oligossacarídeos da série da rafinose estão presentes em baixíssimas concentrações, sugerindo que, possivelmente, outros compostos com funções similares estariam envolvidos na tolerância a secagem e congelamento de sementes dessa espécie.

Apesar da presença marcante de hexoses, que têm sido consideradas como um indício do vigor de sementes, algumas destas perderam a capacidade germinativa durante o armazenamento, indicando, portanto, que a presença de tais carboidratos não garante a viabilidade das sementes de pau-brasil. Contudo, os resultados sugerem que o metabolismo de sacarose, independentemente da viabilidade das sementes, é afetado pela temperatura baixa.

### Abstract

The increasing exploitation of the nature resources without any sort of control has been taking place for a long time and maintaining biodiversity in a sustainable way is a major concern, mainly because of negative effects of environmental degradation and the increasing number of species in risk of extinction. Many biomes have been reduced, and a lot of their species vanished, some of them endemics species.

The Atlantic Forest is an example of such biomes and it is also the birthplace of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood), which included in the list of species at risk of extinction.

One way to preserve the genotype of plants is by storing seeds in gene banks, keeping genetic variability.

Seeds, in general, show different characteristics regarding storage, many of which lose viability when water content is reduced or they are submitted to low temperatures. Under such controlled conditions, that is, by reducing water content and decreasing temperature it is possible to decrease metabolism of the seeds and reduce the amount of microorganisms which harm them. The reductions of water content along with cold temperatures have been used by many gene banks to keep seeds storage for a long time.

Besides the above mentioned controlled conditions, many species accumulate compounds such as oligosaccharides and proteins, among others, which are supposedly involved with desiccation and freezing tolerance.

Seeds of brazilwood endure drying to short levels *ca.* 10% of water. However, as there is no specific technology available to keep seed viability the present research is meant to develop such technology in order to make storage of brazilwood seeds possible.

In positive temperatures (25 °C and 7 °C) seeds of brazilwood lost viability during storage, independent of initial water content, as previously stated Barbedo *et al.* (2002). However, they

showed freezing tolerance, when stored at 12.7% of water, while at 22.6% of water they lost germination capacity since the formation of ice crystals might cause cell damage.

When stored for 12 months at -5 °C and -18 °C seeds with 12.7% of water kept germination capacity, however vigorous seedling development was found only when they were stored at -18 °C.

In seeds of brazilwood, oligosaccharides of the raffinose family are found in lower levels, thus suggesting that other compounds might be involved in drying and freezing tolerance in this species.

Despite the presence of hexoses in these seeds, some of them lost germination capacity. Thus we may suggest that these carbohydrates do not ensure the viability of seeds. However, results indicated that the metabolism of sucrose is apparently affected by cold temperature, nevertheless the seed viability.