

**ESTUDO DA SENSIBILIDADE À
DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE
Eugenia handroana D. Legrand (MYRTACEAE)**

TATHIANA ELISA MASETTO

2005

TATHIANA ELISA MASETTO

ESTUDO DA SENSIBILIDADE À DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE
Eugenia handroana D. Legrand (MYRTACEAE)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Florestas de Produção, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Antonio Claudio Davide

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Masetto, Tathiana Elisa

Estudo da sensibilidade à dessecação em sementes de *Eugenia handroana* D.
Legrand (Myrtaceae)/ Tathiana Elisa Masetto. – Lavras: UFLA, 2005.
60 p. : il.

Orientador: Antonio Claudio Davide
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Germinação. 2. Tetrazólio 3. Raios X. 4. Tolerância à dessecação.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.9562

TATHIANA ELISA MASETTO

**ESTUDO DA SENSIBILIDADE À DESSECÇÃO EM SEMENTES DE
Eugenia handroana D. Legrand (Myrtaceae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Florestas de Produção, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 30 de novembro de 2005

Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, PhD

DCF/UFLA

Dr. Claudio José Barbedo

IBt/SP

Prof. Dr. Antonio Claudio Davide


UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

“- A fruta, entende? Não é o objetivo da árvore (...). Uma laranjeira é uma árvore que só existe para produzir outras árvores iguais a ela. Ela é apenas um veículo de sua própria semente, como nós somos a embalagem da vida. A fruta é uma etapa, não é o fim (...). A própria fruta se soubesse a importância que nós lhe damos, enrubesceria como uma maçã na sua modéstia (...). O importante é a semente. É a ânsia, é o ácido, é o que nos traz de pé nesta vida. (...) A própria planta é um artifício da semente para se recriar”.

Luis Fernando Verissimo

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciências Florestais.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante o curso.

Aos meus pais, Nelson e Jovina, por todo amor dedicado a mim e a minha irmã, sempre na busca de nos tornar seres humanos cada vez melhores.

À minha irmã Patrícia, pelo afeto e apoio que apesar da distância, sempre senti muito presente.

Aos meus familiares, pelo carinho e incentivo.

Ao Prof. A. Cláudio Davide, não só pela confiança e oportunidade, mas, principalmente pela amizade com que sempre me acolhe.

Ao Prof. E. A. Amaral da Silva, pela disposição, amizade e ensinamentos durante o curso.

Ao Prof. Zé Marcio, pela dedicação, entusiasmo e bom humor com que sempre me transmite seus conhecimentos.

Ao Dr. Claudio Barbedo (IBt-SP), pela atenção e colaboração no trabalho.

Ao Rodrigo pelo carinho, companhia e apoio constantes.

À Kírie, pela amizade sincera dedicada ao longo desses anos.

Aos amigos: Lia, Fran, Marcela, Livia, Fer, Fernanda, Allininha, Elvis, Enio, Espeto, Fabrício, Guto, Luciana e tantos outros que passaram pela minha vida durante o curso. Agradeço pela convivência familiar ao longo desses anos e pelo sentido especial que dão a minha vida.

Aos amigos da pós-graduação do DCF, Carol, Lilian, Adauta, Evandro, Fábio, Gleyce, Wendy, Daniel e Anderson, pela convivência e solidariedade durante esse período.

À Sue Ellen (bolsista FAPEMIG), pela disposição e auxílio nas avaliações dos experimentos.

Aos amigos do LSF, nas pessoas de Olívia, Letícia, Zé Pedro, Zé Carlos, Dani, Gui e Juliano, pela convivência e amizade essenciais para tornar esta jornada mais alegre e serena.

Aos funcionários do Laboratório de Melhoramento Florestal, Laboratório de Análise de Sementes e Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA, pelo auxílio ao cederem seus espaços e equipamentos para a condução desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT.....	ii
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I: Avaliação da qualidade de sementes de <i>Eugenia handroana</i> D. Legrand (Myrtaceae) pelos teste de germinação e tetrazólio	
1 RESUMO	4
2 ABSTRACT	5
3 INTRODUÇÃO	6
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
6 CONCLUSÕES.....	21
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
CAPÍTULO II: Avaliação da qualidade de sementes de <i>Eugenia handroana</i> D. Legrand (Myrtaceae) pelo teste de raios X	
1 RESUMO	27
2 ABSTRACT	28
3 INTRODUÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÕES.....	37
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
CAPÍTULO III: Avaliação da tolerância à dessecação e integridade do DNA em sementes de <i>Eugenia handroana</i> D. Legrand (Myrtaceae)	
1 RESUMO	42
2 ABSTRACT.....	43
3 INTRODUÇÃO	44
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÕES.....	57
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

RESUMO

MASETTO, Tathiana Elisa. **Estudo da sensibilidade à dessecação em sementes de *Eugenia handroana* D. Legrand (Myrtaceae)**. 2005. 60 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Com o objetivo de estudar a tolerância à dessecação e analisar a integridade do DNA e os procedimentos dos testes de germinação, tetrazólio e raios X para a avaliação da qualidade de sementes de *Eugenia handroana*, foram conduzidos experimentos utilizando sementes provenientes de diversas matrizes localizadas na região de Lavras, MG. Para a avaliação quanto à tolerância à dessecação, as sementes foram mantidas em sala de secagem com temperatura e umidade controladas (20°C e 60% UR), até que fossem obtidas sementes com diferentes percentuais de umidade (30%, 25%, 20%, 15%, 10% e 5%) e em cada ponto obtido foi realizado teste de germinação. Foi extraído o DNA a partir das sementes submetidas à desidratação e comparado com o padrão de DNA de sementes não desidratadas de goiaba (*Psidium guajava*). No teste de germinação foram avaliados os substratos areia autoclavada e rolo de papel sob as temperaturas de 20°C, 25°C, 30°C e 35°C com luz branca constante e a temperatura alternada de 20°C/30°C, com dez horas de escuro para a temperatura mais baixa e catorze horas de luz para a temperatura mais elevada. Para o teste de tetrazólio foram utilizadas as concentrações de 0,5%, 0,1% e 0,075% de sal de tetrazólio durante 4, 8 e 12 horas no escuro a 30°C. No teste de raios X as sementes foram colocadas em suportes de isopor e expostas a diversas intensidades de radiação (35, 45, 50 e 60Kvp), com duração de 45 e 60 segundos para determinar o padrão de raios X. Os resultados obtidos permitiram concluir que as sementes de *Eugenia handroana* apresentam um comportamento intermediário e, conforme a secagem drástica das sementes, ocorre a degradação do DNA. O substrato areia autoclavada e a temperatura de 30°C permitiram maior porcentagem de germinação. Para o teste de tetrazólio, todas as concentrações possibilitaram a avaliação da viabilidade, tendo a concentração de 0,1% durante o tempo de 4 horas facilitado a avaliação dos embriões comparada com as demais concentrações. No teste de raios X, a combinação de 60 segundos de exposição à radiação de 50 Kvp permitiu visualização clara dos danos internos causados por infestação, os quais afetaram a germinação das sementes de *Eugenia handroana*.

* Comitê Orientador: Antonio Claudio Davide – UFLA (Orientador) e José Marcio Rocha Faria (Co-Orientador) – UFLA.

ABSTRACT

MASETTO, Tathiana Elisa. **Desiccation sensibility studies in *Eugenia handroana* seeds (Myrtaceae)**. 2005. 60 p. Dissertation (Master Program in Forestry Engineer) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

This research aimed to study desiccation tolerance, DNA integrity and to evaluate *Eugenia handroana* seeds quality through the germination, tetrazolium and X-ray tests using seeds of *Eugenia handroana* collected from various trees located in Lavras-MG. To evaluate desiccation tolerance seeds were maintained in dehydration room with controlled temperature and humidity (20°C and 60% UR) and decreased seed moisture content every 5% starting from 35,45%. DNA was extracted from seeds submitted to dehydration and compared with the pattern of DNA from guava (*Psidium guajava*) seeds. Germination tests were performed in sterilized sand and paper roll under the temperatures of 20°C, 25°C, 30°C and 35°C with constant white light and alternate temperatures of 20°C/30°C, with ten hours of darkness for the lowest temperature and fourteen hours of light for the highest temperature. For tetrazolium test the concentrations of 0,5%, 0,1% and 0,075% of tetrazolium salt and times of 4, 8 and 12 hours of seed incubation were used in the dark at 30°C. For the X-ray test seeds were placed in supports and exposed the radiations intensities of 35, 45, 50 and 60 Kvp, with duration of 45 and 60 seconds. The obtained results allowed conclude that *Eugenia handroana* seeds showed an intermediate behavior and that seed dehydration caused DNA degradation. The sterilized sand and 30°C temperature allowed superior germination percentage. For the tetrazolium test, all the concentrations allowed evaluation of seed viability, but the concentration of 0,1% and 4 hours of incubation of the seeds facilitated the evaluation of the

* Guidance Committee: Antonio Claudio Davide – UFLA (Adviser), José Marcio Rocha Faria (Co-Adviser) – UFLA.

embryos compared with the other concentrations. The combination of 60 seconds and 50 Kvp of radiation allowed clear visualization of the internal damages caused by insects, which affected the *Eugenia handroana* seeds germination.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Eugenia* destaca-se como um dos mais importantes da família Myrtaceae, com espécies que apresentam considerável valor comercial, nutritivo (Silva et al., 2003) e, principalmente, devido ao potencial para recomposição ambiental que as espécies frutíferas pertencentes a este gênero apresentam, possibilitando não somente a recuperação da flora como também da fauna, por atraírem pássaros e outros animais (Maluf et al., 2003).

Para dar suporte à forma de conservação *ex situ* dos recursos genéticos de espécies do gênero *Eugenia*, é essencial o estudo sobre o comportamento das sementes quanto à tolerância ou sensibilidade à dessecação e aplicação de tecnologias que permitam avaliar a qualidade de sementes, otimizando o processo de conservação dessas espécies.

Eugenia handroana é uma árvore da família Myrtaceae, popularmente conhecida como pitanga-do-mato e cafezinho, com ocorrência no sudeste e no sul do Brasil (Davide et al., 1995). É uma espécie propagada por sementes e o conhecimento sobre as condições ideais de germinação é de fundamental importância para a utilização desta espécie em plantios de reposição e demais programas florestais em que pode ser empregada.

Muitas espécies do gênero *Eugenia*, a despeito de sua importância ecológica e do potencial de exploração comercial, apresentam baixa densidade de ocorrência (Silva et al., 2005). São caracterizadas por apresentarem sementes sensíveis à dessecação, como é o caso das sementes de *Eugenia handroana* (Carvalho, 2000) e perderem a viabilidade rapidamente após a dispersão dos frutos.

Para garantir o sucesso da conservação *ex situ*, o armazenamento adequado de sementes com qualidade fisiológica definida é fundamental. No

entanto, o conhecimento referente ao comportamento durante o armazenamento de grande parte das espécies nativas ainda é deficiente. A avaliação da qualidade de sementes também é de fundamental importância, evitando o armazenamento, comercialização e semeadura de lotes de sementes com baixa qualidade.

Para a obtenção de resultados relativos ao comportamento germinativo de sementes há a necessidade de aprimoramento de metodologias de testes de germinação para as espécies florestais. Por permitir rápida estimativa da viabilidade e do vigor, o teste de tetrazólio pode também ser muito útil para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes dessas espécies. A qualidade física pode ser estimada com o auxílio do teste de raios X, o qual contribui com informações sobre a integridade das estruturas internas das sementes. Para contribuir para o entendimento das características de tolerância e sensibilidade à dessecação, a pesquisa na área de biologia molecular também pode fornecer informações úteis.

