

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

DETECÇÃO DA DETERIORAÇÃO DE ACESSOS DE SEMENTES DE
***Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All - (Fabaceae) POR TESTES**
BIOQUÍMICOS, DE VIGOR E ANÁLISE CITOGENÉTICA.

LAÍSSA CASTELO SCHWINGEL SISTON

ORIENTADORA: Profa. Dra. ROSANA DE CARVALHO CRISTO MARTINS

CO ORIENTADOR: Dr. JULIANO GOMES PÁDUA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS.

Brasília – DF: 12 de setembro de 2013.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

DETECÇÃO DA DETERIORAÇÃO DE ACESSOS DE SEMENTES DE
Dalbergia nigra (Vell.) Fr. ALI POR TESTES BIOQUÍMICOS, DE VIGOR E
ANÁLISE CITOGÉNÉTICA

LAÍSSA CASTELO SCHWINGEL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS, DO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL, DA FACULDADE DE TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE.

APROVADA POR:



Prof.^a Dr.^a Rosana de Carvalho Cristo Martins (Departamento de Engenharia Florestal, UnB);
(Orientador)



Prof. Dr. Anderson Marcos de Souza (Departamento de Engenharia Florestal, UnB);
(Examinador interno)



Dr. Marcos Aparecido Gimenes (Instituto Agronômico de Campinas - IAC);
(Examinador externo)

Prof. Dr. Ildeu Soares Martins (Departamento de Engenharia Florestal, UnB);
(Examinador suplente)

Brasília, 12 de Setembro de 2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de
Brasília. Acervo 1012022.

S623d Siston, Laíssa Castelo Schwingel.
Detecção da deterioração de acessos de sementes de
Dalbergia nigra (Vell.) Fr. All - (Fabaceae) por testes
bioquímicos, de vigor e análise citogenética / Laíssa
Castelo Schwingel Siston. -- 2013.
ix, 71 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília,
Faculdade de Tecnologia, Departamento de Engenharia
Florestal, Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais,
2013.

Orientação: Rosana de Carvalho Cristo Martins ; Coorientação
Juliano Gomes Pádua.

1. Jacarandá. 2. Sementes. 3. Citogenética. 4. Germinação.
I. Martins, Rosana de Carvalho Cristo. II. Pádua, Juliano
Gomes. III. Título.

CDU 581.142

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

SISTON, L.C.S. 2013. **Detecção da deterioração de acessos de sementes de *Dalbergia nigra* (vell.) Fr. All - (Fabaceae) por testes bioquímicos, de vigor e análise citogenética.** Dissertação de Mestrado em Engenharia Florestal. Publicação PPG EFL 221/2013, Faculdade de Tecnologia, Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 71p.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Laíssa Castelo Schwingel Siston

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Detecção da deterioração de acessos de sementes de *Dalbergia nigra* (vell.) Fr. All - (Fabaceae) por testes bioquímicos, de vigor e análise citogenética.

GRAU: Mestre ANO: 2013.

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação. Nenhuma parte dessa dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

Laíssa Castelo Schwingel Siston

Endereço eletrônico: laissaschwingel@gmail.com

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades;

Ao meu esposo Luiz Gustavo, melhor amigo e companheiro, meu incentivador na busca do meu engrandecimento pessoal e intelectual;

À Universidade de Brasília, pela formação e oportunidade de realização do curso;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo;

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela infraestrutura e oportunidade no desenvolvimento desse estudo;

Ao pesquisador, co-orientador Dr. Juliano Gomes Pádua, pelo apoio e ensinamentos transmitidos, incentivo, momentos de convívio, exemplos de conduta, pela confiança, amizade, disponibilidade, serenidade e paciência na orientação desse estudo;

À pesquisadora, professora, amiga e orientadora Dra. Rosana de Carvalho Cristo Martins, pelo apoio e ensinamentos transmitidos;

À pesquisadora e amiga Dra. Marisa Toniolo Pozzobon, pela compreensão, pelos ensinamentos e auxílio nas avaliações da citogenética desse estudo;

À pesquisadora Dra. Andréa del Pilar de Souza Peñaloza, pela paciência e auxílio durante a execução e análises citogenéticas;

À pesquisadora Antonieta Nassif Salomão, pelos conhecimentos transmitidos e verdadeiros exemplos de dedicação, pela amizade, disponibilidade e inúmeras sugestões durante a execução desse estudo;

À pesquisadora Joseane Padilha da Silva, pela participação fundamental nas análises estatísticas;

A todos os pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, de maneira especial a Dra. Clara Oliveira Goedert, Dr. Marcos Gimenez, Dra. Solange Carvalho Barrios Roveri José, pela amizade, incentivo e confiança;

Ao amigo Gleidson pelo auxílio na coleta e obtenção das sementes;

A todos do Laboratório de Sementes (Ana Paula, Rosa, Valdomiro, Aldo, Leonel, Cheila, Lucimar), pela ajuda nos trabalhos de bancada, bons momentos e excelente convívio;

A todos que, mesmo não citados aqui, contribuíram de alguma forma para a realização desse estudo.

RESUMO

A conservação de sementes é de suma importância para a preservação da diversidade biológica em bancos de germoplasma. A avaliação da viabilidade das sementes é realizada principalmente através de testes de germinação, porém este não é capaz de detectar danos decorrentes do envelhecimento natural em seus estádios iniciais, minimizando os efeitos da erosão genética ao regenerar a amostra quando muitas sementes do acesso já se encontram mortas. Nesse contexto o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da deterioração de sementes de *Dalbergia nigra* por meio do teste de tetrazólio, condutividade elétrica e análises citogenéticas. As sementes coletadas foram envelhecidas artificialmente, sendo mantidas a 42°C por 24, 48, 72 e 96 horas. Posteriormente foram realizados os testes de germinação, tetrazólio, condutividade elétrica e citogenético. O experimento foi realizado com delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições de 25 sementes por tratamento, para cada variável analisada, para sementes armazenadas e recém coletadas. A análise estatística foi efetuada por meio de análise de variância entre os tratamentos, seguido pelo teste de Tukey, a 5%. Foi feita a correlação simples entre as variáveis avaliadas e a germinação e também a correlação multivariada, que evidencia o efeito conjunto de variáveis sobre a germinação, utilizando-se modelos de regressão linear, quadráticos e modelos não lineares. Os resultados mostraram que à medida que o tempo de envelhecimento aumentou a germinação diminuiu. Esses dados foram comprovados com o teste de tetrazólio, que apresentou correlação muito alta com a germinação. O teste de condutividade elétrica identificou que um dos lotes de sementes estava com qualidade fisiológica muito baixa, porém, dentro de um mesmo lote, não se mostrou eficiente em distinguir sementes com distintos níveis de qualidade fisiológica. O índice de velocidade de germinação mostrou-se como o teste mais promissor para identificar lotes com perda de qualidade fisiológica. A frequência das anormalidades encontradas na mitose aumentou com o tempo de duração do teste de envelhecimento acelerado, sugerindo que a germinação diminui à medida que a frequência de aberrações cromossômicas aumenta, sendo as anormalidades ponte e cromossomo retardatário as que apresentam efeito mais pronunciado. De acordo com os dados obtidos, sugere-se que, em associação aos testes de germinação seja avaliado também o índice de velocidade de germinação como forma de detecção de envelhecimento de forma precoce.

Palavras chave: conservação *ex situ*, deterioração, envelhecimento, jacarandá da bahia, citogenética.

ABSTRACT

The conservation of seeds is of utmost importance for the preservation of the biological diversity in germplasm banks. The evaluation of the viability of the seeds is accomplished mainly through germination tests; however, this is not capable to detect related damages of the natural aging in its initial stadiums, minimizing the effects of the genetic erosion when regenerating the sample, when many seeds of the seed lot already meet dead. In this context, the objective of this study was to evaluate the effect of seed deterioration in *Dalbergia nigra* by the tetrazolium test, electrical conductivity and cytogenetic analyzes. The collected seeds were artificially aged, being kept at 42 ° C for 24, 48, 72 and 96 hours. Subsequently, we performed the germination tests, tetrazolium, electrical conductivity and cytogenetics. The experiment was conducted with a completely randomized design with 4 replications of 25 seeds per treatment for each variable analyzed, stored seeds and newly collected. The statistical analysis was performed by analysis of variance between treatments, followed by Tukey test at 5%. It was made the simple correlation between the variables assessed and germination, and also the multivariate correlation, which reflects the joint effect of variables on the germination, using linear regression models, quadratic and nonlinear models. The results showed that as the aging time increased the germination decreased. These data were confirmed with the tetrazolium test, which showed very high correlation with the germination. The electrical conductivity test identified that one lot of seed were with physiological quality too low, however, within the same batch, did not show efficient to distinguish seeds with different physiological quality levels. The rate of germination speed showed up as the most promising test to identify lots with loss of physiological quality. The frequency of abnormalities found in mitosis increased with the duration of the accelerated aging test, suggesting that the germination decreases as the frequency of chromosomal aberrations increases, and abnormalities bridge and latecomer chromosome, those that present most pronounced effect. According to the data obtained, it is suggested that, in association to the germination test is also evaluated the rate of germination speed as a way of detecting the premature aging.

Keywords: conservation ex situ, deterioration, viability, aging, jacaranda da bahia, cytogenetic

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	11
2 - HIPÓTESE	14
3 - OBJETIVOS	14
3.1. OBJETIVO GERAL	14
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4 - REFERENCIAL TEÓRICO	14
4.1. Jacarandá-da-bahia - <i>Dalbergia nigra</i> (Vell.) Fr. All.ex Benth.)	14
4.2. Conservação <i>ex situ</i> : o armazenamento, o vigor e a deterioração	16
4.3. Envelhecimento acelerado	22
4.4. Os testes de condutividade elétrica e tetrazólio	24
4.9. Germinação	28
4.5. Análise citogenética em sementes	29
5- MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1. Obtenção das sementes	33
5.2. Envelhecimento acelerado	33
5.2. Determinação da umidade	33
5.3. Germinação	34
5.4. Índice de Velocidade de Germinação (IVG)	35
5.5. Teste de Condutividade Elétrica	35
5.6. Teste do Tetrazólio	35
5.7. Teste Citogenético	36
5.7.1 Preparação da lâmina	36
5.8. Análise Estatística	37
6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6.1. Teste Citogenético	48
6.1.2. Coleta de tecido meristemático para análise mitótica	49
6.1.3. Avaliação das fases observadas	49
A) Sementes do acesso I	49

B) Sementes do acesso II.....	51
7- CONCLUSÕES.....	56
7.1 RECOMENDAÇÕES.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 6.1: Teor de umidade (U), Teste de germinação (G), Índice de velocidade de germinação (IVG), Teste de Tetrazólio (TZ), Condutividade Elétrica (CE), Porcentagem de Metáfase Anormal (MA), Porcentagem de Ponte (P) Porcentagem de cromossomos retardatários (R) e Soma das anormalidades (SA), após o envelhecimento acelerado de sementes do acesso I de <i>Dalbergia nigra</i> (Vell.) Fr. All.ex Benth.).....	38
Tabela 6.2: Teor de umidade (U), Teste de germinação (G), Índice de velocidade de germinação (IVG), Teste de Tetrazólio (TZ), Condutividade Elétrica (CE), Porcentagem de Metáfase Anormal (MA), Porcentagem de Ponte (P) Porcentagem de cromossomos retardatários (R) e Soma das anormalidades (SA), após o envelhecimento acelerado de sementes do acesso II de <i>Dalbergia nigra</i> (Vell.) Fr. All.ex Benth.).....	39
Tabela 6.3: Coeficientes de correlação simples (r) entre os valores de M A (Metáfase Anormal); A/T (Anáfase/Telófase); R (Retardatário); P (Ponte); G (Germinação) e CE (Condutividade Elétrica), para sementes de <i>Dalbergia nigra</i> do acesso II.	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1: Fruto maduro de <i>Dalbergia nigra</i> (Vell.) Fr. All.ex Benth.) Fonte: Google imagens.....	15
Figura 6.1: Plântulas de <i>Dalbergia nigra</i> , acesso I, envelhecidas por 24 horas a 42°C.....	40
Figura 6.2: Plântulas de <i>Dalbergia nigra</i> , acesso II, envelhecidas por 24 horas a 42°C. ...	40
Figura 6.3: Sementes de <i>Dalbergia nigra</i> envelhecidas por 72 horas.....	41
Figura 6.4: Avaliação do teste de germinação das sementes de <i>Dalbergia nigra</i> , acesso II, envelhecidas por 72 horas.....	42
Figura 6.5: Padrões de coloração obtidos submetendo as sementes de <i>Dalbergia nigra</i> a três diferentes técnicas de exposição dos tecidos; A, B, C e D (exposição do embrião); E, F, G, H (cortes em tecidos não essenciais); I, J, K, L (perfuração dos tecidos não essenciais), solução de 0,75% por 24 horas.....	43
Figura 6.6.: Contagem do número de cromossomos de <i>Dalbergia nigra</i> $2n = 20$	49
Figura 6.7.: Quantidade de anormalidades necessárias para que a germinação de sementes de <i>Dalbergia nigra</i> caia 50%.....	50
Figura 6.8: Quantidade de anormalidades necessárias para que a germinação de sementes de <i>Dalbergia nigra</i> caia 50%.....	52
Figura 6.9: Aberrações nucleares em sementes de <i>Dalbergia nigra</i> envelhecidas artificialmente A e B: metáfase anormal, C: anáfase com ponte e D: anáfase com retardatário.....	53

1- INTRODUÇÃO

A conservação de recursos genéticos é uma atividade estratégica para o país e considerada de segurança nacional, assegurando a continuação dos trabalhos de melhoramento, visando à obtenção de cultivares mais produtivas e adaptadas às regiões brasileiras.

