

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**

Marília Shibata

MATURIDADE DE SEMENTES DE *Araucaria angustifolia*
(Bertoloni) Otto Kuntze: ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS,
BIOQUÍMICAS E CONSERVAÇÃO NA PÓS-COLHEITA

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Recursos
Genéticos Vegetais da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências, área de concentração em
Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Profa. Dra. Cileide M.
M. Coelho de Arruda Souza

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Shibata, Marília

MATURIDADE DE SEMENTES DE *Araucaria angustifolia*
(Bertoloni) Otto Kuntze: ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS,
BIOQUÍMICAS E CONSERVAÇÃO NA PÓS-COLHEITA / Marília
Shibata ; orientadora, Cileide Maria Medeiros Coelho -
Florianópolis, SC, 2013.

110 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Recursos genéticos
vegetais. 3. desenvolvimento de sementes. 4.
armazenamento. 5. compostos de reserva. I. Coelho,
Cileide Maria Medeiros. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais. III. Título.

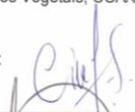
Maturidade de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze: alterações fisiológicas, bioquímicas e conservação na pós colheita

por

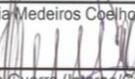
Marilia Shibata

Dissertação julgada e aprovada em 18/02/2013, em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

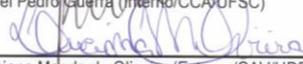
Banca Examinadora:



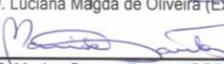
Prof.ª Dr.ª Citeide Maria Medeiros Coelho (Presidente /Orientador)



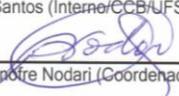
Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra (Interno/CCA/UFSC)



Prof.ª. Dr.ª. Luciana Magda de Oliveira (Externo/CAV/UDESC)



Prof.ª. Dr.ª. Marisa Santos (Interno/CCB/UFSC)



Prof. Dr. Rubens Opoffre Nodari (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2013

Aos meus pais Tadao e Dirce
À minha irmã Denise
Ao meu companheiro e amigo Leonardo
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela oportunidade e formação acadêmica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos meus pais Tadao e Dirce, pelo amor, carinho e apoio na minha vida acadêmica.

Ao meu amigo e companheiro Leonardo pelo apoio, incentivo, paciência e compreensão nos momentos difíceis.

À prof. Dr^a. Cileide M. M. Coelho pela orientação, ensinamentos profissionais e pessoais e estar sempre bem humorada e disposta a ajudar.

À prof. Dra. Luciana Magda de Oliveira pelo incentivo e primeiros conhecimentos e trabalhos na área de sementes.

À prof. Dr^a. Neusa Steiner pela realização das coletas das amostras e pelos ensinamentos sobre a araucária.

Aos professores Dr. Marcelo Maraschin, Dra. Jane Mara Block e Dra. Rosete Pescador pela colaboração intelectual e realização das análises bioquímicas.

Aos professores, Dr. Miguel Pedro Guerra, Dra. Luciana Magda de Oliveira, Dra. Marisa Santos e Dra. Ana Maria Viana pelas importantes contribuições para realização deste estudo e/ou pela participação na defesa do presente trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela possibilidade de aprendizado nas disciplinas realizadas.

Aos colegas e professores responsáveis dos laboratórios de Sementes, Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Fisiologia do Desenvolvimento e de Genética Vegetal, Óleos e Gorduras, Fitopatologia e ao Laboratório de Sementes da UFSC, pelo espaço e material disponibilizado.

Aos amigos e companheiros de laboratório Daniele Nerling, Julia Zappellini, Moisés Pollak Júnior, Monique dos Santos, Pâmela Martins Vieira e Vivian Almeida pela amizade, favores e contribuições.

Às amigas Cristhyane Garcia, Daniela de Conti, e Jenny Paola Corredor pela parceria nos trabalhos/congressos e ajuda na discussão dos resultados.

Aos laboratoristas Luiz (sementes), Luiz (morfogênese), Luiza e Camila pela ajuda com equipamentos, reagentes e técnicas laboratoriais.

À secretária Berna por ajudar nos documentos, solicitações e esclarecimentos.

A Justina Inês Anselmini por ceder às fotos da biologia reprodutiva da araucária

A todos os colegas do programa de Recursos Genéticos Vegetais pelo companheirismo nas disciplinas e colaboração para realização deste trabalho.

RESUMO

Para estabelecer as condições adequadas para a conservação de *Araucaria angustifolia*, uma espécie criticamente em perigo de extinção, há a necessidade de estudos sobre o comportamento das sementes durante a maturidade, para evitar coletas imaturas e/ou inviáveis e obter sementes com máxima viabilidade e vigor. O objetivo do trabalho foi analisar as alterações fisiológicas associadas ao período de maturidade das sementes e relaciona-las às alterações bioquímicas e a conservação pós-colheita. Pinhas de *A. angustifolia* foram coletadas no município de Curitiba – SC, em março, abril, maio, junho e julho de 2011 e 2012, classificando em estágio cotiledonar e I, II, III e IV conforme o mês de coleta. Avaliou-se a viabilidade, o vigor, os principais compostos de reservas e a conservação da qualidade fisiológica na pós-colheita. No ano de 2011, verificou-se que o grau de umidade decresceu do estágio I (56,26 %) até o estágio II (48,23 %), mantendo-se estáveis nos demais estádios. Maiores porcentagens de germinação (98%), índice de velocidade de germinação (0,88), primeira contagem (70%), condutividade elétrica (81,35 $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$) e comprimento da parte aérea (21,8 cm) e raiz (28,2) foram observados no estágio IV. Resultados semelhantes foram obtidos na coleta de 2012, com decréscimos no grau de umidade até o estágio II (49,13%) e valores superiores na germinação (95%), índice de velocidade de germinação (0,66), primeira contagem (79%), condutividade elétrica (81,2 $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$) e comprimento da parte aérea (21,39 cm) e raiz (28,30) no estágio IV. Também se observou acréscimos no teor de carboidratos (2,1 %, no embrião, e 1,7 %, no megagametófito) e amido (10 %, embrião, e 16,7%, no megagametófito) do estágio cotiledonar para o estágio IV. E decréscimos no teor proteico (11,78 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ e 5,51 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, no embrião e no megagametófito, respectivamente) e baixos teores de lipídios (2,1%, no megagametófito). O contínuo acúmulo de amido parece estar relacionado ao aumento na qualidade fisiológica no estágio IV. Observaram-se baixos teores de carboidratos e lipídios em todos os estádios que podem estar relacionados ao comportamento recalcitrante da espécie. Em relação ao teor proteico, observaram-se decréscimos de 28,1 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para 16,3 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ no embrião do estágio cotiledonar até o estágio IV. No estágio cotiledonar e I, após o armazenamento por 60 e 120 dias, observou-se \pm 89% de germinação. Por outro lado, nos estádios II e III observaram-se decréscimos em 28% e 20% na germinação, após o armazenamento por

120 dias. Concluiu-se que o máximo acúmulo de massa seca ocorre no estágio II, não coincidindo com a máxima qualidade fisiológica. As sementes apresentaram acúmulo de carboidratos e amido durante a maturidade, contribuindo para o aumento da viabilidade e do vigor. Os teores de proteínas e lipídios decresceram do estágio cotiledonar até o IV podendo ter desfavorecido a integridade das membranas celulares com o avanço da maturidade. A conservação da qualidade fisiológica na pós colheita foi mantida durante o armazenamento por 60 e 120 dias quando coletadas nos estádios cotiledonar e I.

Palavras chave: desenvolvimento, vigor, amido, proteínas, lipídios, carboidratos

ABSTRACT

To determine appropriate conditions for the conservation of *Araucaria angustifolia*, a critically endangered species, there is a need for research on the behavior of the seed during physiological maturity, to prevent immature or unviable collections and obtain seeds with maximum viability and vigor. This study was developed to analyze the physiological changes associated with the period of physiological maturity of seeds of *A. angustifolia* and relate them to biochemical changes and post harvest conservation. Cones *A. angustifolia* were collected in the Curitiba - SC, in March, April, May, June and July – 2011 and 2012, and classified in cotyledonary and mature I, II, III and IV stage according to the month of collection. This research evaluated viability, vigor, the reserve compounds from megagametophyte and embryo and post-harvest conservation. In 2011, it was found that the moisture content was decreasing from stage I (56.26%) until the maturity stage II (48.23%) remained stable in the other stages. Highest germination (98%), germination speed index (0.88), first count (70%), electrical conductivity (81.35 $\mu\text{S} / \text{cm} / \text{g}$) and shoot length (21.8 cm) and root (28.2) were observed in stage IV. At 2012 collection, were also observed decreases in moisture content until stage II (49.13%) and higher values in germination (95%), germination speed index (0.66), first count (79%), electrical conductivity (81.2 $\mu\text{S} / \text{cm} / \text{g}$) and shoot length (21.39 cm) and root (28.30) also were observed in stage IV.

There were observed increases in carbohydrate (2.1% in the embryo and 1.7% megagametophyte) and starch content (10% embryo and 16.7% megagametophyte) of cotyledonary stage for maturity stage IV and a decreases in protein content (11.78 mg g^{-1} and 5.51 mg g^{-1} in the embryo and megagametophyte, respectively) and lipid content (0.36% in megagametophyte). The continuous accumulation of starch seems to be related to the increased viability and vigor in stage IV. Low levels of carbohydrates and lipids were observed during all stages analyzed, which may be related to the decreased in the integrity of cell membranes during seed maturity. Regarding protein content observed decreases of 28.1 mg.g^{-1} to 16.3 mg.g^{-1} in the embryo - cotyledonary stage to stage IV. The post harvest conservation of viability and vigor of seeds collected in the cotyledon and mature I stage was kept during storage for 60 and 120 days with germination around 89%, but in the maturity stages II and III were observed decreases in germination 28%

and 20%, respectively. Thus, it was concluded that the maximum dry matter accumulation occurs at the maturity stage II, but does not coincide with the highest quality observed in stage IV. The seeds had an accumulation of soluble carbohydrates and starch at maturity that may be related to increased viability and vigor observed in mature IV stage. The levels of proteins and lipids decreased as the maturity. The physiological quality is conserved in post harvest during storage of 60 and 120 days when collected in cotyledonary and mature I stages.

Keywords: maturity, vigor, starch, proteins, lipids, carbohydrates

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Estrutura reprodutiva masculina (A) e feminina (B) de <i>Araucaria angustifolia</i>	25
Figura 1.2 – Ciclo de vida de <i>Araucaria angustifolia</i>	29

CAPÍTULO I

Figura 2. 1– Temperatura média e precipitação mensal no município de Curitiba – SC durante o período de polinização até a maturação das sementes de <i>Araucaria angustifolia</i> durante os anos de (A) 2011 e (B) 2012.....	51
Figura 2. 2 – Massa fresca e seca do embrião de <i>Araucaria angustifolia</i> nos estádios cotiledonar e I, II, III e IV coletas no ano de 2012. .	55
Figura 2. 3 – Estróbilo feminino (pinhas) de <i>Araucaria angustifolia</i> nos estádios de desenvolvimento cotiledonar (Cot) e (I), (II), (III), (IV).....	56
Figura 2. 4 – Grau de umidade (%) e massa seca (mg.g^{-1}) de sementes de <i>Araucaria angustifolia</i> , referente aos estágios de desenvolvimento cotiledonar (Cot) e I, II, III e IV nos anos de 2011 (A) e 2012 (B).	58
Figura 2. 5 – Massa de mil sementes (g) de <i>Araucaria angustifolia</i> nos estádios: cotiledonar e I, II, III e IV nos anos de 2011 e 2012.	60
Figura 2. 6 – Porcentagem de germinação de sementes de <i>Araucaria angustifolia</i> , coletadas nos estádios I, II, III e IV nos anos de (A) 2011 e (B) 2012.....	61
Figura 2. 7 – (A) Índice de velocidade de germinação (IVG), (B) primeira contagem (PC), (C) comprimento da raiz e (D) parte aérea (PA) obtidos nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de <i>Araucaria angustifolia</i>	63
Figura 2. 8 – Taxa média de solutos liberados durante a embebição, por 0 a 24 horas, em água destilada de embriões de <i>Araucaria angustifolia</i> , com base nas leituras da condutividade elétrica (CE) nos estádios cotiledonar e de desenvolvimento I, II, III e IV nos anos de 2011 (A) e 2012 (B); Condutividade elétrica ($\mu\text{S/cm/g}$) de sementes de <i>Araucaria angustifolia</i> nos estádios cotiledonar e desenvolvimento I, II, III e IV, após 12 horas de embebição em água destilada nos anos de 2011 (C) e 2012 (D).	65

Figura 2. 9 - Percentual de sementes viáveis de <i>Araucaria angustifolia</i> pelo teste de tetrazólio nos estádios cotiledonar e de desenvolvimento I, II, III e IV nos anos de 2011 e 2012.	67
--	----

CAPÍTULO II

Figura 3. 1 – Grau de umidade e massa seca no megagametófito e no embrião nos estádios cotiledonar e I, II, III e IV.....	79
Figura 3. 2 – Carboidratos solúveis totais (mg.g^{-1}) nos tecidos do embrião e megagametófito de <i>Araucaria angustifolia</i> nos estádios cotiledonar (Cot) e I, II, III e IV	80
Figura 3. 3 – Amido (mg.g^{-1}) nos tecidos do embrião e megagametófito de <i>Araucaria angustifolia</i> nos estádios cotiledonar (Cot) e I, II, III e IV, no ano de 2011.	82
Figura 3. 4 – Teor de proteínas solúveis totais (mg.g^{-1}) nos tecidos do embrião e megagametófito de <i>Araucaria angustifolia</i> nos estádios cotiledonar (Cot) e I, II, III e IV, no ano 2011.....	83
Figura 3. 5 – Teor de lipídios no megagametófito de <i>Araucaria angustifolia</i> nos estádios cotiledonar (Cot) e I, II, III e IV.	84

CAPÍTULO III

Figura 4. 1 – Grau de umidade das sementes nos estádios cotiledonar (Cot) e I, II e III recém colhidas e armazenadas por 60 e 120 dias em refrigerador (8 ± 2 °C).	95
Figura 4. 2 – Germinação (%) de sementes de <i>A. angustifolia</i> recém colhidas nos estádios de desenvolvimento submetidas ao armazenamento em refrigerador (8 °C) por 60 e 120 dias.	96
Figura 4. 3 – Viabilidade de sementes de <i>Araucaria angustifolia</i> pelo teste de tetrazólio no estágio cotiledonar e I, II e III submetida ao armazenamento em refrigerador por 0, 60 e 120 dias.	97
Figura 4. 4 – Condutividade elétrica de sementes de <i>Araucaria angustifolia</i> no estágio cotiledonar e I, II e III submetida ao armazenamento em refrigerador por 60 e 120 dias.	98
Figura 4. 5 – Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de <i>Araucaria angustifolia</i> no estágio cotiledonar e I, II e III submetida ao armazenamento em refrigerador.	99
Figura 4. 6 – Comprimento de raiz (A) e parte aérea (B) de plântulas de <i>Araucaria angustifolia</i> após 70 dias do início do teste de germinação no estágio cotiledonar e I, II e III submetida ao armazenamento em refrigerador por 60 e 120 dias.	99
Figura 4. 7 – Corte transversal de sementes no estágio cotiledonar de <i>A. angustifolia</i> após 60 dias do teste de germinação a 25 °C.	101

Figura 4. 8 – (A) Corte transversal de sementes e (B) massa fresca e seca dos embriões de *Araucaria angustifolia* no estágio cotiledonar recém colhida e após o armazenamento por 60 e 120 dias. 102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. 1 – Características de sementes de acordo com o grau de recalcitrância	32
Tabela 2. 2 – Data de coleta e meses após a polinização, nos anos de 2011 e 2012 em diferentes estádios de desenvolvimento.....	52
Tabela 2. 3 – Dimensão das sementes de <i>Araucaria angustifolia</i> nos diferentes estádios de desenvolvimento nos anos de 2011 e 2012.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA – Ácido Abscísico

BSA – Albumina de Soro Bovino

DAA – Dias após a antese

DAP – Dias após a polinização

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetraacético

FOM – Floresta Ombrófila Mista

IUCN – União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais

IVG – Índice de Velocidade de Germinação

LEA – “Late embryogenesis abundant”

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

RAS – Regras para Análise de Sementes

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E ANTECEDENTES	23
1.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
1.1.1	<i>Araucaria angustifolia</i>	24
1.1.2	Desenvolvimento e maturação de sementes.....	28
1.1.3	Recalcitrância em sementes.....	32
1.1.4	Alterações fisiológicas durante o desenvolvimento de sementes.....	33
1.1.5	Alterações bioquímicas durante o desenvolvimento de sementes.....	34
1.1.6	Conservação na pós-colheita.....	37
1.2	OBJETIVOS.....	38
1.2.1	Objetivo geral.....	38
1.2.2	Objetivos específicos.....	38
1.3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

CAPÍTULO I

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS DURANTE A MATURIDADE DE SEMENTES DE *Araucaria angustifolia*..... 49

2.1	INTRODUÇÃO.....	49
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.2.1	Coleta das amostras.....	50
2.2.1.1	Caracterização morfológica.....	52
2.2.2	Grau de umidade e massa seca.....	53
2.2.3	Testes de viabilidade.....	53
2.2.4	Testes de vigor.....	53
2.2.5	Análise estatística.....	54
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
2.4	CONCLUSÃO.....	68
2.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

CAPÍTULO II

CONTRIBUIÇÃO DE COMPONENTES BIOQUÍMICOS NA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE *Araucaria angustifolia*..... 73

3.1 INTRODUÇÃO	73
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	75
3.2.1 Coleta das amostras.....	75
3.2.2 Análises bioquímicas.....	76
3.2.3 Análise estatística.....	77
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
3.4 CONCLUSÃO.....	85
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

CAPÍTULO III

ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO E QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE <i>Araucaria angustifolia</i> EM PÓS-COLHEITA.....	91
--	----

4.1 INTRODUÇÃO.....	91
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	92
4.2.1 Coleta das amostras.....	92
4.2.2 Grau de umidade.....	93
4.2.3 Teste de viabilidade.....	93
4.2.4 Testes de vigor.....	93
4.2.5 Análise estatística.....	94
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	94
4.4 CONCLUSÃO.....	103
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	109
---	-----

1. INTRODUÇÃO E ANTECEDENTES

O bioma Mata Atlântica contém alta biodiversidade e endemismo de espécies, é considerado um dos quatro mais importantes *hotspots* para conservação da natureza no planeta (MYERS et al., 2000). Este bioma é constituído por diversos ecossistemas, dentre os quais a Floresta Ombrófila Mista (FOM) ou mata com araucárias, é uma das fitofisionomias mais ameaçadas (BRASIL, 2006).

A principal espécie da FOM é a *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze. É uma conífera nativa do Sul do Brasil que apresenta importância econômica e ecológica (GUERRA et al., 2008). Devido ao seu alto valor econômico, madeireiro, resinífero e alimentar, as populações naturais de araucária têm sido alvo de uma progressiva extinção (EIRA et al., 1994), levando à ampla redução dos estoques naturais dessa espécie. Sua intensa exploração, ao longo do século passado, associada à ausência de programas de melhoramento e de conservação, fez com que restassem apenas alguns remanescentes, estimados entre 2% a 4% da área original (GUERRA et al., 2002), sendo que no Estado de Santa Catarina estimam-se áreas de remanescentes entre 21,9% a 26,9% (VIBRANS et al., 2012). É considerada incluída na categoria criticamente em perigo de extinção (CR), segundo IUCN (The World Conservation Union) (FARJON, 2006) e na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2008).

Para estabelecer as condições adequadas para a conservação da espécie, há a necessidade de estudos sobre o comportamento das sementes durante seu desenvolvimento (CARVALHO et al., 2006). O conhecimento deste processo é de grande importância, pois é a forma de se conhecer o comportamento das espécies durante sua formação e produção, o que possibilita obter material genético de boa qualidade fisiológica, que é a base para os programas de melhoramento, silviculturais, conservação genética e recuperação de áreas degradadas (FIGLIOGLIA; KAGEYAMA, 1994).

Durante o desenvolvimento das sementes ocorrem alterações morfológicas nos frutos e nas sementes, na viabilidade e no vigor, no grau de umidade e na matéria seca e nos compostos de reserva. O conhecimento dessas alterações é fundamental para a determinação de procedimentos relativos à colheita, conservação e reprodução das espécies, sendo que para espécies recalcitrantes há uma carência de trabalhos sobre este assunto, incluindo a *A. angustifolia*.

As sementes recalcitrantes perdem sua viabilidade rapidamente, pois não reduzem seu metabolismo (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998). Se a colheita das sementes não for realizada no momento adequado, estas podem iniciar o processo de deterioração dificultando a conservação da qualidade fisiológica.

A definição de indicadores visuais e do momento em que as sementes apresentam a máxima qualidade fisiológica podem contribuir para melhor aproveitamento das sementes na produção de mudas dessa espécie. Além disso, para obtenção de plantas com maior vigor é fundamental o conhecimento dos mecanismos de acúmulo e mobilização de reservas (BUCKERIDGE et al., 2004), pois estas são responsáveis pelo fornecimento de nutrientes e energia necessários para plena manifestação das funções vitais das sementes (MARCOS FILHO, 2005).

A época de coleta das sementes também pode influenciar na conservação da qualidade fisiológica durante o armazenamento, pois se estas forem colhidas após a maturidade fisiológica apresentarão menor potencial de armazenamento, por já terem iniciado o processo de deterioração (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

O entendimento das alterações fisiológicas e bioquímicas durante a maturidade, assim como a contribuição das reservas na qualidade fisiológica de sementes de *Araucaria angustifolia*, podem contribuir significativamente para obter sementes de melhor qualidade e favorecer a produção e conservação de sementes dessa espécie.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 *Araucaria angustifolia*

O gênero *Araucaria*, pertencente à família das Araucariaceae, possui 23 espécies com ocorrência na Oceania, com apenas duas exceções na América do Sul: *Araucaria araucana* e *Araucaria angustifolia* (MATTOS, 2011). No Brasil, a única espécie encontrada é a *A. angustifolia*, conhecida como araucária, pinheiro do paraná, pinheiro brasileiro, pinho, pinho do Paraná e no exterior como kuri'y, no Paraguai e pino parana, na Argentina (SHIMIZU; OLIVEIRA, 1981; CARVALHO, 2002).

Originalmente, *A. angustifolia* ocupava cerca de 20 milhões de hectares (REITZ; KLEIN, 1966), distribuídos principalmente pelos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com manchas esparsas em São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (MATTOS, 2011).

As árvores dessa espécie possuem aspecto original e contrastante com as demais árvores do Sul do Brasil, com 10 a 35 m de altura e 50 a 120 cm de DAP, atingindo excepcionalmente 50 m de altura e 250 cm ou mais de DAP, com tronco reto, colunar e quase cilíndrico (CARVALHO, 2002). Sua madeira é de alta qualidade, utilizada para vigamentos, móveis, tabulados, caixas, instrumentos musicais, artigos de esportes, ferramentas e fabricação de compensados (GUERRA et al., 2002) e contém 58% de celulose, 29% de lignina e celulose de fibra longa, produzindo papel de excelente qualidade e consequentemente muito atraente para indústria de papel e celulose (CARVALHO, 2002; GUERRA et al., 2008). Outra importante utilização desta espécie é o consumo do pinhão que é muito apreciado na alimentação humana e pela fauna silvestre (CARVALHO, 2002).

A *A. angustifolia* é uma planta dióica, com árvores masculinas e femininas distintas, raramente monóica por traumas ou doenças (CARVALHO, 2002), apresentando estrutura reprodutiva masculina (androstóbilo, amentilho, mingote, charuto ou sabugo) em forma cilíndrica, com 10-15cm de comprimento localizada em ramos jovens, e estrutura reprodutiva feminina (ginostrobilo, estróbilo, pinha) com 10-20 cm de diâmetro quando maduras (Figura 1.1), em formato subarredondado, com 10-150 sementes (pinhões), localizada no ápice dos ramos (REITZ; KLEIN, 1966; MANTOVANI et al., 2004; ANSELMINI, 2005).