Portanto, a adoção de técnicas de controle de qualidade e um melhor entendimento sobre o comportamento das sementes de *Eugenia handroana* quanto à tolerância ou sensibilidade à dessecação são essenciais para o processo de conservação de germoplasma e de propagação dessa espécie.

Os objetivos desse trabalho foram:

- definir procedimentos para a condução de teste de germinação, tetrazólio e raios X, para a avaliação da qualidade de sementes de *Eugenia handroana* e
- avaliar a tolerância à dessecação e a integridade do DNA das sementes da espécie em estudo.

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE SEMENTES DE *Eugenia handroana* D. Legrand (MYRTACEAE) PELOS TESTES DE GERMINAÇÃO E TETRAZÓLIO.

1 RESUMO

MASETTO, Tathiana Elisa. Avaliação da qualidade de sementes de *Eugenia handroana* D. Legrand (Myrtaceae) pelos testes de germinação e tetrazólio. In: _____. **Estudo da sensibilidade à dessecação em sementes de *Eugenia handroana***. 2005. 60 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Eugenia handroana, pertencente à família Myrtaceae, é conhecida popularmente pelos nomes de pitanga-do-mato e cafezinho. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar procedimentos para condução dos testes de germinação e tetrazólio na avaliação da qualidade de sementes de *Eugenia handroana*. Para o teste de germinação, as sementes foram mantidas em BODs sobre areia e rolo de papel, sob as temperaturas de 20°C, 25°C, 30°C e 35°C com luz branca constante e temperatura alternada de 20°C/30°C com 10 horas de escuro para a temperatura mais baixa e 14 horas de luz para a temperatura mais elevada. Foram utilizadas oito repetições de 25 sementes para cada tratamento. Para o teste de tetrazólio, as sementes foram embebidas em água por 12 horas a 30°C; em seguida, os tegumentos foram removidos e as sementes foram seccionadas longitudinalmente. Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes submetidas às seguintes concentrações do sal de tetrazólio: 0,075%, 0,1% e 0,5%, durante 4, 8 e 12 horas, em BOD no escuro a 30°C. A germinação das sementes foi favorecida pelo substrato areia sob temperatura de 30°C e, para o teste de tetrazólio os resultados mostraram que não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Porém, com o uso da concentração de 0,1% de sal de tetrazólio durante 4 horas a 30°C, obteve-se uma coloração uniforme que permitiu a diferenciação entre tecidos saudáveis, em deterioração e tecidos mortos. Assim, este pode ser um procedimento eficiente para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes de *Eugenia handroana*.

* Comitê Orientador: Antonio Claudio Davide – UFLA (Orientador), José Marcio Rocha Faria (Co-Orientador) – UFLA.

2 ABSTRACT

MASETTO, Tathiana Elisa. Evaluation of the seed quality of *Eugenia handroana* D. Legrand-(Myrtaceae)-by germination and tetrazolium tests. In: _____. **Desiccation sensibility studies in *Eugenia handroana* seeds.** 2005. 60 p. Dissertation (Master Program in Forestry Engineer) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Eugenia handroana, belongs to the Myrtaceae family, is known popularly as “pitanga-do-mato” and “cafezinho”. This work was aimed to evaluate the effect of the temperatures of 20°C, 25°C, 30°C, 35°C under constant white light and alternate temperature of 20/30°C with 10 hours in the dark for the lowest temperature and 14 hours in continuous light for the highest temperature and the effect of sand and paper roll substrate. In addition there was also objective of this study evaluate the best concentration of tetrazolium salt among the concentrations of 0,075%, 0,1% and 0,5% and time of imbibition in the tetrazolium solution of 4, 8 and 12 hours. For the germination test the seeds were kept in incubators. Eight repetitions of 25 seeds were used for each treatment. For tetrazolium test seeds four repetitions of 25 seeds were initially imbibed in water for 12 hours at 30°C; followed by removal of seed tegument, longitudinal section with scalpel and imbibition in tetrazolium salt solutions in the dark at 30°C. The results showed that seed germination was favored by the sand substratum under temperature of 30°C. For the tetrazolium test the results showed that there were not significant differences among the treatments. However, with the concentration of 0,1% of tetrazolium salt during 4 hours to 30°C of incubation allowed uniform coloration and better identification of deteriorated and died seeds.

* Guidance Committee: Antonio Claudio Davide – UFLA (Adviser), José Marcio Rocha Faria (Co-Adviser) – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

O gênero *Eugenia* destaca-se como um dos mais importantes da família Myrtaceae, com espécies que apresentam considerável valor comercial, nutritivo (Silva et al., 2003) e, principalmente, devido ao potencial para recomposição ambiental que as espécies frutíferas pertencentes a este gênero apresentam, possibilitando não somente a recuperação da flora como também da fauna, por atraírem pássaros e outros animais (Maluf et al., 2003).

Apesar dos interesses sócio-econômicos, ainda existe a dificuldade de produção de mudas de espécies do gênero *Eugenia*, devido à falta de tecnologia que permita maximizar o uso das sementes, principalmente quanto à sua conservação e multiplicação (Silva et al., 2003).

Eugenia handroana é uma árvore da família Myrtaceae, conhecida popularmente como pitanga-do-mato e cafezinho e tem ocorrência no sudeste e no sul do Brasil (Davide et al., 1995). É uma espécie propagada por sementes e o conhecimento sobre métodos de avaliação da qualidade de sementes é de fundamental importância para a utilização desta espécie em plantios de reposição e demais programas florestais em que pode ser empregada.

As sementes de *Eugenia handroana* foram classificadas por Carvalho (2000) como sensíveis à dessecação e perderem a viabilidade rapidamente após a dispersão dos frutos. Dessa forma, as informações relativas às características favoráveis para germinação das sementes, por meio das quais é possível alcançar o maior potencial germinativo, são necessárias para a forma de utilização adequada dessa espécie.

O teste mais tradicionalmente utilizado para estimar a viabilidade das sementes é o teste de germinação. Contudo, ainda são escassas as informações

sobre os procedimentos de condução do teste para as espécies florestais nativas nas Regras para Análises de Sementes (Brasil, 1992).

Os estudos com germinação de sementes são geralmente realizados com o objetivo de ampliar os conhecimentos fisiológicos, verificando as respostas de germinação a fatores ambientais, causas de dormência e métodos de superação, conhecimentos morfológicos, acompanhando o desenvolvimento do embrião e da plântula. Além disso, busca verificar o estágio de maturação das sementes e do efeito do processamento e do armazenamento sobre a qualidade de sementes (Baskin & Baskin, 1998).

A temperatura necessária para a germinação das sementes de uma espécie é um fator importante a ser verificado, devido à sua atuação na regulação da germinação, ao determinar a taxa e a capacidade germinativa, na superação de dormência primária e ou secundária e por induzir dormência secundária (Bewley & Black, 1994).

Quanto aos substratos comumente recomendados para as espécies arbóreas, a areia é destinada a sementes grandes ou àquelas que exigem um longo período para germinação e o papel é mais usualmente utilizado para sementes pequenas ou que não necessariamente requerem a presença de luz para germinar (ISTA, 1991).

O teste de tetrazólio tem assumido uma posição de destaque na avaliação da qualidade de sementes, pois o mesmo propicia informações valiosas sobre o vigor, além de possibilitar o diagnóstico dos principais problemas que podem afetar a qualidade das sementes (Krzyzanowski et al., 1999).

As sementes de algumas espécies arbóreas necessitam de longo período para germinar, geralmente devido à dormência. Dessa forma, o teste de tetrazólio, como um método rápido que estima a germinabilidade, tem sido aplicado a sementes de tais espécies (ISTA, 1991), como nos trabalhos realizados para *Guazuma ulmifolia* (Neto & Aguiar, 2000), *Didymopanax*

morototoni (Franco & Ferreira, 2002), *Passiflora giberti* (Ferreira et al., 2002), *Spondias mombin* (Silva, 2003) e *Malpighia emarginata* (Costa et al., 2003). No caso de sementes do gênero *Eugenia*, o teste de tetrazólio pode auxiliar no conhecimento sobre a qualidade fisiológica das sementes.

Embora os testes de germinação e de tetrazólio sejam largamente aplicados nos campos de análise e fisiologia de sementes, a metodologia para o emprego de tal tecnologia em sementes de *Eugenia handroana* não consta na literatura.

Dessa forma, objetivou-se, com este trabalho, avaliar procedimentos para a condução do teste de germinação e tetrazólio em sementes de *Eugenia handroana*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Sementes Florestais do Departamento de Ciências Florestais da UFLA, Lavras, MG.

Na primeira quinzena do mês de novembro de 2004, frutos maduros foram coletados, com auxílio de podão e lona plástica, de aproximadamente 15 matrizes em áreas remanescentes de mata na região da cidade de Lavras, no Sul de Minas Gerais (21°14'S, 45°00'W). A região apresenta um clima do tipo Cwb, segundo a classificação climática de Koppen, caracterizado por uma estação seca de abril a setembro e outra chuvosa de outubro a março. As médias anuais de temperatura, precipitação e umidade relativas são, 19,3°C, 1.411 mm e 77%, respectivamente.

O beneficiamento consistiu da maceração e despulpamento dos frutos em peneira, sob água corrente, de modo a separar as sementes dos resíduos dos frutos. A secagem das sementes foi feita à sombra até que o excesso de água fosse eliminado, de acordo com as recomendações de Davide et al. (1995). Após o beneficiamento, foi determinado o grau de umidade pelo método da estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ por 17 horas (Brasil, 1992), com 4 repetições de dois gramas de sementes partidas transversalmente ao meio. Os cálculos foram realizados com base no peso úmido das sementes e os resultados foram expressos em porcentagem.

Foram conduzidos dois experimentos, um para testar o efeito de diferentes substratos e temperaturas na germinação das sementes e outro para testar diferentes concentrações de sal de tetrazólio sob diferentes tempos de incubação na avaliação da qualidade fisiológica das sementes de *Eugenia handroana*.

Teste de germinação: inicialmente, as sementes foram desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio 2% por 2 minutos e, posteriormente, submetidas ao teste de germinação. O experimento foi conduzido em BODs e os tratamentos foram constituídos pela combinação de temperaturas (20°C, 25°C, 30°C e 35°C) sob luz branca constante, 10 horas de luz e 14 horas de escuro sob temperatura de 20/30°C e substratos (rolo de papel e areia autoclavada dentro de gerbox). O teste teve a duração de 90 dias; as contagens foram realizadas semanalmente e as sementes com protrusão de radícula e números de plântulas normais (Figura 1) foram registrados.

O experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado, com 8 repetições de 25 sementes cada, constituindo um fatorial 2X5. Os dados de porcentagem de germinação (plântulas normais) obtidos foram submetidos à análise de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR.

Teste de tetrazólio: as sementes foram imersas em água destilada por 12 horas a 30°C. Pré-testes mostraram que a melhor forma de pré-condicionamento das sementes foi a secção no sentido longitudinal seguida de remoção do tegumento. Após o corte longitudinal, os embriões foram colocados em copos plásticos onde permaneceram imersos em solução de tetrazólio, a 30°C, no escuro. Foram utilizadas diferentes concentrações da solução de tetrazólio (0,075%, 0,1% e 0,5%) e diferentes tempos de imersão (4h, 8h e 12h), com quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento, constituindo um fatorial 3X3.