A conservação de sementes, também apresenta um papel importante para a formação de mudas ou para a semeadura direta, com objetivos de reflorestamento, no caso de espécies florestais. Uma vez que a produção de sementes é dependente de fatores bióticos e abióticos, muitas espécies podem ter sua produção de sementes reduzida ou até mesmo inexistir. Existem espécies que ficam até anos sem produzirem sementes, enquanto outras intercalam altas produções com períodos em que ocorrem produções irregulares (PIÑA-RODRIGUES e PEREIRA, 1993). Para esses casos, a conservação de sementes, ou outro germoplasma, apresenta uma importância ainda maior, pois garante a possibilidade de propagação continuada ao longo dos anos.

O entendimento da biologia da semente é imperativo para o desenvolvimento de ferramentas efetivas de conservação (EL-KASSABY e EDWARDS, 1998). Esta tem sido meta constante entre os pesquisadores, tecnólogos e produtores de sementes para subsidiar o manejo racional, desde a manutenção de bancos de germoplasma até a comercialização e estabelecimento de uma nova cultura (USBERTI e GOMES, 1998).

Para espécies ameaçadas de extinção, como é o caso de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth esses estudos têm sua importância aumentada, pois as sementes conservadas, na forma *ex situ*, podem ser utilizadas para o reflorestamento de áreas. Com o fortalecimento da política ambiental espera-se um aumento na demanda por sementes de espécies nativas, que constituem insumo básico nos programas de recuperação e conservação de ecossistemas (CARVALHO, SILVA e DAVIDE, 2006). Dessa forma, estudos que objetivem entender os processos físicos e biológicos associados ao armazenamento e conservação de sementes são fundamentais para que essa demanda possa ser atendida.

A longevidade da semente é característica de cada espécie e o armazenamento adequado é uma estratégia fundamental para manutenção da sua viabilidade. A qualidade das sementes não é melhorada pelo armazenamento, mas pode ser mantida com um

mínimo de deterioração possível, mediante estocagem adequada. Assim, estabelecer as condições ótimas de armazenamento é de fundamental importância para minimizar ou retardar os efeitos da deterioração das sementes (MARCOS FILHO, 2005).

A viabilidade das sementes durante o armazenamento depende de vários fatores (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Primeiramente, a respiração das sementes deve ser mantida em um nível mínimo, apenas o suficiente para mantê-las vivas, mas em taxas suficientemente baixas para evitar o consumo de reservas e a oxidação degenerativa (FOWLER, 2000). Um fator que contribui para isso é a redução da temperatura. Tal condição diminui o metabolismo da semente e a proliferação de microrganismos, o que favorece a viabilidade das sementes (BARBEDO, BILIA e FIGUEIREDO-RIBEIRO, 2002). Os microrganismos também serão mais bem controlados se as sementes mantiverem baixo teor de água, que pode ser mantidas com a redução da umidade relativa do ambiente de armazenamento (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

Para a maioria das espécies, a viabilidade da semente é mantida quando seca e, por isso, é comum a secagem das sementes, para armazená-las com baixo teor de água (BEWLEY e BLACK, 1994). Portanto torna-se muito importante a manutenção de níveis adequados de umidade das sementes, para controle da velocidade e intensidade das reações, garantindo a qualidade e assegurando o potencial fisiológico das sementes.

O teor de umidade inicial e a umidade de equilíbrio têm sido citados como pontos críticos para a conservação de algumas espécies. A maioria mantém sua viabilidade quando armazenada em condições mais secas, em ambientes e embalagens que permitam atingir uma umidade de equilíbrio abaixo de um ponto crítico para a conservação das sementes da espécie.

A avaliação da viabilidade das sementes conservadas é feita por meio do teste de germinação. No entanto, esse teste não permite detectar o progresso da deterioração das sementes, indicando apenas os estádios finais do processo (ABDUL-BAKI e ANDERSON, 1972). As perdas de vigor e viabilidade das sementes armazenadas decorrem, dentre outros fatores, do processo de envelhecimento natural, que pode estar associado a alterações citológicas, tais como a destruição do sistema de membranas e que podem implicar também em alterações metabólicas, fisiológicas e genéticas (ROBERTS, 1973a).

A qualidade fisiológica das sementes durante o armazenamento pode ser avaliada por testes de germinação e de vigor, os quais refletem atributos diferentes. No teste de germinação, avalia-se a porcentagem final de sementes germinadas que deram origem a plântulas normais (MARCOS FILHO, 1999). No teste de vigor avaliam-se os atributos que indiretamente se relacionam com o vigor, que são: atributos físicos, bioquímicos e fisiológicos, incluindo a integridade do sistema das membranas celulares, permitindo que a deterioração seja constatada em sua fase inicial (ISELY, 1957).

Para a *International Seed Testing Association*, dentre os testes de vigor considerados mais importantes destaca-se o teste de condutividade, devido a sua objetividade e rapidez, além da facilidade de execução na maioria dos laboratórios de análise de sementes, sem maiores despesas em equipamento e treinamento de pessoal (VIEIRA e KRZYZANOWSKI, 1999).

O teste de condutividade elétrica relaciona a quantidade de substâncias liberadas pelas sementes durante a embebição, com a integridade das membranas, uma vez que, membranas mal estruturadas, desorganizadas ou danificadas levam à perda de lixiviados para o meio externo incluindo íons inorgânicos (K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^+ , Mn^{+2}), bem como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, proteínas e enzimas (MARCOS FILHO, 2005), acarretando redução do vigor (VIEIRA e KRZYZANOWSKI, 1999).

Para diagnosticar danos aos cromossomos, além do aumento de aberrações a citogenética tem se mostrado bastante promissora. O uso mais imediato das análises citogenéticas é evitar anos de insucesso na condução de trabalhos de conservação. (PEÑALOZA, 2005).

A utilização de metodologias complementares às tradicionalmente empregadas que possam agregar informações sobre o processo de envelhecimento e deterioração de sementes de *Dalbergia nigra*, poderá trazer avanços significativos no manejo de sementes conservadas, com vistas a maximizar o tempo de conservação, minimizando a perda de sementes por deterioração, e por fim, garantindo a obtenção de plântulas de elevado vigor.

2 - HIPÓTESE

A utilização de testes bioquímicos (tetrazólio e condutividade elétrica), de vigor e análises citogenéticas podem ser utilizados como indicadores da deterioração de sementes, antes da detecção de perda de viabilidade do germoplasma conservado.

3 - OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a deterioração de sementes de *Dalbergia nigra* por meio de testes bioquímicos, de vigor e análises citogenéticas, tendo como propósito a geração de informações a serem utilizadas na sua conservação *ex situ*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliação do processo de deterioração de sementes de *Dalbergia nigra*.

Avaliar o efeito da deterioração de sementes de *D. nigra* por meio do teste de tetrazólio, condutividade elétrica e análises citogenéticas.

4 - REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. Jacarandá-da-bahia - *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All.ex Benth.)

Conhecida popularmente como jacarandá-da-bahia, jacarandá preto ou caviúna, *D. nigra* é uma espécie da família Fabaceae com altura aproximada de 20 m, tronco de 40 a 80 cm de diâmetro e folhas compostas pinadas de 5 a 8 cm de comprimento (LORENZI, 1992).

Ocorre naturalmente na Bahia (sul), Espírito Santo (norte), Minas Gerais (zona da mata), São Paulo (litoral norte) e Rio de Janeiro (Serra dos Órgãos e Serra do Itatiaia). É uma espécie característica da Floresta Ombrófila Densa “Floresta Atlântica”, possui madeira moderadamente dura, pesada, decorativa e de grande durabilidade natural (CARVALHO, 1994 e LORENZI, 2002). É uma planta decídua, heliófita, seletiva, xerófita, característica da floresta pluvial da encosta atlântica. Ocorre principalmente nas encostas bem drenadas, sendo encontrada tanto no interior da mata primária densa como nas formações secundárias; apresenta caráter pioneiro, ocorrendo inclusive em cortes de barrancos. A árvore é muito ornamental, principalmente pela folhagem delicada e forma

aberta de sua copa, sendo largamente empregada no paisagismo em geral. Como planta rústica e adaptada a terrenos secos é ótima para plantio misto em terrenos degradados de preservação permanente (LORENZI, 1992).

O fruto de *D. nigra* (Figura 4.1.) é um legume samaróide, seco, indeiscente, glabro, não segmentado e plano. As sementes são estenopérmicas, oblongo-ovaladas, planas, com ápice e base arredondada e superfície glabra (DONADIO e DEMATTÊ, 2000).

A germinação se inicia rapidamente (MARTINS e SILVA, 1997), com o intumescimento da semente e, em menos de 10 dias, concomitantemente com o crescimento da raiz, ocorre o desenvolvimento do hipocótilo que logo assume a postura geniculada, tornando-se rapidamente ereta.



Figura 4.1: Fruto maduro de *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All.ex Benth.) Fonte: Google imagens

Andrade *et al.* (2006) estudaram o efeito do substrato, da temperatura de germinação de sementes de *D. nigra* e o desenvolvimento pós-seminal, observando que a germinação é do tipo fânoro epigeal; os cotilédones apresentam função de reserva e sofrem rápida abscisão do hipocótilo.

O jacarandá-da-bahia é conhecido comercialmente há mais de 300 anos, por ser uma das mais valiosas espécies madeireiras que ocorrem no Brasil. Sua madeira foi objeto de exportação através dos portos da Bahia e do Rio de Janeiro, desde os tempos coloniais.

O cerne das árvores jovens desta espécie é pouco atrativo, sendo que o cerne responsável pela produção da famosa madeira provém das árvores velhas, sendo formado muito lentamente (CARVALHO, 1994). Apesar do rendimento em madeira desdobrada ser pequeno, em face das imperfeições usuais, o seu alto valor (cerca de US\$ 5.000/m³ serrado) é altamente compensador (JESUS *et al.* 1992). Uma árvore adulta produz cerca de 2m³ de madeira. Na Europa, a madeira é conhecida com os nomes de “palissandro” ou “Brazilian rosewood”.

Produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis e é capaz de se regenerar também a partir de raízes. Floresce durante os meses de setembro a novembro e a maturação dos frutos ocorre no ano seguinte de agosto a setembro (LORENZI, 1992).

A obtenção de sementes é feita colhendo-se os frutos diretamente da árvore quando do início da queda espontânea. Os frutos assim obtidos podem ser diretamente utilizados para a semeadura como se fossem sementes. Isso, entretanto, pode muitas vezes gerar mudas tortas ou defeituosas, o que é contornado utilizando-se a semente pura. Cada fruto contém de uma a duas sementes, sendo que 1 kg de frutos (vagens) contém aproximadamente 10.000 unidades (LORENZI, 1992) e 1 kg de sementes apresenta de 7.000 (TOLEDO-FILHO e PARENTE, 1988) a 16.360 sementes (GOMES *et al.* 1976).

A exploração indiscriminada dessa espécie, em virtude da madeira ser de ótima qualidade, além da devastação de seu ambiente natural, ocasionou sua inclusão na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (IBAMA, 2008). A necessidade de preservação da espécie, bem como de plantios de reflorestamento, tem despertado interesse pelo seu cultivo e estudos por parte de técnicos e pesquisadores (CARVALHO, 1994).

O jacarandá-da-bahia é uma espécie com alto potencial para o manejo florestal sustentável. Entre as principais estão a sua facilidade de comercialização no mercado atual, por sua madeira de alta qualidade; sua alta taxa de regeneração em florestas alteradas e sua fácil adaptação em terrenos de baixa fertilidade.