Fonte: Anselmini, 2005

Figura 1.1 – Estrutura reprodutiva masculina (A) e feminina (B) de *Araucaria angustifolia*

O ciclo reprodutivo da *A. angustifolia* varia de 20-24 meses (MANTOVANI et al., 2004) a 29-37 meses (ANSELMINI, 2005). O início do ciclo é caracterizado pelo aparecimento dos estróbilos femininos e masculinos, seguido pelo desenvolvimento e abertura destes, deixando o pólen livre para ser transportado pelo vento até o estróbilo feminino. Durante os meses de agosto a outubro ocorre a polinização, período em que as escamas permanecem abertas, propiciando a entrada de pólen. A fecundação do óvulo ocorre nos meses seguintes à polinização, no entanto, não foi determinado o período exato (Figura 1.2 - A) (CARVALHO, 2002; SOUSA; HATTEMER, 2003; MANTOVANI et al., 2004; ANSELMINI et al., 2006; GUERRA et al., 2008).

Após a fecundação e anteriormente ao início da formação de paredes celulares, ocorrem divisões nucleares e o número de núcleos livres varia de 32 a 64. Após a formação de paredes celulares, ocorre a alongação celular nos grupos de células, sendo que as células superiores formaram as células do suspensor; o grupo de células inferiores formará as células da capa, e as células centrais darão origem às células embriogênicas. Estas diferentes células constituirão o pró-embrião. Há a formação de mais de um embrião (poliembriõnia) nos estádios iniciais do desenvolvimento das sementes, porém apenas um embrião permanece na semente madura (GUERRA et al., 2008). O desenvolvimento do embrião dominante ocorre nos meses de dezembro a julho, seguindo pelos estádios de desenvolvimento: globular, pré-cotiledonar, cotiledonar e cotiledonar tardio, e por fim, o embrião encontra-se no estádio maduro (STEINER, 2005) (Figura 1.2).

Apesar do período de desenvolvimento do embrião ser de dezembro até junho (GUERRA et al., 2008), para Santa Catarina encontram-se sementes maduras a partir de abril (CARVALHO, 2002). Há relatos de variações no período de desenvolvimento dos estróbilos femininos, que podem ser causadas pelas condições climáticas do local de coleta ou pelo fato de que *A. angustifolia* é uma espécie nativa e não domesticada, podendo encontrar diferentes variedades botânicas (GUERRA et al., 2008).

Os primeiros relatos das variedades botânicas de *A. angustifolia* foram realizados por Reitz e Klein (1966), no qual relataram a presença de nove variedades, baseando-se principalmente nas diferenças na coloração e amadurecimento dos pinhões. Contudo Mattos (2011) descreveu apenas cinco variedades e uma forma, conforme suas características:

- *A. angustifolia* var. *angustifolia*: pinhões com coloração vermelha, vermelha-acastanhada e maturação das pinhas de fevereiro a julho.

- *A. angustifolia* forma *catharinensis*: planta rara, com pinhões com coloração vermelha e maturação em julho;

- *A. angustifolia* var. *indehiscens*: pinhões com coloração vermelha e base branca ou branco-amarelada, constituída pelo apêndice testáceo. A maturação desta variedade ocorre nos meses de novembro a janeiro e os pinhões, não se desprendem das pinhas quando maduros.

- *A. angustifolia* var. *caiova*: pinhões com coloração vermelho-escuro e base branca, sem apêndice testáceo, desprendem-se da pinha quando maduro. Maturação de julho a agosto.

- *A. angustifolia* var. *dependens*: pinheiro encontrado apenas em Mauá – RJ.

- *A. angustifolia* var. *vinacea*: plantas com desprendimento de placas de casca, de 1,0 a 1,5 mm de espessura, lisas e de coloração vinácea.

Após a maturação, os estróbilos femininos são compostos por sementes (pinhão), escamas não fertilizadas (pinhões chochos), escamas (brácteas) estéreis e um eixo central (MANTOVANI et al., 2004; MATTOS, 2011), apresentando de 10 a 25 cm de diâmetro, 0,365 g a 4.700 g de peso e número variável de sementes por pinha de 2 a 150 sementes/pinha (CARVALHO, 2002; ZECHINI et al., 2012).

As sementes de araucária são compostas por tegumento (testa), megagametófito e embrião. O megagametófito representa a maior porção em termos de massa fresca (71,2%), seguido pelo tegumento (27%) e do embrião (1,8%) (MANTOVANI et al., 2004).

As sementes de *A. angustifolia* possuem dimensões que variam de 1,7 a 8 cm no comprimento, de 1,0 a 2,5 cm, na largura e de 0,9 a 2,0 cm, na espessura (CARVALHO, 2002; ANSELMINI, 2005; KRUPPEK; RIBEIRO, 2010; MATTOS, 2011), e apresentam comportamento recalcitrante, ou seja, não toleram longos períodos de armazenamento e apresentam curta longevidade, com perda total em até um ano após a coleta (SHIMIZU; OLIVEIRA, 1981; EIRA et al., 1994).

A propagação de *A. angustifolia* é realizada via sementes (WENDLING; DELGADO, 2008). No entanto, a maturidade fisiológica das sementes é pouco conhecida, acredita-se que a melhor época para obtenção de pinhões para plantio seja de abril a junho, com exceção das

variedades *caiova* e *indehiscens* e a forma *catharinensis* (MATTOS, 2011).

Estudos sobre o desenvolvimento das sementes permitem conhecer o comportamento das espécies no tocante à sua produção, o que possibilita prever e estabelecer a época adequada de colheita, com a determinação de indicativos práticos e seguros, como mudanças na coloração, tamanho e massa, deiscência ou queda de frutos (GEMAQUE et al., 2002).

1.1.2 Desenvolvimento e maturação de sementes

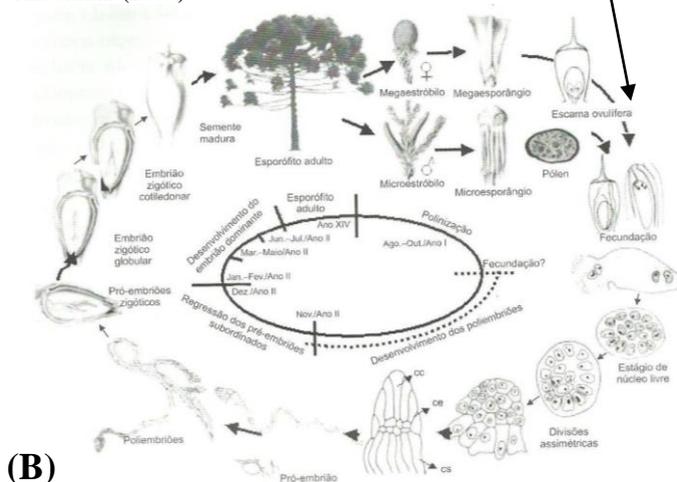
O desenvolvimento da semente, desde a fertilização do óvulo até a maturidade, é um processo constituído por uma série de alterações morfológicas, físicas, fisiológicas e bioquímicas (DELOUCHE, 1971), sendo que este processo é controlado geneticamente e envolve uma sequência ordenada de alterações de várias naturezas (MARCOS FILHO, 2005).

Três estádios gerais são reconhecidos neste processo: o primeiro estádio é a histodiferenciação que inicia com a fertilização e é caracterizado por divisões celulares, ocorrendo à formação do eixo embrionário, a síntese e o acúmulo de reservas. O segundo estádio é o de maturação, fase em que ocorre expansão das sementes devido à acumulação do material de reserva. O terceiro e último estádio é chamado de secagem de maturação e é caracterizado pela suspensão da deposição de reservas seguida de perda de água ou dessecação natural (BEWLEY; BLACK, 1994). Contudo, as sementes com comportamento recalcitrante não toleram ou toleram pouco a secagem de maturação e permanece sensível à dessecação durante o desenvolvimento e quando são liberadas da planta mãe (BERJAK; PAMMENTER, 2010). É o caso das sementes de *A. angustifolia* que são sensíveis à dessecação e perdem sua viabilidade rapidamente (EIRA et al., 1994) e outras espécies florestais como: *Aesculus chinensis* (YU et al., 2006), *Inga uruguensis* (BILIA et al., 1998), *Inga vera* (BONJOVANI; BARBEDO, 2008), *Hopea hainanensis* (LAN et al., 2012), *Quercus robur* (FINCH-SAVAGE, 1992a).

Durante o desenvolvimento das sementes podem ocorrer variações climáticas que retardem ou adiantem o processo de maturação (NERY, 2005). Contudo, a razão para as diferenças anuais, no tempo de maturação das sementes, não é conhecido, mas possivelmente esta relacionada com a quantidade de chuvas, encontrando-se sementes maduras mais rapidamente em anos de seca (LAN et al., 2012). Para *Hopea hainanensis*, as sementes amadureceram



Fonte: Adaptado de Mantovani et al.(2004) e Anselmini (2005)
Fotos: Anselmini (2005)



Fonte: Guerra et al., 2008

Figura1..2 – Ciclo de vida de *Araucaria angustifolia*

(A) No início há o aparecimento das estruturas reprodutivas masculinas e femininas em indivíduos adultos (± 15 anos), seguido pela liberação do pólen e de seu transporte pelo vento até o estróbilo feminino. O momento exato da fecundação ainda não foi determinado. (B) Nos estádios iniciais da embriogênese zigótica há presença de núcleos livres, seguido pela elongação celular e formação dos diferentes grupos de células que formaram as células da capa (cc), células do suspensor (cs) e células embriogênicas (ce) que constituirá o pró-embrião. Há formação de mais de um embrião (poliembrionia) nos estádios iniciais do desenvolvimento das sementes, porém apenas um embrião permanece na semente madura. Os estágios de desenvolvimento do embrião dominante são: globular, cotiledonar e maduro (GUERRA et al., 2008).

mais rápido no ano com menor precipitação (LAN et al., 2012). Resultados semelhantes foram obtidos em sementes de *Inga uruguensis*, em que a redução no período de maturação, entre os anos estudados, foi atribuído à quantidade moderada de chuvas registradas e ao prolongado período de insolação (FIGLIOLIA; KAGEYAMA, 1994). Já para sementes do gênero *Quercus*, na região de Midsouth, algumas diferenças no período de amadurecimento podem ocorrer em diferentes anos, porém a época de colheita não ultrapassa duas semanas (BONNER; VOZZO, 1987).

Além do conhecimento da interferência das variações climáticas, durante o processo de desenvolvimento, é importante estabelecer indicadores do momento adequado à colheita, a fim de obter o máximo potencial fisiológico, ou seja, quando as sementes atingem o período de maturidade fisiológica (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). A colheita realizada no momento inadequado, pode causar consideráveis perdas de qualidade de sementes, além de induzir perdas quantitativas (LIMA et al., 2012). Para sementes recalcitrantes, a colheita deve ser realizada na maturidade fisiológica, ou o mais próximo, pois sua elevada atividade metabólica, após a deiscência ou queda dos frutos, pode desencadear o processo germinativo ou favorecer a taxa de deterioração (FONSECA; FREIRE, 2003).

Os critérios propostos e mais aceitos para identificar a maturidade das sementes são: grau de umidade, conteúdo de matéria seca e aspectos morfológicos do fruto e/ou semente, bem como o número de dias após o início do florescimento ou dias após antese (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; MARCOS FILHO, 2005).

As alterações na morfologia dos frutos/semente, como a mudança na coloração, é um dos critérios mais fáceis de visualizar a campo e não requer equipamentos de laboratório para indicar a maturidade das sementes. Para colher sementes maduras de *A. angustifolia* devem-se observar as seguintes características: se as pinhas apresentam manchas de cor marrom, se há “falhas” ou pinhões no chão e se algumas partes das pinhas se debulham (MATTOS, 2011). Enquanto para outras espécies como para a maioria do gênero *Quercus*, a mudança de coloração verde para marrom escuro/preto do pericarpo das sementes é um indicativo para se realizar a colheita (BONNER; VOZZO, 1987). Para sementes de *Myrica esculenta*, a mudança de coloração verde para vermelho escuro é considerado um bom indicador de maturação (SHAH, et al., 2010) e para o gênero *Eugenia*, a coloração que indica a maturidade são: vermelha para *Eugenia uniflora* (ÁVILA et al., 2009),

verde/amarelo e amarelo/laranja para *Eugenia pyriformis* e vermelho claro para *Eugenia involucrata* (ORO et al., 2012).

No processo de desenvolvimento da semente após a formação do embrião e tecido de reserva, as sementes aumentam de tamanho devido principalmente à expansão das células e deposição de reservas, ocorrendo a substituição do conteúdo de água pela matéria seca (DE CASTRO et al., 2004), atingindo o máximo de desenvolvimento num curto período de tempo, antes mesmo de completar o processo de desenvolvimento (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Em sementes de *Prunus cerasoides* foi observado um aumento no tamanho, no comprimento e na largura das sementes conforme o avanço da maturação (TEWARI et al., 2011) e em sementes de *Euterpe edulis*, o diâmetro dos frutos atingiu o ponto máximo quando eles estavam maduros (LIN, 1988). Já em sementes de *Eugenia uniflora*, foi observado uma tendência na diminuição do tamanho das sementes nas últimas coletas realizadas (AVILA et al., 2009). Esse comportamento também foi observado em *Bixa orellana* (MENDES et al., 2006).

Além do tamanho das sementes, outros parâmetros são utilizados como indicadores de maturação, como o grau de umidade e a massa seca. Em sementes de *Podocarpus lambertii* que também possuem comportamento recalcitrante, o grau de umidade da semente pôde ser considerado o melhor parâmetro para determinar a maturidade fisiológica, quando esta atinge índice mais baixo (32,0%) e índice mais elevado de peso de matéria seca (17,68 g/100 sementes) (RAGAGNIN et al., 1994). Já em sementes de *Ocotea odorifera*, a colheita deve ser feita quando estas apresentarem grau de umidade em torno de 57% (HIRANO; POSSAMAI, 2008).

Em *Prunus cerasoides*, o grau de umidade das sementes entre 29,8% e 34,13%, o comprimento e a largura das sementes são indicadores confiáveis de maturidade da semente (TEWARI et al., 2011). Avila et al. (2009) observaram que a maturação fisiológica das sementes *Eugenia uniflora* foi alcançada quando a comprimento, diâmetro e massa de frutos e sementes atingiram seus valores máximos e o grau de umidade e massa seca das sementes tenderam a estabilização.

Em *A. angustifolia*, não há relatos do tamanho e do grau de umidade das sementes para obter o máximo potencial fisiológico. Sabe-se que a coleta deve ser realizada logo após a queda das mesmas ao solo, e o plantio logo que colhidas (LORENZI, 1992).

Para definir os indicadores de maturidade como grau de umidade, massa seca e aspectos morfológicos dos frutos/sementes deve-se avaliar as alterações fisiológicas das sementes, ou seja, a definição destes

indicadores é definida com base na época em que as sementes apresentam máximo potencial fisiológico avaliado pelos testes de viabilidade e vigor.

1.1.3 Recalcitrância em sementes

No processo de desenvolvimento de sementes, dois tipos de comportamento podem ser observados: quando as sementes adquirem tolerância à dessecação e podem ser armazenadas no estado seco por longos períodos, conhecidas como ortodoxa e as sementes que sofrem pouco ou não sofrem secagem e são sensíveis a dessecação durante o desenvolvimento e após a deiscência, conhecidas como recalcitrantes (BERJAK; PAMMENTER, 2004).

Nas sementes com comportamento recalcitrante foram observadas diferenças entre a sensibilidade a dessecação. Farrant et al. (1988), admitindo esta variação, propuseram a separação das sementes recalcitrantes nas categorias altamente recalcitrantes (pequena tolerância à dessecação), moderadamente recalcitrantes (moderada tolerância à dessecação) e minimamente recalcitrantes (elevada tolerância à perda de água) – (Tabela 1). O enquadramento da espécie em uma destas categorias deve-se a tolerância a perda de água, velocidade de germinação, tolerância a baixas temperaturas e à sua região de origem.

Sementes de *A. angustifolia* enquadram-se no tipo mínima de recalcitrância, assim como sementes do gênero *Quercus*.

Tabela 1. 1 – Características de sementes de acordo com o grau de recalcitrância

	Tipos de recalcitrância		
	Mínima	Moderada	Alta
Maior tolerância à perda de água	Tolerância moderada à desidratação	Pouco tolerante à dessecação	
Germinação lenta, em ausência de quantidade adicional de água	Velocidade média de germinação em ausência de água adicional	Germinação rápida em ausência de água adicional	
Maior tolerância a baixas temperaturas	Maioria das espécies é sensível a baixas temperaturas	Sensível a baixas temperaturas	
Distribuição subtropical/temperada	Distribuição tropical	Florestas tropicais e terras úmidas	

Fonte: Farrant et al., 1988

1.1.4 Alterações fisiológicas durante o desenvolvimento de sementes

As alterações fisiológicas que ocorrem durante o desenvolvimento das sementes são fundamentais para a determinação de procedimentos relativos à colheita, à conservação e à reprodução da espécie, além de serem ferramentas para se entender a dinâmica das florestas, sua biologia e ecologia para no futuro possibilitar o manejo e a conservação de populações naturais (AGUIAR et al., 1993).

Teoricamente, a porcentagem de germinação de sementes é crescente durante o desenvolvimento, atingindo um máximo próximo ao momento da paralisação do fluxo de matéria seca da planta para a semente (MARCOS FILHO, 2005).

Em sementes *Hopea hainanensis*, a maior taxa de germinação (98%) foi observada na última coleta realizada aos 173 dias após a antese (DAA) coincidindo com a época de maiores massa fresca e seca (LAN et al., 2012). Assim como, em sementes de *Hevea spp*, os máximos valores de germinação foram próximos aos valores mais altos de matéria seca e menores de umidade (BARRUETO et al., 1986). Já em sementes de *Eugenia uniflora*, a maior porcentagem de germinação (63%) também coincidiu com maior incremento de massa seca aos 63 DAA, porém não ocorreu no final do período de frutificação (77 DAA) (AVILA et al., 2009). Apesar de ocorrer maiores acúmulos de massa seca nos últimos estádios, para algumas espécies recomendam-se a colheita do fruto verde, como *Ocotea puberula*, *Ocotea odorifera* e a *Ocotea porosa* para evitar ataque de insetos (HIRANO; POSSAMAI, 2008).

A capacidade de germinação não está necessariamente associada à formação de plântulas vigorosas, mas, geralmente, as modificações do vigor das sementes ocorrem paralelamente à evolução da transferência de matéria seca da planta para as sementes (MARCOS FILHO, 2005). Assim, uma semente atingiria seu máximo vigor quando apresentasse a máxima matéria seca, podendo ocorrer defasagens, em função da espécie e das condições ambientais (ALVES, 2003; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

O vigor das sementes é avaliado por testes como: condutividade elétrica e características das plântulas, como primeira contagem, velocidade de germinação e comprimento raiz/parte aérea.

Um teste operacional, que avalia as sementes durante o desenvolvimento, é o teste de condutividade elétrica (PHARTYAL et al., 2006). As sementes menos vigorosas apresentam menor velocidade de restabelecimento da integridade das membranas celulares durante a

embebição e, em consequência, liberam maiores quantidade de solutos para o exterior (MARCOS FILHO, 2005).

Em sementes de *Inga vera* subsp. *affinis*, durante a maturação das sementes, observaram-se maiores valores de condutividade elétrica (34 $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$) no último estágio de maturação, indicando sementes menos vigorosas nas coletas tardias (BONJOVANI; BARBEDO, 2008). Similarmente, ocorrendo durante a dessecação de sementes recalcitrantes de *Aesculus chinensis*, com aumento nos valores de condutividade elétrica com o decréscimo no grau de umidade (YU et al., 2006).

Por outro lado, trabalhos que avaliaram a viabilidade e o vigor, com base nas características das plântulas, foram observados maiores valores de porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) nos últimos estágios de maturação, como em sementes de *Euterpe edulis* (LIN, 1988), *Miconia cinnamomifolia* (LOPES; SOARES, 2006) e *Eugenia pyriformis* e *E. involucrata* (SANTANA, 2007).

Os principais estudos referentes à maturação de sementes estão relacionados ao monitoramento das modificações fisiológicas que acontecem durante o processo, especialmente o conteúdo de massa seca, germinação e vigor (VIDIGAL et al., 2009). Contudo, para obtenção de plantas com maior vigor é fundamental o conhecimento dos mecanismos de acúmulo e mobilização de reservas (BUCKERIDGE et al., 2004). Segundo Carvalho e Nakagawa (2000), quanto maior o teor de reservas nas sementes, maior será o vigor das plântulas originadas.

1.1.5 Alterações bioquímicas durante o desenvolvimento de sementes

As reservas podem funcionar como fonte de energia, para manter processos metabólicos em funcionamento e/ou como fonte de matéria, para a produção de tecidos vegetais que irão constituir a plântula (BUCKERIDGE et al., 2004).

As substâncias armazenadas em grande quantidade constituem os carboidratos, os lipídeos e as proteínas (MARCOS FILHO, 2005), sendo armazenadas no embrião ou nos tecidos extra-embriônicos, como o megagametófito nas gimnospermas ou em ambos, porém em proporções diferentes (BEWLEY; BLACK, 1994). É o caso de sementes de *Araucaria angustifolia*, em que as principais reservas são armazenadas no embrião e no megagametófito (PANZA et al., 2002), encontrando principalmente proteínas, amido e lípidios (TOMPSETT, 1984; FARRANT et al., 1989; ROGGE-RENNER et al., 2012).

Os carboidratos são encontrados na forma solúvel (oligossacarídeos da série rafínosica), insolúvel (amido) e aqueles depositados nas paredes celulares espessadas de cotilédones e endosperma (CACCERE, 2010), servindo como fonte de energia e carbono para a germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas (BUCKERIDGE et al., 2004).

Os carboidratos de reserva solúveis e de parede celular atuam nos mecanismos de embebição de água e na proteção do embrião contra o dessecamento e o ataque de patógenos (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998). Em sementes *Aesculus chinensis*, o teor de açúcar solúvel acumulou-se lentamente durante a dessecação (YU et al., 2006). De acordo com Pritchard et al. (1995), sementes recalcitrantes possuem baixos valores de carboidratos solúveis e podem estar relacionados à intolerância das sementes à dessecação.

Em um estudo comparativo com espécies ortodoxas e recalcitrantes, sementes de *Eugenia uniflora* e *Inga vera*, duas espécies recalcitrantes possuíam 7% e 6% de açúcares solúveis, respectivamente, teores mais baixos do que sementes ortodoxas (MELLO et al., 2010). Em sementes maduras de *A. angustifolia*, baixos teores de carboidratos também foram observados – 2,4% (CORDENUNSI et al, 2004), sendo que no megagametófito houve em torno de 3,5% e no embrião aproximadamente 9,0 % (STEADMAN et al., 1996).

O amido é o carboidrato mais comumente encontrado em sementes (BEWLEY; BLACK, 1994) e a principal fonte de carbono para crescimento das plantas de *A. angustifolia* (PANZA et al., 2002). O isolamento deste composto, para esta espécie, é simples e de alto rendimento tornando-se atraente para produção em escala comercial (BELLO-PÉREZ et al., 2006).

Nos estádios iniciais do desenvolvimento dos embriões zigóticos de *A. angustifolia* foi encontrado menor conteúdo de amido do que nos estádios maduros (STEINER, 2005), podendo ser observado grãos de amido dentro dos amiloplastos (ROGGE-RENNER et al., 2012) e em grande quantidade no megagametófito (PANZA et al., 2002). As sementes maduras são consideradas ricas em amido, podendo apresentar de 36,28% a 86,26% (RAMOS; SOUZA, 1991; PIRIZ CARRILLO, 2003; CORDENUNSI et al., 2004; CORRÊA; HELM, 2009; BELLO-PÉREZ et al., 2006; GARCIA, 2012).

Durante o desenvolvimento de outras espécies, como em sementes de *Inga vera* observou-se um aumento no teor de amido durante os estádios analisados, com maior acúmulo no estádio IV, em torno de 350 mg.g⁻¹ (CACCERE, 2010), ou em sementes de *Hevea*

brasiliensis onde houve aumento gradativo do teor de amido, no embrião e no tecido de reserva, com o desenvolvimento das sementes (BONOME et al., 2011).

Além dos açúcares solúveis, os lipídios armazenados nas sementes podem ter importante papel na proteção das membranas das células embrionárias contra as lesões durante a desidratação das sementes (MELLO et al., 2010) e também podem ter a função de reserva e estrutural (MARCOS FILHO, 2005). Em *Eugenia uniflora* e *Inga vera*, espécies consideradas intolerantes à dessecação observaram-se baixos teores de lipídios (0,84 % e 0,27%, respectivamente), sugerindo que este composto pode estar envolvido no mecanismo de tolerância à dessecação (MELLO et al., 2010).

Em sementes do gênero *Araucaria*, também foram observados baixos teores deste composto. Em *A. angustifolia*, os teores de lipídios variaram de 0,52 % a 7,38 % (RAMOS; SOUZA, 1991; CORDENUNSI et al., 2004; CONFORTI; LUPANO, 2007; CAPELLA et al., 2009; ABE et al., 2010) e em sementes de *A. araucana* apresentaram 1,1% (HENRÍQUEZ et al., 2008).