As avaliações foram realizadas com auxílio de lente de aumento e pinça, e os embriões foram separados em categorias de viáveis e não viáveis de acordo com os diferentes padrões de tonalidade que variaram do vermelho intenso até o

branco, de acordo com a coloração observada a partir da secção interna dos embriões.

Para efeito de comparação com os resultados do teste de tetrazólio, foi realizado um teste de germinação em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições de 25 sementes. Inicialmente, as sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 2% por 2 minutos e colocadas sobre areia autoclavada, a 30°C, sob luz branca constante, de acordo com a metodologia empregada de com o experimento anterior. O teste teve duração de 90 dias e as contagens de plântulas normais foram realizadas semanalmente.

Os dados obtidos nos teste de tetrazólio e germinação foram submetidos à análise de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste de Tukey, a de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SANEST (Zonta et al., 1985).

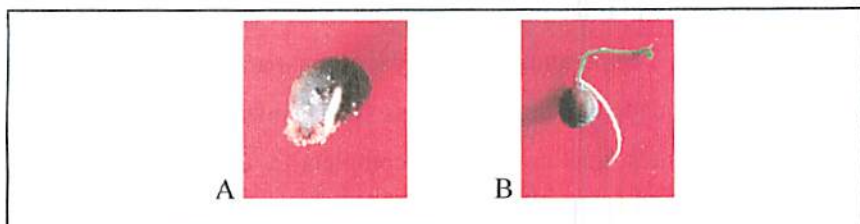


FIGURA 1. A – semente de *Eugenia handroana* com protrusão radicular. B – plântula normal obtida ao final do teste de germinação de sementes de *Eugenia handroana*. UFLA, Lavras, MG, 2005.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O lote de sementes de *Eugenia handroana* apresentou grau de umidade de 35,45% por ocasião da realização dos testes. O início da protrusão de radículas ocorreu aos 28 dias após a semeadura. A emergência de plântulas normais foi observada após 90 dias do início do teste. Resultados semelhantes foram observados por Maluf et al. (2003) ao realizarem o teste de germinação com sementes de *Eugenia involucrata*. Em trabalho realizado com *Eugenia stipitata*, Gentil & Ferreira (1999) verificaram que o tempo médio de emergência de plântulas foi de 66 dias.

Os resultados médios de porcentagem de germinação estão demonstrados na Tabela 1. Pode-se observar que houve diferenças significativas entre os dois tipos de substratos e houve interação significativa entre substrato e temperatura. A germinação sobre o substrato areia apresentou um desempenho crescente conforme o aumento da temperatura, com exceção de 35°C que pode ter sido drástica. Temperaturas acima da ótima para o total de germinação aceleram a velocidade do processo, mas desorganizando-o, de forma que o número de sementes que conseguem completá-lo é reduzido (Carvalho & Nakagawa, 2000).

O substrato rolo de papel não apresentou um comportamento padrão conforme o aumento da temperatura, destacando-se as de 20°C, 25°C, 20°C/30°C e 35°C, que proporcionaram as maiores porcentagens de germinação e foram iguais entre si estatisticamente. A germinação das sementes, numa faixa mais ampla de temperatura, propicia uma elevada capacidade de estabelecimento em campo, o que pode lhe conferir uma vantagem sobre as espécies que apresentam

germinação em faixa de temperatura mais estreita, principalmente em ambientes tropicais onde ela é bastante variável ao longo do ano (Fantin, 2001).

TABELA 1 Porcentagem final de germinação utilizando substrato sobre areia e rolo de papel. UFLA, Lavras, MG, 2005.

<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Areia</i>	<i>Rolo de Papel</i>
20	3,0 b B	14,0 a AB
25	9,0 a B	12,0 a AB
20/30	9,0 b B	18,0 a A
30	20 a A	8,0 b B
35	2,0 b B	19,0 a A
CV (%)	62,49%	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O gráfico da Figura 2 apresenta dados de germinação obtidos com a utilização do substrato rolo de papel sob diferentes temperaturas. Observa-se que os tratamentos conduzidos com as temperaturas de 20°C/30°C e 35°C, que apresentaram resultados finais de germinação superiores e estatisticamente iguais (Tabela 1), também permitiram que estes resultados fossem alcançados aos 28 dias após o início do teste. Isto não foi verificado para as demais temperaturas, que apresentaram resultados finais de germinação semelhantes.

Apesar de apresentar maiores resultados de porcentagem de germinação, o substrato rolo de papel propiciou o desenvolvimento de fungos, o que implicou em trocas constantes do papel, tornando o emprego do mesmo bastante trabalhoso para a espécie em estudo. Esse tipo de substrato também não foi adequado para germinação de sementes de *Didymopanax morototoni* em consequência da proliferação de fungos (Franco et al., 2002). A ocorrência de sementes infestadas por insetos também prejudicou a avaliação da germinação nesse tipo de substrato, devido à perfuração do papel ocasionada pela saída de larvas das sementes.

A condução do teste de germinação em substrato rolo de papel também dificultou o controle da umidade do substrato. Prudente et al., (2005) verificaram que a intensidade luminosa e a umidade foram preponderantes no desenvolvimento e estabelecimento de plântulas de *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia pyriformis* e *Eugenia uniflora* em diversas áreas por meio de semeadura direta.

Os resultados de germinação apresentados no gráfico da Figura 3 demonstram que a temperatura de 30°C e a utilização do substrato areia proporcionaram o maior valor absoluto de germinação (Tabela 1) em relação ao substrato rolo de papel e possibilitaram maior resultado aos 90 dias após a montagem do teste. As demais temperaturas utilizadas com esse substrato não foram eficientes para condução do teste, como pode ser verificado pelos baixos resultados de germinação apresentados ao final do experimento. De acordo com Abreu et al. (2005), o substrato areia é indicado para todo tipo de sementes, até para as espécies mais sensíveis ao ressecamento e que exigem um período mais prolongado para completarem a germinação.

Silva et al. (2005) também utilizaram a temperatura de 30°C para conduzir o teste de germinação de sementes de *Eugenia uniflora*, *E. involucrata* e *E. brasiliensis*. A temperatura de 30°C também está dentro da faixa ótima para

germinação de sementes de jaboticaba (Valio & Ferreira, 1992), maçaranduba (Landgraf, 1994), barbatimão, jatobá do cerrado (Dignart, 1998), sucupira preta (Feronato, 1999), canafístula (Oliveira, 2000) e mutamba (Neto et al., 2002).

Entretanto, ao conduzirem teste de germinação para sementes de faveleira, Silva & Aguiar (2004) verificaram que o substrato areia apresenta o inconveniente de drenar excessivamente a água, ficando a parte de cima ressecada, sendo muito pesado e de difícil manuseio dentro do gerbox.

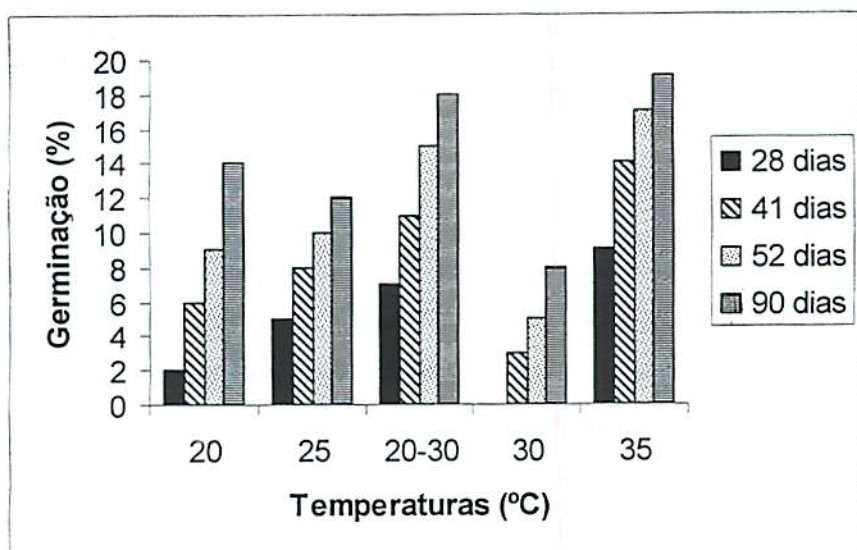


FIGURA 2. Germinação acumulada de sementes de *Eugenia handroana* utilizando substrato rolo de papel e diferentes temperaturas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

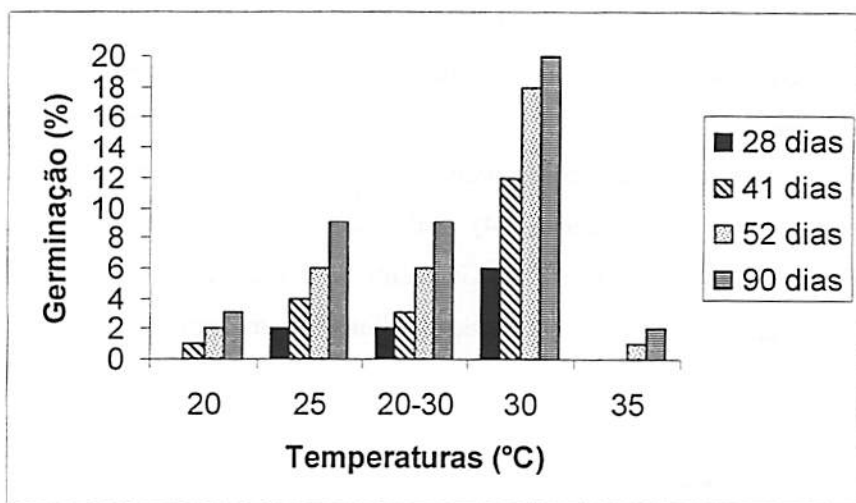


FIGURA 3. Germinação acumulada de sementes de *Eugenia handroana* utilizando substrato rolo de papel e diferentes temperaturas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Para uma melhor aferição do desenvolvimento da metodologia do teste de germinação para as sementes dessa espécie, sugerem-se a realização de novas tentativas com outros substratos e a utilização de um maior número de lotes de sementes com diferentes qualidades.

Apesar da baixa taxa apresentada pelo teste de germinação, o teste de tetrazólio mostrou alto potencial de germinabilidade do lote de sementes estudado. Essa observação, possivelmente, deve-se ao fato dos embriões de *Eugenia* apresentarem-se conferruminados, ou seja, os cotilédones são aderidos sem vestígio de eixo hipocótilo-radícula, sugerindo a presença de tecido meristemático não diferenciado (Barroso, 1991). Tal característica pode justificar o lento processo germinativo e a baixa porcentagem de germinação das sementes recém-colhidas de *Eugenia handroana* e também o potencial para aplicação do teste de tetrazólio em sementes desta espécie, otimizando a previsão da qualidade fisiológica das sementes do lote.

Após o tempo de embebição das sementes em água por 12 horas, as sementes apresentaram umidade de 50,51%. A literatura tem mostrado que o grau de umidade das sementes, após a fase de pré-condicionamento, é um fator extremamente importante para o desenvolvimento normal da coloração pelo teste de tetrazólio (Costa et al., 1998). É provável que o valor de grau de umidade atingido durante o período de embebição já esteja dentro daqueles que caracterizam a fase II do padrão trifásico de embebição (Bewley & Black, 1994).