4.2. Conservação *ex situ*: o armazenamento, o vigor e a deterioração

O armazenamento é uma etapa fundamental para a manutenção da qualidade fisiológica das sementes e visa à conservação da sua qualidade, utilizando o controle das condições ambientais para a manutenção da viabilidade do produto armazenado. A complexidade das técnicas utilizadas no armazenamento das sementes depende,

fundamentalmente, da finalidade da conservação e da longevidade requerida. Devem-se levar em conta que sementes são estruturas responsáveis pela perpetuação e disseminação das espécies na natureza. Entretanto, tal como outras formas de vida, as sementes não podem manter a sua viabilidade indefinidamente e, eventualmente, elas se deterioram e morrem. Dessa forma, um dos motivos do armazenamento é de se procurar manter a qualidade fisiológica da semente, pela minimização da velocidade de deterioração (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

A maioria das espécies vegetais produz as sementes cujo comportamento durante o armazenamento é ortodoxo (ROBERTS, 1974), isto é, as sementes mantêm a viabilidade em condições de baixa umidade e temperatura. Quando a conservação da capacidade germinativa e das características genéticas das sementes são muito importantes, como em bancos de germoplasma, procura-se exercer o melhor controle possível sobre esses fatores (umidade relativa e temperatura do ar), bem como dar início ao armazenamento somente após terem secado as sementes a valores de umidade que garantam redução significativa das atividades metabólicas. Estes valores de umidade oscilam entre 5 e 7% (CARVALHO e NAKAGAWA, 1988).

O comportamento das sementes durante o armazenamento sofre influência de diversos fatores associados à qualidade inicial da semente (condições climáticas durante a maturação das sementes; grau de maturação no momento da colheita; ataque de pragas e doenças; grau de injúria mecânica), e as características do ambiente (umidade relativa do ar ou teor de água das sementes; temperatura do ar, ação de fungos e insetos de armazenamento) (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000; MARCOS FILHO, 2005).

Os princípios gerais do armazenamento indicam que: este não melhora a qualidade do lote de sementes, apenas a mantém. A temperatura e umidade são vitais para a atividade fisiológica da semente, onde as melhores condições de armazenamento para sementes ortodoxas são no geral temperatura e umidade baixas. Sementes imaturas e danificadas apresentam menor potencial de armazenamento e este varia com a espécie (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000; UFSM, 2004).

A viabilidade das sementes resulta de vários fatores: características genéticas da espécie ou cultivar; vigor das plantas progenitoras; condições climáticas durante a maturação das sementes; grau de dano mecânico e condições ambientais de armazenamento (CARVALHO e NAKAGAWA, 1988). A viabilidade das sementes é

perdida no armazenamento em condições de temperaturas elevadas ou durante prolongados períodos de armazenamento, com a taxa de deterioração variando de espécie para espécie (DHAKAL e PANDEY, 2001).

Como consequência do tempo de armazenamento, pode ocorrer redução da velocidade de crescimento das plântulas, aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática, redução da atividade de algumas enzimas, maior susceptibilidade a estresses, mudanças na respiração, alteração nas reservas alimentícias, alteração na cor, alteração na velocidade de síntese dos compostos orgânicos. O processo de deterioração é parcialmente controlado por métodos adequados de produção, colheita, secagem, beneficiamento e armazenamento (UFSM, 2004).

Toda e qualquer semente armazenada sofre deterioração que pode ser mais rápida ou mais lenta, dependendo das características ambientais e das características das próprias sementes. Geralmente a redução da luminosidade, da temperatura e da umidade de ambos, sementes e ambiente, faz com que seu metabolismo seja reduzido e que os microrganismos que as deterioram permaneçam inativos, aumentando sua longevidade (VIEIRA, *et al.*, 2001).

Outro aspecto importante é a longevidade da semente que é o período de tempo em que esta se mantém viável. As sementes de algumas espécies deterioram-se rapidamente, enquanto outras mantêm sua viabilidade por longo período de tempo (CARNEIRO e AGUIAR, 1993). É possível determinar a viabilidade, que é o período de vida da semente dentro de determinada condição ambiental (CARVALHO e NAKAGAWA, 1988).

ELLIS (1984) verificou que os valores de viabilidade das sementes em porcentagem poderiam ser transformados em valores de 'probit' e plotados linearmente em relação ao período de armazenamento das sementes. Também observou que a longevidade apresenta distribuição normal e que as curvas de sobrevivência das sementes são sigmoidais cumulativas negativas. De acordo com ELLIS e ROBERTS (1980) a viabilidade de sementes armazenadas pode ser determinada através da equação:

$$V = K_i - \frac{p}{10^{K_e - C_w \log m - C_H t - C_Q t^2}}$$

Em que:

v = % viabilidade final prevista (probit);
p = tempo de armazenamento (dias);
m = conteúdo de água (base úmida, em %);
t = temperatura de armazenamento (°C);
K_i = viabilidade inicial do lote de sementes (constante do lote de sementes);
C_H e **C_Q** = constante para cada espécie, relacionada à temperatura;
K_E e **C_W** = constante para cada espécie, relacionada ao conteúdo de água.

A longevidade das sementes armazenadas é influenciada principalmente pelos seguintes fatores (HONG e ELLIS, 2003; BONNER, 2001);

- Umidade e temperatura – Quanto menor o teor de umidade das sementes, e menor for a temperatura de armazenamento, menos intensa será a atividade fisiológica das sementes com consequente queda da atividade fisiológica dos agentes deterioradores (KRAMER e KOZLOWSKI, 1972);

- Quantidade de substâncias de reserva da semente – Geralmente, quanto menor a semente e quanto menor a quantidade de substâncias de reserva da mesma, menor seu período de viabilidade (KAGEYAMA e MARQUEZ, 1981);

- Luminosidade – A luminosidade favorece a oxidação e a alteração das substâncias presentes nas sementes, facilitando sua deterioração (KRAMER e KOZLOWSKI, 1972; CABRAL, BARBOSA e SIMABUKURO, 2003);

- Deterioração do DNA embrionário – As proteínas dos núcleos das células dos embriões das sementes se degeneram com o tempo, causando aberrações cromossômicas que impedem a germinação (KRAMER e KOZLOWSKI, 1972; FONTES, DAVIDE e DAVIDE, 2001);

- Tempo de estocagem (processo do envelhecimento) – Todos os componentes químicos de um ser vivo são instáveis seja em curto ou longo prazo, vindo a se transformar em outros à medida que o tempo passa (envelhecimento), levando as sementes à deterioração gradual e constante em maior ou menor velocidade (CABRAL, BARBOSA e SIMABUKURO, 2003).

A avaliação do vigor das sementes começou nos EUA, na década de 40 e tem evoluído à medida que os testes vêm sendo aperfeiçoados, ganhando precisão e reprodutibilidade de seus resultados (FRANCO e PETRINI, 2002).

Para o estudo de armazenamento de sementes, é necessária a compreensão dos conceitos de vigor e deterioração. De acordo com (MARCOS FILHO, 2005) deterioração ou envelhecimento leva a queda gradativa da viabilidade e do vigor das sementes.

O vigor deve ser entendido como o nível de energia que uma semente dispõe para realizar as tarefas do processo germinativo. O teste de vigor é utilizado para indicar os lotes com maior ou menor probabilidade de sucesso após a semeadura em campo ou durante o armazenamento, sob diferentes condições do ambiente, diferenciando assim do teste de germinação, que informa a porcentagem máxima de plântulas normais sob condições ótimas (CARVALHO, 1986).

A deterioração das sementes pode ser vista como um complexo de mudanças físicas, bioquímicas e fisiológicas que ocorrem com o passar do tempo, resultando na diminuição no grau de capacidade e desempenho da semente na produção de uma plântula normal (KRYZANOWSKI e FRANÇA NETO, 2001). A dimensão das mudanças que ocorrem neste processo depende especialmente do período de tempo e condições de armazenamento (BINGHAM, HARRIS e MC DONALD, 1994).

Segundo DELOUCHE (1963) a deterioração começa a partir da maturidade fisiológica até a total perda da capacidade de germinar, tendo assim, papel determinante na qualidade da semente. A duração do processo de deterioração é determinada principalmente pela interação entre herança genética e fatores ambientais relacionadas ao manejo, pós-colheita das sementes (DELOUCHE e BASKIN, 1973).

DELOUCHE (1963) caracteriza a deterioração como processo inexorável, irreversível, mínimo na maturidade fisiológica cuja velocidade varia entre lotes de sementes da mesma variedade, sendo variável entre sementes individuais dentro de um lote e com diferenças inerentes entre espécies quanto à longevidade.

A perda de germinação é o último efeito ou consequência da deterioração. Assim, a natureza progressiva da deterioração e seus efeitos iniciais não são levados em conta ao analisar-se apenas a germinação das sementes (DELOUCHE, 1963; MARCOS FILHO, 2005).

Diante da premissa de que a perda da capacidade de germinação é o resultado final da deterioração das sementes, pode-se considerar a possibilidade de efeitos do envelhecimento antes mesmo que o processo germinativo seja afetado, por isso estudos sobre o processo fisiológico de sementes armazenadas tornam-se fundamentais para a melhor conservação de sementes.

Os efeitos da deterioração vêm sendo classificados em fisiológicos ou metabólicos/bioquímicos (BRACCINI *et al.* 2001; MARCOS FILHO, 2005).

Os efeitos fisiológicos são mais evidentes, e destacam-se: redução na velocidade de emergência que é o primeiro sintoma da queda do vigor, geralmente determinada pela desorganização do sistema de membranas. Estas perdem sua seletividade e as enzimas tornam-se menos eficientes nas atividades catalíticas, acarretando acúmulo de mutações em cromossomos (SMITH e BERJAK, 1995), redução do crescimento; menor resistência a condições desfavoráveis do ambiente durante a germinação e emergência, decréscimo do potencial de armazenamento; menor resistência à ação de microrganismos, perda de sincronização e aumento da anormalidade no desenvolvimento das plântulas, redução da porcentagem de germinação e perda do poder germinativo.

Carvalho (1994); Marcos Filho (2005), entre outros autores, destacam como principais efeitos metabólicos e bioquímicos, a redução da respiração e síntese de ATP; alterações no sistema de reserva; nos sistemas de membranas; e em sistemas enzimáticos.

A deterioração pode ser explicada pelo fato do envelhecimento das sementes levar a peroxidação de lipídios que é subsequente a causa de perturbações à membrana (SUNG e JENG, 1994). Tais mudanças nas membranas decorrentes do envelhecimento das sementes levam ao extravasamento de eletrólitos ocasionando diminuição na capacidade germinativa. (CHANG e SUNG, 1998).

Goel e Sheoran (2003) avaliaram a correlação existente entre o envelhecimento e o aumento no extravasamento de eletrólitos e relataram que a diminuição da germinabilidade pode estar relacionada com a perda da integridade das membranas.

Segundo Carvalho (1986) existem diversos estudos que buscam a padronização dos testes de vigor que podem usar como parâmetro de avaliação: velocidade de germinação, uniformidade de emergência, resistência ao frio, resposta a germinação sob condições de temperatura e umidade elevadas, substâncias tóxicas entre outros.

De maneira geral os objetivos desses testes consistem em avaliar ou detectar diferenças significativas na qualidade fisiológica de lotes de germinação semelhante, complementando as informações fornecidas pelo teste; distinguir lotes de alto dos de baixo vigor; classificar (ou separar) lotes em diferentes níveis de vigor, de maneira proporcional ao comportamento quanto à emergência das plântulas, resistência ao transporte e potencial de armazenamento (MARCOS FILHO, 1999; POPINIGIS, 1977).

A aplicação dos testes de vigor em sementes de espécies florestais é uma prática que permite estimar e comparar lotes de sementes para diferentes objetivos. A simplicidade, inerente a vários desses testes, aliadas aos bons resultados, tornam-os de utilização promissora em vários campos de pesquisa. Comparações de vigor de sementes entre matrizes, progênies e procedências, podem oferecer ao pesquisador dados adicionais em uma fase inicial de um programa de melhoramento ou conservação genética (PIÑA-RODRIGUES, 1995).

4.3. Envelhecimento acelerado

Os testes de vigor possibilitam identificar os lotes com maior ou menor probabilidade de expressar seu comportamento no campo ou durante o armazenamento. Sendo o objetivo essencial dos testes de vigor verificar diferenças importantes no potencial fisiológico entre lotes de sementes, especialmente daqueles com poder germinativo elevado e semelhante. Nesse sentido, um dos testes mais utilizados para avaliação do vigor é o envelhecimento acelerado, sendo enfatizado por sua capacidade de proporcionar informações com alto grau de consistência (MARCOS FILHO, 1999).

O teste de envelhecimento acelerado ou envelhecimento precoce, ou ainda de envelhecimento artificial, se baseia no fato de que a taxa de deterioração das sementes é aumentada consideravelmente através de sua exposição a níveis muito adversos de temperatura e umidade relativa (MARCOS FILHO, 1999).