Durante o desenvolvimento de sementes de *Durio zibethinus* observaram-se baixos teores de lipídios, sendo que este composto compreende apenas uma proporção muito pequena da semente (BROWN et al., 2001).

As proteínas de reserva têm sido consideradas marcadores do processo de desenvolvimento em embriões zigóticos de gimnospermas e angiospermas (DUNSTAN et al., 1998), além de fornecer os aminoácidos, cujos usos são essenciais aos processos de germinação e desenvolvimento da plântula a partir do crescimento embrionário (SHEWRY et al., 1995; BUCKERIDGE et al., 2004). Este composto é sintetizado em grandes quantidades em tecidos específicos durante o desenvolvimento de sementes de *A. angustifolia*, com maiores teores de proteínas solúveis nos tecidos do eixo embrionário, cotilédones e por último no megagametófito (ASTARITA et al., 2003; SILVEIRA et al., 2008).

Nos estádios iniciais do desenvolvimento dos embriões de *A. angustifolia*, observaram-se menores quantidades de proteínas do que nos estádios cotiledonar e maduro (ASTARITA et al., 2003; STEINER, 2005; DOS SANTOS et al., 2006; SILVEIRA et al., 2008; BALBUENA et al., 2009).

Em outras espécies, como em sementes de *Durio zibethinus* observaram-se um incremento nos teores de proteínas até 105 DAA, seguido de decréscimos nos teores aos 110 DAA (BROWN et al., 2001).

Este decréscimo no final do processo de maturação também foi observado em sementes de *Podocarpus henkelii* (DODD et al., 1989).

Além do conhecimento das alterações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante a maturidade das sementes, é importante estudar a conservação da viabilidade e do vigor na pós-colheita para dar suporte a conservação *ex situ* desta espécie.

1.1.6 Conservação na pós-colheita

A conservação na pós-colheita de sementes pode ser influenciada pela época de coleta, pois se forem colhidas após o ponto de maturidade fisiológica apresentam menor potencial de armazenamento, por já terem iniciado o processo de deterioração (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

A determinação da tolerância à dessecação, capacidade de germinação e de armazenamento das sementes coletadas, em diferentes estádios de desenvolvimento, podem ajudar na preservação e conservação deste tipo de germoplasma (LAN et al., 2007).

No armazenamento de sementes recalcitrantes é evidente a importância do conhecimento do estágio de desenvolvimento, porque o acúmulo de massa seca é contínuo com o tempo de maturação e os processos de desenvolvimento e germinação são praticamente contínuos (SCHMIDT, 2000). Se a germinação não ocorre, inicia rapidamente o processo de deterioração, tornando a coleta tardia inadequada (BERJAK; PAMMENTER, 1996).

A conservação na pós-colheita de sementes de *A. angustifolia* é dificultada pela sua natureza recalcitrante (TOMPSETT, 1984), com rápida perda de viabilidade com a redução do grau de umidade (EIRA et al., 1994; FOWLER et al., 1998). Mesmo em curto prazo, para a conservação das sementes desta espécie, é indicado armazená-las logo após a colheita, com o máximo grau de umidade possível e evitar a perda de água durante esse período (EIRA et al., 1994).

O armazenamento de sementes com umidade elevada protege as que apresentam comportamento recalcitrante, permitindo a atuação de mecanismos de reparo, por outro lado, este alto grau de umidade pode proporcionar um risco de deterioração às sementes, pois permite alta taxa metabólica, consumindo importantes reservas, e favorecendo a proliferação de patógenos (SANTANA, 2007).

Geralmente, sementes imaturas tendem a serem mais susceptíveis a danos de processamento e a infecção durante o armazenamento (SCHMIDT, 2000), além de não serem capazes de completar a acumulação de reservas, desenvolverem todas as enzimas necessárias

e/ou reguladores de crescimento e completarem o seu desenvolvimento morfológico e organização celular (BONNER, 2008).

Para sementes de *Inga uruguensis*, a identificação do estágio de maturidade fisiológica das sementes foi um fator determinante para a conservação da sua viabilidade durante o armazenamento, com maior viabilidade das sementes na coleta intermediária (mid-harvest) (BARBEDO; CICERO, 2000). Em outro estudo, com a mesma espécie, porém utilizando outra classificação dos estádios de desenvolvimento, as sementes coletadas nos estádios IV e armazenadas a 8 °C por 30 dias, obtiveram maiores porcentagens de plântulas normais com 60 % (BONJOVANI; BARBEDO, 2008). Resultados semelhantes foram obtidos para *Eugenia involucrata*, em que sementes maduras apresentaram maior conservação da viabilidade durante o armazenamento (SANTANA, 2007).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi identificar e determinar as alterações fisiológicas e bioquímicas durante a maturidade de sementes de *Araucaria angustifolia* e a conservação da viabilidade e vigor na pós colheita.

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar se o momento de máximo acúmulo de massa seca nas sementes coincide com a máxima qualidade fisiológica (vigor e viabilidade), através de avaliações fisiológicas e morfológicas durante os estádios de desenvolvimento.
- Determinar o teor de amido, açúcares solúveis totais, proteínas e lipídios no megagametófito e no embrião durante a maturidade das sementes.
- Indicar a contribuição e a dependência entre a qualidade fisiológica de sementes de araucária com as reservas presentes no megagametófito e no embrião.
- Avaliar a conservação da viabilidade e do vigor na pós-colheita das sementes coletadas nos diferentes estádios de desenvolvimento.

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Comparison of phenol content and antioxidant capacity of nuts. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 30, p. 254-259, 2010
- AGUIAR, I.B., PIÑA-RODRIGUES, F.C.M., FIGLIOLIA, M.B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: Associação brasileira de tecnologia de Sementes, 1993. 350p.
- ALVES, E. U. **Maturação de sementes de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.)**. 2003. 89 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Curso de pós graduação em agronomia – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.
- ANSELMINI, J. I. **Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, na Região de Curitiba – PR**. 2005. 52 f. Dissertação (Mestrado em Produção vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- ASTARITA, L.V.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W. Free amino acids, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**, v. 47, p. 53–59, 2003.
- ÁVILA, A.L.; et al. Maturação fisiológica e coleta de sementes de *Eugenia uniflora* L. (Pitanga), Santa Maria, RS. **Ciência Florestal**, v.19, n.1, p.61-68, 2009
- BALBUENA, T. S. **Proteômica do desenvolvimento da semente de *Araucaria angustifolia***. Tese (Doutorado em Ciências/Botânica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- BARBEDO, C.J.; CICERO, S.M. Effects of initial quality, low temperature and ABA on the storage of seeds of *Inga uruguensis*, a tropical species with recalcitrant seeds. **Seed Science and Technology** v. 28, p. 793-808, 2000.
- BARBEDO, C.J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botanica Brasilica** v. 12, p. 145-164, 1998.

BARRUETO, L.P.; PEREIRA, I.P. & NEVES, M.A. Influência da maturação fisiológica e do período entre a coleta e o início do armazenamento, sobre a viabilidade da semente de seringueira (*Hevea* spp). **Turrialba**, San José. v.36, n.1, p.65-75, 1986

BELLO-PÉREZ, L. A.; et al. Isolation and Characterization of Starch from seeds of *Araucaria brasiliensis*: A Novel Starch for Application in Food Industry. **Starch-Starke**. v. 58, p. 283-291, 2006.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. Recalcitrant (desiccation-sensitive) seeds. In: **Innovations in Tropical Tree Seed Technology**. Proceedings of the IUFRO Symposium of the Project Group P.2.04.00, 'Seed Problems'. Arusha, Tanzania 1995. pp. 14-29.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. Chapter 4: Orthodox and recalcitrant seeds. In: VOZZO, J.A. **Tropical tree seed manual**. Washington: USDA Forest Science, 2003. p.137-147.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2 ed. Plenum Press, New York. 1994. 445p.

BILIA, D.A.C.; MARCOS FILHO, J.; NOVENBRE, A.D.C.L. Conservação da qualidade fisiológica de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. **Revista Brasileira de Sementes** v. 20, p. 48-54, 1998.

BONJOVANI, M. R.; BARBEDO, C. J. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. toleram temperatura sub-zero. **Revista brasileira Botânica**. v.31, n.2, p. 345-356, 2008

BONNER, F. T. Storage of seeds. In: BONNER, F. T.; KARRFALT, R. P. NISLEY, R. G. (Eds.) **The woody Plant Seed Manual**. USDA Forest Service, Agricultural Handbook 727, p. 85 – 95, 2008.

BONNER, F. T.; VOZZO, J. A. **Seed Biology and Technology of *Quercus***. New Orleans, La. : U.S. Dept of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, 1987.

BRASIL. Lei 11.428 de 22 de Dezembro de 2006. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/lei/11428.htm>. Acesso em: 18 dezembro 2012.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 6 de 26 de setembro de 2008**, 2008. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2012.

BROWN, M. J.; HOR, Y. L.; GREENWOOD, J. S. Reserve accumulation and protein storage vacuole formation during development of recalcitrant seeds of *Durio zibethinus* L. **Seed Science Research** v. 11, p. 293–303, 2001.

BUCKERIDGE, M. S. et al. Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 163-185.

CACCERE, R. **Caracterização bioquímica e histo-estrutural de embriões de *Inga vera* Willd. Subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. durante a maturação e após a secagem**. 2007. 92p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010

CAPELLA, A. C. V.; PENTEADO, P. T. P. S.; BALBI, M. E. Semente de *Araucaria angustifolia*: aspectos morfológicos e composição química da farinha. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 135-142, 2009.

CARVALHO, L. R.; SILVA, E. A. A. da.; DAVIDE, A. C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 28, p. 15-25, 2006.

CARVALHO, N. M. de; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p

CARVALHO, P.E.R. **Pinheiro-do-paraná**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 2002. 17p. (Circular técnica , 60)

CONDÉ, A. dos R.; GARCIA, J. Efeito da época de colheita sobre o potencial de armazenagem das sementes do capim-braquiária, em

condições ambientais. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 7, n. 2, p. 85-92, 1985.

CONFORTI, P. A.; LUPANO, C. E. Starch characterization of *Araucaria angustifolia* and *Araucaria araucana* seeds. **Starch-Starke**, v.59, p.284-289. 2007.

CORDENUNSI, B. R.; et al. Chemical Composition and Glycemic Index of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 3412-3416, 2004

CORRÊA, M. F.; HELM, C. V. Caracterização da composição nutricional do pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze). In: VII EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS. **Anais...** Colombo: Embrapa Florestas, 2009

DE CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Desenvolvimento de semente e conteúdo de água. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação do básico ao aplicado**. São Paulo, 2004.

DELOUCHE, J. C. Seed maturation. In: **Handbook of seed technology**. Mississippi State University, State College, Mississippi. P. 17-21, 1971.
DODD, M.C.; VAN STADEN, J.; SMITH, M.T. Seed development in *Podocarpus henkelii*: an ultrastructural and biochemical study. **Annals of Botany**. v. 64, p. 297-310, 1989.

DOS SANTOS, A. L. W.; et al. Protein expression during seed during in *Araucaria angustifolia*: transient accumulation of class IV chitinases and arabinogalactan proteins. **Physiologia Plantarum**, v.127, p.138-148, 2006.

DUNSTAN, D.I. et al. Events following ABA treatment of spruce somatic embryos. **In Vitro Cellular & Development, Biology-Plant**, v. 34; p. 159-168, 1998.

EIRA, M. T. S, et al. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze - Araucariaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, n. 1, p.71-75, 1994.

FARJON, A. 2006. *Araucaria angustifolia*. In: IUCN 2012. **IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/32975/0>> Acesso: 18 de dez de 2012.

FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Recalcitrance current assessment. *Seed Science and Technology* v. 16, p.155-166, 1988.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Germination-associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds – a study on three unrelated species. **Planta**, v. 178, n. 2, p. 189-198, 1989.
FINCH-SAVAGE, W. E., Embryo water status and survival in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: Evidence for a critical moisture content. **Journal of Experimental Botany**. v.43, p. 663-669, 1992a

FIGLIOLIA, M. B.; KAGEYAMA, P. Y. Maturação de sementes de *Inga uruguensis* Hook et Arn em floresta ripária do rio Moji Guaçu, Município de Moji Guaçu, SP. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 6, p. 13-52, 1994.

FONSECA, S. C. L.; FREIRE, H. B. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. **Bragantia**, v. 62, n.2, p. 297-303, 2003

FOWLER, J. A. P.; BIANCHETTI, A.; ZANON, A. **Conservação de sementes de pinheiro-do-paraná sob diferentes condições de ambientes e embalagens**. Colombo: Embrapa-CNPQ, 1998. 4 p. (Comunicado Técnico, 34).

GARCIA, C. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze sob condições controladas de armazenamento**. 2012. 117 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012

GEMAQUE, R.C.R.; DAVIDE, A.C.; FARIA, J.M.C. Indicadores de maturidade fisiológica de sementes de ipê roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.). **Cerne**, Lavras, v.8, n.2, p. 84-091, 2002.

GUERRA, M. P.; et al Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. **Sustentável Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Senac, 2002. p. 85-102.

GUERRA, M. P.; et al. Evolução, ontogênese e diversidade genética em *Araucaria angustifolia*. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. **Origem e Evolução de Plantas Cultivadas**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 149-184.

HENRÍQUEZ, C.; et al. Characterization of pinõn seed (*Araucaria araucana* (Mol) K. Koch) and the isolated starch from the seed. **Food Chemistry**. v. 107, p; 592-601, 2008.

HIRANO, E.; POSSAMAI, E. Estádio de maturação do fruto e germinação de sementes de três espécies de Lauraceae. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 219-223, 2008

KRUPEK, R.; RIBEIRO, V. Biometria e germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze provenientes de um remanescente Florestal do Município de Turvo (PR). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 12, n. 1, p. 73-89. 2010

LAN, Q. Y.; et al. Changes in germinability and desiccation-sensitivity of recalcitrant *Hopea hainanensis* Merr. et Chun seeds during development. **Seed Science and Technology**, v. 35, p. 21-31, 2006.

LAN, Q. Y.; et al. Development and storage of recalcitrant seeds of *Hopea hainanensis*. **Seed Science and Technology**, v.40,p. 200-208, 2012.

LIMA, C. R.; et al. Physiological maturity of fruits and seeds of *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, nº 2 p. 231 - 240, 2012.

LIN, S. S. Efeito do tamanho e maturidade sobre a viabilidade, germinação e vigor do fruto de palmitreiro. **Revista brasileira de sementes**. V. 8, n. 1, p. 57-66, 1988.

LOPES, J. C.; SOARES, A. S.. Estudo da maturação de sementes de carvalho vermelho (*Miconia cinnamomifolia* (Dc.) Naud.). **Ciência e agrotecnologia**, v.30, n.4, p. 623-628, 2006.

LORENZI. H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. v. 1. 368 p.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p

MATTOS, J. R. de. **O Pinheiro Brasileiro**. Florianópolis: Ufsc, 2011. 698 p.

MANTOVANI, A.; et al. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista brasileira Botânica**. v.27, n.4, pp. 787-796. 2004

MELLO, J. I. de O.; et al. Reserve carbohydrates and lipids from the seeds of four tropical tree species with different sensitivity to desiccation. **Brazilian archives of biology and technology**. Curitiba, v. 53, n. 4, 2010

MENDES, A. M. S.; FIGUEIREDO, A. F.; SILVA, J. F. Crescimento e maturação dos frutos e sementes de urucum. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 133-141, 2006.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853 - 858, February 2000.

NERY, M. **Aspectos morfofisiológicos do desenvolvimento de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich**. 2005. 95p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Curso de Pós graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

ORO, P.; et al. Maturação fisiológica de sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess e *Eugenia involucrata* DC. **Biotemas**, v. 25, n. 3, p. 11-18, set. 2012

PANZA, V. et al. Storage reserves and cellular water in mature seeds of *Araucaria angustifolia*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 140, p. 273–281, 2002.

PHARTYAL, S.; et al. Ex situ conservation os rare and valuable Forest tree species through seed-gene bank. **Current Science**. v. 83, n.11, p. 1351-1357, 2001

PIRIZ CARRILLO, V. et al. Refrigerated storage of seeds of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze over a period of 24 months. **Seed Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 411-421, 2003.

- PRITCHARD, H. W.; et al., A comparative study of seed viability in Inga species: desiccation tolerance in relation to the physical characteristics and chemical composition of the embryo. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 23, p. 85- 100. 1995
- RAGAGNIN, L.I.M.; COSTA, E.C.; HOPPE, J.M. Maturação fisiológica de sementes de *Podocarpus lambertii* Klotzsch. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 4, n.1, p. 23-41, 1994
- RAMOS, A.; SOUZA, G. B. Utilização das reservas alimentícias de sementes de araucária durante o armazenamento. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 22/23, p. 21-27, 1991
- REITZ, R.; KLEIN, R.M.. Araucariáceas. **Flora Ilustrada Catarinense**. 1966, 62 p.
- ROGGE-RENNER, G.D. et al. Structural and component characterization of meristem cells in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze zygotic embryo. **Protoplasma**, Epub, 27 set 2012.
- SANTANA, P. J. A. **Maturação, secagem e armazenamento de sementes de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade vegetal e meio ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo, 2007
- SCHMIDT, L. **Guide to Handling Tropical and Subtropical Forest Seed**, Danida Forest Seed Centre. 511 p.
- SHAH, S.; et al. A. Seed maturation indicators in *Pyraecantha crenulata* Roxb. in Kumaun central Himalaya. **New Forest**. v. 32, p. 1–7, 2006
- SHAH, S.; et al. Seed maturity indicators in *Myrica esculenta*, Buch-Ham. Ex. D.Don.—a multipurpose tree species of subtropical-temperate Himalayan region. **New Forest**. v. 4, p. 9–18, 2010
- SHEWRY, P.R., NAPIER, J.A., TATHAM, A.S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, p. 945-965, 1995.
- SHIMIZU, J. Y.; OLIVEIRA, Y. M. M. de. Distribuição, variação e usos dos recursos genéticos da araucária no sul do Brasil. Curitiba: EMBRAPA-URPFCS, 1981. 9 p. (EMBRAPA-URFPCS. Documentos, 4).

SILVEIRA, V. et al. Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia*. **Biologia plantarum**. V. 52, n. 1, p. 101-104, 2008.

SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H. Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* no Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 47, p. 19-32, 2003

STEADMAN, K. J.; PRITCHARD, H. W.; DEY, P. M. Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. **Annals of Botany**. v. 77, p. 667-674. 1996

STEINER, N. **Parâmetros fisiológicos e bioquímicos durante e embriogênese zigótica e somática de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H. Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* no Brasil. **Boletim Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 47, p. 19-32, jul./dez. 2003.

TEWARI, B.; et al. Physical attributes as indicator of seed maturity and germination enhancement in Himalayan Wild Cherry (*Prunus cerasoides* D. Don.). **New Forest**. v.41, p. 139–146, 2011.

TOMPSETT, P.B. Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. **Annals of Applied Botany**, v. 105, n. 3, p.581-586, 1984.

VIBRANS, A.C.; et al. How much remains of the Brazilian Atlantic forest in the state of Santa Catarina? Assessing the accuracy of forest cover maps using ground data from the Santa Catarina Forest and Floristic Inventory. **Remote Sensing of Environment** (submetido). 2012

VIDIGAL, D. de S. et al . Alterações fisiológicas e enzimáticas durante a maturação de sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.). **Revista brasileira de sementes**, Londrina, v. 31, n. 2, 2009.

WENDLING, I.; DELGADO, M. E. Produção de mudas de araucária em tubetes. Colombo: Embrapa Florestas, 2008. 8 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 201).

YU, F.; DU, Y.; SHEN, Y. Physiological characteristics changes of *Aesculus chinensis* seeds during natural dehydration. **Journal of Forestry Research**. v. 17, n. 2, p. 103-106. 2006

ZECHINI, A. A., et al., Produção, comercialização e identificação de variedades de pinhão no entorno da Floresta Nacional de Três Barras – SC. **Revista Biodiversidade Brasileira**, n. 2, p. 74 – 82. 2012

CAPÍTULO I

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS DURANTE A MATURIDADE DE SEMENTES DE *Araucaria angustifolia*

2.1 INTRODUÇÃO

A intensa exploração da *Araucaria angustifolia* tornou a espécie criticamente em perigo de extinção (FARJON, 2006) e consta na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2008).

Além disso, essa espécie possui sementes com comportamento recalcitrante (SUITER FILHO, 1966; AQUILA; FERREIRA, 1984), com rápida perda da viabilidade fisiológica à medida que há redução de seu grau de umidade, dificultando ações de conservação. Tompsett (1984) relatou que o nível crítico de umidade para a *A. angustifolia* era de 37%, sendo que, abaixo de 25% de umidade houve perda total da viabilidade das sementes. Em trabalho semelhante, Eira et al. (1994) mostraram que sementes de *A. angustifolia* apresentam características tipicamente recalcitrantes, ao atingirem umidade em torno de 38%, houve perda total de viabilidade, sendo esta considerada de nível letal para as sementes.

A qualidade fisiológica das sementes depende do estágio de desenvolvimento, sendo importante identificar a maturidade fisiológica para determinar o melhor momento para a colheita (CARVALHO; NAKAGAWA, 1983).

A colheita precoce pode resultar em sementes imaturas e de baixo vigor devido ao desenvolvimento incompleto do eixo embrionário e/ou disponibilidade de compostos de reserva necessários para a germinação e para o desenvolvimento inicial das plântulas (BORGES et al., 2005).

Por outro lado, a colheita de sementes após a maturidade fisiológica pode também resultar em perdas quantitativas, pois as sementes recalcitrantes continuam com elevada atividade metabólica após a maturidade. Se a germinação não ocorre, inicia rapidamente o processo de deterioração, tornando a coleta tardia inadequada (BERJAK; PAMMENTER, 1996).

Para realização da coleta de frutos e sementes florestais, os indicadores de maturidade são confiáveis e de grande ajuda, permitindo realizar a coleta o mais cedo possível (BONNER, 1988). Geralmente,

quanto mais madura a semente estiver, maior é o seu vigor e potencial para estabelecer como uma muda (SHAH et al., 2010), como em sementes de *Hopea hainanensis*, a maior taxa de germinação (98%) foi observada na última coleta realizada aos 173 dias após a antese (DAA) (LAN et al., 2012).

As características morfológicas e físicas das sementes vêm sendo utilizados para caracterizar a maturidade. O grau de umidade e/ou massa seca são considerados indicativos do momento ideal para a colheita de sementes de *Ocotea odorifera* (HIRANO; POSSAMAI, 2008), *Pyracantha crenulata* (SHAH et al., 2006) e *Podocarpus lamberti* (RAGAGNIN et al., 1994). Em *Prunus cerasoides*, o grau de umidade, o comprimento e a largura das sementes são indicadores confiáveis de maturidade (TEWARI et al., 2011).

Em sementes de *Eugenia uniflora*, a maior porcentagem de germinação (63%) coincidiu com maior incremento de massa seca aos 63 DAA (AVILA et al., 2009). Assim como em sementes de *Hevea spp*, os máximos valores de germinação foram próximos aos valores mais altos de matéria seca e menores de umidade (BARRUETO et al., 1986).

Para sementes de *A. angustifolia*, para colher sementes maduras fisiologicamente devem-se observar as seguintes características: pinhas apresentando manchas de cor marrom, presença de “falhas” e pinhões no chão ou pedaços das pinhas debulhando, quando ainda presas (MATTOS, 2011) e a semeadura deve ser realizada imediatamente após a colheita (BIANCHETTI; RAMOS, 1981; LORENZI, 1992).

O presente trabalho teve como objetivo determinar se o momento de máximo acúmulo de massa seca nas sementes coincide com a máxima qualidade fisiológica (vigor e viabilidade), através de avaliações fisiológicas e morfológicas em diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de *Araucaria angustifolia*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Coleta das amostras

Os estróbilos femininos de *A. angustifolia* foram coletados em uma população natural localizada em Curitibanos, Santa Catarina – Brasil, durante os anos de 2011 e 2012. A primeira coleta foi realizada no mês de março, quando os embriões estavam no estágio de desenvolvimento cotiledonar (GUERRA et al., 2008), seguindo com coletas mensais até julho, considerando o histórico de colheita em Santa

Catarina de que nos meses de abril até julho encontram-se pinhas maduras (CARVALHO, 1994).