Portanto, supõe-se que o tempo de embebição de 12 horas seja suficiente para ativar os processos fisiológicos necessários para reação do sal de tetrazólio, como foi reportado por Nascimento (1997) para sementes de *Genipa americana*.

A partir da coloração apresentada pelos embriões foram encontradas duas categorias de sementes viáveis e três categorias de sementes não viáveis (Figura 4). Os padrões de tonalidade observados na secção interna das sementes variaram do róseo (semente viável) ao branco (semente morta). A coloração branca foi encontrada principalmente no centro do embrião, estendendo-se para a periferia, assim como foi observado por Camargo (1997), ao avaliar a qualidade fisiológica de sementes de castanheira-do-brasil.

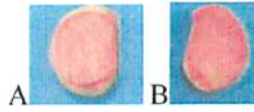
Os resultados obtidos para viabilidade, de acordo com os padrões de coloração, estão apresentados na Tabela 2. Foi observado que não houve diferenças significativas entre as concentrações utilizadas para o lote estudado; entretanto, as concentrações utilizadas proporcionaram diferentes tonalidades nos embriões de *Eugenia handroana*. Todavia, a solução de tetrazólio 0,5% e o tempo de 12 horas dificultaram a interpretação das classes de viabilidade devido à formação de coloração escura bastante uniforme nos embriões.

TABELA 2. Resultados médios do teste de germinação e tetrazólio em sementes de *Eugenia handroana*, para os diferentes tratamentos estudados. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Tratamentos	Porcentagem de viabilidade
0,5% 12h	99 a
0,075% 12h	99 a
0,1% 12h	96 a
0,5% 4h	95 a
0,5% 8h	93 a
0,075% 8h	90 a
Germinação	87 a
0,1% 4h	88 a
0,1% 8h	87 a
0,075% 4h	87 a
CV	7,66%

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, a 5% de significância.

Categorias de sementes viáveis



Categorias de sementes não viáveis



FIGURA 4. Categorias encontradas no teste de tetrazólio em sementes de *Eugenia handroana*. UFLA, Lavras, MG, 2005. A - embrião com coloração rósea homogênea e aspecto normal e firme; B - embrião com menos de 50% dos tecidos internos descoloridos e demais regiões rosas; C - embrião com coloração vermelho intenso e tecido amolecido; D - mais de 50% dos tecidos do embrião descoloridos e demais regiões com coloração vermelho intenso; E - embrião completamente descolorido.

Embora não ocorresse nenhuma diferença significativa entre os tratamentos, vale salientar que, por motivos de economia de reagentes e disposição de funcionários para a realização de testes de rotina em laboratórios, sugere-se a utilização da solução de tetrazólio com concentração de 0,1% e tempo de exposição de 4 horas, que permitiu uma intensidade de coloração nos tecidos dos embriões, possibilitando melhor separação entre os padrões de coloração apresentados. A concentração de 0,1% também apontou melhores resultados para avaliar a viabilidade e o vigor de lotes de sementes de *Peltophorum dubium* (Oliveira, 2000).

A concentração de 0,075% afetou a interpretação da leitura dos testes no que diz respeito a alterações no processo de coloração pelo tetrazólio por gerar uma coloração muito clara. Porém, esta concentração foi eficiente para avaliar a viabilidade potencial de sementes *Senna multijuga* e *Senna macranthera* em bancos de sementes no solo (Ferreira et al., 2004).

As sementes infestadas apresentaram regiões com coloração vermelho intenso, o que corresponde ao tecido em deterioração ocasionado pela entrada das larvas de insetos do gênero *Bruchids* no interior das sementes. Estes resultados indicam que há a necessidade de novas pesquisas no sentido de aplicação de novas concentrações de solução do sal de tetrazólio e a utilização de diferentes lotes de sementes para verificar diferenças de viabilidade.

Para sementes de *Eugenia handroana*, o teste de germinação teve duração de 90 dias, enquanto que os resultados do teste de tetrazólio foram obtidos em apenas dois dias. Diante disso, o emprego do teste de tetrazólio pode otimizar a previsão da qualidade fisiológica das sementes da espécie em estudo.

6 CONCLUSÕES

Para a condução do teste de germinação em laboratório de sementes de *Eugenia handroana* pode-se recomendar o substrato areia combinado com a temperatura de 30°C.

A utilização da concentração de 0,1% de sal de tetrazólio durante 4 horas a 30°C é uma metodologia eficiente para avaliação da viabilidade das sementes de *Eugenia handroana*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, D. C. A.; NOGUEIRA, A. C.; MEDEIROS, A. C. S. Efeito do substrato e da temperatura na germinação de sementes de cataia (*Drimys brasiliensis* MIERS. Winteraceae) **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 149-157, 2005.
- BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, 1991. 443 p.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds – ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination**. New York: Academic Press, 1998. p. 5-26.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York, 1994. 445 p.
- BRASIL. Ministério da agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365 p.
- CARVALHO, L. R. de. **Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais quanto à capacidade de armazenamento**. 2000. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências florestais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CARVALHO, N M.; NAKAGAWA, J. **Sementes, ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.
- CAMARGO, I. P. de. **Estudos sobre a propagação da castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsea* Humb. & Bonpl)**. 1997. 127 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- COSTA, L. C.; PAVANI, M. C. M. D.; MORO, F. V.; PERECIN, D. Viabilidade de sementes de acerola (*Malpighia emarginata* dc): avaliação da vitalidade dos tecidos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 3, p. 532-534, dez. 2003. Comunicação técnica.
- COSTA, N. P. da; FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; PEREIRA, J. E. Avaliação de metodologia alternativa para o teste de tetrazólio para sementes de soja. **Scientia agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 2, p. 305-312, maio/ago. 1998.

DAVIDE, A. C.; FARIA, J. M. R.; BOTELHO, S. A. **Propagação de espécies florestais**. Belo Horizonte: CEMIG/UFLA/FAEPE; Lavras: UFLA, 1995. 41 p.

DIGNART, S. **Análise de sementes de jatobá do cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* (Hayne) Mart.] e barbatimão [*Stryphonodendron adstrigens* (Mart.) Cov.]**. 1998. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) - Universidade Federal de Mato Grosso. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Cuiabá.

FANTIN, S. C. **Aspectos da germinação e efeitos do condicionamento osmótico em sementes de paineira (*Chorisia speciosa* St. Hil. – **Bombacaceae**)**. 2001. 145 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, São Carlos.

FERREIRA, G.; DETON, A. M.; TESSER, S. M.; MALAVASI, M. M. **Avaliação de métodos de extração do arilo e tratamento com Ethephon em sementes de *Passiflora giberti* N. E. Brown pelos teste de germinação e de tetrazólio**. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v. 24, n. 1, p. 248-253, 2002.

FERREIRA, R. A.; DAVIDE, A. C.; MOTTA, M. S. **Vigor e viabilidade de sementes de *Senna multijuga* e *Senna macranthera* num banco de sementes em solo de viveiro**. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v. 26, n. 1, p. 24-31, 2004.

FERRONATO, A. **Análise de sementes de *Bowdichia virgilioides* H. B. K. (sucupira preta) e *Cybistax antisyphilitica* M. (pé-de-anta)**. 1999. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) - Universidade Federal de Mato Grosso. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Cuiabá.

FRANCO, E. T. H.; FERREIRA, A. G. **Tratamentos pré-germinativos em sementes de *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch.** *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 12, n. 1, p. 1-10, jun. 2002.

GENTIL, D. F. O.; FERREIRA, S. A. N. **Viabilidade e superação da dormência em sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp *sororia*)**. *Acta Amazonica*, Manaus, AM, v. 29, n. 1, p. 21-31, mar. 1999.

INTERNATIONAL RULES FOR SEED TESTING – ISTA. **Tree and shrub seed handbook**. Zurich, Switzerland, 1991. paginação irregular.

KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.) **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. Cap. 8, p. 8-4.

LANDGRAF, P. R. C. **Germinação de sementes de guarea (*Guarea guidonea* (L.) Sleumer), maçaranduba (*Persea pyrifolia* Ness et Mart. ex Ness) e peito de pambo (*Tapirira guianensis* Aubl.)**. 1994. 91 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

MALUF, A. M.; BÍLIA, D. A.; BARBEDO, C. J. **Drying and storage of *Eugenia involucrata* DC. seeds**. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 60, n. 3, p. 471-475, jul/sept. 2003.

NASCIMENTO, W. M. O. **Caracterização morfo-anatômica, comportamento germinativo e avaliação de técnicas para o teste de tetrazólio em sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.)** 1997. 95 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

NETO, J. C. de. A.; AGUIAR, I. B. de. **Germinative pretreatments to dormancy break in *Guazuma ulmifolia* Lam. seeds**. *Scientia Florestalis*, Piracicaba, n. 58, p. 15-24, dez. 2000.

NETO, J. C. A.; AGUIAR, I. B.; FERREIRA, V. M.; RODRIGUES, T. J. D. **Temperaturas cardeais e efeito da luz na germinação de sementes de mutamba**. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 6, n. 3, p. 460-465, set./dez. 2002

OLIVEIRA, L. M. **Avaliação da qualidade de sementes de canafistula (*Peltophrum dubium* (Sprengel) Taubert) pelos testes de germinação, tetrazólio e raios-X**. 2000. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PRUDENTE, C. M.; BARBOSA, J. M.; SANTOS JÚNIOR, N. A. **Efeito da umidade do solo e intensidade luminosa sobre a germinação de sementes, desenvolvimento de plântulas e estabelecimento de indivíduos de três espécies frutíferas silvestres do gênero *Eugenia***. Disponível em: <<http://www.adaltech.com.br/evento/museugoeldi/resumoshtm/resumos/R0631-1.htm>>. Acesso em: 18 mar. 2005.

SILVA, C. V.; BÍLIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J. **Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia***. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v. 27, n. 1, p. 86-92, 2005.

SILVA, C. V.; BILIA, D. A. C.; MALUF, A. M.; BARBEDO, C. J. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. -Myrtaceae) **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 213-221, abr./jun. 2003.

SILVA, L. M. da. **Superação de dormência de diásporos de cajazeira** (*Spondias mombin* L.). 2003. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVA, L. M. M.; AGUIAR, I. B. Efeito dos substratos e temperaturas na germinação de sementes de *Cnidoscopus phyllacanthus* Pax & K. Hoffm. (faveleira). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 9-14, 2004.

VALIO, I. F. M.; FERREIRA, Z. L. Germination of seeds of *Myrciaria cauliflora* (Mart). Bergh. Myrthaceae. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 4, n. 2, p. 95-98, dez. 1992.