Nessas condições, sementes de menor qualidade deterioram-se mais rapidamente do que as mais vigorosas, com reflexos na germinação após o período de envelhecimento acelerado (TORRES e MARCOS FILHO, 2001). Inicialmente, este teste foi desenvolvido com a finalidade de estimar o potencial de armazenamento de sementes (DELOUCHE e BASKIN, 1973), mas é eficiente também na comparação do vigor entre lotes de sementes e na estimativa do potencial de desempenho em condições de campo (POPINIGIS, 1977).

No Brasil, são duas as técnicas empregadas para a condução do teste de envelhecimento acelerado: câmara de envelhecimento acelerado e método do gerbox. Fratin e Marcos Filho (1984) concluíram que, o teste de envelhecimento conduzido pelo método do gerbox proporcionou informações semelhantes às obtidas com o método da câmara; no entanto, o emprego do primeiro apresentou maior praticidade, possibilidade de padronização e precisão, porém exige-se equipamento específico para a realização do teste.

Ataíde *et al.* (2012) estudando as alterações fisiológicas de *Pterogyne nitens* (amendoim do campo), envelhecidas artificialmente relataram que o envelhecimento artificial afetou significativamente a viabilidade e vigor das sementes, observando decréscimo na germinação e aumento na peroxidação de lipídios, durante o envelhecimento.

Corte *et al.* (2010) relataram que, o envelhecimento natural e acelerado afetou de forma semelhante o comportamento das sementes de braúna preta (*Melanoxylon brauna* – Leguminosae -Caesalpinoideae) promovendo redução do vigor. Embora os efeitos dos dois tipos de envelhecimento afetassem igualmente a germinação, o envelhecimento artificial a 45° C por 72 horas, simulou adequadamente o comportamento enzimático manifestado pelas sementes armazenadas por 12 meses em câmara fria. Houve semelhante redução gradativa das reservas de lipídios em ambos os sistemas de envelhecimento.

Guedes *et al.* (2011 b) relataram que o envelhecimento acelerado afetou a qualidade fisiológica de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. promovendo redução da viabilidade e do vigor.

Observa-se variabilidade na resposta das diferentes espécies em relação ao uso do envelhecimento acelerado nos estudos do vigor e na deterioração das sementes. Vários autores afirmam haver correlação entre envelhecimento natural e o acelerado, sendo os mecanismos promotores da deterioração os mesmos em ambas as situações, somente variando a velocidade com que ocorrem (DELOUCHE e BASKIN, 1973; SANTOS e PAULA, 2007).

O teste de envelhecimento acelerado é utilizado para avaliar o vigor de sementes de diversas espécies e está incluído em programas de controle de qualidade por empresas produtoras de sementes, pois em poucos dias, podem-se obter informações relativamente

seguras sobre o potencial de armazenamento dos lotes processados e emergência das plântulas em campo (MARCOS FILHO, 1999).

Valentini e Pinã-Rodrigues (1995) observaram que em função da diversidade das espécies florestais nativas e das condições ambientais de produção das sementes a utilização do teste de envelhecimento acelerado com metodologia conhecida ainda é restrito e pode-se considerar que ainda é pequeno o número de trabalhos com o teste de envelhecimento acelerado com espécies arbóreas nativas.

Pereira et. Al (2012) estudando o teste de envelhecimento acelerado para separar lotes com diferentes níveis de vigor relataram que, o teste conduzido por 24 horas, a 41°C, foi eficiente para a avaliação do vigor de sementes de pinhão-manso permitindo a classificação dos lotes em níveis de vigor.

Vários autores têm estudado a temperatura e o tempo de envelhecimento acelerado específico para espécies florestais. Isto mostra a importância de pesquisas para a padronização da metodologia para cada espécie. De acordo com Santos e Paula (2007) este teste de vigor, como qualquer outro, precisa ter boa sensibilidade para separar lotes de sementes que apresentam diferentes níveis de qualidade.

O envelhecimento acelerado conduzido a 41°C por 48h foi eficiente para separar os lotes de sementes de *C.glaziovii* em vários níveis de vigor (GUEDES, ALVES e OLIVEIRA, 2013).

4.4. Os testes de condutividade elétrica e tetrazólio

O teste de condutividade elétrica começou a ser utilizado a partir da década de 20, como provável indicativo de viabilidade de sementes forrageiras (VIEIRA e KRZYZANOWSKI, 1999). A partir da década de 60, as pesquisas sobre este teste passaram a ser intensificadas (DIAS e MARCOS FILHO, 1995). Foi aceito e recomendado pela ISTA (*International Seed Testing Association*) para uso em sementes de ervilha (MATHEWS e POWELL, 1981), e logo depois, pela AOSA (*Association of Official Seed Analysts*), em sementes de ervilha e soja (HAMPTON e TEKRONY, 1995).

O primeiro evento no envelhecimento das sementes é a perda da permeabilidade seletiva nas membranas. Consequentemente as enzimas tornam-se menos eficientes nas suas atividades catalíticas, cromossomos podem acumular mutações, as reservas são

decompostas e há acúmulo de produtos tóxicos que prejudicam o desempenho das sementes (MCDONALD, 1999; PRIESTLEY, 1986; SMITH e BERJAK, 1995).

O teste de condutividade elétrica foi proposto para avaliar o vigor de sementes, considerando que aquelas com baixo vigor geralmente apresentam menor velocidade para restabelecer a integridade das membranas celulares, exibindo aumento na lixiviação de solutos durante a embebição. Como consequência, ocorre maior perda de lixiviados, tais como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, enzimas e íons inorgânicos como K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} e Na^+ (TAYLOR *et al.* 1995). Neste teste, a qualidade das sementes é avaliada indiretamente por meio da determinação da condutividade elétrica na solução de embebição das sementes. Os menores valores correspondem a menor liberação de exsudados, indicando maior vigor, revelando menor intensidade de desorganização dos sistemas de membranas de células (VIEIRA, 1994).

A quantidade e a intensidade de material lixiviado estão diretamente relacionadas à permeabilidade das membranas e, conseqüente, com o nível de vigor das sementes. Estes solutos, com propriedades eletrolíticas, apresentam carga elétrica, podendo ser medidos por aparelhos chamados de condutivímetros, constituindo estes um importante método da qualidade fisiológica das sementes (MARCOS FILHO, 1987). O teste de condutividade elétrica ainda não é muito utilizado no Brasil, o seu uso está restrito a atividades relacionadas à pesquisa (KRYZANOWSKI *et al.* 1991).

Não são comuns trabalhos utilizando este teste para a determinação da qualidade fisiológica das sementes florestais. Porém é um teste de vigor promissor quanto à possibilidade de padronização da metodologia, pelo menos dentro de uma espécie. Contudo, existem fatores que influenciam os valores de condutividade, como o tamanho, o teor de água inicial, o tempo e a temperatura de embebição, o número de sementes da amostra e o genótipo (VIEIRA, 1994).

O teste de condutividade elétrica forneceu, em 24 horas, uma estimativa do potencial germinativo de lotes de *Inga uruguensis*, podendo-se separá-los em baixa, média e elevada qualidade (BARBEDO e CÍCERO, 1998).

A eficiência na diferenciação de lotes de sementes de *D. nigra* foi atestada pela alta associação da germinação em condições de laboratório e viveiro, sendo recomendado para

a análise de vigor quando adotadas as amostras de 50 sementes, embebidas por pelo menos 36 horas em 75 ml de água deionizada, a 25°C (MARQUES *et al.* 2002).

Alguns autores têm utilizado o teste de condutividade elétrica para avaliar o vigor de sementes florestais, dentre eles podemos citar: GONÇALVES *et al.* (2009) avaliando sementes de *Guazuma ulmifolia*; MARQUES *et al.* (2002a) e GUEDES *et al.* (2011 b) trabalhando com sementes de *D. nigra*; SANTOS e PAULA (2005) com sementes de *Sebastiania commersoniana*; MARTINS e MATOS (2011) estudando sementes de *Caesalpinia ferrea*, *Pterogyne nitens* e *Copaifera langsdorffii*.

O teste de tetrazólio ou teste bioquímico de viabilidade se baseia na reação que ocorre entre o sal de tetrazólio e as enzimas desidrogenases presentes nos processos respiratórios dos tecidos. Durante a respiração, ocorre a liberação de íons de hidrogênio, com os quais o sal 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio reage, formando uma substância de cor vermelha e insolúvel, denominada *formazan* nos tecidos vivos das sementes. O mesmo não se processa em tecidos inviáveis, que permanecem na cor original (DELOUCHE *et al.* 1976).

A vantagem da utilização desta técnica, além da rapidez de obtenção de resultados, é que o teste detecta a viabilidade de sementes que apresentam dormência. Nesta condição fisiológica, as sementes mesmo quando expostas às condições ótimas exigidas para germinarem não o fazem. Além do preparo prévio das sementes, fatores como a concentração da solução ou mesmo o tempo de coloração na solução podem afetar a eficiência do teste na avaliação da qualidade de sementes. O período necessário para o desenvolvimento da coloração adequada, segundo as Regras para a Análise de Sementes, varia de acordo com cada espécie, podendo ser entre 30 a 240 minutos (BRASIL, 2009).

As sementes podem ser utilizadas inteiras ou preparadas para o teste, realizando-se punção do tegumento, corte ou seccionamento da semente, retirada do tegumento ou extração do embrião. Essas práticas têm por objetivo facilitar o contato do sal com os tecidos das sementes. Finda a fase de preparação, estas são imersas na solução de sal de tetrazólio preparado a concentrações específicas para cada espécie (FERREIRA e BORGUETTI, 2004).

As sementes permanecem na solução de tetrazólio no escuro, uma vez que o tetrazólio também reage com a luz, em temperaturas entre 25 e 40°C, conforme a espécie.

Quando atingem a coloração ideal, as sementes podem ser retiradas, lavadas e analisadas em lupa estereoscópica. Caso não sejam analisadas imediatamente, podem ser conservadas em refrigerador imersas em água pura (FERREIRA e BORGUETTI, 2004).

Considerando a estrutura morfológica da semente, sabe-se que há regiões específicas, mais sensíveis a deterioração do que outras (DAS e SEM-MANDI, 1992; MARCOS FILHO, 2005). Sementes podem permanecer viáveis mesmo se os cotilédones são danificados, mas se o eixo embrionário morrer ou for severamente danificado nenhuma plântula será produzida (SUNG e JENG, 1994).

Durante o envelhecimento o eixo embrionário tende a ter maior peroxidação de lipídios e subsequentemente maior acúmulo de peróxidos por unidade de peso seco do que nos cotilédones, isso pode se dar pela variável proteção contra os oxidantes ambientais provida pelas características morfológica das sementes (PRIESTLEY, 1986).

Por isso, parâmetros de avaliação da qualidade de sementes que qualifiquem eixo embrionário e cotilédones separadamente, tal como o teste do tetrazólio, contribuem com informações relevantes sobre o vigor de sementes.

Esse método já vem sendo bastante usado com êxito para avaliar a qualidade de sementes florestais (OLIVEIRA *et al.* 2005), por apresentar resultados mais rápidos do que os testes de germinação, constituindo-se uma alternativa viável para a análise da qualidade de semente, principalmente para as espécies florestais que apresentam dormência (VIEIRA, 1994).

Para Gaspar-Oliveira *et al.* (2009) diversos fatores podem interferir na obtenção de resultados satisfatórios no teste de tetrazólio, principalmente aqueles relacionados à metodologia de execução, como preparo das sementes antes da coloração, concentração da solução de tetrazólio, período e temperatura de exposição.

Apesar das informações rápidas e precisas sobre a viabilidade de um lote de sementes, que o teste de tetrazólio é capaz de fornecer, nas Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009) a metodologia padronizada para espécies florestais se restringe, basicamente, para espécies exóticas, especialmente gimnospermas. Porém, há uma preocupação por parte dos pesquisadores com o ajuste das avaliações de sementes florestais nativas à solução e critérios de interpretação (LAZAROTTO *et al.* 2011).

Assim, vários autores têm estudado a utilização do teste de tetrazólio em sementes florestais, dentre os quais podemos destacar: (SILVA *et al.* 1997) estudando sementes de barbatimão; (SOROL e PÉREZ, 2001) com sementes de araucária; (LAZAROTTO *et al.* 2011) com sementes de paineira; (FOGAÇA *et al.* 2011) trabalhando com sementes de copaíba e guapuruvu, entre outros.

4.5. Germinação

Os estudos de germinação de sementes são realizados com o objetivo de ampliar os conhecimentos fisiológicos, verificar as respostas de germinação a fatores ambientais, causas de dormência e métodos para sua superação, obter conhecimentos morfológicos, acompanhar o desenvolvimento do embrião e da plântula, verificar o estágio de maturação das sementes e do efeito do processamento e armazenamento sobre a qualidade de sementes (BASKIN e BASKIN, 1998).