O município de Curitibaanos está a 987 m de altitude, e pela classificação de Köppen o clima da região é Cfb – temperado (mesotérmico úmido com verão ameno) com temperatura média nos últimos quatro anos de 16,2 °C, precipitação pluviométrica 125,6 mm e umidade relativa 80% (EPAGRI/CIRAM, 2012). As variações de temperatura e precipitação pluviométrica desde a polinização até a maturação das pinhas dos dois anos de coletas estão apresentadas na figura 2.1 (A) e (B).

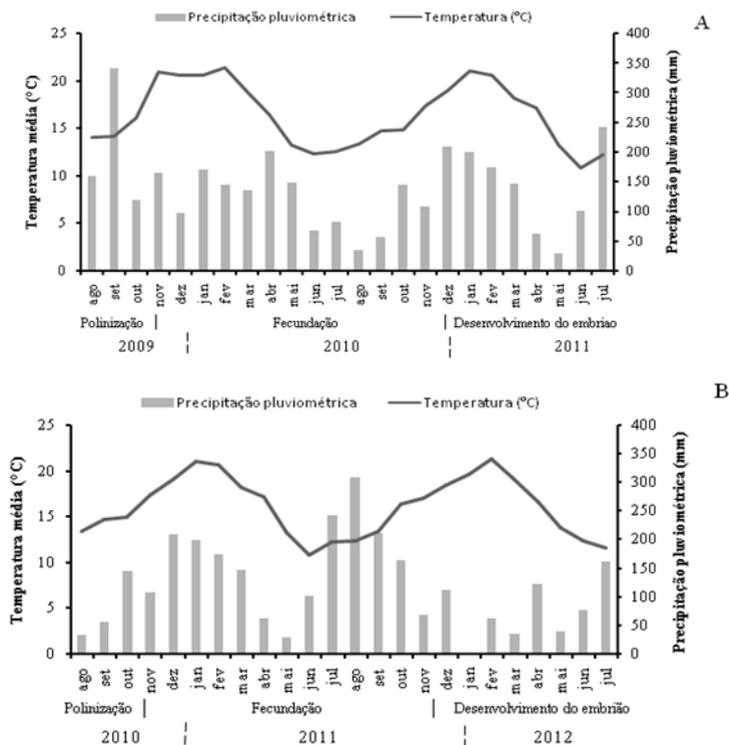


Figura 2. 1– Temperatura média e precipitação mensal no município de Curitibaanos – SC durante o período de polinização até a maturação das sementes de *Araucaria angustifolia* durante os anos de (A) 2011 e (B) 2012.

As coletas foram realizadas em uma população com aproximadamente 50 árvores, retirando de forma aleatória 10 estróbilos femininos em cada estágio. Após cada coleta, os estróbilos foram debulhados manualmente retirando-se as sementes danificadas, e

posteriormente homogeneizadas ao acaso para obter a amostra média. Desta amostra obteve-se a amostra de trabalho composta por 4 repetições, as quais foram utilizadas para as análises morfológicas e fisiológicas das sementes.

No segundo ano coletaram-se as sementes no estádio cotiledonar para utilizar como referência - tratamento controle.

Tabela 2. 2 – Data de coleta e meses após a polinização, nos anos de 2011 e 2012 em diferentes estádios de desenvolvimento

Estádio desenvolvimento	Data da coleta / dias do ano 2011	Data da coleta / dias do ano 2012	Meses após a polinização (MANTOVANI et al., 2004)
Cotiledonar	*	29 março - 89 dias	19 – 20
I	14 abril - 104 dias	19 abril - 110 dias	20 – 21
II	19 maio - 139 dias	21 maio - 142 dias	21 – 22
III	16 junho - 167 dias	25 junho - 177 dias	22 – 23
IV	10 julho - 191 dias	28 de julho - 210 dias	23 – 24

* Não se realizou as análises fisiológicas neste estádio

2.1.1 Caracterização morfológica

A morfologia do estróbilo feminino foi registrada por fotografias em cada estádio de coleta, e da semente obtidas a partir de oito repetições de 25 sementes mensurando-se o comprimento, a largura e a espessura das sementes com auxílio de um paquímetro.

A massa de mil sementes foi obtida a partir da contagem ao acaso de oito repetições com 100 sementes cada e em seguida medidas em balança de precisão e calculado pela fórmula:

$$\text{Massa de mil sementes} = \frac{\text{peso da amostra} \times 1.000}{n^{\circ} \text{ total de sementes}}$$

2.2.2. Grau de umidade e massa seca

As sementes foram cortadas transversalmente e determinou-se o grau de umidade e massa seca pelo método de estufa a $105 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, com 2 repetições de 3 sementes (BRASIL, 2009).

2.2.3. Testes de viabilidade

Teste de germinação

As sementes foram previamente desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio (2%, v/v), por 3 minutos e posteriormente submetidas a um corte para remoção de aproximadamente 3 mm da ponta de cada semente (MOREIRA-SOUZA; CARDOSO, 2003). O teste foi conduzido com 4 repetições de 25 sementes em bandejas com vermiculita, em câmara germinativa a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sob foto período de 12 horas por 70 dias.

Teste de tetrazólio

As sementes foram imersas em água durante 18 horas, e em seguida separaram-se o embrião do tegumento e tecido nutritivo com auxílio de estilete, para posterior imersão em solução de tetrazólio 0,1% a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora, utilizando-se 4 repetições de 25 sementes (OLIVEIRA et al., 2009). Para a análise do teste de tetrazólio, os embriões foram classificados em viáveis ou inviáveis de acordo com a coloração e aspecto dos tecidos, extensão dos danos, e pela localização destas colorações em relação às áreas essenciais ao crescimento (eixo embrionário e cotilédones).

2.2.4. Testes de vigor

Índice de velocidade de germinação - IVG

As contagens foram feitas a cada três dias, a partir do início da germinação, por meio da fórmula proposta por Maguire (1962).

$$IVG = \Sigma (NSG/DAI)$$

Onde:

NSG: número não acumulado de sementes germinadas;

DAI: número de dias após instalação do teste.

Primeira contagem de germinação

Consistiu na contagem de plântulas normais (BRASIL, 2009) no 35º dia do início do teste de germinação.

Comprimento da parte aérea e raiz principal

No final do teste de germinação, ou seja, aos 70 dias mediu-se o comprimento da parte aérea das plântulas (medição da parte aérea até o cotilédone) e das raízes (inserção do cotilédone até a ponta inferior da raiz principal), em centímetros por plântula (KORNDÖRFER et al., 2008).

Teste de Condutividade Elétrica

Utilizaram-se 4 repetições com 10 embriões, embebidos em 75 mL de água destilada e mantidos a 25 °C, conforme Medeiros e Abreu (2007) realizando-se leituras em condutivímetro portátil Quimis modelo Q795 durante 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas de embebição. Os dados obtidos para cada lote foram expressos em $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$ de sementes.

Calculou-se a taxa média de solutos liberados entre dois diferentes tempos de embebição para verificar o período de estabilização nas leituras de condutividade elétrica, baseando na diferença entre a segunda e a primeira leitura, e posteriormente dividindo pela segunda leitura.

$$\text{Taxa média de solutos} = \frac{L_2 - L_1}{L_2}$$

Onde:

L_1 : primeira leitura da condutividade elétrica durante tempo n de embebição

L_2 : segunda leitura da condutividade elétrica durante tempo $n + 2$ horas de embebição

2.2.5. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro (2011) e cinco (2012) tratamentos (estádios de desenvolvimento), com quatro repetições para cada tratamento. Os resultados obtidos em porcentagem, como germinação, tetrazólio, primeira contagem de germinação foram transformados em $\arcsen\sqrt{(x/100)}$ e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Os resultados que apresentaram efeito de época foram submetidos à regressão polinomial.

2.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estróbilos femininos, nos estádios de desenvolvimento cotiledonar e I, apresentavam coloração esverdeada na parte externa e internamente uma coloração creme/esbranquiçada. Com o avanço dos estádios de desenvolvimento, os estróbilos femininos apresentaram pequenas manchas de coloração marrom/preta na superfície externa e, na parte interna, um escurecimento dos pinhões e brácteas em direção ao eixo central. No último estágio, observou-se uma mudança completa de coloração da parte externa de esverdeada para marrom (Figura 2.3).

Segundo Mattos (2011), quando a superfície do estróbilo feminino de *A. angustifolia* apresentam alguns pontos escuros isolados ou agrupados formando manchas, indicam que este está maduro, e com o avanço da maturação, os pontos tendem a aumentar. Semelhante ao que ocorre na maioria das espécies do gênero *Quercus*, em que a mudança de coloração verde para marrom escuro ou preto do pericarpo das sementes é um indicador de maturidade (BONNER; VOZZO, 1987).

Em relação à morfologia interna das sementes de *A. angustifolia*, notou-se um aumento na área ocupada pelo embrião no megagametófito (Figura 2.3- c) e nos valores de massa fresca e seca do embrião (Figura 2.2), indicando um acúmulo de reservas conforme o avanço dos estádios de desenvolvimento. O embrião, assim como o megagametófito são consideradas estruturas de reservas, principalmente de proteínas, lipídios e amido (PANZA et al., 2002).

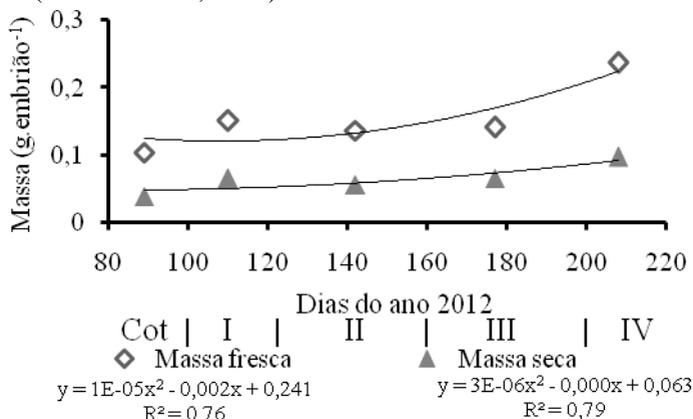


Figura 2. 2 – Massa fresca e seca do embrião de *Araucaria angustifolia* nos estádios cotiledonar e I, II, III e IV coletas no ano de 2012.

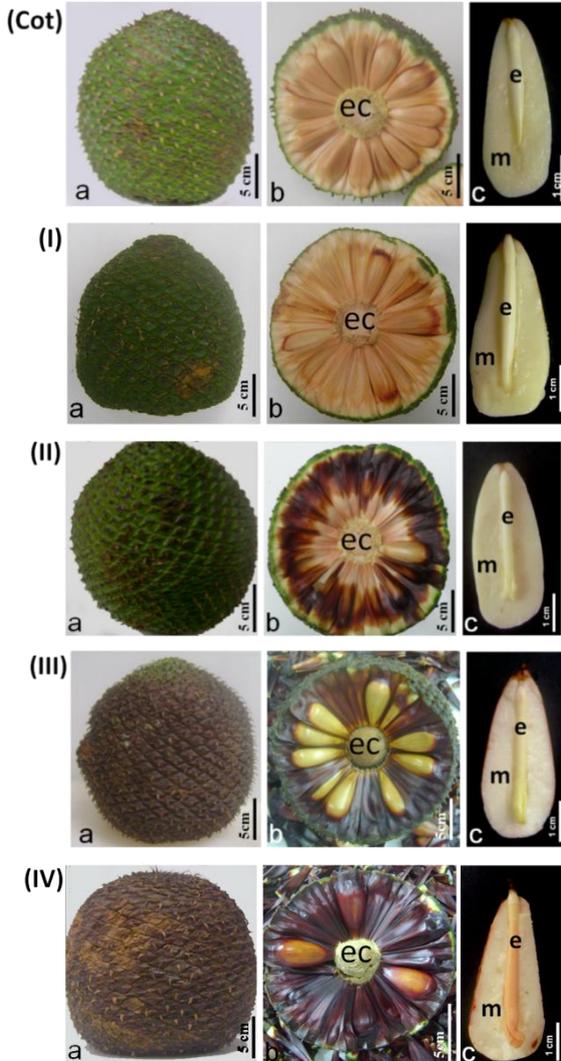


Figura 2. 3 – Estróbilo feminino (pinhas) de *Araucaria angustifolia* nos estádios de desenvolvimento cotiledonar (Cot) e (I), (II), (III), (IV).

(a) Estróbilo feminino; (b) seção transversal do Estróbilo feminino; (c) seção longitudinal da sementes. ec: eixo central do estróbilo feminino; e:embrião; m: megagametófito

Em relação ao grau de umidade das sementes no primeiro ano de coleta, no estádio I as sementes apresentaram 56,26% decrescendo para 48,23 % no estádio II, mantendo-se estáveis a partir deste período. O conteúdo de matéria seca nas sementes aumentou acentuadamente do estádio I para II atingindo 51,77 mg.g⁻¹ (Figura 2.4). Já na coleta de 2012, no estádio cotiledonar as sementes apresentaram elevado grau de umidade (66,54%), diminuindo para 53,36% no estádio I e 49,13% no estádio II.

Apesar das diferenças durante os dois anos de coleta, em torno de 1-3% no grau de umidade, é importante observar que o comportamento foi similar, ou seja, foi decrescente até o estádio II, mantendo-se estáveis nos demais estádios. Esta diferença pode estar associada aos maiores índices pluviométricos durante o desenvolvimento das sementes. Entre os meses de dezembro a abril de 2011, a região de Curitiba registrou em média 158,2 mm de precipitação pluviométrica, enquanto no ano de 2012 apenas 66,6 mm (Figura 2.1) (EPAGRI/CIRAM, 2012). Borges et al. (2005), estudando a maturação de sementes de *Caesalpinia echinata* também encontrou diferenças entre os dois anos estudados, em que o ano com maior precipitação, as sementes estavam mais úmidas e a antese iniciou mais cedo, porém aos 59-60 dias após antese, os valores ficaram próximos em ambos os anos. A razão para as diferenças anuais no período de desenvolvimento das sementes não é conhecido, mas possivelmente esta relacionada com a quantidade de chuva, com sementes maduras mais rapidamente, em anos de seca (LAN et al., 2012).

Os valores obtidos para o grau de umidade encontram-se dentro da faixa proposta para sementes recalcitrantes e no caso de *A. angustifolia*, abaixo de 38 %, são consideradas letais as sementes, indicando a perda total de viabilidade (EIRA et al., 1994). Para algumas espécies, este parâmetro é considerado como índice eficaz para auxiliar na determinação da maturidade fisiológica das sementes e conseqüentemente, o momento ideal para realizar a colheita. Em sementes de *Podocarpus lambertii*, o grau de umidade foi o melhor parâmetro para determinar a maturidade fisiológica, quando esta atinge 32,0% (RAGAGNIN et al., 1994). O mesmo ocorrendo em sementes de *Pyracantha crenulata*, quando as sementes atingem entre 68-71% (SHAH et al, 2006).

No entanto, para *A. angustifolia* este parâmetro não parece ser um bom indicativo do momento ideal para colheita, o comportamento encontrado para o grau de umidade e massa seca das sementes, seguiu um padrão similar do estágio I para o II, ocorrendo a substituição do

conteúdo de água pela matéria seca, como indicado por outros autores (DE CASTRO et al., 2004), ocasionando redução no grau de umidade e aumento da massa seca, mas a partir deste estágio não se observou alterações.

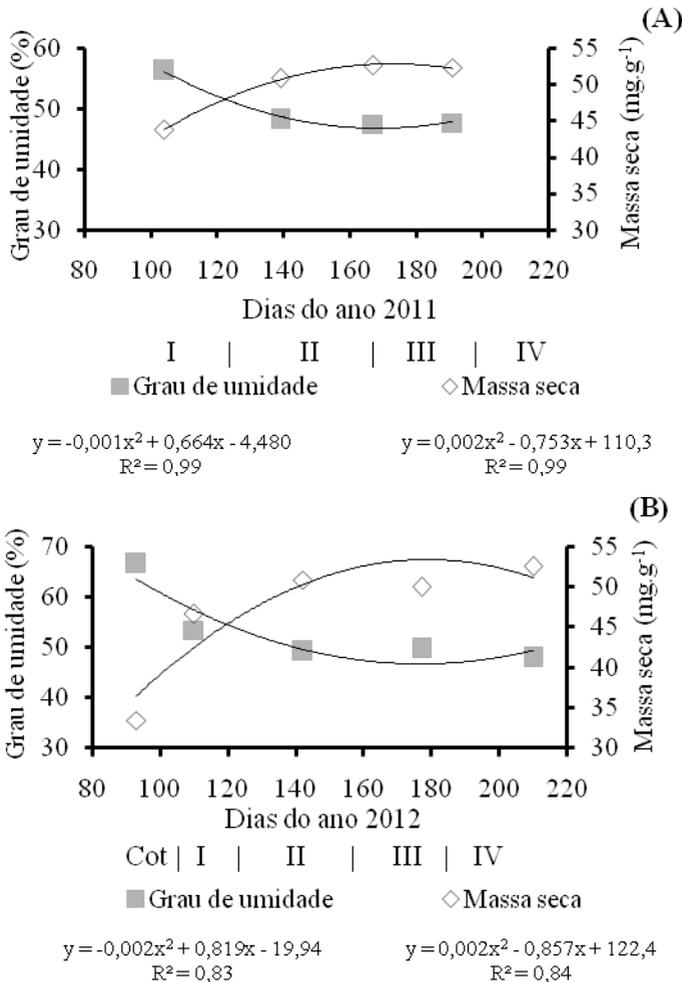


Figura 2. 4 – Grau de umidade (%) e massa seca (mg.g⁻¹) de sementes de *Araucaria angustifolia*, referente aos estágios de desenvolvimento cotiledonar (Cot) e I, II, III e IV nos anos de 2011 (A) e 2012 (B).

As características morfológicas da semente indicaram que nos estádios I e II de 2011, o comprimento, a largura e a espessura das sementes apresentaram maiores valores, diminuindo nos demais estádios. O comprimento diminuiu de 5,57 cm para 4,69 cm, a largura de 1,70 cm para 1,32 cm e a espessura de 1,27 cm para 0,95 cm, nos estádios I para III, respectivamente. Contudo, para a coleta de 2012, as sementes do estádio IV apresentaram maior comprimento (5,99 cm), largura (2,12 cm) e espessura (1,71 cm) em relação aos estádios anteriores (Tabela 2.2).

Apesar das diferenças encontradas entre os dois anos de coleta, as características morfológicas das sementes encontram-se dentro dos valores obtidos para *A. angustifolia*, variando de 1,7 a 8 cm no comprimento, de 1,0 a 2,5 cm na largura e de 0,9 a 2,0 cm na espessura (CARVALHO, 2002; ANSELMINI, 2005; KRUPPEK; RIBEIRO, 2010; MATTOS, 2011). Esta variação é esperada, pois as sementes de diferentes estróbilos de *A. angustifolia* apresentam grande variação no seu tamanho, essas diferenças poderiam ser menores se a análise fosse feita separadamente para cada estróbilo, pois a massa e tamanho das sementes dentro dos estróbilos são semelhantes (KUNIYOSHI, 1983; MANTOVANI et al., 2004; ANSELMINI, 2005).

Tabela 2. 3 – Dimensão das sementes de *Araucaria angustifolia* nos diferentes estádios de desenvolvimento nos anos de 2011 e 2012.

Parâmetros Avaliados	Ano	Cot	Estádio de desenvolvimento			
			I	II	III	IV
Comprimento das sementes (cm)	2011	*	5,6 aA	5,3 aAB	4,7 bC	4,9 bBC
	2012	5,4 C	5,4 aC	5,4 aC	5,6 aB	6,0 aA
Largura das sementes (cm)	2011	*	1,6bAB	1,7 bA	1,3 bC	1,5 bB
	2012	2,0 B	2,0 aB	2,0 aB	1,9 aB	2,2 aA
Espessura das sementes (cm)	2011	*	1,3 bA	1,3 bA	0,9 bB	1,0 bB
	2012	1,6 B	1,6 aB	1,7 aB	1,6 aB	1,7 aA

As letras referem-se ao teste de Tukey a 5% sendo: minúscula – comparação nas colunas, entre os anos 2011 e 2012 no mesmo estádio de desenvolvimento e maiúscula – comparação nas linhas, entre os estádios de desenvolvimento.

Outro parâmetro diretamente relacionado com a maturidade das sementes é a massa de mil sementes. Foram observadas diferenças entre os estádios coletados, contudo no estádio IV observou sementes com maiores massas de mil sementes 9550 g em 2012 (Figura 2.5), valores acima do encontrado por Kuniyoshi (1983) para sementes de *A. angustifolia*, em torno de 7398 g.

Variações na massa de sementes durante o período de coleta, também foram obtidas em sementes de *Citharexylum montevidense* iniciando com 4,32 (g/100 sem.), decrescendo para 3,88 (g/100 sem.) na 27ª semana após a antese e aumentando para 4,24 (g/100 sem.) na 35ª semana (LEONHARDT et al., 2010). O mesmo ocorrendo em sementes de *Prunus cerasoides* com incrementos na massa de 100 sementes nas duas primeiras coletas, seguido de decréscimo na terceira coleta e novamente acréscimos até a última coleta (TEWARI et al., 2011).

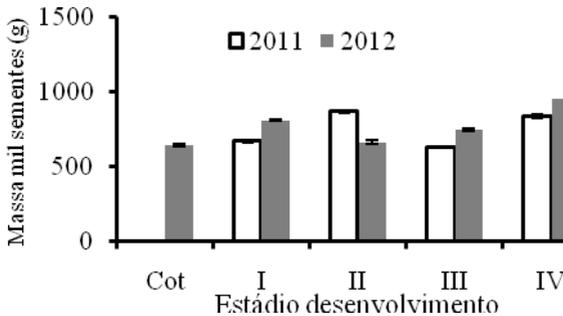


Figura 2. 5 – Massa de mil sementes (g) de *Araucaria angustifolia* nos estádios: cotiledonar e I, II, III e IV nos anos de 2011 e 2012.

Além das características morfológicas e físicas das sementes durante o desenvolvimento é fundamental avaliar a qualidade fisiológica e estabelecer relações entre estas características, para isso realizou-se testes de viabilidade e vigor.

Na coleta de 2011, a porcentagem de germinação das sementes de *A. angustifolia* apresentou-se elevada nos estádios iniciais de desenvolvimento, em torno de 86%, mas após o estádio III, observou-se um acréscimo significativo para 98%. Resultado similar foi obtido na coleta de 2012, em torno de 86% das sementes germinaram nos estádios I, II e III, aumentando no último estádio para 95% (Figura 2.6). O interessante é que nestes estádios mais tardios, as sementes apresentavam-se estáveis quanto ao grau de umidade e de massa seca, o

que demonstra que o máximo acúmulo de massa seca não coincidiu com a máxima viabilidade.

Marcos Filho (2005) citou alguns trabalhos que indicaram acréscimos da germinação e/ou vigor durante o período em que as sementes apresentavam estabilidade do valor máximo da massa seca, e sugeriu a possibilidade da ocorrência de modificações bioquímicas nas sementes, promovendo “ajustes” metabólicos, após a paralisação do fluxo de reservas para a semente.

Em outras espécies como *Phoenix roebelenii*, uma espécie que também possui sementes com comportamento recalcitrante, o grau de umidade manteve-se estável (em torno 36%) nas coletas feitas aos 138 d.a.a até os 194 d.a.a, porém a germinação não foi alterada mantendo-se alta - 95% (IOSSI et al., 2007). Enquanto em sementes de *Myrica esculenta*, a germinação aumentou com a diminuição do grau de umidade quando apresentaram entre 30-32% (SHAH et al., 2010). O mesmo ocorrendo em sementes de *Podocarpus lambertii* em que a máxima germinação (81%) ocorreu quando a percentagem de umidade da semente atingiu o índice mais baixo (32%) e o índice mais elevado de matéria seca (17,68 gramas/100 sementes) (RAGAGNIN et al., 1994).

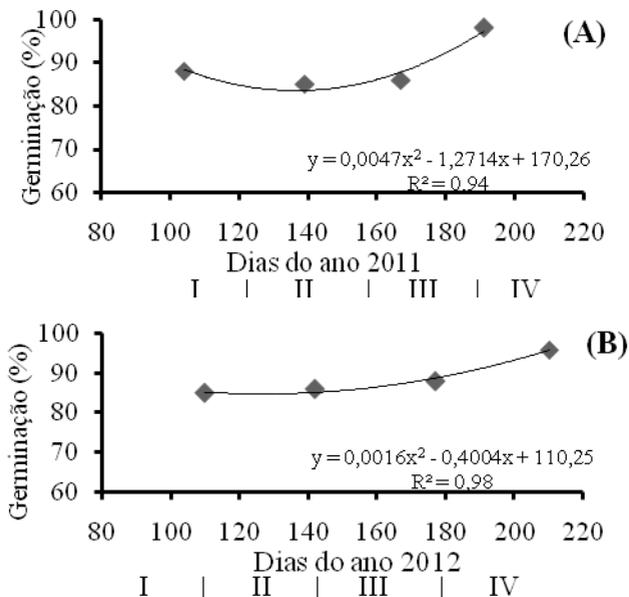


Figura 2. 6 – Porcentagem de germinação de sementes de *Araucaria angustifolia*, coletadas nos estádios I, II, III e IV nos anos de (A) 2011 e (B) 2012.