ZONTA, E. F.; MACHADO, A. A.; SILVEIRA JUNIOR, P. Sistema de análise estatística (SANEST) para microcomputador (versão 1. 0). In: SIMPÓSIO DE ESTATÍSTICA APLICADA À EXPERIMENTAÇÃO AGRONÔMICA, 1985, Piracicaba. p. 74-90.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE SEMENTES DE *Eugenia handroana* D. Legrand. (MYRTACEAE) PELO TESTE DE RAIOS X

1 RESUMO

MASETTO, Tathiana Elisa. Avaliação da qualidade de sementes de *Eugenia handroana* D. Legrand (Myrtaceae) pelo teste de raios X. In: _____. **Estudo da sensibilidade à dessecação em sementes de *Eugenia handroana***. 2005, 60p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O teste de raios X é uma ferramenta útil para avaliar a qualidade física de sementes florestais, que pode ser afetada pela ocorrência de sementes vazias, infestação por insetos e alterações físicas. Objetivou-se, com este estudo, verificar a eficiência do teste de raios X na avaliação dos danos internos em sementes de *Eugenia handroana*, bem como examinar a consequência destes danos na germinação. Sementes de *Eugenia handroana* foram colocadas em suportes de isopor e expostas a diversas intensidades de radiação (35, 45, 50 e 60 Kvp), com duração de 45 e 60 segundos para determinar o padrão de raios X. De acordo com a anatomia visualizada nas radiografias, as sementes foram classificadas em Sementes Cheias e Sementes Infestadas. Em seguida, as sementes foram submetidas ao teste de germinação em substrato sobre areia a 30°C sob luz branca constante. A intensidade de radiação de 50 Kvp no tempo de exposição aos raios X de 60 segundos permitiu a visualização nítida dos danos internos causados por infestação de insetos nas sementes. Os danos internos observados nas radiografias afetaram a germinação das sementes de *Eugenia handroana*.

* Comitê Orientador: Antonio Claudio Davide – UFLA (Orientador), José Marcio Rocha Faria (Co-Orientador) – UFLA.

2 ABSTRACT

MASETTO, Tathiana Elisa. Evaluation of seed quality in *Eugenia handroana* D. Legrand- (MYRTACEAE) by x-ray test. In: _____. **Desiccation sensibility studies in *Eugenia handroana* seeds.** 2005. 60 p. Dissertation (Master Program in Forestry Engineer) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

The X ray test is an useful tool to evaluate physical quality of seeds, that it can be affected by the occurrence of empty seeds, presence of insects and physical alterations. It was aimed to study the efficiency of rays X test in the evaluation of the internal damages in seeds of *Eugenia handroana*, as well as to examine the consequence of these damages in the germination. Seeds of *Eugenia handroana* were placed in supports and exposed to several radiation intensities (35, 45, 50 and 60 Kvp), with duration of 45 and 60 seconds to determine the pattern of X rays. According to the anatomy visualized in the X rays, the seeds were classified in Full Seeds and Infested Seeds. The seeds were submitted to the germination test having sand as substratum placed at 30°C under continuous light. The intensity of radiation of 50 Kvp in the time of exposure of the X rays for 60 seconds allowed clear visualization of the internal damages caused by the presence of insects in the seeds. The internal damages observed in the x-rays test affected the *Eugenia handroana* seeds germination.

* Guidance Committee: Antonio Claudio Davide – UFLA (Adviser), José Marcio Rocha Faria (Co-Adviser) – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

O teste de raios X é um método não destrutivo para análise das características internas das sementes, que compreendem a anatomia e os defeitos internos, além de mudanças morfológicas que ocorrem durante a maturação e a germinação (ISTA, 1991). Esse teste vem sendo utilizado com várias finalidades, como visualização de injúrias mecânicas e de danos causados por insetos (Battisti et al., 2000) e decorrentes de outros fatores adversos pré e pós-colheita, detecção de anormalidades em embriões, determinação do estágio de desenvolvimento das sementes (Machado, 2002). Vale destacar que a técnica de raios X pode também ser aplicada na identificação de embriões mutantes (Bino et al., 1993) e na seleção de sementes cheias de aveia (Craviotto et al., 2002), aroeira (Machado & Cícero, 2003), candeia (Tonetti, 2004) e ipê (Oliveira et al., 2004).

As espécies florestais são caracterizadas pela grande ocorrência de predação, sementes vazias e má formação do embrião, entre outros. Dessa forma, o teste de raios X é recomendado pela ISTA (1999) como uma técnica promissora no controle de qualidade de sementes das espécies arbóreas.

Embora exista a necessidade de conservação de forma *ex situ* das espécies florestais nativas, as limitações em razão do pouco conhecimento referente às características morfológicas das sementes de tais espécies são um entrave para o processo de conservação. Dessa forma, há a necessidade de aprimorar as técnicas referentes à avaliação da qualidade de sementes das espécies florestais nativas para que o processo de armazenamento e propagação seja realizado com sucesso.

Muitas espécies do gênero *Eugenia*, pertencentes à família Myrtaceae, apresentam potencial nos programas de recomposição ambiental, pela capacidade de recuperação não somente da flora, como também da fauna por atraírem pássaros e outros animais (Maluf et al., 2003). As espécies pertencentes a esse gênero também são caracterizadas pelo valor comercial, nutritivo e potencial farmacológico que apresentam (Silva et al., 2003).

Eugenia handroana é conhecida como pitanga-do-mato e cafezinho e tem ocorrência no sudeste e no sul do Brasil (Davide et al., 1995). É uma espécie propagada por sementes, portanto, a utilização de sementes com alta qualidade é essencial para a propagação e a utilização desta espécie em programas florestais.

A aplicação da técnica de raios X pode contribuir para o controle de qualidade de sementes de *Eugenia handroana*, já que não existem estudos na literatura sobre a metodologia para realização do teste nesta espécie. Todavia, a eficiência do teste depende de procedimentos específicos para a espécie em estudo, como a determinação do melhor tempo e intensidade de radiação a que as sementes ficam expostas durante a execução do teste.

Diante do exposto, objetivou-se, com este trabalho, estudar a eficiência do teste de raios X na avaliação dos danos internos em sementes de *Eugenia handroana*, bem como verificar a consequência destes danos na germinação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletados frutos maduros com auxílio de podão e lona plástica de aproximadamente 15 matrizes na região de Lavras, localizada ao sul de Minas Gerais (21°14'S, 45°00'W). Após a coleta, os frutos foram levados ao Laboratório de Sementes Florestais do Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG onde permaneceram armazenados em câmara fria (8°C/45%UR) durante dois meses. O beneficiamento consistiu da maceração dos frutos maduros em peneira, sob água corrente de modo a separar as sementes dos resíduos e secagem das sementes à sombra até que o excesso de água fosse eliminado, de acordo com as recomendações de Davide et al. (1995).

O grau de umidade foi determinado pelo método da estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ por 17 horas (Brasil, 1992), com 4 repetições de dois gramas de sementes. Os resultados foram calculados com base no peso das sementes úmidas.

Inicialmente, foi realizado um teste de germinação com 4 repetições de 25 sementes que foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 2% por 2 minutos e colocadas sobre areia autoclavada dentro de gerbox em BOD sob 30°C e luz constante. Para a realização do teste de raios X, primeiramente foi determinada a melhor combinação de intensidade de radiação (Kvp) e tempo de exposição (Tabela 1). Utilizou-se o equipamento Faxitron HP, modelo 43855AX.

Após a escolha das melhores intensidades e tempos de exposição, o teste de raios X foi realizado utilizando-se uma amostra aleatória de 400 sementes posicionadas sobre suporte de isopor. Em seguida, de acordo com a visualização da anatomia interna pelas radiografias, as sementes foram classificadas como Sementes Cheias e Sementes Infestadas (com danos causados por larvas ou que

apresentavam larva no interior das sementes). As sementes foram então identificadas e submetidas ao teste de germinação da mesma forma citada anteriormente. O teste teve a duração de 90 dias e os números de sementes com protrusão radicular, plântulas normais e sementes mortas foram anotadas.

Os dados obtidos no teste de germinação foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo Teste de Tukey, usando o programa estatístico SISVAR.

TABELA 1. Intensidades de radiação e tempos de exposição para o teste de raios-X. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Intensidade (Kvp)	Tempo (segundos)
35	
45	45
50	60
60	



5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As sementes de *Eugenia handroana* apresentaram grau de umidade de 35,45% e germinação inicial de 87%. A combinação de 50Kvp por 60 segundos foi considerada como a melhor combinação de intensidade de radiação e tempo de exposição das sementes à radiação, por permitir nítida visualização das estruturas internas das sementes, possibilitando a identificação dos danos que ocorrem por infestação nas sementes (Figura 1D). As demais combinações testadas não possibilitaram a observação dos danos ou larvas presentes nas sementes.

Contudo, não foi possível inferir sobre a presença de anormalidades relacionadas à morfologia do embrião como nos trabalhos realizados com sementes de milho (Cícero & Banzatto Junior, 2003), canafistula (Oliveira et al., 2003), aroeira-branca (Machado & Cícero, 2003) e ipê-roxo e amarelo (Oliveira et al., 2004), devido ao alto grau de umidade apresentado pelas sementes reduzir a densidade óptica dos tecidos (Simak, 1991). Essa característica implica no baixo potencial de resolução na diferenciação dos formatos e detalhes internos das sementes (Figura 1C). A habilidade de retenção de água pelas sementes viáveis em relação às sementes mortas permite distinção entre as densidades radiográficas das mesmas e, dessa forma, a avaliação de sementes não germinadas ao final do teste de germinação (Simak et al., 1989).

Porém, ao executar o teste de raios X com sementes submetidas à desidratação (5% de umidade), estudos preliminares indicaram que não foi possível observar os detalhes da morfologia interna das sementes de *Eugenia handroana*.

Vale salientar que a dificuldade de observação dos detalhes das características morfológicas do embrião também pode ser associada ao fato do embrião de *Eugenia* ser conferruminado, conforme descrito por Barroso (1991), ou seja, os cotilédones apresentam-se aderidos, sem vestígio de eixo hipocótilo-radícula, sugerindo a presença de tecido meristemático não diferenciado.

De acordo com os resultados do teste de germinação (Tabela 1), é possível verificar que nem todas as sementes da categoria Sementes Cheias (Figura 1C) (68,75%) germinaram e formaram plântulas. A presença de sementes mortas geralmente ocorre por causas naturais ou por elas apresentarem-se em estádios mais avançados de deterioração (Van der Burg, 1994).

Foi observado que 31,25% das sementes ocorreram na categoria Sementes Infestadas. As larvas presentes nas sementes (Figura 1D) foram identificadas, no Departamento de Entomologia da UFLA, como pertencentes à ordem Coleóptera, gênero *Bruchids*. A detecção das larvas não é presumível pela visualização externa das sementes, evidenciando a importância do teste de raios X para diagnosticar material infestado, assim como relatado para sementes do gênero *Cassia* (Kapur et al., 2002).

Os resultados de germinação referentes à categoria Sementes Infestadas (Tabela 2) revelam que a presença de larvas e de danos causados pelas mesmas resultou, na sua totalidade, em sementes mortas. Pela análise radiográfica, também foi observado que as larvas ocuparam mais de 50% dos tecidos internos das sementes e, provavelmente a perda da capacidade germinativa das sementes ocorreu devido ao fato das larvas terem se alimentado das reservas das sementes ou, mesmo, causarem danos severos ao eixo embrionário. Resultados semelhantes foram encontrados por Battisti et al. (2000) em sementes de cipreste (*Cupressus sempervirens* L). De acordo com estes autores, o nível de infestação das sementes afetou significativamente a germinação das sementes e está

diretamente relacionado com a disseminação de fungos nos plantios desta espécie.

A presença de sementes infestadas por insetos tem o mesmo efeito prejudicial sobre a qualidade do lote que a presença de sementes vazias. Sementes que contêm excrementos de insetos e larvas são fáceis e rapidamente detectadas por meio da análise radiográfica e, dessa forma, é possível prevenir a transferência de sementes contendo insetos maléficos de uma região para outra (ISTA, 1991).