O teste de germinação é fundamental para se determinar a qualidade das sementes, o qual deve ser realizado sob condições ideais de temperatura e substrato para cada espécie. Em relação à germinação, vários fatores podem influenciar o processo germinativo, sendo a água, o oxigênio, a temperatura e eventualmente a luz, considerados como fatores externos ou ambientais. Dentre os principais fatores internos ou intrínsecos relacionados às sementes, encontra-se a viabilidade, a longevidade, o grau de maturidade, a dormência, a sanidade e o genótipo, (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000; MARCOS FILHO, 2005).

Andrade *et al.*(2006) estudando a germinação de sementes de *Dalbergia nigra* relataram que a espécie não possui exigência na alternância de temperatura, para acelerar ou iniciar o processo germinativo, uma vez que tanto temperaturas constantes quanto alternadas apresentaram valores elevados de germinação e de velocidade de emergência de plântulas. Tais resultados demonstraram que suas sementes podem germinar na sombra da vegetação, onde as temperaturas sofrem pouca variação diária, e em clareiras, onde a variação entre as temperaturas mínima e máxima pode ser superior a 15°C (VÁZQUEZ-YANES e OROZCO-SEGOVIA, 1996).

Embora a temperatura ótima para a germinação de sementes de espécies tropicais encontre-se entre 20 e 35°C (BRASIL, 2009), os resultados observados na temperatura de 35°C para porcentagem de germinação e para velocidade de emergência de plântulas

indicaram que as sementes de *D. nigra* não suportaram temperaturas tão elevadas. Independentemente do substrato, os maiores valores de germinação e de velocidade de emergência foram alcançados em temperaturas entre 20-30°C, além das temperaturas alternadas de 20–30 e 20–35°C (VÁZQUEZ-YANES e OROZCO-SEGOVIA, 1996).

Guedes *et al.* (2011) avaliando a germinação e o vigor de sementes de *Dalbergia nigra* em laboratório, concluíram que as condições ideais para o teste de germinação são temperatura constante de 25°C e o substrato papel toalha.

Carvalho (1994) observou que sementes de *D. nigra* recém-colhidas com 12% de grau de umidade conservaram a viabilidade inalterada por 105 dias, em embalagem semipermeável, armazenadas em condições ambientais ou em câmara fria (10°C e 65%UR). Sementes armazenadas em pequenos tamboretos de papelão em câmara fria (3-5°C e 92%UR) apresentaram germinação de 65%, após dois anos de armazenamento.

Sementes de *Dalbergia nigra* foram secas a 22°C e 55%UR, com redução da umidade inicial de 21% para 11%, e não tiveram sua viabilidade comprometida, apresentando germinação acima de 80% após 30 dias de secagem (PEREIRA, ANDRADE e COSTA, 1991).

4.6. Análise citogenética em sementes

Sendo a citogenética o estudo da genética por meio da citologia, esta área da ciência engloba todo e qualquer estudo relacionado com os cromossomos, isolados ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função e replicação, quanto à sua variação e evolução (BRAMMER *et al.* 2007). É uma das fontes geradoras de questionamentos que impulsionaram a genética molecular, a biotecnologia e a engenharia genética, permanecendo junto às mesmas, como um dos recursos de avaliação em várias pesquisas dessa natureza (SACCHET, 1999).

A citogenética clássica desenvolveu-se, principalmente, a partir do início do século passado e seu crescente progresso acompanhou o aprimoramento de técnicas e equipamentos de microscopia. A análise cromossômica sempre foi um dos campos estimulantes da Citologia e da Genética, tendo relação entre estudos taxonômicos e evolutivos, bem como no melhoramento genético e na caracterização de germoplasma. Apesar da revolução provocada pela Genética Molecular, a análise cromossômica continua sendo a única maneira de observar o genoma de um eucarioto na forma de blocos

individualizados de material genético, fáceis de serem mensurados, diferenciados em subunidades e manipulados de diferentes formas, pois de nenhuma outra forma o material genético é tão claramente observado (GUERRA e SOUZA, 2002).

A análise de aberrações cromossômicas é um teste para a detecção de alterações estruturais. É um dos poucos métodos diretos para mensurar mutações em sistemas expostos a mutagênicos ou carcinogênicos potenciais. Para avaliar os efeitos danosos que os mutagênicos podem causar, é necessário que a amostra esteja em constante divisão mitótica, pois dessa forma é possível analisar as etapas da divisão celular, com o objetivo de identificar os efeitos tóxicos e alterações cromossômicas ao longo do processo de divisão celular (SILVA *et al.* 2003).

Murata *et al.* (1979) relataram que a diminuição da germinação pode estar associada ao acúmulo de aberrações cromossômicas ou a danos nos cromossomos durante o envelhecimento de sementes, especialmente em condições de alta temperatura e umidade.

De acordo com Soares-Scott *et al.* (2005) para que a mitose ocorra sem alterações é necessário que quatro eventos importantes ocorram:

1° - Necessidade de um sinal reprodutivo, que pode ser interno ou externo à célula, que dá início aos eventos da divisão celular. O tamanho celular e as substâncias produzidas pelo organismo ou pelas células, funcionam como sinais reprodutivos;

2° - Replicação do DNA, assim como de outros componentes celulares vitais, de maneira que as duas novas células filhas sejam idênticas e tenham todas as funções celulares;

3° - Distribuição do DNA replicado para cada célula filha, através do processo de segregação;

4° - Adição de material novo à membrana plasmática e à parede celular, para que as duas células filhas fiquem separadas, através da citocinese.

Aparentemente, a mitose é uma sequência simples, antes da qual cada cromossomo se duplica para originar uma estrutura com dois filamentos, cujas unidades componentes são idênticas em organização morfológica e genética. Esta duplicação cromossômica é “perfeita” e baseia-se nas propriedades de replicação do DNA. Assim, a mitose constitui-se

em um mecanismo que assegura a distribuição qualitativa e quantitativa exata dos produtos desta duplicação cromossômica/gênica para as células filhas. Esta distribuição é obtida através de uma sequência regular e precisa de movimentos cromossômicos, que resultam na separação das cromátides irmãs, as quais se dirigem para pólos opostos da célula, (SOARES-SCOTT, MELETTI, *et al.*, 2005).

Os processos degenerativos dos compostos de reserva, degradação de enzimas, perda da seletividade das membranas, síntese de proteínas e ácidos nucleicos podem ocasionar problemas de anomalias celulares. A ocorrência de aberrações celulares durante a divisão mitótica no momento da protrusão da raiz primária, proporciona as primeiras evidências da ocorrência de alterações genéticas em sementes armazenadas (PRIESTLEY, 1986).

A redução da integridade do DNA durante o envelhecimento das sementes demonstra que o DNA e as proteínas envolvidas em seu metabolismo são propensos à deterioração, distúrbios à germinação, com intensidade variável de acordo com o genótipo (OSBORNE e BOUBRIAK, 1994).

Boubriak *et al.* (1997) demonstraram que, um dos primeiros eventos ativados com a embebição é a ação de mecanismos de reparo de possíveis danos ao DNA. Se ocorrer bloqueio à atuação desses mecanismos, a degradação do DNA pode se acentuar e provocar distúrbios ao desempenho das sementes. Portanto, a deterioração pode provocar decréscimo das concentrações de DNA e RNA, danos aos cromossomos, decréscimo da síntese DNA e RNA, além de acréscimo de aberrações durante a anáfase, indução de mutações, alterações na transcrição da mensagem genética e aumento da degradação do DNA. No entanto, é mais provável que esses eventos sejam destacáveis apenas em estádios mais avançados do processo de deterioração, (Figura 4.2).

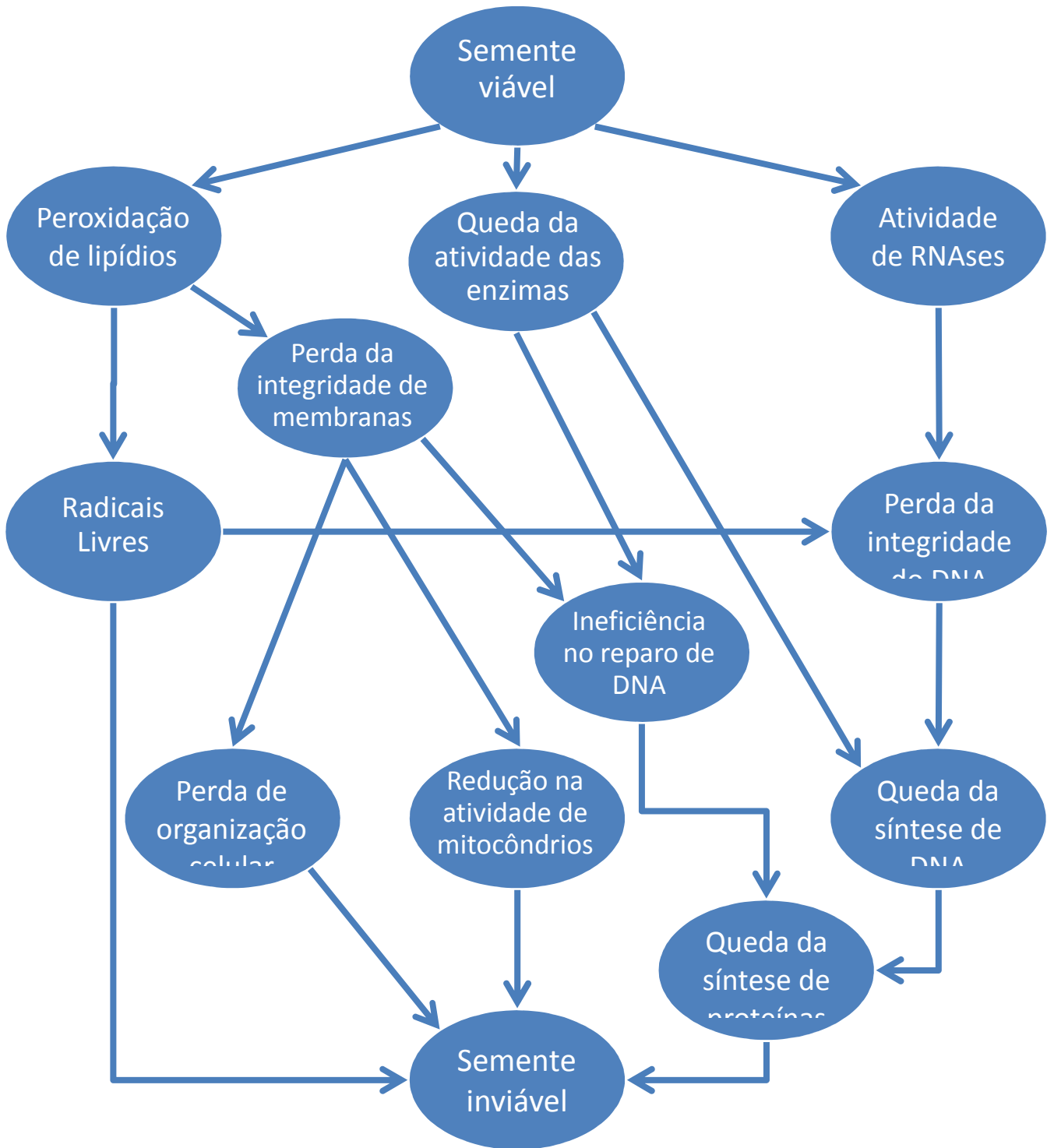


Figura 4.2: Sequência do processo de deterioração adaptado de (ARAÚJO, 2004).

5 - MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Obtenção das sementes

O trabalho foi executado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen). Para a obtenção das sementes foram coletados frutos de uma planta de *Dalbergia nigra* na área do Cenargen, em setembro de 2011 e uma nova coleta foi realizada dentro do viveiro da Embrapa – Cerrados, em outubro de 2012. Por se tratar de espécie ameaçada, as coletas foram autorizadas pelo SISBIO (Autorização Número 34410-1 de 20 de maio 2012). Os frutos foram acondicionados em sacos de papel e conduzidos ao Laboratório de Sementes para beneficiamento, mediante debulha manual das vagens. As sementes ficaram dispostas em sacos de papel tipo Kraft, em bancada, até atingirem a umidade ideal para que pudessem ser armazenadas. Em seguida, as mesmas foram acondicionadas em envelope aluminizado e mantidas em câmara fria a -20°C (acesso I) e o lote das sementes recém-coletadas (acesso II) foi armazenado em sacos de papel tipo Kraft ficando na bancada até serem utilizadas para os testes descritos a seguir.