As avaliações relacionadas ao vigor para 2011, como o IVG, a primeira contagem e o comprimento da raiz indicaram que as sementes mais vigorosas foram as dos estádios III e IV para o IVG; e para a primeira contagem e comprimento da raiz em todos os estágios, com exceção do estágio I. Já os resultados obtidos para a coleta em 2012, o IVG e a primeira contagem indicaram que o estágio IV é o mais vigoroso e para o comprimento de raiz o estágio II e IV (Figura 2.7). Apesar dessas diferenças, os valores encontrados para esses parâmetros de vigor, o estágio IV sempre apresentou maiores valores em conjunto ou não com outros estádios.

Já para o comprimento da parte aérea, o resultado foi semelhante ao teste de germinação, com valores superiores no estágio IV em relação aos estágios II e III, independente do ano de coleta. Indicando que nesse estágio, as sementes apresentaram maior viabilidade coincidindo com maiores índices de vigor, pelo teste de IVG, primeira contagem e comprimento de radícula e parte aérea.

Resultados similares de aumento de viabilidade e vigor durante os últimos estádios de desenvolvimento também foram obtidos em sementes de *Citharexylum montevidense* (LEONHARDT et al., 2001), *Eugenia pyriformis* e *E. involucrata* (SANTANA, 2007) e *Miconia cinnamomifolia* (LOPES; SOARES, 2006), porém para sementes de *A. angustifolia* não há relatos na literatura.

Entre as duas coletas, observaram-se resultados menores para IVG e primeira contagem no ano de 2012, que podem estar relacionados com fatores ambientais, como baixos índices de precipitação pluviométrica. Segundo Marcos Filho (2005), a disponibilidade hídrica é particularmente importante durante o período de transferência de matéria seca para as sementes, reduzindo a probabilidade da formação de sementes defeituosas.

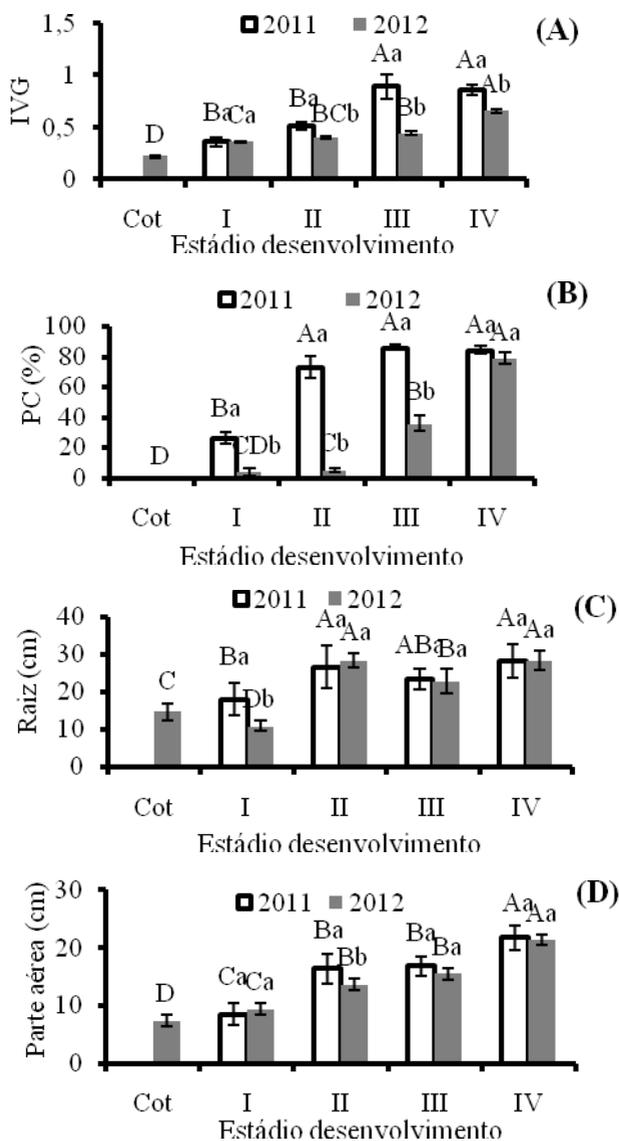


Figura 2.7 – (A) Índice de velocidade de germinação (IVG), (B) primeira contagem (PC), (C) comprimento da raiz e (D) parte aérea (PA) obtidos nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de *Araucaria angustifolia*.

As letras referem-se ao teste de Tukey para separação de médias ao nível de 5 % de probabilidade sendo: minúscula – diferenças entre os anos de 2011 e 2012 e maiúscula – diferenças entre os estádios de desenvolvimento.

No estádio cotiledonar avaliado apenas em 2012, as sementes apresentaram menor taxa de germinação (69%) e índices de vigor, como IVG (0,22), primeira contagem (0%) e comprimento da parte aérea (7,37 cm) demonstrando que as coletas pré maduras resultam em menor qualidade fisiológica provavelmente pela menor quantidade de reservas acumuladas.

O uso de apenas testes de vigor relacionados às características das plântulas podem gerar informações incompletas, com isso para compreender as alterações no vigor e relacioná-lo com os demais testes realizou-se o teste de condutividade elétrica. Este teste tem importância como um teste operacional para avaliar as sementes durante o desenvolvimento (PHARTYAL et al, 2006), tem recebido maior atenção devido a simplicidade, rapidez e baixo custo, e sua natureza não destrutiva (BONNER, 1994). Detecta o início do processo de deterioração, que é caracterizado pela desestruturação do sistema das membranas celulares (SANTOS; PAULA, 2005).

A condutividade elétrica foi monitorada a cada 2 horas até um tempo final de 24 horas (Figura 1.7- A e C), sendo que após 12 horas de embebição ocorreu uma estabilização nas leituras da condutividade elétrica, permitindo inferir que a quantidade de lixiviados é causada pela qualidade das sementes possibilitando uma comparação entre os estádios de desenvolvimento.

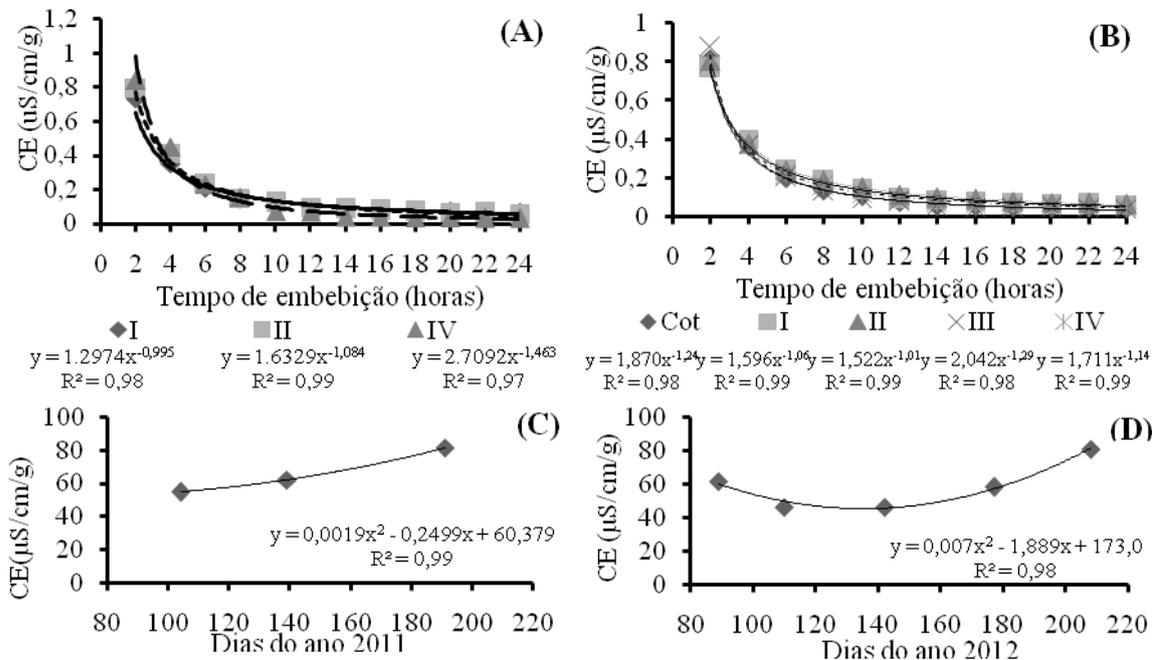


Figura 2. 8 – Taxa média de solutos liberados durante a embebição, por 0 a 24 horas, em água destilada de embriões de *Araucaria angustifolia*, com base nas leituras da condutividade elétrica (CE) nos estádios cotiledonar e de desenvolvimento I, II, III e IV nos anos de 2011 (A) e 2012 (B); Condutividade elétrica (µS/cm/g) de sementes de *Araucaria angustifolia* nos estádios cotiledonar e desenvolvimento I, II, III e IV, após 12 horas de embebição em água destilada nos anos de 2011 (C) e 2012 (D).

A liberação de exsudatos mais intensa ocorreu no estágio IV, nos dois anos de coleta (figura 2.7 – B e D) indicando uma maior desorganização dos sistemas de membranas das células em comparação com os demais estádios. Esta desorganização não refletiu em menor viabilidade ou vigor como previamente mencionado. O estágio cotiledonar também apresentou maior liberação de lixiviados (61,98 $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$) do que os estádios I, II e III. Este fato pode estar associado às membranas ainda não estarem completamente organizadas, pois o sistema de membranas se organiza gradativamente durante o desenvolvimento e sua máxima organização é alcançada fase final do acúmulo de reservas, próxima da maturidade fisiológica (MARCOS FILHO, 2005).

Resultados similares foram constatados em sementes de *Inga vera* subsp. *affinis*, onde maiores valores de condutividade elétrica (34 $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$) também foram encontrados no último estágio de desenvolvimento - IV, e foram coincidente com 100% de porcentagem de germinação (BONJOVANI; BARBEDO, 2008).

A ausência de relação entre os resultados da condutividade elétrica com os demais parâmetros de vigor (IVG, primeira contagem e comprimento raiz/parte aérea) pode ser explicada pelo fato que o teste de condutividade elétrica indicar o início da deterioração, pela menor integridade do sistema de membranas celulares das sementes, uma vez que este é o primeiro evento característico do processo de deterioração (MARCOS FILHO, 2005).

A determinação da viabilidade, baseando-se no teste de tetrazólio não mostrou diferenças significativas entre os estágios de desenvolvimento no ano 2011, mas foi próximo aos percentuais de germinação pelo teste padrão nos estádios I e II. No ano de 2012, a viabilidade foi inferior apenas no estágio II. Desta forma o teste padrão de germinação e os demais testes de vigor foram mais sensíveis para detectar as alterações fisiológicas durante os estádios de desenvolvimento das sementes de *A. angustifolia*.

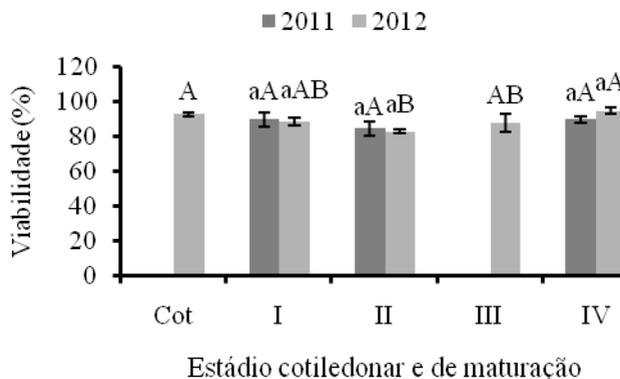


Figura 2. 9 - Percentual de sementes viáveis de *Araucaria angustifolia* pelo teste de tetrazólio nos estádios cotiledonar e de desenvolvimento I, II, III e IV nos anos de 2011 e 2012.

As letras referem-se ao teste de Tukey ($P < 0,05$), sendo: maiúsculas – comparação entre os estádios cotiledonar e de desenvolvimento; minúsculas – comparação entre os anos de 2011 e 2012.

A *A. angustifolia* apresenta diferentes variedades botânicas, contudo na população estudada não há definição da variedade encontrada. As sementes provenientes deste local apresentaram coloração avermelhada quando maduras (Figura 2.3), não apresentando bases brancas (características das variedades *caiova* e *indehiscens*) e o período de amadurecimento das pinhas foi de abril a julho. Segundo as características das variedades descritas por Mattos (2011), sugere-se que coletaram sementes da variedade *angustifolia*. Esta variedade ocorre com maior frequência nas propriedades de agricultores próximos a Floresta Nacional de Três Barras, SC, sendo denominado por eles de “pinhão comum” devido sua maior ocorrência (ZECHINI et al., 2012). Porém são necessários estudos que investiguem mais profundamente estas características, além do conhecimento tradicional dos agricultores próximos a esta população.

Através dos testes realizados pode-se verificar que ocorrem modificações fisiológicas durante os estádios de desenvolvimento de sementes de *Araucaria angustifolia*, o que demonstra resultados inéditos. Pela literatura, muitos trabalhos têm classificado os estádios I, II, III e IV como um único estágio, pois consideram as características morfológicas do embrião (GUERRA et al., 2008, BALBUENA et al., 2009). Geralmente, para muitas espécies de coníferas, a maturidade

morfológica, ou seja, quando o embrião torna-se totalmente alongado, é uma fase chave ocorrendo à máxima viabilidade (EDWARDS, 1980).

Entretanto, verificou-se que há diferenças no grau de umidade, na viabilidade e vigor das sementes durante o desenvolvimento. É indicado realizar a colheita das sementes no último estágio, ou seja, quando as pinhas iniciam a debulha no campo e apresentam coloração marrom. Neste estágio, as sementes contêm grau de umidade próximo a 47% possibilitando elevados percentuais de germinação e índices de vigor, mas em alguns casos particulares, caso exista a necessidade de colheita prematura, isto é possível, em função da germinação e vigor não serem tão baixos com 67 % de germinação no estágio cotiledonar.

2.4 CONCLUSÃO

Existem diferenças na viabilidade e no vigor nos estádios de desenvolvimento de sementes de *Araucaria angustifolia*, sendo que no estágio IV, as sementes apresentaram maior viabilidade e vigor pelo índice de velocidade de germinação, primeira contagem e comprimento da raiz e parte aérea.

Pelo teste de condutividade elétrica existe indícios de desordens estruturais nas sementes de forma precoce no estágio IV, pela maior liberação de solutos. As sementes de *Araucaria angustifolia* apresentaram um máximo acúmulo de matéria seca, no estágio II, e não coincidiu com a máxima qualidade fisiológica das sementes.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AQUILA, M.E.A.; FERREIRA, A.G. Germinação de sementes escarificadas de *Araucaria angustifolia* em solo. **Ciência e Cultura**, v.36, n.9, p. 1583-1589, 1984.
- ANSELMINI, J. I. **Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, na Região de Curitiba – PR.** 2005. 52 f. Dissertação (Mestrado em Produção vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- ÁVILA, A.L.; et al. Maturação fisiológica e coleta de sementes de *Eugenia uniflora* L. (Pitanga), Santa Maria, RS. **Ciência Florestal**, v.19, n.1, p.61-68, 2009

- BALBUENA, T. S. **Proteômica do desenvolvimento da semente de *Araucaria angustifolia***. Tese (Doutorado em Ciências/Botânica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- BARRUETO, L.P.; PEREIRA, I.P. & NEVES, M.A. Influência da maturação fisiológica e do período entre a coleta e o início do armazenamento, sobre a viabilidade da semente de seringueira (*Hevea* spp). **Turrialba**, San José. v.36, n.1, p.65-75, 1986
- BIANCHETTI, A.; RAMOS, A. Efeito da temperatura de secagem sobre o poder germinativo de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Curitiba, n.2, p.27- 56, 1981.
- BONJOVANI, M. R.; BARBEDO, C. J. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. affinis (DC.) T. D. Penn. toleram temperatura sub-zero. **Revista brasileira Botânica**. v.31, n.2, p. 345-356, 2008
- BONNER, F.T. Using leachate conductivity of bulked samples to estimate seed quality. In: **Proceedings of the 1988 southern forest nursery association**, 218-Charleston, SC. Southern Forest. Nursery Association, Columbia Sc, p. 164–172, 1988.
- BONNER, F. T.; VOZZO, J. A. **Seed Biology and Techonology of *Quercus***. New Orleans, La. : U.S. Dept of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, 1987.
- BONNER, F.T.; et al. **Tree seed technology training course:student outline**. New Orleans: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, 1994. 81p.
- BORGES, I.F.; et al. Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 851–861., 2005.
- BRASIL. **Instrução Normativa n° 6 de 26 de setembro de 2008**, 2008. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.
- CARVALHO, N. M. de; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília: Embrapa. 1994. 640 p.

- CARVALHO, P.E.R. **Pinheiro-do-paraná**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 2002. 17p. (Circular técnica , 60)
- DE CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Desenvolvimento de semente e conteúdo de água. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação do básico ao aplicado**. São Paulo, 2004.
- EDWARDS, D.G.W. Maturity and quality of tree seeds- a state of the art review. **Seed Science and Technology**, v. 8, p.625–657, 1980
- EIRA, M. T. S, et al. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze - Araucariaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, n. 1, p.71-75, 1994.
- EPAGRI/CIRAM. **Atlas climatológico do estado de Santa Catarina**. Disponível em: <<http://www.ciram.epagri.rct-sc.br>> Acesso em:05 de novembro de 2012.
- FARJON, A. 2006. *Araucaria angustifolia*. In: IUCN 2012. **IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/32975/0>> Acesso em: 18 de dezembro de 2012..
- GUERRA, M. P.; et al. Evolução, ontogênese e diversidade genética em *Araucaria angustifolia*. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. **Origem e Evolução de Plantas Cultivadas**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica , 2008. p. 149-184.
- HIRANO, E.; POSSAMAI, E. Estádio de maturação do fruto e germinação de sementes de três espécies de Lauraceae. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 219-223, 2008
- IOSSI, E.; et al. Maturação fisiológica de sementes de *Phoenix roebelenii* O'Brien. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 29, n. 1, p. 147-154, 2007.
- KORNDÖRFER, C. L.; MÓSENA, M.; DILLENBURG, L. R. Initial growth of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) under equal soil volumes but contrasting rooting depths. **Trees**, v. 22, p. 835-841, 2008.
- KRUPEK, R. A.; RIBEIRO, V. Biometria e germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze provenientes de um remanescente florestal do município de Turvo (PR). **Revista Ciência Exatas e Naturais**, vol. 12, n° 1, jan/jan. 2010
- KUNIYOSHI, Y. S. **Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de ima floresta com Araucaria**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1983.

- LAN, Q.Y.; et al. Development and storage of recalcitrant seeds of *Hopea hainanensis*. **Seed Science and Technology**, v.40,p. 200-208, 2012
- LEONHARDT, C.; et al. Maturação fisiológica de sementes de tarumã-de-espinho (*Citharexylum montevidense*) (Spreng.) Moldenke - Verbenaceae, no jardim Botânico de Porto Alegre, RS. **Revista Brasileira de Sementes** v. 23, n.1, p. 100-107, 2001.
- LIMA JUNIOR, M. J. V.; FIGLIOLIA, M. B.; PIÑA-RODIRGUES, F. C. M.; GENTIL, D. F. O.; SOUZA, M. M.; SILVA, V.S. Determinações adicionais. In: LIMA JUNIOR, M. J. L. **Manual de procedimentos para análise de sementes florestais**, Manaus, p. 123-125, 2010
- LOPES, J. C.; SOARES, A. da S. Estudo da maturação de sementes de carvalho vermelho (*Miconia cinnamomifolia* (Dc.) Naud.). **Ciência agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, 2006
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v. 1. 368 p.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.
- MANTOVANI, A.; et al. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista brasileira Botânica**. v.27, n.4, pp. 787-796. 2004
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p
- MATTOS, J. R. de. **O Pinheiro Brasileiro**. Florianópolis: Ufsc, 2011. 698 p.
- MEDEIROS, A. C. S.; ABREU, D. C. A. de. Desidratação ultra-rápida de embriões. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 54, p. 119-125, 2007.
- MOREIRA-SOUZA, M.; CARDOSO, E. J. B. N.. Método prático para germinação de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. sementes. **Scientia agrícola** , Piracicaba, v. 60, n. 2, 2003.
- OLIVEIRA, L. M. et al. Tetrazolium test in *Araucaria angustifolia* seeds. In: XIII Congresso Florestal Mundial, 2009, Buenos Aires. XIII Congresso Florestal Mundial, 2009.
- PANZA, V. et al. Storage reserves and cellular water in mature seeds of *Araucaria angustifolia*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 140, p. 273-281, 2002.

- PHARTYAL, S.; et al. Ex situ conservation of rare and valuable Forest tree species through seed-gene bank. **Current Science**. v. 83, n. 11, p. 1351-1357, 2001
- RAGAGNIN, L.I.M.; COSTA, E.C.; HOPPE, J.M. Maturação fisiológica de sementes de *Podocarpus lambertii* Klotzsch. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 4, n.1, p. 23-41, 1994
- SANTANA, P. J. A. **Maturação, secagem e armazenamento de sementes de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade vegetal e meio ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo, 2007
- SANTOS, S. R. G. dos; PAULA, R. C. de. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes *Sebastiania commersoniana* (Bail) Smith & Downs - Euphorbiaceae. **Revista brasileira de sementes**, Pelotas, v. 27, n. 2, 2005.
- SHAH, S.; et al. Seed maturity indicators in *Myrica esculenta*, Buch-Ham. Ex. D.Don.—a multipurpose tree species of subtropical-temperate Himalayan region. **New Forest**. v. 4, p. 9–18, 2010
- SUITER FILHO, W. **Conservação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze**. Piracicaba: ESALQ. 1966. 17 p.
- TEWARI, B.; et al. Physical attributes as indicator of seed maturity and germination enhancement in Himalayan Wild Cherry (*Prunus cerasoides* D. Don.). **New Forest**. v.41, p. 139–146, 2011.
- TOMPSETT, P.B. Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. **Annals of Applied Botany**, v. 105, n. 3, p.581-586, 1984.
- ZECHINI, A. A., et al., Produção, comercialização e identificação de variedades de pinhão no entorno da Floresta Nacional de Três Barras – SC. **Revista Biodiversidade Brasileira**, n. 2, p. 74 – 82. 2012

CAPÍTULO II

CONTRIBUIÇÃO DE COMPONENTES BIOQUÍMICOS NA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE *Araucaria angustifolia*

3.1 INTRODUÇÃO

As reservas acumuladas são responsáveis pelo fornecimento de nutrientes e energia necessários para plena manifestação das funções vitais das sementes (MARCOS FILHO, 2005). As substâncias armazenadas em grande quantidade constituem os carboidratos, os lipídeos e as proteínas (BUCKERIDGE et al., 2004), sendo que em muitas espécies, estas reservas são armazenadas em diferentes tecidos e proporções (BEWLEY; BLACK, 1994). Em *Araucaria angustifolia*, tais reservas são armazenadas no embrião e no megagametófito (PANZA et al., 2002).

As proteínas armazenam principalmente nitrogênio e enxofre, essenciais para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e compostos secundários na plântula em crescimento (BUCKERIDGE et al., 2004). Além de fornecer os aminoácidos, cujos usos são essenciais aos processos de germinação e desenvolvimento da plântula a partir do crescimento embrionário (SHEWRY et al., 1995; BUCKERIDGE et al., 2004). Esse composto vem sendo muito estudado principalmente durante a embriogênese zigótica e somática de *A. angustifolia* (ASTARITA, 2000; FERNANDEZ, 2001; DOS SANTOS, 2002; STEINER, 2005; SILVEIRA et al., 2008; BALBUENA, 2009; STEINER, 2009; FARIAS-SOARES et al., 2012).

Durante a embriogênese zigótica, há acúmulo de proteínas até o estágio cotiledonar, com acréscimos (DOS SANTOS et al., 2006; SILVEIRA et al., 2008), decréscimos (BALBUENA et al., 2009) ou estabilidade até o estágio maduro (ASTARITA et al., 2003). No entanto, não se sabe como esta variação pode contribuir na qualidade fisiológica das sementes de araucária.