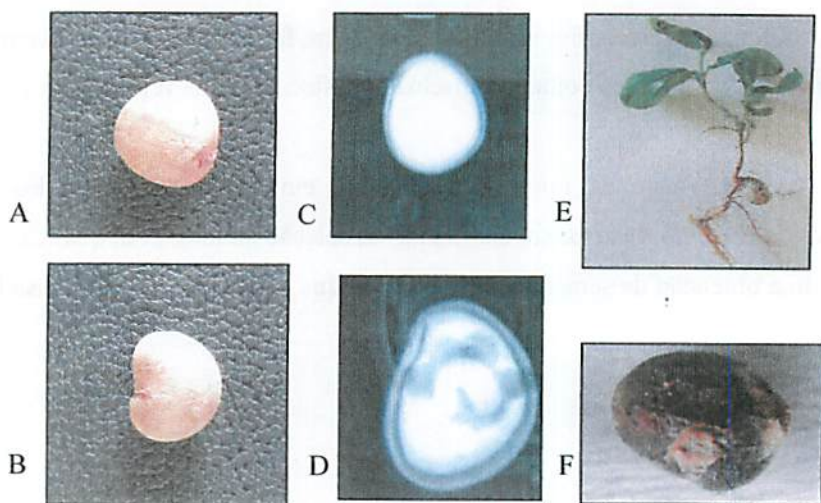
Assim, o teste de raios X é eficiente em estudos relacionados às sementes de *Eugenia handroana*, auxiliando na seleção de lotes com qualidade e reduzindo a obtenção de sementes infestadas ou que apresentem danos causados por insetos.

TABELA 2. Porcentagem do teste de germinação para cada categoria de sementes de *Eugenia handroana*. PR-protrusão de radícula (PN-plântulas normais, SM-sementes mortas). UFLA, Lavras, MG, 2005.

<i>Categoria</i>	<i>PR</i>	<i>PN</i>	<i>SM</i>
Cheias	33,6 a	35,2 a	31,2 a
Infestadas	0 b	0 b	100 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna (para cada categoria) não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

FIGURA 1. Sementes de *Eugenia handroana* D. Legrand visualmente intactas (A, B), classificadas pela análise radiográfica, de acordo com a anatomia interna, em Semente Cheia (C) e Semente Infestada (D). (E): plântula normal originada de uma semente cheia; (F): semente morta ao final do teste de germinação com sementes infestadas. UFLA, Lavras, MG, 2005.



6 CONCLUSÕES

O teste de raios X é eficiente na avaliação de danos causados por infestação em sementes de *Eugenia handroana*.

A presença de larvas e de danos causados pelas mesmas afetam a germinação, reduzindo a qualidade do lote de sementes desta espécie.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, 1991. 443 p.

BATTISTI, A.; CANTINI, R.; FECL, E.; FRIGIMELICA, G.; GUIDO, M.; ROQUES, A. Detection and evaluation of seed damage of cypress, *Cupressus sempervirens* L. , in Italy. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 28, n. 3, p. 729-738, 2000.

BINO, R. J.; AARTSE, J. W.; BURG, W. J. van der. Non-destructive X-ray of *Arabidopsis* embryo mutants. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 2, p. 167-170, June 1993.

BRASIL. Ministério da agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365 p.

CÍCERO, S. M.; BANZATTO JUNIOR, H. L. Avaliação do relacionamento entre danos mecânicos e vigor, em sementes de milho, por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 25-28, 2003.

CRAVIOTTO, R. M.; YOLDJIAN, A. M.; SALINAS, A. R.; ARANGO, M. R.; BISARO, V.; MATURO, H. Description of pure seed fraction of oat through usual evaluations and radiographic images. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 8, p. 1183-1188, Ago. 2002.

DAVIDE, A. C.; FARIA, J. M. R.; BOTELHO, S. A. **Propagação de espécies florestais**. Belo Horizonte: CEMIG/UFLA/FAEPE; Lavras: UFLA, 1995. 41 p.

INTERNATIONAL RULES FOR SEED TESTING – ISTA. **Seed Science and Technology**, Zurich, 1999. 333 p. Supplement.

INTERNATIONAL RULES FOR SEED TESTING – ISTA. **Tree and shrub seed handbook**. Zurich, Switzerland, 1991. paginação irregular.

KAPUR, M. L.; SHASHI-BHALLA; VERMA, B. R.; BHALLA, S. Bruchids associated with *Cassia* spp. seeds and their quarantine significance. **Indian Journal of Entomology**, v. 64, n. 4, p. 471-47, 42002

MACHADO, C. F. **Metodologia para a condução do teste de germinação e utilização do teste de raios X para a avaliação da qualidade de sementes de aroeira-branca (*Lithraea molleoides* (Vell.) (Engl.). 2002. 51 p. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.**

MACHADO, C. F.; CICERO, S. M. Aroeira-branca (*Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. – Anacardiaceae) seed quality evaluation by the X-ray test. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 2, p. 393-397, abr./jun. 2003.

MALUF, A. M.; BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J. Drying and storage of *Eugenia involucrata* DC. Seeds. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 3, p. 471-475, July/Sept. 2003.

OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO, M. L. M.; DAVIDE, A. C. Utilização do teste de raios-X na avaliação da qualidade de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 116-120, 2003.

OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO, M. L. M., GUIMARÃES, R. M., MASETTO, T. E. Avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia Serratifolia* Vahl Nich. e *T. Impetiginosa* (Martius Ex A. P. De Candolle) Standley - (BIGNONIACEAE) pelo teste de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 138-143, dez. 2004

SILVA, C. V.; BILIA, D. A. C.; MALUF, A. M.; BARBEDO, C. J. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. -Myrtaceae) **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 213-221, 2003.

SIMAK, M. Testing of forest tree and shrub seeds by X-radiography. In: GORDON, A. G.; GOSLING, P.; WANG, B. S. P. **Tree and shrub seed handbook**. Zurich: ISTA, 1991.

SIMAK, M.; BERGSTEN, U.; HENRIKSSON, G. Evaluation of ungerminated seeds at the end of germination test by radiography. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 17, p. 361-369, 1989.

TONETTI, O. A. O. **Melhoria da qualidade física e estudo da germinação de sementes de candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less. e *Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac. Leish). 2004. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.**

VAN DER BURG, W. J.; AARTSE, J. W.; VAN ZWOL, R. A.; BINO, R. J.
Predicting tomato seedling morphology by X-ray analysis of seeds. **Journal of
the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 119, n. 2, p.
258-263, Mar. 1994.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO E INTEGRIDADE DO DNA EM SEMENTES DE *Eugenia handroana* D LEGRAND (MYRTACEAE)

1 RESUMO

MASETTO, Tathiana Elisa. Avaliação da tolerância à dessecação e integridade do DNA em sementes de *Eugenia handroana* D. Legrand (Myrtaceae). In: _____. **Estudo da sensibilidade à dessecação em sementes de *Eugenia handroana***. 2005. 60 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de tolerância à dessecação de sementes de *Eugenia handroana* e investigar a integridade do DNA das sementes quando submetidas a diferentes graus de umidade. Sementes obtidas de frutos maduros foram submetidas à secagem em sala climatizada (20°C/60% UR), atingindo graus de umidade decrescentes a cada 5% a partir da umidade inicial (35,45%) observada após o beneficiamento. Os efeitos da desidratação nas sementes foram verificados por meio de teste de germinação. Para o estudo da integridade do DNA das sementes de *Eugenia handroana*, foram obtidas diferentes taxas de secagem a partir da umidade inicial (30%, 20%, 10% e 7%). Encontrou-se, para as sementes da espécie estudada, um comportamento intermediário quanto à capacidade de tolerância à dessecação e conforme a secagem a 7% de umidade ocorreram a degradação do DNA e a perda da capacidade germinativa das sementes.

* Comitê Orientador: Antonio Claudio Davide – UFLA (Orientador), José Marcio Rocha Faria (Co-Orientador) – UFLA.

2 ABSTRACT

MASETTO, Tathiana Elisa. Desiccation tolerance and evaluation of DNA integrity in *Eugenia handroana* D. Legrand- (MYRTACEAE) SEEDS. In: _____. **Desiccation sensibility studies in *Eugenia handroana* seeds.** 2005. 60 p. Dissertation (Master Program in Forestry Engineer) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

This study had the objectives of evaluate the desiccation tolerance of *Eugenia handroana* seeds and investigate the DNA integrity when seeds were submitted to different moisture contents. Mature seeds were submitted to dehydration in acclimatized room (20°C / 60% UR), decreasing seed moisture content every 5% starting from 35,45%. The effects of desiccation were verified through germination test. To evaluate DNA integrity the seeds were submitted to different drying rates starting from the initial moisture content of 30%, 20%, 10% and 7%. The results showed that seeds of *Eugenia handroana* had an intermediate behavior with relationship to desiccation tolerance and dehydration of the seeds to 7% of moisture content caused DNA degradation and loss of germination capacity.

* Guidance Committee: Antonio Claudio Davide – UFLA (Adviser), José Marcio Rocha Faria (Co-Adviser) – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, houve um aumento das tentativas de conservação *ex situ* da variabilidade genética das espécies, devido ao desaparecimento contínuo dos ambientes naturais (Schoen & Brown, 2001). Porém, a dificuldade de conservação da qualidade fisiológica das sementes sensíveis à dessecação concorre com a estabilidade dos recursos genéticos de algumas espécies em bancos de germoplasmas.

Portanto, para dar suporte à conservação de sementes das espécies nativas sob condições controladas, é essencial o estudo sobre o comportamento fisiológico dessas sementes, estimando a viabilidade após a desidratação, a longevidade durante o armazenamento e os fatores intrínsecos à sensibilidade à dessecação.

Nem todas as espécies respondem ao ambiente durante o armazenamento do mesmo modo. Baseado na resposta sob dessecação e baixas temperaturas, Roberts (1973) classificou as sementes em ortodoxas e recalcitrantes. Mais tarde, uma terceira categoria intermediária entre as ortodoxas e as recalcitrantes foi identificada por Ellis et al. (1990). As sementes intermediárias toleram a desidratação a baixos conteúdos de água, mas se tornam sensíveis à temperatura de congelamento neste estado.

Muitos fenômenos do desenvolvimento que implicam na tolerância à dessecação e manutenção da viabilidade no estado desidratado das sementes ortodoxas são ausentes ou não expressos em sementes recalcitrantes (Gumede et al., 2003). Sementes de espécies com comportamento ortodoxo podem ser mantidas satisfatoriamente de modo *ex situ* por longos períodos em ambiente frio e seco. Contudo, a conservação da viabilidade de sementes com

comportamento intermediário ou recalcitrante é problemática. Conseqüentemente, tais sementes não podem ser armazenadas sob as condições satisfatórias para sementes ortodoxas (Hong & Ellis, 1996). De acordo com esses autores, em geral, em ambiente bem definido e controlado, um período médio de armazenamento é realizável para sementes com comportamento intermediário. Para espécies com sementes de comportamento recalcitrante, o melhor que pode ser alcançado é um curto período de armazenamento sob condições controladas.

Algumas espécies do gênero *Eugenia*, pertencentes à família Myrtaceae, apresentam sementes com comportamento recalcitrante. As pesquisas com sementes desta família são importantes devido ao potencial para recomposição ambiental que as espécies frutíferas pertencentes a este gênero apresentam, possibilitando não somente a recuperação da flora como também da fauna, por atraírem pássaros e outros animais (Maluf et al., 2003).