5.2. Envelhecimento acelerado

O envelhecimento acelerado das sementes, com o objetivo de obter sublotes com diferentes níveis de qualidade foi realizado nos dois lotes de sementes (acessos I e II). O procedimento foi conduzido em caixas de plástico tipo "gerbox" contendo uma camada única de sementes sobre a tela metálica interna da caixa. As sementes ficaram imersas em água destilada por 4 horas em temperatura ambiente. Posteriormente as caixas, tampadas e contendo 40 ml de água destilada foram mantidas em incubadora tipo B.O.D a 42°C (MARCOS FILHO, 1998) por 24, 48, 72 e 96 horas. Após o envelhecimento das sementes foi determinada a umidade das mesmas e os diferentes sublotes foram submetidos aos testes fisiológicos (germinação, índice de velocidade de germinação e condutividade elétrica), teste de tetrazólio e teste citogenético.

5.2. Determinação da umidade

O grau de umidade foi determinado pelo método de estufa a $105 \pm 2^\circ\text{C}$, por 24 horas de acordo com (BRASIL, 2009).

Para cada lote foram amostradas 10 sementes, com três repetições para cada tratamento para determinação da umidade. O peso das amostras foi determinado com uma balança de precisão de 0,001g.

A determinação do teor de água (%) foi realizada com a fórmula:

$$\% \text{ de Umidade (U)} = \frac{100 (P-p)}{P-t}$$

Onde:

P = peso inicial, peso do recipiente e sua tampa mais o peso da semente úmida;

p = peso final, peso do recipiente e sua tampa mais o peso da semente seca;

t = tara, peso do recipiente com a sua tampa.

O resultado final foi obtido através da média aritmética das porcentagens de cada uma das repetições retiradas de cada amostra.

5.3. Germinação

As sementes testemunha e envelhecidas por 24, 48, 72, e 96 horas foram avaliadas quanto ao potencial de germinação, utilizando-se 100 sementes (quatro repetições de 25 sementes) para cada tratamento. As sementes passaram por um processo de desinfecção descrito a seguir:

- Sementes foram imersas em solução com detergente neutro (100 ml de água + 5 gotas de detergente neutro), por 5 minutos;
- Posteriormente foram lavadas em água corrente, imersas em solução de hipoclorito 0,5% (98 ml de água + 2 ml de hipoclorito comercial a 2,5%), por 5 minutos;
- Lavadas em água corrente, e imersas em água destilada por 5 minutos.

Logo em seguida, foram semeadas em rolos de papel Germitest umedecidos com água destilada em volume equivalente a 3 vezes do peso do papel seco. Os rolos foram colocados em sacos plásticos, em posição vertical dentro de germinadores com temperatura constante de 25°C, fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações foram diárias, adotando-se o critério botânico de germinação, a emissão da raiz primária em pelo menos 2,0 mm de comprimento (FERREIRA e

BORGUETTI, 2004). O teste teve duração de 14 dias e os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais para cada lote.

5.4. Índice de Velocidade de Germinação (IVG)

Para determinar o vigor das sementes foi avaliado o índice de velocidade de germinação, conjuntamente com o teste de germinação. O cálculo do índice de velocidade de germinação foi realizado segundo Maguirre (1962) considerando-se germinadas as sementes que apresentaram radícula de pelo menos 2,0 mm. Com os dados das contagens, procedeu-se ao cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG) para cada tratamento, conforme (MAGUIRRE, 1962):

IVG = $G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$ em que,

G_1, G_2 e G_n = número de sementes germinadas no 1º, 2º e último dia de contagem.

N_1, N_2, N_n = número de dias que as sementes levaram para germinar, até o décimo quarto dia de contagem.

5.5. Teste de Condutividade Elétrica

Quatro repetições de 25 sementes aparentemente intactas foram selecionadas para cada tratamento, nos dois lotes estudados. Em seguida, foram imersas em 75 ml de água destilada por 24 horas, à temperatura constante de 25°C. Com um condutivímetro de massa foi efetuada a leitura em $\mu\text{S}/\text{cm}$ e os resultados médios expressos com base no peso da amostra (VIEIRA, 1994).

5.6. Teste do Tetrazólio

Foram testadas as seguintes concentrações de 2, 3, 5- trifenil cloreto de tetrazólio: 0,1; 0,5; 0,75 e 1% por 24 e 48 horas em câmara de germinação com temperatura constante de 25°C e ausência de luz para determinar o melhor tempo e a solução de tetrazólio. O teste foi realizado utilizando-se três repetições de 20 sementes para cada tratamento. Também foi testada a maneira ideal de exposição dos tecidos à coloração. Foram testadas as seguintes técnicas de exposição dos tecidos (BRASIL, 2009);

- Perfuração da semente – sementes pré-umedecidas por 4 horas foram perfuradas com um bisturi distante dos tecidos essenciais da semente.

- Corte transversal – o corte transversal foi feito em área de tecido não essencial, usando-se bisturi.
- Extração do embrião – o embrião foi extraído com um bisturi que foi introduzido através do endosperma e fora do centro da semente. O embrião foi separado do endosperma e transferido para a solução de tetrazólio.

Após a aplicação do teste as sementes foram analisadas em lupa estereoscópica a fim de se avaliar as áreas efetivamente coradas (BRASIL, 2009).

5.7. Teste Citogenético

Foram realizados pré-testes para avaliar o melhor horário de coleta das raízes, ou seja, o horário em que apresentou a maior quantidade de células em divisão, assim como, melhor solução de fixação e duração mínima do tempo de coloração.

A análise mitótica foi feita em todos os lotes, identificando-se todas as fases encontradas em 10 lâminas para cada tratamento. Para análise do comportamento mitótico as radículas foram coletadas após o teste de germinação e fixadas em Carnoy II (6:3:1, clorofórmio, ácido acético glacial, etanol absoluto) por 24 horas, e estocadas em álcool 70% em geladeira.

A principal finalidade da fixação é permitir a coagulação e precipitação das proteínas, mantendo a forma e a estrutura do conteúdo celular, sem causar qualquer distorção dos componentes celulares, promovendo, ainda, a conservação por longos períodos, sem que as amostras sofram decomposição, (WALKER, 1973).

No momento da análise, as radículas foram hidrolisadas em HCl 1N por 10 min em temperatura constante de 60°C, coradas com Reativo de Schiff (fucsina básica, metabisulfito de potássio, carvão ativado e HCl 0,15N) por no mínimo 2 horas.

5.7.1 Preparação da lâmina

Uma ponta de raiz foi transferida para uma lâmina, retirou-se o excesso do reativo de Schiff com papel filtro e acrescentou-se uma gota de orceína acética a 2%. Com o auxílio de agulhas e de um estereomicroscópio, retirou-se a coifa e as capas mais externas da raiz, procurando deixar apenas a região meristemática. Cortou-se o tecido em pedaços tão pequenos quanto possível, cobriu-se com uma lamínula e fez-se uma pressão leve, com uma agulha de ponta rombuda, diretamente em cima dos fragmentos do meristema, até que

cada um deles se transformasse em uma pequena mancha de células espalhadas (GUERRA e SOUZA, 2002).

Em seguida, esmagou-se o material colocando o conjunto lâmina-lamínula em um papel filtro dobrado, pressionando firme e cuidadosamente para não permitir nenhum deslize da lamínula sobre a lâmina. As lâminas foram analisadas imediatamente em microscópio óptico a uma magnitude de 400x, sendo contadas todas as fases da mitose encontradas em cada lâmina, com especial atenção para as configurações cromossômicas em anáfase/telófase.

5.8. Análise Estatística

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições de 25 sementes por tratamento, para cada variável analisada, para as sementes dos acesso I e II.

A análise estatística dos dados foi efetuada por meio de análise de variância considerando o nível de significância de 5%, e havendo diferença estatística entre os tratamentos, aplicou-se o teste de médias de Tukey, a 5%. As análises foram realizadas usando-se o pacote R.

Foi feita a análise de correlação simples entre as variáveis avaliadas e a germinação e também a correlação multivariada, que evidencia o efeito conjunto de variáveis sobre a germinação. Foram utilizados modelos de regressão linear, quadráticos e modelos não lineares, Gompertz que apresenta a seguinte estrutura:

$$W = \frac{A}{(1 + B \exp^{-Kt})}$$
$$W = A \exp(-B \exp^{-Kt})$$

Em que **W** expressa o número de sementes germinadas; **A** é o número máximo de sementes germinadas; **B** corresponde ao parâmetro de locação, sem interpretação biológica; **K** determina a taxa de expansão da germinação; **exp** refere-se à base dos logaritmos neperianos; **t** refere-se a variável que está sendo correlacionada com germinação. Foram utilizados modelos, que apresentaram maior coeficiente de determinação - **r**², que é uma medida de ajustamento do modelo aos valores observados.

As variáveis (metáfase anormal, ponte e cromossomos retardatários) foram correlacionadas isoladamente com a germinação, a fim de estudar o grau de relação de cada uma dessas variáveis com a germinação.

Uma correlação múltipla (soma das anormalidades: metáfase anormal + ponte + retardatário) *versus* germinação, também foi realizada com o objetivo de avaliar o quanto que essas anormalidades estariam relacionadas com a queda na germinação.

Para avaliar a influência das anormalidades no processo de germinação das sementes de *D. nigra* envelhecidas artificialmente, utilizou-se o modelo matemático de Probit, descrito por ELLIS e ROBERTS (1980) para previsão da perda de germinação em sementes armazenadas.

6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes realizados e das porcentagens das fases encontrados nas sementes de *Dalbergia nigra* dos acessos I e II são apresentados nas (Tabela 6.1 e 6.2), respectivamente.

Tabela 6.1: Teor de umidade (U), Teste de germinação (G), Índice de velocidade de germinação (IVG), Teste de Tetrazólio (TZ), Condutividade Elétrica (CE), Porcentagem de Metáfase Anormal (MA), Porcentagem de Ponte (P) Porcentagem de cromossomos retardatários (R) e Soma das anormalidades (SA), após o envelhecimento acelerado de sementes do acesso I de *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All.ex Benth.).

Acesso I	U	G	IVG	TZ	CE	MA	P	R	SA
Test.	46,59 B	76 A	15,10 A	78,3 B	54,72 C	0,39 C	5,53 C	3,74 D	9,41 CD
24 h	43,57 E	80 A	16,10 A	86,6 A	73,97 B	0,62 C	5,83 C	4,83 C	11,28 D
48 h	46,13 C	71,2 A	12,36 B	66,6 C	40,82 C	1,08 B	6,55 B	1,28 E	8,92 C
72 h	49,36 A	55,7 A	11,05 C	50 D	49,75 C	1,01 B	9,09 AB	4,83 B	14,94 B
96 h	45,02 D	34 B	8,11 D	41,66 E	91,60 A	2,81 A	8,68 A	5,93 A	17,42 A

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 6.2: Teor de umidade (U), Teste de germinação (G), Índice de velocidade de germinação (IVG), Teste de Tetrázólio (TZ), Condutividade Elétrica (CE), Porcentagem de Metáfase Anormal (MA), Porcentagem de Ponte (P) Porcentagem de cromossomos retardatários (R) e Soma das anormalidades (SA), após o envelhecimento acelerado de sementes do acesso II de *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All.ex Benth.).

Acesso II	U	G	IVG	TZ	CE	MA	P	R	SA
Test.	25,3 D	79 A	13,41 A	70 A	163,4 B	0 C	2,04 C	1,99 B	4,03 C
24 h	25,96 C	37 B	5,12 B	41,66 B	163,12 B	1,78 B	2,77 C	2,55 B	7,06 C
48 h	26,52 B	24 C	3,40 C	33,33 C	163,53 B	3,56 A	5,32 B	3,86 A	12,75 B
72 h	32,3 A	6 D	0,61 D	10 D	186,56 B	2,17 A	7,72 A	3,98 A	13,88 A
96 h	24,34 E	0 D	-	1,66 E	258,13 A	-	-	-	-

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com o tempo de envelhecimento, a qualidade fisiológica das sementes apresentou variação.

A umidade inicial para sementes do acesso I era de 6,5% alcançando 46,59% após quatro horas de embebição. Em relação à porcentagem de germinação houve um decréscimo de 42% (Tabela 6.1), para sementes envelhecidas por 96 horas o que foi comprovado com o teste de tetrázólio (Tabela 6.1).

Para o lote de sementes do acesso I a queda mais expressiva na germinação foi a partir de 72 horas de envelhecimento na qual o percentual caiu pela metade.

Guedes *et al.*(2011) estudando a qualidade fisiológica de sementes de *Dalbergia nigra* por meio do processo de envelhecimento acelerado, observaram um decréscimo significativo no percentual de germinação à medida que as sementes foram envelhecidas.

No tratamento de 24 horas de envelhecimento acelerado houve um aumento de 4% na germinação em relação à testemunha; esse fato pode ser explicado porque as sementes de espécies florestais normalmente apresentam uma germinação irregular e o envelhecimento pode auxiliar para uma germinação mais uniforme (Figura 6.1).



Figura 6.1: Plântulas de *Dalbergia nigra*, acesso I, envelhecidas por 24 horas a 42°C.