Outra importante reserva nas sementes são os carboidratos, encontrados na forma solúvel, como os oligossacarídeos da série rafínósica, ou insolúvel como o amido e aqueles depositados nas paredes celulares espessadas de cotilédones e endosperma (CACCERE, 2010). Atuam como fonte de energia e carbono para a germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas (BUCKERIDGE et al., 2004).

Os carboidratos solúveis podem exercer proteção contra os efeitos negativos da desidratação; contribuindo para a estabilidade do sistema de membranas, ao favorecer a preservação das relações hidrofílicas associadas a atividades de proteínas durante a desidratação (MARCOS FILHO, 2005). Acumulam-se tardiamente no desenvolvimento das sementes (DE CASTRO et al., 2004). No caso de *A. angustifolia* nos tecidos do megagametófito há em torno de $35,5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ e no embrião $\pm 90 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (STEADMAN et al., 1996).

O carboidrato na forma insolúvel, ou seja, o amido é o mais comumente encontrado em sementes (BEWLEY; BLACK, 1994) e uma das mais importantes formas de reserva de carbono nas plantas, em termos de quantidade, universalidade de sua distribuição e importância comercial (BUCKERIDGE et al, 2004). Sementes de *A. angustifolia* são consideradas ricas em amido, podendo apresentar de 36,28% a 86,26% (RAMOS; SOUZA, 1991; PIRIZ CARRILLO, 2003; CORDENUNSI et al, 2004; CORREA; HELM, 2009; BELLO-PÉREZ et al., 2006; GARCIA, 2012).

Durante o desenvolvimento das sementes dessa espécie foi observado grãos de amido dentro dos amiloplastos (ROGGE-RENNER et al., 2012), e em grande quantidade no megagametófito, sendo considerado a principal fonte de carbono para crescimento das plantas (PANZA et al., 2002). Similarmente, não se têm relatos da contribuição de proteínas sobre a qualidade fisiológica das sementes de araucária.

Além dos carboidratos, outra fonte de energia durante a germinação são os lipídios, estes são considerados mais eficientes e também podem ter a função de reserva e estrutural (MARCOS FILHO, 2005). Tem importante papel na proteção das membranas das células embrionárias contra as lesões durante a desidratação das sementes (MELLO et al., 2010).

Em células meristemáticas de *A. angustifolia* há presença de corpos lipídicos (PANZA et al., 2002; ROGGE-RENNER et al., 2012), sendo que em sementes maduras, os teores de lipídios variam de 0,52 % a 7,38 % (RAMOS; SOUZA, 1991; CORDENUNSI et al., 2004; CONFORTI; LUPANO, 2007; CAPELLA et al., 2009; ABE et al., 2010).

Em outras espécies recalcitrantes, como *Eugenia uniflora* e *Inga vera*, também se observou baixos teores de lipídios, sugerindo que este composto pode estar envolvido no mecanismo de tolerância à dessecação (MELLO et al., 2010), pois são constituintes essenciais do sistema de membranas celulares (MARCOS FILHO, 2005). A organização das membranas afeta diretamente a normalidade dos

processos fisiológicos em sementes, como a germinação e a manifestação do vigor, sendo os principais alvos do processo de deterioração pós maturidade (MARCOS FILHO, 2005).

O conhecimento dos mecanismos de acúmulo e mobilização de reservas são fundamentais para a obtenção de plantas de maior vigor (BUCKERIDGE et al, 2004), além de dar subsídio para manipulação da multiplicação *in vitro* via embriogênese somática (SILVEIRA et al, 2008). Desta forma, o entendimento da deposição de reservas nos diferentes tecidos durante o desenvolvimento de sementes de *Araucaria angustifolia* e sua relação com a qualidade fisiológica, pode contribuir significativamente para obter sementes de maior qualidade e favorecer a produção e conservação de sementes dessa espécie.

Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar os teores de carboidratos, amido proteínas e lipídios no embrião e no megagametófito de *A. angustifolia* durante a maturidade das sementes e indicar a contribuição destes componentes na qualidade fisiológica de sementes.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coleta das amostras

As coletas das sementes foram realizadas em uma população localizada no município de Curitiba – SC, iniciando-se no mês de março de 2011, quando os embriões estavam no estágio de desenvolvimento cotiledonar (GUERRA et al, 2008), seguindo com coletas mensais até julho, sendo classificados em estádios I, II, III e IV.

As coletas foram realizadas em uma população de aproximadamente 50 árvores, de forma aleatória totalizando 10 estróbilos femininos coletados em cada estágio. Após cada coleta, os estróbilos foram debulhados manualmente retirando-se as sementes danificadas, e posteriormente homogeneizadas para obter a amostra de trabalho, utilizou-se uma fração da amostra para extrair o megagametófito e o embrião, e analisou-se o grau de umidade e massa seca de cada estrutura colocando-os em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, com 2 repetições de 5 embriões (BRASIL, 2009). A outra fração foi congelada com nitrogênio líquido e armazenada em ultrafreezer ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) até o momento das análises.

As amostras foram retiradas do ultrafreezer e imediatamente liofilizadas (Liotop L101 – Liobras) por aproximadamente 9 horas e submetidas às análises bioquímicas.

3.2.2 Análises bioquímicas

Carboidratos solúveis e amido

Para a extração dos carboidratos solúveis totais e amido, utilizou-se 200 mg de biomassa seca maceradas com o auxílio de nitrogênio líquido e submetidas a uma extração tripla com etanol 80% a 100 °C durante 5 minutos. Os extratos foram centrifugadas a 1500 g durante 15 min, posteriormente filtrados com lã de vidro e os sobrenadantes coletados para quantificação dos açúcares solúveis totais. O amido foi extraído a partir do resíduo formado, adicionando-se 5 mL de água destilada e 6,5 mL de ácido perclórico 52%, mantidos por 15 minutos em banho de gelo e agitando ocasionalmente com bastão de vidro, em seguida foram centrifugados a 1500 g por 15 minutos. O sobrenadante foi decantado em proveta e ao resíduo adicionou-se 5 mL de água destilada e 6,5 mL de ácido perclórico para nova extração. As frações de amido foram unidas e ajustou-se o volume para 100 mL. Posteriormente, foram filtradas em lã de vidro e conservou-se uma amostra adequada para quantificação (McCREADY et al, 1950).

A quantificação dos carboidratos solúveis totais e amido foi realizada por análise colorimétrica pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Utilizou-se alíquotas das amostras, diluídos em água destilada para 0,5 mL e acrescentou-se 0,5 mL fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm, utilizando como padrão uma curva de D-glicose de 0 a 60 µg/mL ($R^2 = 0,9955$, $y = 0,0127x + 0,0266$).

Proteínas solúveis totais

A extração das proteínas solúveis totais foi realizada através da metodologia descrita por Steiner (2005), com adaptações (FARIAS, et al., 2011). Utilizou-se 100 mg de biomassa seca maceradas com auxílio de nitrogênio líquido e 1 mL de tampão de extração contendo: 20 mM de fosfato de sódio dibásico – pH 7,5; 1 mM de EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético; 50 mM de NaCl – cloreto de sódio; 10% de Glicerol (v/v), 1 mM de PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonil e 1,5% de β -mercaptoetanol (v/v). Posteriormente, centrifugou-se a 4000 rpm, a 4 °C, por 25 minutos, e as proteínas totais foram precipitadas com a presença de dois volumes de álcool etílico absoluto para cada volume de sobrenadante, com posterior armazenamento a 4 °C, por 50 minutos. Após este período, as amostras foram novamente centrifugadas a 4000 rpm, a 4 °C por 35 minutos. O sobrenadante foi descartado e as proteínas totais ressuspendidas em solução de 20 mM de fosfato de

sódio dibásico (pH 7,5). Os teores de proteínas solúveis totais das amostras foram quantificados em espectrofotômetro pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão (BSA 0 – 800 µg/mL, $R^2 = 0,9845$, $y = 2078,7x - 29,82$).

Lipídios

A extração dos lipídios foi realizada pelo método de extração de óleo a frio (BLIGH-DYER, 1959, com adaptações de BRUM, 2004). Utilizou-se 1,5 g de amostra seca com 10 mL de clorofórmio, 20 mL de Metanol e 8 mL de água destilada. Em seguida, as amostras foram agitadas em vortex por 30 minutos e adicionou-se 10 mL de clorofórmio e 10 mL de água destilada. Posteriormente foram armazenadas a 4 °C por aproximadamente 1 hora. Após esse período formou-se um sistema bifásico, com a fase superior composta de metanol, água e não lipídios e a fase inferior, com clorofórmio, contendo os lipídios extraídos. A fase inferior foi recolhida em balões previamente pesados e filtrada com 2 g de sulfato de sódio anidro sobre papel filtro quantitativo (JP42 – faixa azul, 80 g/m², porosidade 8µm). O solvente foi rotaevaporado a 30° C por aproximadamente 5 minutos e os balões pesados novamente. O teor de lipídios foi calculado pela diferença do peso final e inicial dos balões em 1,5 g de amostra do megagametófito.

Qualidade fisiológica

Para relacionar os componentes bioquímicos com a qualidade fisiológica das sementes foram utilizados os resultados de viabilidade e vigor obtidos no Capítulo I do presente trabalho.

3.2.3 Análise estatística

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições dentro de cada estágio e leituras em duplicatas. Para indicar a relação de dependência da qualidade fisiológica de sementes de *A. angustifolia* em função da deposição de reservas no megagametófito e no embrião foram conduzidos testes de correlação dentro de cada estágio de coleta das sementes e análise de regressão para determinar o efeito do período de desenvolvimento nas respostas fisiológicas e bioquímicas.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos estádios cotiledonar e I, o megagametófito apresentou 66,5 % e 56,3% de grau de umidade, respectivamente. Mantendo-se estável

a partir do estágio II, em torno de 47,5%. No embrião, o grau de umidade foi próximo a 63% nos estádios cotiledonar e I com redução até o estágio III para 49,9%. Demonstrando que o megagametófito foi o que mais contribuiu para que houvesse redução no grau de umidade das sementes íntegras ao longo do período de desenvolvimento (Figura 3.1). Astarita et al., (2003) observaram aumento no grau de umidade durante o desenvolvimento de sementes de *A. angustifolia* nos tecidos do megagametófito, sendo que nos estádios 5 e 6, ou seja coletados no início e final de março, respectivamente, observaram-se estabilidade no conteúdo de água (96,6%).

Durante a desenvolvimento das sementes, o acúmulo de reservas ocorre quando estas apresentam elevado grau de umidade, sendo que o fluxo de acúmulo de matéria seca é intensificado até atingir um máximo (MARCOS FILHO, 2005). Esse máximo de matéria seca foi observado no estágio II para o megagametófito ($0,52 \text{ g.g}^{-1}$) e no estágio III para o embrião ($0,49 \text{ g.embrião}^{-1}$).

Em sementes de *A. angustifolia*, o embrião e o megagametófito são considerados locais de reservas (PANZA et al 2002). O interessante é que o megagametófito contribui de forma mais acentuada para o acúmulo de matéria seca do estágio I ao II, porém se assemelha ao embrião no estágio III e IV (Figura 3.1). O máximo acúmulo de massa seca em ambos componentes de reserva permitiu indicar que as sementes atingiram a maturidade. No entanto, não indicam que outras alterações fisiológicas e bioquímicas na semente não ocorram, visto que existem relatos de outras espécies que mesmo após ter atingido o máximo acúmulo de massa seca verificou-se mudanças fisiológicas e bioquímicas, atribuindo este fato a imaturidade fisiológica ou funcional por ocasião do seu desprendimento da planta, como *Ilex paraguayensis* e *Copaifera langsdorffii* (REIS, 2004).

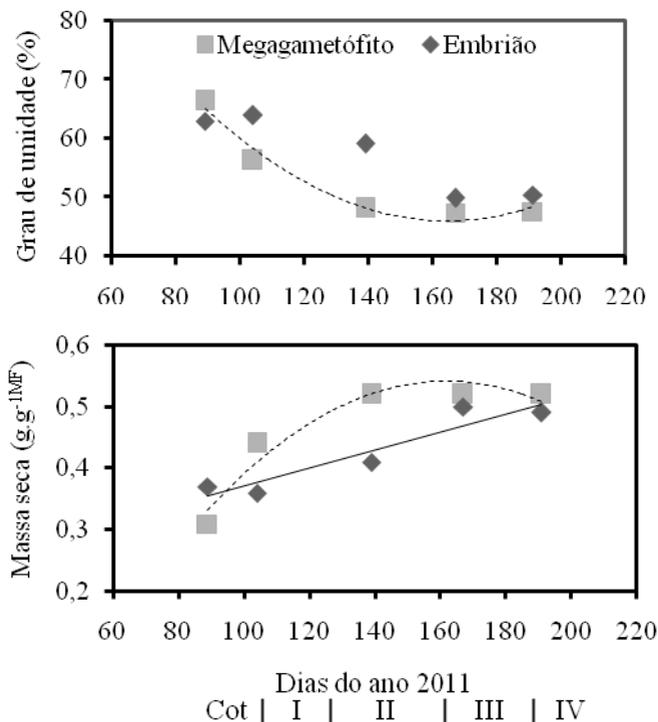


Figura 3. 1– Grau de umidade e massa seca no megagametófito e no embrião nos estádios cotiledonar e I, II, III e IV no ano de 2011.

O teor de carboidratos solúveis totais aumentou do estágio cotiledonar até o estágio IV, de $6,7 \text{ mg.g}^{-1}$ para 24 mg.g^{-1} no megagametófito e de $33,5 \text{ mg.g}^{-1}$ para $54,7 \text{ mg.g}^{-1}$ no embrião. Os valores encontrados a partir do estágio II encontram-se próximo ao encontrado por Steadman et al., (1996) para o megagametófito de *A. angustifolia*, em torno de $35,5 \text{ mg.g}^{-1}$ e para sementes maduras 24 mg.g^{-1} (CORDENUNSI et al, 2004), porém abaixo do encontrado para o embrião, em torno de 90 mg.g^{-1} (STEADMAN et al., 1996).

Observou-se um ponto de transição após o estágio II, ou seja, o aumento acentuado nos teores de carboidratos solúveis no embrião coincidiu com a queda deste no megagametófito, indicando que a reservas estão sendo remobilizadas do megagametófito para o embrião a partir deste ponto, coincidindo com os índices mais altos de velocidade

de germinação e próximos a máxima porcentagem de germinação observada no estágio IV.

Algumas espécies com sementes recalcitrantes possuem baixos valores de carboidratos solúveis e podem estar relacionados à intolerância das sementes a dessecação (PRITCHARD et al., 1995; DE CASTRO, 2004; MARCOS FILHO, 2005; MELLO et al., 2010). A função dos carboidratos neste processo pode ser de proteção das membranas durante a desidratação (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998).

Apesar do aumento nos teores de carboidratos solúveis, este não foi suficiente para evitar a maior quantidade de solutos liberados durante a embebição no teste de condutividade elétrica no estágio IV. Se compararmos os resultados obtidos com algumas sementes ortodoxas como *Erythrina speciosa* e *Caesalpinia echinata* que possuem acima de 140 mg.g^{-1} (MELLO et al., 2010), os valores obtidos são menores, o que pode ser um indicativo da desestruturação das membranas observados durante a maturidade das sementes.

Por outro lado verificou-se uma correlação positiva de 0,76 dos teores de carboidratos com a germinação, sugerindo importante papel dos carboidratos solúveis na viabilidade das sementes de *A. angustifolia*. A capacidade de tolerar a dessecação esta relacionada não apenas aos carboidratos, mas a outros compostos, como proteínas LEA, enzimas anti oxidantes, características físicas intracelulares entre outros (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998; PAMMENTER; BERJAK, 1999), por isso é necessário outros estudos para tal afirmação.

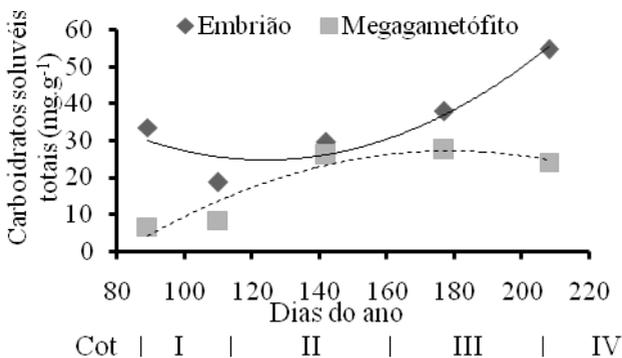


Figura 3. 2 – Carboidratos solúveis totais (mg.g^{-1}) nos tecidos do embrião ($y = 0,0044x^2 - 1,0824x + 91,723 - R^2 = 0,8974$) e megagametófito ($y = -0,0029x^2 + 1,0275x - 64,629 - R^2 = 0,896$) de *Araucaria angustifolia* nos estádios cotiledonar (Cot) e I, II, III e IV

O amido é uma das formas de carboidrato insolúvel, considerado o principal composto de reserva em sementes de *A. angustifolia* (TOMPSETT, 1984). Teores elevados no megagametófito e no embrião, foram observados principalmente no estágio IV, com 46,52 % no embrião e 52,87 % no megagametófito. Nos trabalhos realizados com sementes maduras de *A. angustifolia* observaram-se variações nos teores de amido de 36,28% a 86,26% (RAMOS; SOUZA, 1991; PIRIZ CARRILLO, 2003; CORDENUNSI et al, 2004; CORREA; HELM, 2009; BELLO-PÉREZ et al., 2006; GARCIA, 2012).

Durante os estádios analisados observou-se incremento de amido no embrião e no megagametófito do estágio cotiledonar até o estágio de IV, sendo mais acentuada neste último estágio. Esses resultados foram semelhantes ao observado por Steiner (2005), nos estádios iniciais do desenvolvimento dos embriões zigóticos de *A. angustifolia* em que foi encontrado menor conteúdo de amido do que nos estádios maduros.

O maior acúmulo de amido observado no estágio IV coincidiu com a maior viabilidade e vigor das sementes avaliadas pelo teste de germinação, comprimento da parte aérea/raiz e IVG. Para Carvalho e Nakagawa (2000) quanto maior o teor de reservas nas sementes, maior será o vigor das plântulas originadas.

Efeitos positivos foram observados pela análise de correlação entre os teores de amido no megagametófito e no embrião com os resultados do teste de germinação, com coeficiente de 0,98 e 0,86, respectivamente. Demonstrando que o acúmulo de amido durante o desenvolvimento favoreceu a viabilidade das sementes.

Nas sementes recalcitrantes é comum a continuidade de acúmulo de metabólitos de reserva, como observado para outras espécies como de *Inga vera* em que observaram um aumento no teor de amido durante os estádios analisados, com maior acúmulo no estágio IV, em torno de 350 mg.g⁻¹ (CACCERE, 2010), ou em sementes de *Hevea brasiliensis* onde foi observado aumento no embrião de 2 mg.g⁻¹ (38 dias após a polinização - DAP) para 5,5 mg.g⁻¹ (195 DAP) e no tecido de reserva de 2 mg.g⁻¹ para 8,93 mg.g⁻¹ do 38 DAP para o 195 DAP (BONOME et al., 2011).

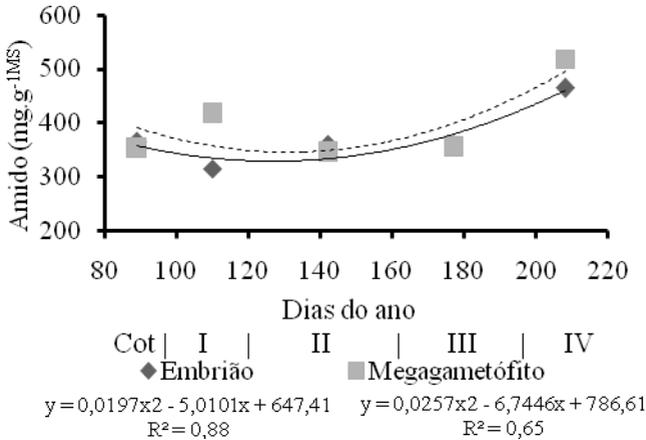


Figura 3. 3 – Amido (mg.g^{-1}) nos tecidos do embrião e megagametófito de *Araucaria angustifolia* nos estádios cotiledonar (Cot) e I, II, III e IV, no ano de 2011.

Outros compostos que vem sendo muito estudado em sementes de *A. angustifolia* são as proteínas. Nos tecidos do megagametófito do estádio cotiledonar até o estádio III observou-se em torno de $9,5 \text{ mg.g}^{-1}$ de teor proteico, com decréscimo no estádio IV para $4,3 \text{ mg.g}^{-1}$.

Na literatura, encontram-se diferentes relatos sobre os teores de proteínas do megagametófito entre os estádios cotiledonar e maduro com acréscimos até o estádio maduro, chegando a 20 mg.g^{-1} (SILVEIRA et al., 2008) ou teores semelhantes nos dois estádios ($5,3 \text{ mg.g}^{-1}$) (ASTARITA et al., 2003) ou ainda decréscimos no teor proteico (de $\pm 6 \mu\text{g.mg}^{-1}$ cotiledonar tardio para $\pm 3 \mu\text{g.mg}^{-1}$ no estádio maduro) (BALBUENA et al., 2009).

No embrião também é encontrado grande quantidade de proteína em todo o citoplasma celular (ROGGE-RENNER et al., 2012). Os resultados demonstraram decréscimos no teor proteico no embrião do estádio cotiledonar até o estádio III de $29,5 \text{ mg.g}^{-1}$ para $12,2 \text{ mg.g}^{-1}$.

O comportamento do teor proteico no embrião encontrado na literatura é semelhante ao megagametófito com acréscimos do estádio cotiledonar inicial para maduro de $0,5 \text{ mg.g}^{-1}$ para $4,6 \text{ mg.g}^{-1}$ (SANTOS et al, 2006) ou valores semelhantes nos estádios cotiledonar e maduro (em torno de 27 mg.g^{-1}) ou decréscimos de $19 \mu\text{g.mg}^{-1}$ no estádio cotiledonar tardio para $12 \mu\text{g.mg}^{-1}$ no estádio maduro (BALBUENA et al., 2009).

Comparando o teor proteico nos tecidos das sementes, observou-se uma queda mais acentuada no embrião. Este decréscimo pode estar relacionado com o aumento transitório da expressão gênica, tradução proteica e atividade metabólica (BALBUENA, 2009) ou pode indicar que a hidrólise das proteínas já iniciou, para que seus produtos sejam translocados aos pontos de crescimento do eixo embrionário para a formação dos novos tecidos, ou para as reações da cadeia respiratória que, neste caso, está em ritmo mais acelerado em relação ao megagametófito, talvez esta constatação remeta aos primeiros eventos da germinação, quando há o alongamento das células do eixo embrionário, sem que haja o acúmulo de matéria seca (GARCIA, 2012). Um dos aspectos marcantes do desenvolvimento das espécies recalcitrantes é a ausência da etapa de dessecação durante o desenvolvimento, passando diretamente do metabolismo de desenvolvimento para o de germinação (MARCOS FILHO, 2005).

Em sementes de *Durio zibethinus*, antes da abscisão dos frutos, as sementes começaram a mobilizar proteínas e amido e conseqüentemente observaram-se um declínio desses compostos (BROWN et al., 2001). O mesmo ocorrendo em sementes de *Podocarpus henkelii* em que a quantidade de proteínas diminuiu nos estádios tardios de desenvolvimento (DODD et al., 1989).

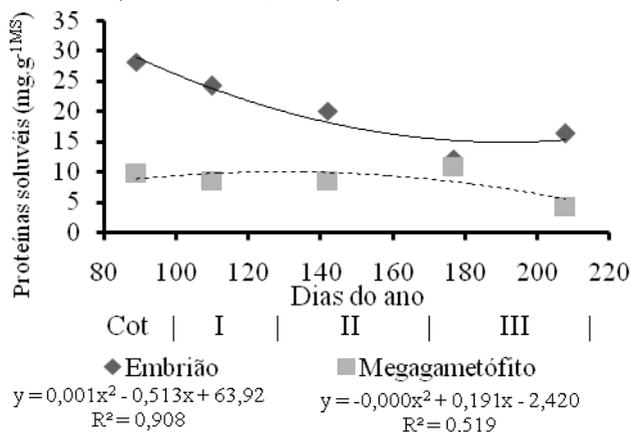


Figura 3. 4 – Teor de proteínas solúveis totais (mg.g^{-1}) nos tecidos do embrião e megagametófito de *Araucaria angustifolia* nos estádios cotiledonar (Cot) e I, II, III e IV, no ano 2011.