Eugenia handroana é uma árvore da família Myrtaceae, conhecida popularmente como pitanga-do-mato e cafezinho e tem ocorrência no Sudeste e no Sul do Brasil (Davide et al., 1995). As sementes dessa espécie foram classificadas como recalcitrantes (Carvalho, 2000), de acordo com uma metodologia baseada na tolerância à dessecação e armazenamento sob temperaturas baixas.

Para entender a resposta à dessecação e o comportamento no armazenamento é necessário mais informação que simplesmente respostas relacionadas à viabilidade ao diminuir o conteúdo de água das sementes (Berjak & Pammenter, 1994). A conservação da integridade do DNA em sementes ortodoxas desidratadas e ou a habilidade de reparo do material genético quando as sementes são reidratadas são requerimentos fundamentais para a característica de tolerância à dessecação (Pammenter & Berjak, 1999).

Dessa forma, estudos envolvendo biologia molecular podem contribuir para a compreensão dos mecanismos de tolerância e sensibilidade à dessecação, por meio de investigação da integridade do DNA de sementes submetidas à desidratação. No entanto, essas pesquisas devem ser comparadas com o potencial de germinação que as sementes apresentam após a secagem e com espécies que apresentam comportamento ortodoxo quanto à capacidade de armazenamento.

Assim, objetivou-se, com este estudo, avaliar a capacidade de tolerância à dessecação em sementes de *Eugenia handroana* e analisar a integridade do DNA das sementes durante a desidratação.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Sementes Florestais do Departamento de Ciências Florestais da UFLA, Lavras, MG.

Frutos maduros foram coletados com auxílio de podão e lona plástica de diversas matrizes, na região da cidade de Lavras (21°14'S, 45°00'W), localizada no Sul de Minas Gerais. A região apresenta um clima do tipo Cwb, segundo a classificação climática de Koppen, caracterizado por uma estação seca de abril a setembro e outra chuvosa de outubro a março. As médias anuais de temperatura, precipitação e umidade relativas são de 19,3°C, 1.411 mm e 77%, respectivamente. Após a coleta, partes dos frutos permaneceram armazenadas durante dois meses na câmara fria do laboratório (8°C, 45% UR), até o momento da instalação dos experimentos.

O beneficiamento consistiu da maceração e despulpamento dos frutos em peneira, sob água corrente, de modo a separar as sementes dos resíduos dos frutos. A secagem das sementes foi feita à sombra, até que o excesso de água fosse eliminado, de acordo com as recomendações de Davide et al. (1995).

O grau de umidade foi determinado pelo método da estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ por 17 horas (Brasil, 1992), com 4 repetições de dois gramas de sementes partidas transversalmente ao meio. Os resultados foram calculados com base no peso das sementes úmidas e expressos em porcentagem.

Tolerância à dessecação: para esta determinação, foi utilizado um protocolo baseado na redução do nível de hidratação das sementes a cada 5% (Hong & Ellis, 1996). Para a obtenção dos tratamentos, após o beneficiamento, as sementes foram divididas em subamostras de acordo com os níveis de hidratação a serem obtidos (30%, 25%, 20%, 15%, 10% e 5%). As sementes

foram misturadas com sílica gel, de acordo com a metodologia utilizada por Pammenter et al. (1998) e colocadas em gerbox vedados com filme plástico mantidos em sala de secagem climatizada (20°C/60% UR), monitorada com termoigrógrafo. Foram realizadas pesagens sucessivas, até que o peso encontrado coincidissem com o grau de umidade desejado, por meio da expressão proposta por Cromarty et al. (1985):

$$Pd = Pi \times \frac{(100 - U_i)}{(100 - U_d)}$$

onde, Pd= peso desejado

Pi= peso inicial

U_i= umidade inicial

U_d= umidade desejada

O efeito da desidratação das sementes foi verificado por meio de teste de germinação realizado sobre areia dentro de gerbox a 30°C, sob luz branca constante, com quatro repetições de 25 sementes em delineamento inteiramente casualizado. O teste teve a duração de 90 dias.

Avaliação da integridade do DNA: para a extração de DNA, foram utilizadas cinco sementes sem tegumentos, com 35%, 30%, 20%, 10% e 7% de umidade. Para efeito de comparação com uma espécie de comportamento ortodoxo, paralelamente, foi realizado um ensaio com sementes de goiaba (*Psidium guajava* - Myrtaceae). Os frutos maduros de goiaba foram colhidos de diversas árvores localizadas no Viveiro Florestal da UFLA e levados ao galpão do Laboratório de Sementes Florestais, onde ocorreu o beneficiamento. A extração de DNA foi realizada a partir de 1g de sementes inteiras recém-colhidas (23,18% de umidade) e de sementes com 7% de umidade, submetidas à secagem em sílica gel.

A extração de DNA de ambas as espécies foi realizada de acordo com o protocolo com CTAB 2X. Inicialmente, as amostras foram maceradas

separadamente em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bem fino que foi transferido para um microtubo de 2mL. Foram acrescentados 800µL de CTAB 2X (água pura; 1M TRIS-HCl pH 7,5, 5M NaCl, 0,5M EDTA pH 8,0, 2 gramas de CTAB e 2% de β-mercaptoetanol) pré-aquecido a 65°C, mantendo-se esta temperatura por 40 minutos. Posteriormente, foram adicionados 800µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e os microtubos foram invertidos durante 5 minutos, quando, então, foram centrifugados a 7.900rpm, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e acrescentaram-se 2µL de RNAase (10mg/mL), mantendo à temperatura de 37°C durante uma hora. Após esse período adicionou-se 1 volume de isopropanol gelado aos tubos que permaneceram a -20°C por 12 horas. Em seguida os tubos foram centrifugados a 14000 rpm a 4°C durante 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Adicionaram-se 800µL de etanol 70% e os tubos permaneceram em repouso por 10 minutos, quando foram novamente centrifugados a 7.900 rpm, a 4°C, durante 10 minutos com a finalidade de remover resíduos de CTAB. Os tubos foram então invertidos em um papel limpo para secar o pélete que, posteriormente, foi dissolvido em 10µL de TE pH 8,0 (10mM TRIS-HCl e 1mM EDTA).

Para a avaliação por eletroforese foi utilizado o marcador 1Kb Plus DNA Ladder (1µg/µL) e 7µL de DNA de cada amostra em um gel de agarose 1% com coloração de brometo de etídio, sendo visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento EDAS 290 (Kodak®).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes recém-colhidas de *Eugenia handroana* apresentaram grau de umidade de 35,45% e germinação de 20%. Esses valores são semelhantes aos encontrados por Carvalho (2000) para a mesma espécie. Este autor relatou um grau de umidade inicial de 47,1% e germinação de 25% logo após a colheita. Todavia, na presente pesquisa, parte dos frutos foi armazenada por dois meses e, após o beneficiamento, apresentou 87% de germinação. O aumento observado no resultado de germinação após o armazenamento pode ser atribuído ao término da diferenciação dos tecidos das sementes, já que embriões de *Eugenia* apresentam-se conferruminados, ou seja, os cotilédones são concrecidos sem vestígio de eixo hipocótilo-radícula, sugerindo a presença de tecido meristemático não diferenciado (Barroso, 1991). De acordo com Baskin & Baskin (1998), esse é um tipo de dormência morfológica descrita como dormência primária e endógena. Porém, mais estudos são necessários para caracterizar corretamente o tipo de dormência que esta espécie apresenta.

Os resultados percentuais de umidade, germinação e tempo necessário para secagem constam da Tabela 1. Pelos dados observados é possível inferir que a desidratação crescente causou a redução acentuada de formação de plântulas normais pelas sementes com níveis de hidratação inferiores. Isto, possivelmente, deve-se ao aumento no processo de deterioração das sementes. O fato de a secagem ter influenciado de forma negativa a germinação revela o caráter de sensibilidade à dessecação das sementes de *Eugenia handroana*.

Geralmente, quanto mais rápida é a forma de secagem, mais baixo é o conteúdo de água que a semente pode tolerar, pelo fato desse método não oferecer tempo suficiente para o progresso de reações de efeito deletério que

causam a perda da viabilidade em materiais sensíveis à dessecação (Pammenter et al., 1998).

TABELA 1. Porcentagem de germinação (plântulas normais) de sementes de *Eugenia handroana* D Legrand com diferentes graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Grau de umidade desejado (%)	Período de secagem (dias)	Grau de umidade alcançado (%)	Germinação (%)
35,45	-	-	87
30	5	31,12	79
25	11	25,68	63
20	18	21,29	59
15	24	16,20	56
10	31	9,84	36
7	40	7,35	0
5	44	5,65	0

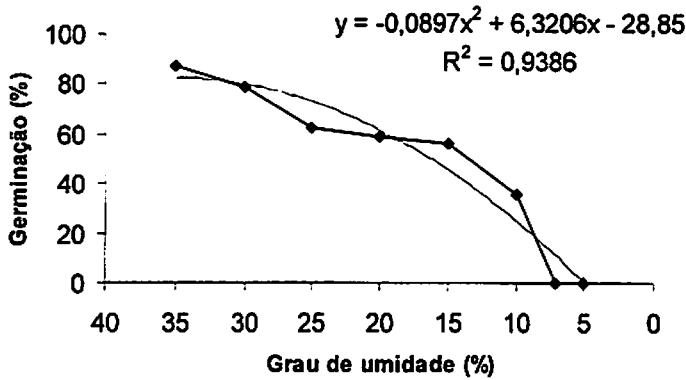


FIGURA 1. Porcentagem de germinação (plântulas normais) de sementes de *Eugenia handroana* D. Legrand (Myrtaceae) em função de diferentes graus de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Um decréscimo na formação de plântulas normais foi observado à medida que o grau de umidade das sementes foi reduzido (Figura 1). Pelos resultados obtidos é possível observar que a porcentagem de germinação é máxima quando o grau de umidade das sementes é superior a 30%. Ao reduzi-lo para valores abaixo de 25%, a capacidade germinativa das sementes é diminuída gradativamente até ser completamente anulada quando o nível de hidratação atinge valores inferiores a 10%.

A redução drástica da germinação, observada quando as sementes atingiram menos de 10% de umidade, permite considerar que as sementes da espécie em estudo possivelmente podem ser classificadas como intermediárias. De acordo com Ellis et al. (1990), nessas sementes, alguns elementos se destacam, como a tolerância a níveis de umidade entre 10% e 12,5% e a intolerância a temperaturas abaixo de 0°C, especialmente no caso de sementes de espécies tropicais.

Carvalho (2000) classificou as sementes de *Eugenia handroama* como recalcitrantes ao observar que as sementes recém-colhidas (47,1% de grau de umidade) apresentaram 25% de germinação e que, após a desidratação a 11,5%, ocorreu completamente a perda da capacidade germinativa e também quando as sementes foram armazenadas sob baixas temperaturas (5°C e -18°C). Porém, parece que as sementes dessa espécie não haviam completado o processo de diferenciação de seus tecidos no momento em que foram submetidas à desidratação e talvez por isso não tenham sobrevivido à redução do nível de hidratação. Assim, foram precocemente classificadas como recalcitrantes naquela pesquisa, já que, como discutido anteriormente, embriões de *Eugenia* apresentam tecido meristemático não diferenciado (Barroso, 1991).