Para as sementes do acesso II a umidade inicial era de 7% e chegou a 25,3% após o envelhecimento, e a germinação caiu consideravelmente chegando a 0 no tratamento de 96 horas, no qual todas as sementes estavam mortas, o que também pode ser comprovado com o teste de tetrazólio, Tabelas 6.1 e 6.2.

Na Figura 6.2 podemos observar o teste de germinação na última avaliação.

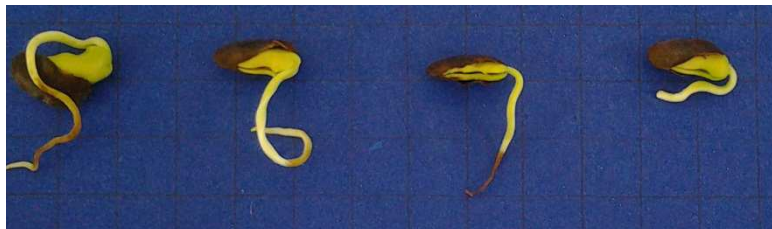


Figura 6.2: Plântulas de *Dalbergia nigra*, acesso II, envelhecidas por 24 horas a 42°C.

Esse acesso mostrou-se extremamente sensível ao envelhecimento acelerado, uma vez que com 48 horas de envelhecimento as sementes só apresentaram germinação de 33,3%.

Resultados semelhantes foram encontrados por Pinho *et al.*(2010) que relataram que viabilidade e o vigor das sementes de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. foram afetados pelo aumento do tempo de sua permanência na câmara de envelhecimento. O período de 96 h de envelhecimento acarretou perda total da viabilidade e vigor das sementes de *A. peregrina*.

O envelhecimento artificial simula os resultados fisiológicos e bioquímicos da deterioração ocorrida em sementes de *Melanoxylon brauna* armazenadas por 12 meses, reduzindo o potencial fisiológico dessas sementes (CORTES *et al.* 2010).

Ao longo do envelhecimento acelerado constatou-se que as sementes absorveram água, atingindo valores superiores a 25% em ambos os lotes após 96 horas. Segundo MARCOS FILHO (2005) o teor de água das sementes envelhecidas deve ser superior a 20%; e isso ocorreu em todos os períodos testados.

Durante a condução do trabalho foi observado que a partir de 72 horas de envelhecimento as sementes apresentavam contaminação por fungos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Rhizopus sp.* (Figura 6.3).



Figura 6.3: Sementes de *Dalbergia nigra* envelhecidas por 72 horas

Os fungos são os principais microrganismos que compõem a microflora das sementes em condições de armazenamento, sendo os principais causadores de deteriorações e perdas durante este período (PUZZI, 2000).

O gênero *Aspergillus* é o mais comumente encontrado em sementes armazenadas. Desenvolve-se em sementes cujo teor de água está em equilíbrio com umidades relativas entre 65-90% (SILVA, DONZELES e AFONSO, 1995).

As espécies dos gêneros *Aspergillus* estão entre os principais agentes deterioradores de sementes (POPINIGIS, 1977); (Figura 6.4).



Figura 6.4: Avaliação do teste de germinação das sementes de *Dalbergia nigra*, acesso II, envelhecidas por 72 horas.

No teste de tetrazólio vários pré-testes foram realizados a fim de se obter o melhor tempo de exposição e concentração de 2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio, e também a melhor técnica de corte dos tecidos.

As concentrações de 0,1 e 0,5% da solução de tetrazólio durante 24 e 48 horas de embebição não houve a coloração ideal dos tecidos das sementes em nenhuma das técnicas utilizadas.

Durante 48 horas a 0,75% os tecidos ficaram com manchas coloridas em vermelho muito intenso, em algumas partes essenciais, dificultando a avaliação da viabilidade das sementes analisadas. Nenhuma das técnicas de perfuração dos tecidos foi eficiente nessa avaliação.

Para a concentração de 1% já nas primeiras 24 horas os tecidos avaliados apresentaram coloração muito avermelhada o que também impossibilitou a avaliação das sementes nessas condições.

Na Figura 6.5 são apresentados vários tipos de coloração, de acordo com a técnica de preparação das sementes para exposição dos tecidos a solução de tetrazólio.

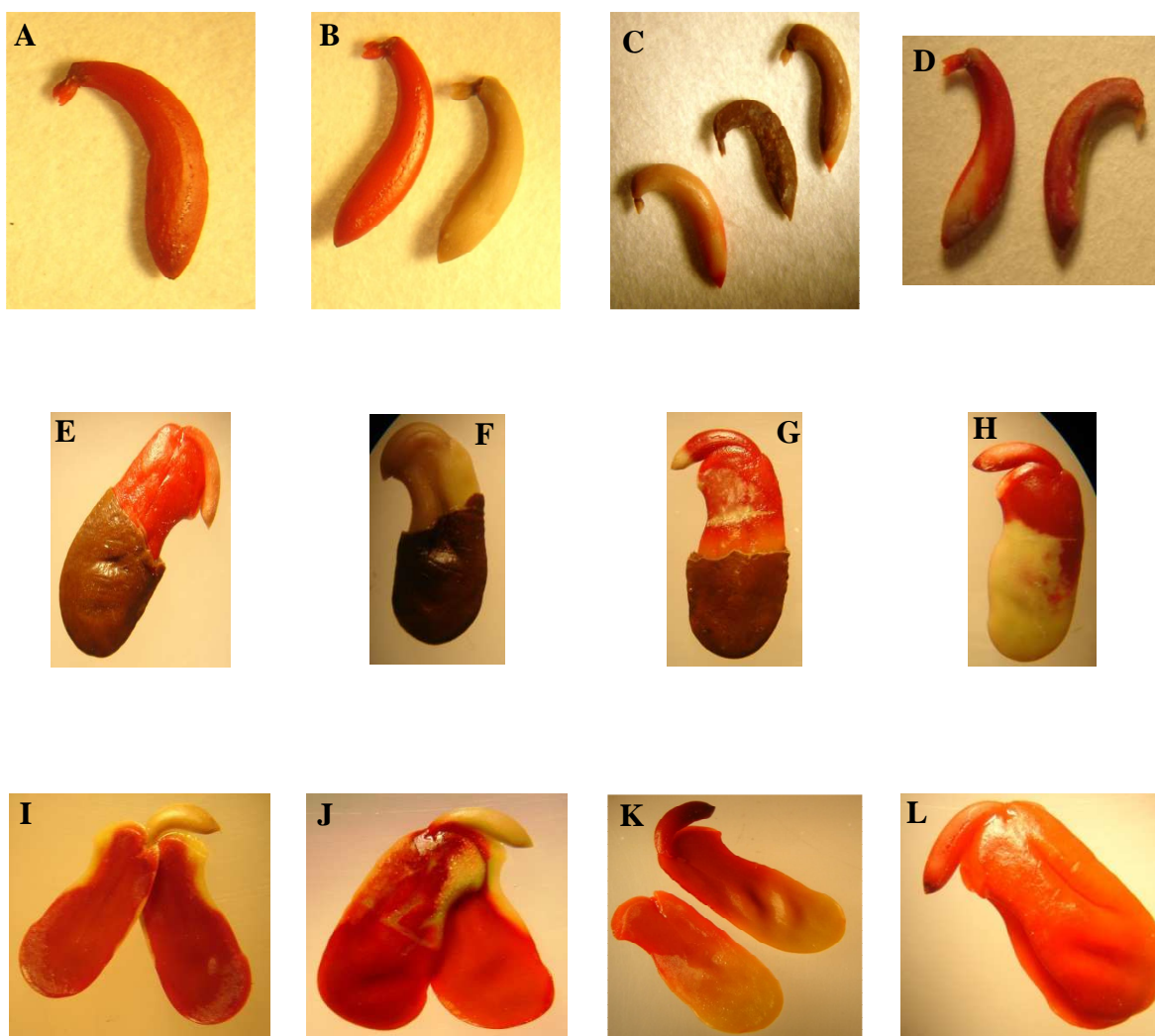


Figura 6.5: Padrões de coloração obtidos submetendo as sementes de *Dalbergia nigra* a três diferentes técnicas de exposição dos tecidos; A, B, C e D (exposição do embrião); E, F, G, H (cortes em tecidos não essenciais); I, J, K, L (perfuração dos tecidos não essenciais), solução de 0,75% por 24 horas.

Nas sementes pré-umedecidas que foram perfuradas com um bisturi longe dos tecidos essenciais e nas sementes em que foi feito um corte transversal em área de tecido não essencial, verificou-se que não houve uniformidade na coloração, uma vez que a solução não foi capaz de atingir os tecidos mais internos, dificultando assim a avaliação dos lotes das sementes de *Dalbergia nigra*, acessos I e II.

Na técnica de extração do embrião, em que o mesmo foi isolado do endosperma e transferido para a solução de tetrazólio, as sementes apresentaram coloração mais adequada, permitindo uma avaliação mais eficiente.

Na Figura 6.5 letra B pode-se perceber a diferença de um embrião considerado viável (esquerda) e um embrião considerado não viável (direita). Nas letras C e D os embriões apresentados foram considerados inviáveis, pois não apresentaram a coloração ideal ou apresentaram coloração não uniforme.

O teste de tetrazólio não é utilizado com frequência na determinação da viabilidade das sementes de espécies florestais nativas, e uma das razões é que a padronização do seu método ainda não foi desenvolvida para a maioria destas espécies. Por este motivo, há um número crescente de trabalhos com espécies brasileiras, que tem por objetivo padronizar o método deste teste, podendo-se citar os trabalhos de: (BIRUEL 2001; BOTELHO *et al.* 1995; FERREIRA *et al.* 2001; FOGAÇA 2003; MALAVASI *et al.* 1999; MENDONÇA *et al.* 2001 e NASCIMENTO e CARVALHO, 1998; ZUCARELI *et al.* 2001).

Comparativamente, o teste de tetrazólio apresenta resultados mais rápidos sobre a viabilidade das sementes que o ensaio de germinação, e pode ser útil nas áreas de comercialização, beneficiamento, armazenamento e produção de mudas, sem que isso signifique que o teste de germinação venha a perder importância, pois ele é um teste de referência (SANTOS, 2006).

A metodologia adequada, bem como as condições ideais para o estabelecimento do teste de tetrazólio é muito importante para análise da viabilidade de sementes. Esse protocolo ainda é inexistente para *Dalbergia nigra*, assim como para várias espécies arbóreas florestais, que poderá ser utilizado como ferramenta para auxiliar a manutenção de sementes conservadas nos bancos de germoplasma.

O teste de germinação e de tetrazólio apresentaram-se altamente correlacionados. Alguns estudos têm mostrado que o teste de tetrazólio apresenta boa correlação com os diferentes testes de vigor (BARROS e MARCOS FILHO, 1990; PASHA e DAS, 1982).

No início do experimento de CE, as sementes apresentavam teores de água variando de 43 a 49% para sementes do acesso I e 25 a 32% para sementes do acesso II. MARQUES *et al.* (2002a) verificaram que a variação do teor de água das sementes de *Dalbergia nigra* de 9,4 a 10,6% não interferiu nos resultados dos testes de CE.

Para as sementes do acesso I foi verificado um aumento na quantidade de lixiviados para o tratamento de 96 horas de envelhecimento, o que pode ser comprovado pela queda drástica de germinação que inicialmente era de 76% e passou para 34% (Tabela 6.1). Nesse lote de sementes percebe-se que houve um reparo no sistema de membranas, já que os tratamentos de 48 e 72 horas não apresentaram diferença significativa.

No tratamento de 48 horas as sementes do acesso I ainda apresentaram germinação de 71% o que é considerado aceitável para a conservação em bancos de germoplasma.

Os resultados apresentados contrariam os encontrados por BORGES *et al.* (2000) que demonstraram que sementes de *Dalbergia nigra* mostram-se muito sensíveis, sendo a temperatura de 40°C por 48 horas suficientes para provocar a morte das sementes.

O teste de condutividade elétrica não se mostrou eficaz para a separação de lotes com qualidade intermediária de sementes de *Dalbergia nigra*.

Os valores dos coeficientes de variação encontrados nas análises são considerados adequados por isso indicam que este experimento é confiável.

Na literatura não existem muitos estudos sobre testes de condutividade elétrica para avaliação de vigor de espécies florestais nativas. Segundo Vieira (1994) as espécies que apresentam a maior quantidade de informações são sementes de culturas de lavouras como: feijão, soja, ervilha e milho.

Existe grande dificuldade de fazer comparações entre sementes de diferentes espécies, pois não se dispõe de parâmetros de comparações. Esta dificuldade existe até entre a mesma espécie, pois diferenças de metodologia, como utilização de diferentes volumes e qualidade de água, tamanhos de recipiente de embebição utilizado podem influenciar diretamente nas interpretações.