Assim como as proteínas e os carboidratos, os lipídios podem proteger as células das plantas contra a situações de estresse (MELLO et al., 2010). Em sementes de *A. angustifolia*, o teor de lipídios obtidos nos

diferentes estádios analisados foi em torno de 2,1 % , valores próximos ao observado na literatura entre 0,52 % a 1,58% (RAMOS; SOUZA, 1991; CORDENUNSI et al., 2004; CONFORTI; LUPANO, 2007; ABE et al., 2010) e abaixo do encontrado por Capella et al. (2009) - 7,38%.

Durante a maturidade das sementes observou-se um queda pouco acentuada no teor de lipídios. Os teores de lipídios associados aos baixos teores de carboidratos em todos os estádios podem estar relacionados aos maiores valores obtidos no teste de condutividade elétrica, pois a arquitetura central das membranas celulares é a camada dupla de lipídios (LEHNINGER et al., 2002). Os baixos teores destes compostos e a diminuição do teor proteico podem modificar a organização das membranas e conseqüentemente afetar diretamente a normalidade dos processos fisiológicos em sementes, como a germinação, a dormência, a manifestação do vigor, a tolerância à dessecação e condicionamento fisiológico (MARCOS FILHO, 2005).

Em estudo realizado com sementes recalcitrantes e ortodoxas, foram observados que eixos embrionários e cotilédones de *Eritryna speciosa* e *Caesalpinia echinata* apresentaram rendimento de lipídios muito superior às sementes recalcitrantes estudadas (*Inga vera* e *Eugenia uniflora*) (MELLO et al., 2010), dando indícios de que a maior quantidade de lipídios poderia estar associada a mecanismos de proteção contra estresse hídrico (REGO, 2012).

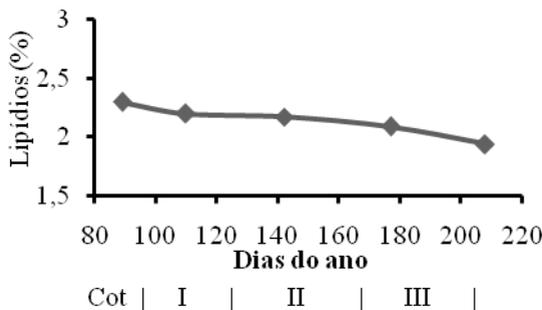


Figura 3. 5 – Teor de lipídios no megagametófito de *Araucaria angustifolia* nos estádios cotiledonar (Cot) e I, II, III e IV, no ano 2011.

Assim, os resultados demonstraram que ocorrem modificações bioquímicas mesmo após as sementes terem atingindo o máximo conteúdo de massa seca. O acúmulo de amido e carboidratos solúveis durante a maturidade das sementes contribuiu para o aumento da

viabilidade e do vigor. Os baixos teores observados de lipídios e carboidratos e o decréscimo no teor proteico podem estar relacionados à incapacidade de manter as membranas celulares organizadas nas coletas tardias, pois estes são componentes que conferem à tolerância à dessecação das sementes.

O decréscimo observado no teor proteico pode indicar uma transição do metabolismo de desenvolvimento para o da germinação. Brown et al. (2001) sugerem que as sementes que não atingem a tolerância à dessecação, armazenam e começam a mobilizar as reservas antes do desenvolvimento e poderiam ser classificadas em uma quarta categoria de comportamento das sementes, além das ortodoxas, intermediárias e recalcitrantes propostas por Farrant et al. (1997).

Com isso, há necessidade de estudos bioquímicos e ultraestruturais que relatem a mobilização dos compostos de reserva que conferem a habilidade nas sementes de se manterem viáveis por mais tempo, como características intracelulares, atividade metabólica, acúmulo de moléculas de substâncias protetoras, principalmente as proteínas tipo LEA, carboidratos e oligossacarídeos específicos.

3.4 CONCLUSÃO

O acúmulo de massa seca nas sementes de araucária estabilizou entre os estádio II e III, ou seja no momento da colheita as sementes já atingiram a máxima massa seca.

Por outro lado, os componentes bioquímicos, como carboidratos solúveis totais e amido no embrião aumentaram até o último estádio de desenvolvimento, mas o teor de proteína solúvel decresceu, o que demonstra claramente que o embrião estava em plena atividade fisiológica mesmo após estabilizar o acúmulo de massa seca.

O estádio em que os teores de carboidratos solúveis totais e amido estão elevados coincidem com o aumento na viabilidade e vigor das sementes.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Comparison of phenol content and antioxidant capacity of nuts. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 30, p. 254-259, 2010

ASTARITA, L. V. Aspectos bioquímicos e fisiológicos da embriogênese e de culturas celulares embriogênicas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000. 112 p.

ASTARITA, L.V.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W. Free amino acids, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**, v. 47, p. 53–59, 2003.

BALBUENA, T. S. **Proteômica do desenvolvimento da semente de *Araucaria angustifolia***. Tese (Doutorado em Ciências/Botânica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BARBEDO, C.J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botanica Brasilica** v. 12, p. 145-164, 1998.

BELLO-PÉREZ, L. A.; et al. Isolation and Characterization of Starch from seeds of *Araucaria brasiliensis*: A Novel Starch for Application in Food Industry. **Starch-Starke**. v. 58, p. 283-291, 2006.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2 ed. Plenum Press, New York. 1994. 445p.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n. 8, p.911-917, 1959.

BONOME, L. T. da S.; et al. Metabolism of carbohydrates during the development of seeds of the brazilian rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. de Juss) Muell.-Arg.]. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 211-219, 2011

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, n. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.

BROWN, M. J.; HOR, Y. L.; GREENWOOD, J. S. Reserve accumulation and protein storage vacuole formation during development of recalcitrant seeds of *Durio zibethinus* L. **Seed Science Research** v. 11, p. 293–303, 2001.

BRUM, A.A.S. 2004. **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. 79p.

BUCKERIDGE, M. S. et al. Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 163-185.

CACCERE, R. **Caracterização bioquímica e histo-estrutural de embriões de *Inga vera* Willd. Subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. durante a maturação e após a secagem**. 2007. 92p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010

CAPELLA, A. C. V.; PENTEADO, P. T. P S.; BALBI, M. E. Semente de *Araucaria angustifolia*: aspectos morfológicos e composição química da farinha. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 135-142, 2009.

CARVALHO, N. M. de; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p

CONFORTI, P. A.; LUPANO, C. E. Starch characterization of *Araucaria angustifolia* and *Araucaria araucana* seeds. **Starch-Starke**, v.59, p.284-289. 2007.

CORDENUNSI, B. R.; et al. Chemical Composition and Glycemic Index of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 3412-3416, 2004

CORRÊA, M. F.; HELM, C. V. Caracterização da composição nutricional do pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze). In: VII EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS. **Anais...** Colombo: Embrapa Florestas, 2009

DE CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Desenvolvimento de semente e conteúdo de água. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação do básico ao aplicado**. São Paulo, 2004.

DODD, M.C.; VAN STADEN, J.; SMITH, M.T. Seed development in *Podocarpus henkelii*: an ultrastructural and biochemical study. **Annals of Botany**. v. 64, p. 297-310, 1989.

DOS SANTOS A.L.W.; et al. Somatic Embryogenesis in Paraná Pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 97-106, 2002.

DOS SANTOS, A. L. W.; et al. Protein expression during seed during in *Araucaria angustifolia*: transient accumulation of class IV chitinases and arabinogalactan proteins. **Physiologia Plantarum**, v.127, p.138-148, 2006.

DUBOIS, M.; GILES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DYER, J. M.; et al. High-value oils from plants. **Plant Journal**, v. 54, p. 640 – 655, 2008.

FARIAS, F.L.; BURRIEZA, H.; MALDONADO. S.; STEINER, N.; GUERRA, M.P. Detecção de proteínas LEA tipo desidrinas em embriões zigóticos de *Araucaria angustifolia*. In: XVIII Congresso Brasileiro de Sementes, 2011, Natal. **Informativo Abrates**, 2011. v. 21.

FARIAS-SOARES, F.; et al. Immunoanalysis of dehydrins in *Araucaria angustifolia* embryos. **Protoplasma**, 2012 Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s00709-012-0474-7>> Acesso: 28 de dezembro de 2012.

FARRANT, J.M.; et al. Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. **Seed Science Research**, v. 7, p. 135–144, 1997.

FERNANDEZ JH **Identificação e caracterização de proteínas e genes expresso diferencialmente durante o desenvolvimento do embrião zigótico de *Araucaria angustifolia***. Tese de doutorado. Campinas. Universidade Estadual de campinas. 2001, 126p.

GARCIA, C. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze sob condições controladas de armazenamento**. 2012. 117 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012

GUERRA, M. P.; et al. Evolução, ontogênese e diversidade genética em *Araucaria angustifolia*. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. **Origem e Evolução de Plantas Cultivadas**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 149-184.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios da bioquímica**. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2002, 975p.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p

McCREADY, R. M. et al. Determination of starch and amylase in vegetables. **Analytical Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 1156-1158. 1950.

MELLO, J. I. de O.; et al. Reserve carbohydrates and lipids from the seeds of four tropical tree species with different sensitivity to desiccation. **Brazilian archives of biology and technology**. Curitiba, v. 53, n. 4, 2010

PANZA, V. et al. Storage reserves and cellular water in mature seeds of *Araucaria angustifolia*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 140, p. 273-281, 2002.

PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation tolerance. **Seed Science Research**, v. 9, p. 13-37, 1999

PIRIZ CARRILLO, V. et al. Refrigerated storage of seeds of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze over a period of 24 months. **Seed Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 411-421, 2003.

PRITCHARD, H. W; et al., A comparative study of seed viability in *Inga* species: desiccation tolerance in relation to the physical characteristics and chemical composition of the embryo. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 23, p. 85- 100. 1995

RAMOS, A.; SOUZA, G. B. Utilização das reservas alimentícias de sementes de araucária durante o armazenamento. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 22/23, p. 21-27, 1991

REIS, E. R. Maturação de sementes florestais. In: HOPPE, J. M.; et al **Produção de sementes e mudas florestais**, Caderno didático nº1, 2ª ed. Santa Maria, 2004, 388 p.

REGO, S. S. **Tolerância à desidratação e armazenamento de sementes de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) Berg. E *Casearia decandra* Jacq.** Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

ROGGE-RENNER, G.D. et al. Structural and component characterization of meristem cells in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze zygotic embryo. **Protoplasma**, Epub, 27 set 2012

SHEWRY, P.R., NAPIER, J.A., TATHAM, A.S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, p. 945-965, 1995.

SILVEIRA, V. et al. Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia*. **Biologia plantarum**. V. 52, n. 1, p. 101-104, 2008.

STEADMAN, K. J.; PRITCHARD, H. W.; DEY, P. M. Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. **Annals of Botany**. v. 77, p. 667-674. 1996

STEINER, N. **Parâmetros fisiológicos e bioquímicos durante e embriogênese zigótica e somática de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze.** Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

STEINER, N. **Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, *Pinus sylvestris* Linnaeus) e *Picea abies* (Linnaeus) Karsten: ontogênese, padrão de expressão protéica e do gene SERK.** Tese (Doutorado em Ciências/Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

TOMPSETT, P.B. Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. **Annals of Applied Botany**, v. 105, n. 3, p.581-586, 1984.

CAPÍTULO III

ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO E QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE *Araucaria angustifolia* EM PÓS-COLHEITA

4.1 INTRODUÇÃO

A longevidade das sementes durante o armazenamento é afetada pela qualidade inicial das sementes, características do ambiente, tipos de embalagem, tamanho e densidade das sementes, método de secagem, grau de umidade e estágio de desenvolvimento das sementes (JUSTICE; BASS, 1978; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; SCHMIDT, 2000; BONNER, 2008).

No armazenamento de sementes recalcitrantes, é evidente a importância do conhecimento do estágio de desenvolvimento, porque os processos de desenvolvimento e germinação são praticamente contínuos (SCHMIDT, 2000). Se a germinação não ocorre, inicia o processo de deterioração rapidamente, tornando a coleta tardia inadequada (BERJAK; PAMMENTER, 1995).

Sementes colhidas antes e depois da maturidade fisiológica apresentam menor potencial de armazenamento, por não terem atingido ainda o máximo vigor, ou por já terem iniciado o processo de deterioração (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). A causa fisiológica da capacidade de armazenamento reduzida pode ser atribuída à incapacidade de realizar alguns eventos no ciclo tardio, por exemplo, desenvolvimento embrionário incompleto, inadequada proteção da dessecação, ou formação inadequada de proteínas de reserva ou compostos químicos necessários para a capacidade de armazenamento (HONG; ELLIS, 1990).

Santana (2007), ao trabalhar com sementes de *Eugenia involucrata* em diferentes estádios de desenvolvimento, as sementes imaturas apresentaram menores porcentagens de germinação, tanto inicialmente quanto após os três diferentes períodos de armazenamento (30, 60 e 120 dias). Em sementes de *A. angustifolia* diversos estudos tem sido realizados sobre as condições de armazenamento (FOWLER et al, 1998; PIRIZ CARRILLO et al, 2002; CAÇOLA et al., 2006; GARCIA 2012) ou efeito da água/secagem das sementes (TOMPSETT, 1984; BIANCHETTI e RAMOS, 1985; EIRA et al, 1994), porém não há relatos do efeito do estágio de

desenvolvimento na conservação da viabilidade e do vigor na pós-colheita.

Teores elevados de umidade são utilizados como principal método para conservação das sementes com comportamento recalcitrante, pois estas não toleram grandes perdas de água durante o armazenamento (SANTANA, 2007), como em sementes de *Inga uruguensis* (BILIA et al. 1999), *Hevea brasiliensis* (CICERO et al. 1986), *Euterpe edulis* (ANDRADE, 2001), *E. oleraceae* (NASCIMENTO et al., 2010). Para a conservação das sementes de *A. angustifolia*, mesmo em curto prazo, deve-se procurar armazená-las logo após a colheita, com o máximo grau de umidade possível e evitar a perda de água durante esse período (EIRA et al., 1994).

O armazenamento de sementes com umidade elevada protege as que apresentam comportamento recalcitrante, permitindo a atuação de mecanismos de reparo, por outro lado, este alto grau de umidade pode proporcionar um risco de deterioração às sementes, pois permite alta taxa metabólica, consumindo importantes reservas, e favorecendo a proliferação de patógenos (SANTANA, 2007).

Com isso, o objetivo do trabalho foi determinar a conservação da qualidade fisiológica das sementes em função de coletas nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de *Araucaria angustifolia*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Coleta das amostras

As coletas das sementes foram realizadas em uma população localizada no município de Curitiba – SC, a partir do mês de março de 2012, quando os embriões estavam no estágio de desenvolvimento cotiledonar (GUERRA et al., 2008), seguindo com coletas mensais até julho nos estádios I, II e III.

As coletas foram realizadas em uma população com aproximadamente 50 árvores, de forma aleatória totalizando 10 estróbilos femininos coletados em cada estágio. Após cada coleta, os estróbilos foram debulhados manualmente retirando-se as sementes danificadas, e posteriormente homogeneizadas para obter a amostra de trabalho, no qual foi subdividida em quatro repetições.

As sementes foram armazenadas em refrigerador (8 ± 2 °C), em embalagens plásticas transparentes vedadas com porosidade de 0,015 μm e aos 60 e 120 dias de armazenamento realizaram-se os testes: grau de umidade, massa de mil sementes, germinação, tetrazólio, índice de

velocidade de germinação, condutividade elétrica e comprimento raiz e parte aérea.

4.2.2 Grau de umidade

As sementes foram cortadas transversalmente e determinou-se o grau de umidade e massa seca pelo método de estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, com 2 repetições de 3 sementes (BRASIL, 2009).

4.2.3 Teste de viabilidade

Teste de germinação

As sementes foram previamente desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio (2%, v/v), por 3 minutos e posteriormente submetidas a um corte para remoção de aproximadamente 3 mm da ponta de cada semente (MOREIRA-SOUZA; CARDOSO, 2003). O teste foi conduzido com 4 repetições de 25 sementes em bandejas com vermiculita, em câmara germinativa a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob foto período de 12 horas por 70 dias.

Teste de tetrazólio

As sementes foram imersas em água durante 18 horas, e em seguida separaram-se o embrião do tegumento e tecido nutritivo com auxílio de estilete, para posterior imersão em solução de tetrazólio 0,1% a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora, utilizando-se 4 repetições de 25 sementes (OLIVEIRA et al., 2009). Para a análise do teste de tetrazólio, os embriões foram classificados em viáveis ou inviáveis de acordo com a coloração e aspecto dos tecidos, extensão dos danos, e pela localização destas colorações em relação às áreas essenciais ao crescimento.

4.2.4 Testes de vigor

Índice de velocidade de germinação - IVG

As contagens foram feitas a cada três dias, a partir do início da germinação, por meio da fórmula proposta por Maguire (1962).

$$IVG = \frac{\sum (NSG/DAI)}{n}$$

Onde:

NSG: número não acumulado de sementes germinadas;

DAI: número de dias após instalação do teste.

Comprimento da parte aérea e raiz principal

No final do teste de germinação, ou seja, aos 70 dias mediu-se o comprimento da parte aérea das plântulas (medição da parte aérea até o cotilédone) e das raízes (inserção do cotilédone até a ponta inferior da raiz principal), em centímetros por plântula (KORNDÖRFER et al, 2008).

Condutividade Elétrica

Utilizaram-se 4 repetições com 10 embriões, embebidos em 75 mL de água destilada e mantidos a 25 °C, conforme Medeiros e Abreu (2007), realizando-se leituras em 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas de embebição. Nos respectivos tempos realizou-se a determinação da condutividade elétrica da solução através do condutivímetro portátil Quimis modelo Q795, e os resultados foram expressos em $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$ de sementes.

4.2.5 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em parcela subdividida com quatro estádios (cotiledonar e I, II e III) em três tempos de armazenamento em refrigerador a 8 °C (0, 60 e 120 dias), com quatro repetições para cada tratamento. Os resultados obtidos em porcentagem, como germinação, tetrazólio, primeira contagem de germinação foram transformados em $\arcsen\sqrt{(x/100)}$ e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras recém colhidas no estádio cotiledonar e após 60 dias de armazenamento apresentaram próximo a 66% de umidade. Enquanto para as sementes colhidas nos estádio II e III, observou-se um decréscimo em torno de 4% até os 120 dias de armazenamento.

Garcia (2012) observou acréscimos de 4% na umidade entre as sementes de *A. angustifolia* recém colhidas e após o armazenamento em refrigerador a 5 °C por 60 dias. Enquanto Carillo et al., (2004) observaram acréscimos em torno de 10% nos primeiros 12 meses de armazenamento em refrigerador a 4 °C.

O resultado observado no estádio I, em que o grau de umidade das sementes não apresentou variações durante o armazenamento foi similar ao observado por Martins et al., (2011) em que as sementes de *A. angustifolia* apresentaram entre 39 – 42% de umidade no armazenamento a 5 °C por até 420 dias. Com isso, notou-se que o a

manutenção do grau de umidade das sementes durante o armazenamento pode ser variável e dependente do momento de colheita das sementes visto que as sementes apresentaram teores variáveis em função da época de coletada nos respectivos tempos de armazenamento avaliados.

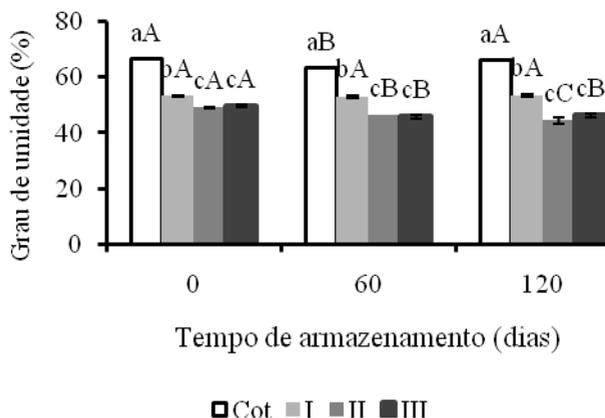


Figura 4. 1 – Grau de umidade das sementes nos estádios cotiledonar (Cot) e I, II e III recém colhidas e armazenadas por 60 e 120 dias em refrigerador (8 ± 2 °C).

As letras referem-se ao teste de Tukey para separação de médias ao nível de 5 % de probabilidade sendo: minúscula – diferenças entre os estádios de desenvolvimento e maiúscula – diferença entre os tempos de armazenamento dentro de cada estádio.

No estádio cotiledonar, a porcentagem de germinação das sementes foi favorecida pelo armazenamento por 60 e 120 dias, com 86% e 93%, respectivamente. Contudo, quando as sementes estavam no estádio de desenvolvimento à viabilidade das sementes manteve-se constante (estádios I e III) ou decresceu (estádio II). Em outros trabalhos observou-se diferentes resultados para sementes de *A. angustifolia*, com decréscimos de 31% após o armazenamento por 120 dias em refrigerador a 5 °C (GARCIA, 2012) ou acréscimos em torno de 44% na germinação das sementes armazenadas a 5 °C por 60/ 120/240/420 dias em relação as sementes recém colhidas (MARTINS et al., 2011) ou aumento de 2,5 vezes na germinação das sementes recém colhidas em relação ao armazenamento por 4 a 6 meses a 4 °C (PIRIZ CARILLO et al., 2004).

Martins et al., (2011) atribui este acréscimo na porcentagem de germinação de sementes de *A. angustifolia*, ao período de coleta das

sementes, no qual foi realizada provavelmente antes da maturidade fisiológica.

Em outras espécies com comportamento recalcitrante, também foi verificado que a viabilidade das sementes na pós colheita é influenciada pelo estágio de desenvolvimento, com favorecimento da germinação nas sementes coletadas precocemente e posteriormente armazenadas, como em sementes imaturas de *Eugenia pyriformis* em que foi observado aumento em 30% na porcentagem de germinação após o armazenamento por 30 dias a 12 °C (SANTANA, 2007) e, em *Psidium guajava*, em que as sementes oriundas de frutos amarelos armazenados a 10 °C por 13 dias foi observado maior emergência de plântulas dentre todos os outros tratamentos (MELO et al., 2011).

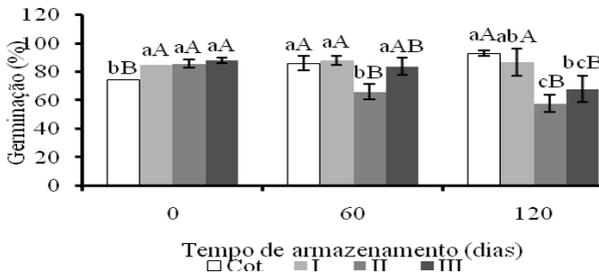


Figura 4. 2 – Germinação (%) de sementes de *A. angustifolia* recém colhidas nos estádios de desenvolvimento submetidas ao armazenamento em refrigerador 8 a 10 °C por 60 e 120 dias.

As letras referem-se ao teste de Tukey ($P < 0,05$), sendo: minúscula – comparação entre estádios de desenvolvimento dentro de cada tempo de armazenamento; maiúscula – comparam o desempenho de cada estágio ao longo do tempo de armazenamento.

A viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio demonstrou que as sementes do estágio cotiledonar recém colhidas e armazenadas por 60 e 120 dias apresentaram estáveis em relação a viabilidade, em torno de 90%. O mesmo ocorrendo nos estádios I e II, em torno de 83%. Já no estágio III, observaram-se decréscimos na viabilidade durante o armazenamento, com queda de 18% e 32% aos 60 e 120 dias, respectivamente.

Os resultados do teste de germinação e tetrazólio nos estádios I, II e III tiveram uma correlação positiva acima de 0,92, contudo no estágio cotiledonar essa correlação foi negativa, pois a viabilidade das sementes recém colhidas avaliadas pelo teste de tetrazólio foi superior em 25% em relação ao teste de germinação. Diferenças entre os testes de

germinação e tetrazólio pode ser causada pela presença dormência (PIÑA-RODRIGUES et al., 2005), mesmo quando as sementes estão dormentes não há interferência nos resultados de viabilidade pelo teste de tetrazólio.

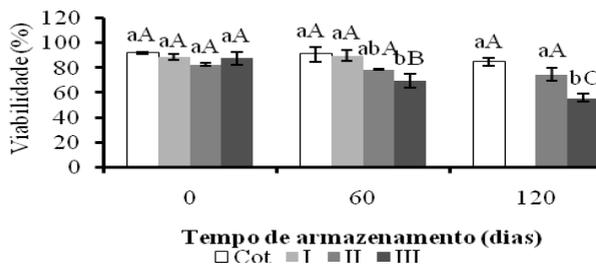


Figura 4. 3 – Viabilidade de sementes de *Araucaria angustifolia* pelo teste de tetrazólio no estágio cotiledonar e I, II e III submetida ao armazenamento em refrigerador (8 a 10 °C) por 0, 60 e 120 dias.