Os danos causados pela dessecação são atribuídos à falta ou ineficiência dos processos e mecanismos que protegem as sementes tolerantes à dessecação no estado desidratado, tais como características físicas celulares, dediferenciação intracelular, presença de sistemas eficientes de antioxidantes, acúmulo de moléculas protetoras, como LEA proteínas, sucrose e certos oligossacarídeos, o desenvolvimento de moléculas anfipáticas e a presença de mecanismos de reparo durante a reidratação das sementes (Pammenter & Berjak, 1999). Assim, a característica de sensibilidade à dessecação está associada à ausência ou ineficiência de tais processos que facilitam a aquisição e a manutenção da tolerância à dessecação pelas sementes ortodoxas durante a maturação e após a dispersão.

Muitas espécies pertencentes à família Myrtaceae produzem sementes sensíveis à dessecação. Dentro do gênero *Eugenia*, outras espécies também apresentam comportamento intermediário quanto à capacidade de armazenamento, como *Eugenia florida* (Carvalho, 2000) e *Eugenia rostrifolia* (Santos et al., 2004); muitas espécies apresentam sementes recalcitrantes, tais como *E. calycina* (Bülow et al., 1994), *E. pyriformis* (Andrade & Ferreira, 2000;

Silva et al., 2003), *E. brasiliensis* (Andrade, 2002), *E. involucrata* (Maluf et al., 2003), *E. divaricata* (Gentil, 2003), *E. dysenterica*, *E. unifolia* e *E. bimarginata* (Faiad et al., 2005).

Nas sementes sensíveis à dessecação, a perda de água estrutural durante o processo de secagem causa a alteração de sistemas metabólicos e de membranas, resultando no início do processo de deterioração das sementes (Farrant et al., 1988).

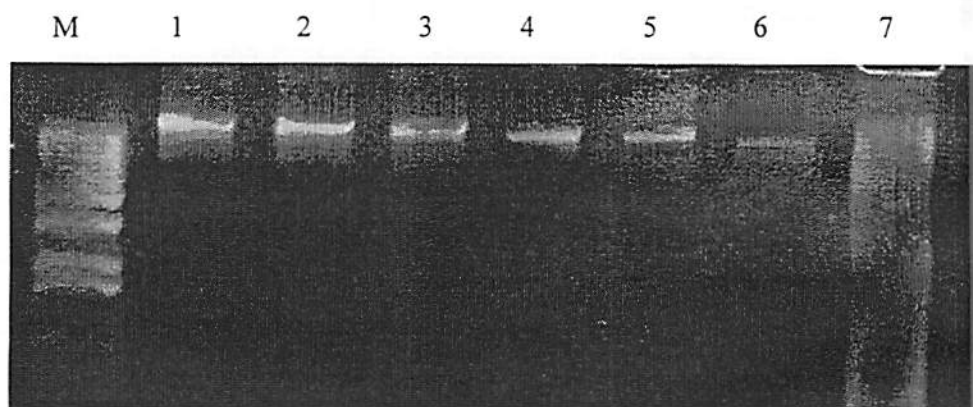


FIGURA 2. Gel de agarose 1% com DNA extraído de sementes de goiaba (*Psidium guajava*) e de embriões de *Eugenia handroana* D Legrand. M: marcador 1 Kb Plus DNA Ladder; 1: goiaba (23,18%); 2: goiaba (7%); 3: *Eugenia* (35,45%); 4: *Eugenia* (30%); 5: *Eugenia* (20%); 6: *Eugenia* (10%); 7: *Eugenia* (7%). UFLA, Lavras, MG, 2005.

Teoricamente, a tolerância à dessecação tende a aumentar com o número de mecanismos de proteção em atividade, de modo que, provavelmente, existe um gradiente de tolerância dependente da interação efetiva entre os mecanismos que estão presentes (Berjak & Pammenter, 2000).

As sementes de goiaba recém-colhidas apresentaram 81% de germinação e as sementes secas a 7% de umidade apresentaram 90% de germinação.

Pela Figura 2, é possível observar que o aspecto do DNA das sementes de goiaba não sofreu alterações com a secagem. Em sementes ortodoxas, tal habilidade certamente está relacionada aos mecanismos de sobrevivência da célula sob reduzido nível de hidratação. O mesmo foi verificado com o DNA das sementes de *Eugenia handroana* com 30%, 20% e 10% de umidade, embora apresentando uma redução constante da capacidade germinativa. Essa redução, portanto, não é causada pela degradação do DNA. Segundo Osborne (2000), o conteúdo de água nas sementes pode determinar a manutenção da integridade das proteínas, a ativação de endonucleases, a conformação do DNA e a integridade do genoma.

Os resultados demonstraram que a redução do nível de hidratação para 7% ocasionou a degradação completa do DNA, coincidindo com a perda da capacidade germinativa das sementes. O modelo de degradação observado deve-se ao processo de morte passiva da célula (Wang et al., 1998), que ocorre no momento em que a célula é sujeita ao estresse ambiental. No estado desidratado, a denaturação de proteínas, a desestabilização de membranas e a perda da função de enzimas e da integridade de ácidos nucléicos acontecem a taxas que são determinadas pelo ambiente externo e pela constituição genética da espécie. Se a célula permanece no estado desidratado, a perda da viabilidade e a morte são eventualmente inevitáveis (Osborne & Boubriak, 1997).

Em sementes intermediárias, pode ocorrer a expressão de um gene ou de uma combinação de genes que conferem uma tolerância considerável, porém

incompleta e que determina o tipo de comportamento intermediário quanto à capacidade de tolerância à dessecação (Hong & Ellis, 1995).

Assim, a manutenção da informação genética é um fator essencial para a tolerância à dessecação e sobrevivência da célula após a desidratação e reidratação (Osborne et al., 2002). Com a redução do grau de umidade para 7%, ocorreu a degradação do DNA de modo irreversível para recuperar a integridade e restabelecer sua condição funcional após a reidratação das sementes.

Os danos no DNA incidem nas células se a desidratação ocorre quando a cromatina ou a conformação do DNA não são organizados para suportar a desidratação (Osborne & Boubriak, 1994).

Faria et al. (2005) também relataram a fragmentação do DNA de sementes germinadas de *Medicago truncatula* com 2mm de radícula submetida à desidratação. Essa fragmentação ocorreu de acordo com o processo de morte-programada das células em que são formados múltiplos fragmentos de DNA e não a degradação do DNA como um arrasto no gel, conforme foi observado para as sementes de *Eugenia handroana*.

6 CONCLUSÕES

Sementes de *Eugenia handroana* apresentam um comportamento fisiológico possivelmente intermediário quanto à capacidade de tolerância à dessecação.

A secagem das sementes até 10%, embora tenha causado uma redução na germinação, não provocou alterações na integridade do DNA. Sementes com 7% de umidade perdem a capacidade germinativa e a integridade do DNA.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, R. N. B. **Germinação de sementes de plantas ornamentais ocorrentes no Rio Grande do Sul.** 2002. 110 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

ANDRADE, R. N. B.; FERREIRA, A. G. Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. -Myrtaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 118-125, 2000.

BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas.** Viçosa: UFV, 1999. 443 p.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds – ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination.** New York: Academic Press, 1998. p. 5-26.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, n. 1, p. 22-55, abr. 2000.

BRASIL. Ministério da agricultura. **Regras para análise de sementes.** Brasília, 1992. 365 p.

BÜLOW, J. F. W. V.; CARMONA, R.; PARENTE, T. V. Armazenamento e tratamento de sementes de pitanga-vermelha-do-cerrado (*Eugenia calycina*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 961-970, jun. 1994.

CARVALHO, L. R. de. **Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais quanto à capacidade de armazenamento.** 2000. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CROMARTY, A. S.; ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. **Desing of seed storage facilities for genetic conservation.** Rome: IPGRI, 1985. 100 p.

DAVIDE, A. C.; FARIA, J. M. R.; BOTELHO, S. A. **Propagação de espécies florestais.** Belo Horizonte: CEMIG/UFLA/FAEPE; Lavras: UFLA, 1995. 41 p.

- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, Sept. 1990.
- FAIAD, M. G. R.; SALOMÃO, A. N.; SANTOS, I. R. I. Estratégias e resultados da conservação de germoplasma-semente a longo prazo. Disponível em: <<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=../biotecnologia/index.html&conteudo=../biotec....>>. Acesso em: 30 out. 2005.
- FARIA, J. M. R.; BUITINK, J.; LAMMEREN, A. A. M. V.; HILHORST, H. W. M. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation-tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v. 56, n. 418, p. 2119-2130, Aug. 2005.
- FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Recalcitrance; a current assessment. **Seeds Science and Technology**, Zurich, v. 16, n. 1, p. 155-166, 1988.
- GENTIL, D. F. O. **Conservação de sementes de Myrciaria dúbia (H. B. K.) McVaugh**. 2003. 41 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- GUMEDE, Z.; MERHAR, V.; BERJAK, P. Effect of dessication on the microfilament component of the cytoskeleton in zygotic embryonic axes. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON DESSICATION-SENSITIVITY AND TOLERANCE IN SEEDS AND VEGETATIVE PLANT TISSUES, 4., 2003, South Africa. **Abstracts...** South Africa, 2003. p 22.
- HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Interspecific variation in seed storage behaviour within two genera – *Coffea* and *Citrus*. **Seeds Science and Technology**, Zurich, v. 23, n. 1, p. 165-181, 1995.
- HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 55 p. (IPGRI. Technical Bulletin, 1).
- MALUF, A. M.; BÍLIA, D. A.; BARBEDO, C. J. Drying and storage of *Eugenia involucrata* DC. seeds. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 3, p. 471-475, July/sept. 2003.
- OSBORNE, D. J.; BOUBRIAK, I. I. DNA and desiccation tolerance. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 2, p 175-185, June 1994.

OSBORNE, D. J. Hazards of a germinating seed: available water and the maintenance of genomic integrity. **Israel Journal of Plant Sciences**, Jerusalem, v. 48, p. 173-179, 2000.

OSBORNE, D. J.; BOUBRIAK, I., LEPRINCE, O. Rehydration of died systems: membranes and the nuclear genome. **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford, Oxon, U.K: CABI Publishing, p.343-364. 2002

OSBORNE, D. J.; BOUBRIAK, I. I. DNA status, replication and repair in desiccation tolerance and germination. **Basic and applied aspects of seed biology**. Kluwer Academic Publishers, 1997. p. 23-32.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 1, p. 13-37, Mar. 1999.

PAMMENTER, N. W.; GREGGAINS V.; KIOKO, J. I.; WESLEY-SMITH, J.; BERJAK, P.; FINCH-SAVAGE, W. E. Effects of differential drying rates on viability of recalcitrants seeds of *Ekebergia capensis*. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, n. 4 p. 463-471, Dec. 1998.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seeds Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 4, p. 449-514, 1973.

SCHOEN, D. J.; BROWN, A. H. D. The conservation of wild plant species in seeds banks. **Bioscience**, Montreal, v. 51, n. 11, p. 960-966, Nov. 2001.

SANTOS, C. M. R.; FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Características de frutos e germinação de seis espécies de Myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 14, n. 2, p. 13-20, dez. 2004.

SILVA, C. V.; BILIA, D. A. C.; MALUF, A. M.; BARBEDO, C. J. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. -Myrtaceae) **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 213-221, abr./jun. 2003.