As letras referem-se ao teste de Tukey ($P < 0,05$), sendo: minúsculas – comparação entre estádios de desenvolvimento; maiúsculas – comparam o desempenho de cada estádio ao longo do tempo de armazenamento.

No processo de deterioração, antes da perda de viabilidade podem ocorrer mudanças na integridade do sistema de membranas, com aumento da taxa de liberação de solutos quando as sementes são embebidas. Um dos testes que avaliam indiretamente a permeabilidade seletiva das membranas é o teste de condutividade elétrica (MARCOS FILHO, 2005).

Os resultados demonstraram que as sementes recém colhidas no estágio cotiledonar apresentaram maior liberação de solutos em comparação com as sementes armazenadas por 60 e 120 dias. Provavelmente, o sistema de membranas das sementes recém colhidas não estava completamente organizado, pois estas ainda estavam desenvolvendo-se.

Após o armazenamento, esta liberação diminuiu, indicando que durante o armazenamento o sistema de membranas organizou-se ao invés de iniciar o processo de deterioração com a desestruturação das membranas. Já no estágio I, as sementes mantiveram-se estáveis durante o armazenamento, por 60 dias. E nos estádios II e III observou-se um aumento na liberação de solutos com o avanço do tempo de armazenamento, indicando perda de vigor das sementes.

Garcia (2012), trabalhando com sementes de *A. angustifolia*, também observou aumento nas leituras da condutividade elétrica das

sementes recém colhidas e após o armazenamento por 60 e 120 dias. Resultados semelhantes foram observados em sementes de *Hevea brasiliensis*, com aumento na condutividade elétrica após o armazenamento por 60 dias indicando sementes menos vigorosas (PAULA et al., 1997).

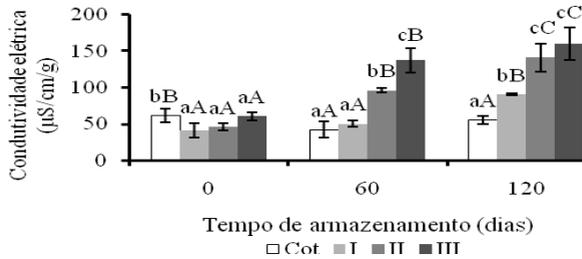


Figura 4. 4 – Condutividade elétrica de sementes de *Araucaria angustifolia* no estágio cotiledonar e I, II e III submetida ao armazenamento em refrigerador por 60 e 120 dias.

As letras referem-se ao teste de Tukey ($P < 0,05$), sendo: minúsculas – comparação entre estádios de desenvolvimento; maiúsculas – comparam o desempenho de cada estádio ao longo do tempo de armazenamento.

Os resultados do IVG indicaram que as sementes no estágio cotiledonar armazenadas por 120 dias com IVG de 0,98 são mais vigorosas do que as sementes recém colhidas e armazenadas por 60 dias com 0,22 e 0,54, respectivamente. No estágio I e III, o armazenamento também favoreceu a velocidade de germinação das sementes com aumento do IVG em torno de 0,25 das sementes recém colhidas para as sementes armazenadas por 60 dias, enquanto no estágio II o IVG manteve-se estável.

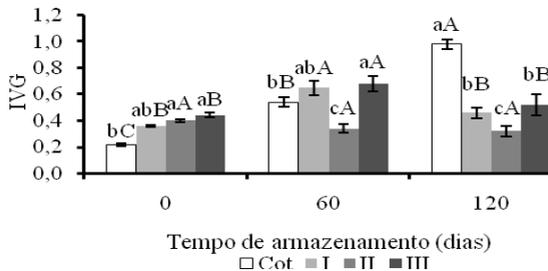


Figura 4. 5 – Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Araucaria angustifolia* no estágio cotiledonar e I, II e III submetida ao armazenamento em refrigerador por 60 e 120 dias.

As letras referem-se ao teste de Tukey ($P < 0,05$), sendo: minúsculas – comparação entre estádios de desenvolvimento; maiúsculas – comparam o desempenho de cada estágio ao longo do tempo de armazenamento.

Os resultados do comprimento da raiz e parte aérea foram semelhantes ao IVG para o estágio cotiledonar, observando maiores valores conforme o tempo de armazenamento atingindo 23,4 cm de raiz e 13,16 cm de parte aérea nas sementes armazenadas por 120 dias, o mesmo ocorrendo no estágio I, com aumento de 10,8 cm (recém colhidas) para 28,5 cm no comprimento de raiz, após ao armazenamento por 120 dias. Já nos estádios II e III observou-se comportamento inverso, em que conforme o aumento no tempo de armazenamento, observou-se menores valores no comprimento da raiz e parte aérea.

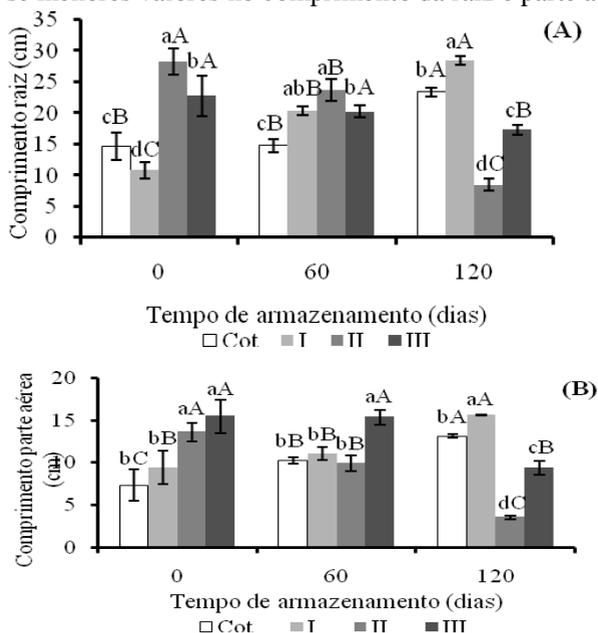


Figura 4. 6 – Comprimento de raiz (A) e parte aérea (B) de plântulas de *Araucaria angustifolia* após 70 dias do início do teste de germinação provenientes de sementes no estágio cotiledonar e I, II e III submetida ao armazenamento em refrigerador por 60 e 120 dias.

As letras referem-se ao teste de Tukey ($P < 0,05$), sendo: minúsculas – comparação entre estádios de desenvolvimento; maiúsculas – comparam o desempenho de cada estádio ao longo do tempo de armazenamento.

Em trabalho realizado por Caçola et al. (2006) foi observado maior comprimento da parte aérea das plântulas e maior velocidade de germinação das sementes de *A. angustifolia* armazenadas durante 60 dias, atribuindo este resultado a presença de dormência nas sementes recém colhidas e com possível eliminação da dormência após o período de exposição a baixas temperaturas, que variaram entre 0 °C e 1°C. Piriz Carrillo et al. (2003) também atribuíram o aumento na viabilidade durante o armazenamento a dormência inicial, sendo posteriormente eliminada pelo armazenamento refrigerado. Geralmente, o armazenamento a baixas temperaturas é um tratamento utilizado para dormência embrionária (BORGHETTI, 2004).

Outros autores atribuíram a presença do tegumento externo (brácteas) para o atraso no processo de germinação das sementes de *A. angustifolia* (DONI FILHO, 1985; ANGELI; STAPE, 2003) devido à restrição à entrada de água ocasionada pelo impedimento do tegumento (SOARES; MOTA, 2004). Entretanto, no presente trabalho as sementes foram submetidas a um corte para remoção de aproximadamente 3 mm da ponta das sementes para facilitar e uniformizar a germinação conforme recomendado por Moreira-Souza e Cardoso (2003).

Com isso, nota-se que o aumento da germinação nas sementes nos estádios cotiledonar e I não foi causada pela restrição à entrada de água, uma vez que o corte permitiu a entrada destas nas sementes. Os resultados desses diferentes trabalhos podem sugerir a ocorrência de dois tipos de dormência causada pelo tegumento e o embrião, como em sementes de castanha do pará (*Bertholletia excelsa*) que apresentam dormência atribuída ao revestimento de semente e ao embrião (KAINER et al., 1999)

Ao final do teste de germinação das sementes no estádio cotiledonar recém colhidas e após o armazenamento por 60 dias algumas sementes, 11% e 9% respectivamente, não germinaram, os cotilédones aumentaram de tamanho, porém não ocorreu o alongamento do eixo embrionário (Figura 4.6). Uma hipótese para este fato, é que neste estádio as sementes ainda não haviam completado seu desenvolvimento, ocorrendo impedimentos metabólicos para que ocorra o alongamento do eixo embrionário, que pode ser causado pelo balanço entre fitormônios promotores e inibidores de germinação (BORGHETTI, 2004).

Um dos hormônios que inibe a germinação durante o desenvolvimento é o ácido abscísico – ABA (MARCOS FILHO, 2005), existindo um pico de acúmulo deste hormônio entre as fases intermediária e tardia da embriogênese (TAIZ; ZEIGER, 2006). Em sementes de *A. angustifolia* este acúmulo foi observado no estágio cotiledonar (SILVEIRA et al., 2008). Para afirmar a relação do ABA com a germinação das sementes de *A. angustifolia* outros trabalhos são necessários para detecção do ABA por cromatografia gasosa ou líquida de alta eficiência e imunoenaios (TAIZ; ZEIGER, 2005).

A hipótese da ocorrência de dormência no estágio cotiledonar é reforçada através dos resultados superiores obtidos pelo teste de tetrazólio em relação ao teste de germinação no estágio cotiledonar, sendo que este teste é indicado para sementes que apresentam dormência (BRASIL, 2009).



Figura 4. 7 – Corte transversal de sementes no estágio cotiledonar de *A. angustifolia* após 60 dias do teste de germinação a 25 °C.

Outra hipótese para o aumento da viabilidade e vigor das sementes de *A. angustifolia* no estágio cotiledonar e I é que as sementes passaram por um amadurecimento artificial, devido o acréscimo na massa fresca e seca dos embriões com aumento do tempo de armazenamento (Figura 4.8). Este amadurecimento artificial foi observado em algumas espécies de coníferas, onde o armazenamento dos estróbilos coletados anteriormente ao desenvolvimento, amadureceram durante o armazenamento, enquanto que aquelas coletados mais tarde deterioraram-se no armazenamento, demonstrando um possível atraso no processo de deterioração das sementes colhidas precocemente (HUSS, 1951; REDISKE, 1969 ; BARNETT; MCLEMORE, 1970; apud EDWARDS, 1980).

Em sementes de *Acer saccharinum* a atividade mitótica nos meristemas do embrião não diminuiu no último período do desenvolvimento, mesmo com o decréscimo da sua umidade as células

continuaram em divisão, isto é, continuaram a crescer, dando suporte ao ponto de vista de Berjak et al., (1989) relataram que em sementes recalcitrantes podem continuar o desenvolvimento após dispersão (KOZEKO; TROYAK, 2000).

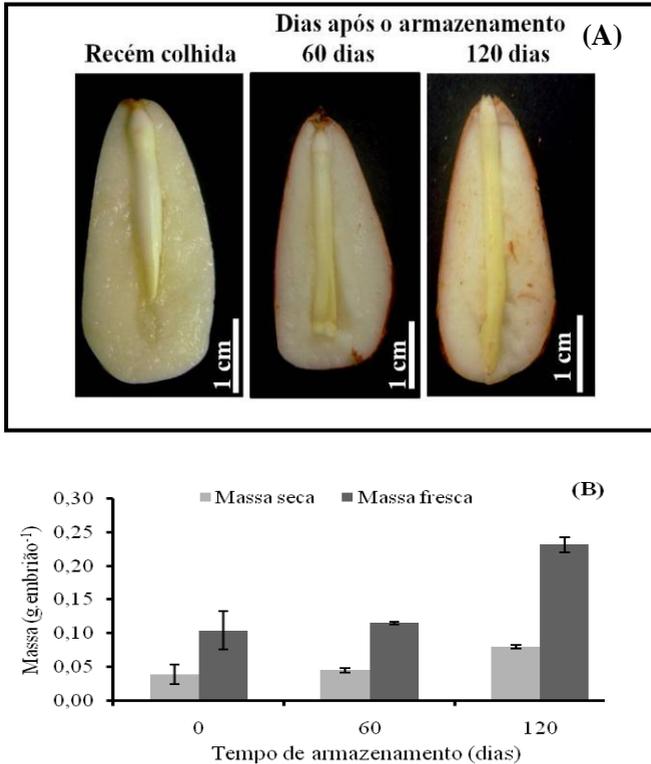


Figura 4. 8 – (A) Corte transversal de sementes e (B) massa fresca e seca dos embriões de *Araucaria angustifolia* no estágio cotiledonar recém colhida e após o armazenamento por 60 e 120 dias.

As sementes recalcitrantes de algumas espécies são dispersas quando o eixo embrionário ainda não completou o desenvolvimento. Estas desde que não percam água, podem ser armazenadas pelo tempo necessário para que o desenvolvimento do eixo embrionário esteja completo. Em outros casos, semente recalcitrantes são dispersas com o desenvolvimento completo porém o período de armazenamento capaz de manter o vigor das sementes, será menor. Um indicador de que este período está no fim é a extensa vacuolização celular (BERJAK;

PAMMENTER, 2000), por isso outros estudos envolvendo anatomia das sementes são recomendados.

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram verificar que a conservação na pós-colheita de sementes de *A. Angustifolia* é mantida quando se coleta as sementes no estágio cotiledonar e I. Este comportamento foi diferente do observado na literatura, pois geralmente semente recalcitrantes tendem a iniciar o processo de deterioração após sua coleta pois mantem elevada atividade metabólica, no entanto estas coletas normalmente são realizadas em estágio mais tardios.

Por outro lado, há perspectivas para outros trabalhos visando aumentar a longevidade das sementes, como a redução do grau de umidade nos diferentes estádios de desenvolvimento. Técnica eficaz que vem sendo aplicada para prolongar a longevidade de algumas espécies com comportamento recalcitrante, como em sementes de *Hopea hainanensis* (LAN et al., 2012).

4.4 CONCLUSÃO

A conservação pós-colheita da viabilidade e vigor de sementes de *A. angustifolia* foi influenciada pelo momento de colheita, sendo mantida por maior período quando coletadas precocemente no estágio cotiledonar e I.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A.C.S. The effect of content and temperature on the longevity of heart of palm seeds (*Euterpe edulis*). **Seed Science and Technology**, v. 29, n.1, p. 171-182, 2001.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. Recalcitrant (desiccation-sensitive) seeds. In: Innovations in Tropical Tree Seed Technology. Proceedings of the IUFRO Symposium of the Project Group P.2.04.00, 'Seed Problems'. Arusha, Tanzania 1995. p. 14-29.

ANGELI, A.; STAPE, J.L. **Araucaria angustifolia (araucária)**. Piracicaba: IPEF, 2003. Disponível em: <<http://www.ipef.br/identificacao/araucaria.angustifolia.asp>>. Acesso em: 08 de dezembro de 2012.

BERJAK, P.; FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W. The basis of recalcitrant seed behaviour. In: Taylorson, R.B. (Ed.) **Recent advances**

in the development and germination of seeds. New York, Plenum Press. p. 89–108, 1989.

BIANCHETTI, A.; RAMOS, A. Efeito da temperatura de secagem sobre o poder germinativo de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Curitiba, n.2, p.27- 56, 1981.

BILIA, D.A.C.; MARCOS FILHO, J.;NOVEMBRE, A.D.C.L. Conservação da qualidade fisiológica de sementes de *Inga uruguensis*Hook. et Arn. **Revista Brasileira de Sementes** v. 20, p. 48-54, 1998.

BONNER, F. T. Storage of seeds. In: BONNER, F. T.; KARRFALT, R. P. NISLEY, R. G. (Eds.) **The woody Plant Seed Manual**. USDA Forest Service, Agricultural Handbook 727, p. 85 – 95, 2008.

BORGHETTI, F. Dormência embrionária. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 109-123.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.

CAÇOLA, Á. V. et al. Qualidade fisiológica de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze submetidas a diferentes condições de armazenamento e a escarificação. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 391-398, 2006

CARVALHO, N. M. de; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.

DONI FILHO, L. AMARAL, L.; CERVI, P.H. Métodos para testar o poder germinativo das sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze.**Revista Brasileira de sementes** v. 7, n. 2, p. 113-124, 1985.

EDWARDS, D.G.W. Maturity and quality of tree seeds- a state of the art review. **Seed Science and Technology**, v. 8, p.625–657, 1980

EIRA, M. T. S, et al. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze - Araucariaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, n. 1, p.71-75, 1994.

FOWLER, J. A. P.; BIANCHETTI, A.; ZANON, A. **Conservação de sementes de pinheiro-do-paraná sob diferentes condições de ambientes e embalagens**. Colombo: Embrapa-CNPQ, 1998. 4 p. (Comunicado Técnico, 34).

HONG, T.D.; ELLIS, R.H. A comparison of maturation drying, germination and desiccation tolerance between developing seeds of *Acer pseudoplatanus* L. and *A. platanoides* L. **New Phytologist**, v. 116, p. 589-596, 1990.

GARCIA, C. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze sob condições controladas de armazenamento**. 2012. 117 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012

GUERRA, M. P.; et al. Evolução, ontogênese e diversidade genética em *Araucaria angustifolia*. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. **Origem e Evolução de Plantas Cultivadas**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 149-184.

JUSTICE, L. O.; BASS, N. L. Principles and practices of seed storage. **USDA agriculture handbooks N. 506**. Washington. United States Department of Agriculture, 1978. 298 p

KAINER, K. A.; et al. Moist storage of Brazil nut seeds for improved germination and nursery management. **Forest Ecology and Management**, v. 116, p. 207-217, 1999.

KOZEKO, L. E.; TROYAN, V. M. The relationship between the mitotic activity and moisture content of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum* (L.) during maturation, postmaturation drying and germination. **Seed Science Research**, v. 10, n. 3, p. 225-232, 2000.

KORNDÖRFER, C. L.; MÓSENA, M.; DILLENBURG, L. R. Initial growth of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) under equal soil volumes but contrasting rooting depths. **Trees**, v. 22, p. 835-841, 2008.

LAN, Q.Y.; et al. Development and storage of recalcitrant seeds of *Hopea hainanensis*. **Seed Science and Technology**, v.40,p. 200-208, 2012.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p

MARTINS, M. S.; TONETTI, O. A. O.; FARIA, J. M. R. Storage of *Araucaria angustifolia* seeds. In: 10th International Conference of the International Society for Seed Science, 2011, Costa do Sauípe. **Informativo Abrates**. Londrina, PR: Abrates, v. 21, n. 1, p. 277, 2011.

MEDEIROS, A. C. S.; ABREU, D. C. A. de. Desidratação ultra-rápida de embriões. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 54, p. 119-125, 2007.

MELO, A. P. C.; et al.,Efeito do estágio de maturação e armazenamento de frutos na emergência de araçá.In: XVII Congresso Brasileiro de Sementes, 2011, Natal. **Informativo Abrates**. Londrina: Abrates, v.21, 2011.

MOREIRA-SOUZA, M.; CARDOSO, E. J. B. N.. Método prático para germinação de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. sementes. **Scientia agrícola** , Piracicaba, v. 60, n. 2, 2003.

NASCIMENTO, W.M.O. Conservação de sementes de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart).**Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1, p. 24-33, 2010

PIRIZ CARRILLO, V. et al. Refrigerated storage of seeds of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze over a period of 24 months. **Seed Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 411-421, 2003.

OLIVEIRA, L. M. et al. Tetrazolium test in *Araucaria angustifolia* seeds. In: XIII Congresso Florestal Mundial, 2009, Buenos Aires. XIII Congresso Florestal Mundial, 2009.

PAULA, N. F.; et al. Alterações fisiológicas em sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell.Arg.) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 19, n. 2, p. 326-333, 1997.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C. Testes de qualidade. . In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação do básico ao aplicado.** . Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 283-297

PIRIZ CARRILLO, V. et al. Refrigerated storage of seeds of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze over a period of 24 months. **Seed Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 411-421, 2003.

SANTANA, P. J. A. **Maturação, secagem e armazenamento de sementes de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae).** Dissertação (Mestrado em Biodiversidade vegetal e meio ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo, 2007

SCHMIDT, L. **Guide to Handling Tropical and Subtropical Forest Seed**, Danida Forest Seed Centre.511 p.

SOARES, T. S.; MOTA, J. H. Araucária – o pinheiro brasileiro. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, ano II, n. 3, 2004.

Disponível

em:

www.revista.inf.br/florestal04/pages/resenhas/revisao01.htm

Acesso em: 18 de dezembro de 2012.

TOMPSETT, P.B. Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. **Annals of Applied Botany**, v. 105, n. 3, p.581-586, 1984.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

No presente estudo foram obtidos resultados relevantes e inéditos sobre a maturidade e conservação pós-colheita em sementes de *Araucaria angustifolia*. Alterações na morfologia das pinhas, na viabilidade, no vigor e nos componentes bioquímicos das sementes foram obtidos, permitindo caracterizar os estádios de desenvolvimento.

Os quatro estádios de desenvolvimento estabelecidos no presente estudo, anteriormente eram considerados como um único estágio, porém os resultados demonstraram que ocorreram alterações fisiológicas, com aumento na viabilidade e no vigor das sementes coletadas no último estágio. A conservação pós-colheita, por até 120 dias foi favorecida pelas coletas precoces; e o acúmulo dos componentes bioquímicos favoreceram à qualidade fisiológica das sementes no momento da colheita, mas podem ser a causa da rápida perda de viabilidade quando as sementes foram colhidas maduras (estádio IV).

A variação constatada nos diferentes estádios de desenvolvimento demonstrou que a conservação da viabilidade e do vigor das sementes é dependente da época de coleta, observando uma mudança na coloração das pinhas de verde para marrom e um incremento na porcentagem de germinação e nos parâmetros de vigor, como índice de velocidade de germinação, primeira contagem e comprimento da raiz e parte aérea nas coletas tardias. Contudo, resultados inversos foram obtidos no teste de condutividade elétrica, em que, no último estágio, as sementes apresentaram menor vigor pela maior liberação dos exsudatos, indicando o início da deterioração, pela menor integridade do sistema de membranas celulares das sementes.

Geralmente, os teores de lipídios e os carboidratos estão relacionados à tolerância a dessecação. No presente trabalho foram observados baixos teores desses compostos explicando, em partes, o comportamento recalcitrante da araucária, ou seja, possivelmente estes compostos não exerceram a total proteção à desidratação, como ocorre em sementes ortodoxas.

Os resultados de teor protéico indicaram uma hidrólise desse composto durante a maturidade das sementes, podendo estar associado ao início do processo de germinação ou de deterioração. Em muitas espécies recalcitrantes, o processo de desenvolvimento e germinação é praticamente contínuo. Já o acúmulo dos teores de amido, composto considerado a principal reserva das sementes de araucária, parecem ter favorecido a viabilidade das sementes na última coleta.

As sementes de araucária mantêm elevada atividade metabólica em todos os estádios analisados, não diminuindo o metabolismo dos compostos de reservas. Trabalhos que relacionem a qualidade fisiológica com os componentes bioquímicos são importantes para compreender os mecanismos envolvidos na maturidade das sementes, além de darem suporte para escolha da época de coleta.

A maior lixiviação de solutos na última coleta observada pelo teste de condutividade elétrica, demonstrou que há a necessidade de um maior aprofundamento de estudos relacionados às alterações que ocorrem a nível ultraestrutural das sementes, com a finalidade de observar a integridade das membranas celulares.

A conservação pós-colheita de sementes coletadas precocemente pode dar perspectivas para a manutenção da viabilidade e do vigor das sementes de *Araucaria angustifolia* durante armazenamento por maiores períodos.

Estudos voltados para este tema, bem como a compreensão dos mecanismos envolvidos nos controles estrutural e quantitativos dos compostos de reserva envolvendo bioquímica, fisiologia e ecofisiologia possibilita a utilização de novas tecnologias para auxiliar a produção de melhores alimentos e uma inserção ecológica mais segura do homem e sua tecnologia na natureza (BUCKERIDGE et al., 2004).

Os temas abordados no presente estudo associados ao manejo adequado das áreas remanescentes podem permitir um grande avanço para a conservação deste importante recurso genético, podendo ainda ser empregados como ferramentas em outras técnicas de conservação da espécie.