A deterioração pode ser explicada pelo fato do envelhecimento das sementes levar a peroxidação de lipídios que é subsequentemente a causa de perturbações a membrana (SUNG e JENG, 1994). Tais alterações nas membranas levam ao extravasamento de eletrólitos (CHANG e SUNG, 1998), aumentando os valores observados no teste de condutividade elétrica.

Para Delouche (2002) a deterioração de sementes pode ser vista como um complexo de mudanças que ocorrem com o passar do tempo, causando prejuízos a sistemas

e funções vitais e resultando na diminuição no grau de capacidade e desempenho da semente.

Goel e Sheoran (2003) mostraram que existe uma correlação entre a diminuição da germinabilidade com o aumento do extravasamento de eletrólitos, o que reflete na perda da integridade das membranas.

Nas sementes do acesso II observou-se que o sistema de membranas apresenta uma desorganização celular já no tratamento controle ou testemunha, o que foi ainda mais severo nos tratamentos de 72 e 96 horas, apresentando 186,56 $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$ e 258,13 $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$ de lixiviados e 6% e 0 de germinação respectivamente, indicando a baixa qualidade fisiológica desse lote de sementes, conforme apresentado na Tabela 6.2.

O tempo de exposição ao envelhecimento acelerado pode aumentar a quantidade de lixiviados principalmente em sementes com baixa qualidade fisiológica. Leopold (1980) observou que, principalmente em tecidos mortos, quantidade elevada de lixiviados na solução de embebição pode ser um indicativo da ineficiência e desorganização do sistema de membranas.

Nota-se que para as sementes do acesso II os valores para todos os tratamentos, da variável condutividade elétrica (CE), exceto 96 horas na qual as sementes estavam inviáveis, estão muito próximos de acordo com a Tabela 6.3. Esses resultados mostram que este teste não se mostrou sensível para a avaliação da qualidade fisiológica desse lote de sementes.

Esses dados não estão de acordo com Marques *et al.* (2002b), onde o teste de condutividade elétrica se mostrou eficiente na diferenciação de lotes de sementes de *Dalbergia nigra*, apresentando alta associação com a germinação, em condições de laboratório e viveiro.

O teste de condutividade elétrica não é eficiente para a separação de lotes de qualidade intermediária; entretanto, tem sido amplamente utilizado para diferenciar lotes de alta qualidade de fisiológica dos lotes de baixa, de acordo com (VIEIRA e KRZYZANOWSKI, 1999; VIEIRA, 1994). Para lotes de qualidade inferior ou intermediária deve-se usar um maior número de repetições, tornando os resultados mais confiáveis, especialmente quando se trabalha com espécies nativas, sem domesticação e

melhoramento, em que há grande variação entre as repetições dentro de um mesmo tratamento (SANTOS e PAULA, 2009).

O teste de condutividade não foi adequado para discriminar as matrizes de *Albizia hassleri* quanto à qualidade das sementes (GONZALES *et al.* 2009).

FAnti e perez (2005) observaram que o decréscimo no vigor de sementes de *Chorisia speciosa* (paineira) envelhecidas artificialmente, foi diretamente proporcional ao aumento da lixiviação eletrolítica dos solutos celulares das sementes.

Santos e Paula (2005) verificaram que teste de condutividade elétrica mostra-se promissor para a diferenciação de lotes de sementes de *Sebastiania commersoniana*, podendo ser conduzido a 25°C, em 75 ml de água por 24 horas. Isso não ocorreu neste estudo.

Percebe-se que a redução dos valores de IVG foram significativos para todos os tratamentos nas sementes do acesso II (Tabela 6.2).

Para sementes do acesso I a redução desses valores não foi significativa nas primeiras 24 horas, mas passando a haver diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à testemunha a partir de 48 horas.

Delouche (1963) caracteriza a deterioração como processo inexorável, irreversível, mínimo na maturidade fisiológica, cuja velocidade varia entre lotes de sementes de mesma variedade, sendo variável entre sementes individuais dentro de um lote e com diferenças inerentes entre espécies quanto à longevidade.

De maneira geral, à medida que as sementes foram envelhecidas ocorreu uma redução no vigor. O índice de velocidade de germinação (IVG) decresceu com o aumento do tempo de envelhecimento, confirmando a queda no vigor e na germinação. A redução gradativa da viabilidade e do vigor das sementes, promovida pelas condições estressantes durante o envelhecimento acelerado, pode ser observada pelas características avaliadas. Isto se deve a um maior consumo das reservas, decorrente da acelerada atividade metabólica nestas condições.

Sementes de menor qualidade deterioram-se mais rapidamente do que as vigorosas, com reflexos na germinação após o período de envelhecimento acelerado (TORRES e MARCOS FILHO, 2001).

Ferreira *et al.* (2004) estudando o efeito do envelhecimento acelerado em sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf., relataram que o vigor foi o atributo mais afetado durante o envelhecimento artificial, constatado pela redução gradativa no índice de velocidade de germinação e pelo aumento na quantidade de lixiviados, observado no teste de condutividade elétrica

O envelhecimento acelerado ocasionou redução na germinação e no vigor de sementes de *C. langsdorffii*, sendo o vigor afetado mais rapidamente do que a germinação (CARVALHO *et al.* 2006).

Resultados semelhantes foram obtidos por Garcia e Abreu (2004) que, verificaram que sementes de *Anadenanthera colubriana* Bram. apresentaram uma redução significativa da porcentagem de germinação, quando submetidas a condições de envelhecimento acelerado.

Em sementes de eucalipto, a taxa de germinação decresceu com o aumento do tempo de armazenamento das sementes, sendo que as sementes envelhecidas artificialmente apresentaram menor vigor quando comparadas com os tratamentos das sementes envelhecidas naturalmente (Tukey 5%), demonstrando que o tratamento das sementes colocadas a 42°C e 100% de UR por 96 horas provocou um declínio na germinação destas (CAMARGO, *et al.*, 2000).

Em sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) também foi observado que o vigor avaliado pelo teste de IVG reduziu à medida que o tempo de envelhecimento acelerado aumentou (GARCIA e VIEIRA, 1994).

O índice de velocidade de germinação apresentou os melhores resultados para identificar danos iniciais em sementes conservadas de *Dalbergia nigra*.

6.1. Teste Citogenético

Para realização do teste citogenético, no qual foi avaliado o número de anormalidades mitóticas, a técnica precisou ser otimizada, já que na literatura não foram encontrados protocolos para análise do comportamento mitótico de *Dalbergia nigra*.

6.1.2. Coleta de tecido meristemático para análise mitótica

O tecido meristemático é caracterizado por possuir células indiferenciadas e em constante divisão mitótica, principalmente na raiz. Para a coleta deste material foram testados vários horários de coleta; foi constatado que o horário de 16:00h foi o melhor, pois nele foi obtida maior frequência de divisão mitótica.

O fixador utilizado, Carnoy II (6:3:1 v/v/v) clorofórmio, ácido acético glacial e etanol absoluto, apresentou os melhores resultados do que o Carnoy I (3:1 v/v) ácido acético glacial e etanol absoluto, que na sua composição não apresenta clorofórmio. O clorofórmio promove a dissolução de graxas e secreções cerosas da superfície celular, facilitando a penetração da solução fixadora (PEÑALOZA, 2005).

6.1.3. Avaliação das fases observadas

Foram analisadas 17.597 células em divisão com média de 3.519,4 em 10 lâminas, por tratamento.

O número de cromossomos observado está de acordo com POLIDO *et al.* (2011) $2n = 20$, Figura 6.6.

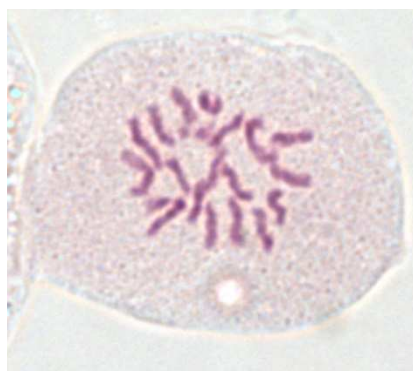


Figura 6.6.: Contagem do número de cromossomos de *Dalbergia nigra* $2n = 20$

A) Sementes do acesso I

O teste de médias para a soma das anormalidades em sementes do acesso I (Tabela 6.1) mostrou que à medida que as sementes foram envelhecidas essas anormalidades aumentaram, coincidindo com a queda na germinação.

Para o tratamento testemunha e 24 horas de envelhecimento acelerado não foram encontradas diferenças significativas para a variável SA (soma de todas as aberrações celulares encontradas em cada tratamento), mas para 48, 72 e 96 horas as diferenças foram

significativas, comprovando que à medida que as alterações celulares aumentam a germinação de sementes de *Dalbergia nigra* diminui.

Dentre as várias consequências relacionadas ao processo de deterioração das sementes, a queda na germinação tem sido apontada como um dos últimos eventos que caracterizam o declínio na qualidade fisiológica de sementes (PAIVA, 2008).

Alterações na anáfase/telófase já são estudadas por outros autores em sementes envelhecidas.

Para avaliar o potencial da presença das aberrações observadas na germinação de sementes do acesso I utilizou-se a análise de Probit. De acordo com os resultados a presença de 10 células com anormalidades na metáfase é capaz de reduzir a germinação em 50% (Figura 6.7).

Para a alteração mitótica do tipo ponte são necessárias 41 células com esta anomalia para que a germinação se reduza à metade. No caso de células que apresentam irregularidades do tipo cromossomos retardatários, a presença de 24 células é suficiente para a germinação decrescer pela metade (Figura 6.7).

Portanto para que a germinação de sementes do acesso I de *Dalbergia nigra* caia pela metade são necessárias 74 alterações cromossômicas.

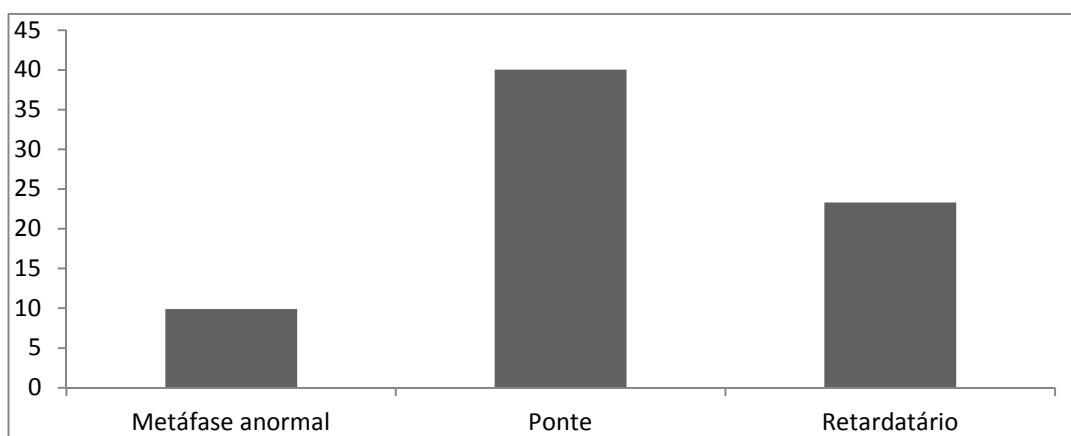


Figura 6.7.: Quantidade de anormalidades necessárias para que a germinação de sementes de *Dalbergia nigra* caia 50%.

Nilan e Gunthardt (1956) relataram que, a capacidade de germinação das sementes diminui com o aumento da frequência de anomalias cromossômicas de acordo com o tempo de envelhecimento das sementes.

Murata e Tsuchiya (1980) estudando o efeito do envelhecimento em sementes de *Hordeum vulgare*, observaram que, a sincronização da mitose foi afetada à medida que as sementes foram envelhecidas, e que as alterações na anáfase (ponte e retardatário) são encontradas geralmente de maneira isolada, mas também podem ser encontradas células com os dois tipos de alteração cromossômica.

Ribeiro *et al.* (2010) estudando a citogenética de sementes de trigo armazenadas a longo e médio prazos em banco de germoplasma relataram que, a falta de sincronização da mitose pode ocasionar o surgimento de irregularidades que pode ser em decorrência das condições e/ou do tempo de armazenamento das sementes, como também da genealogia dos materiais, cujos parentais podem ser instáveis geneticamente, sendo tais características herdadas e manifestadas nas sementes avaliadas.

B) Sementes do acesso II

Foram avaliadas 8.839 células em divisão para sementes do acesso II, com média de 2.209,75 células por tratamento, uma vez que para esse lote de sementes não foi possível realizar o teste citogenético para sementes envelhecidas até 96 horas, pois todas as sementes estavam inviáveis (Tabela 6.2).

Comparando - se os dados de germinação com a soma das anomalias em sementes do acesso II, verifica-se uma relação entre a diminuição da germinação com o aumento na frequência de células anormais (Tabela 6.2).

Para esse lote de sementes também não houve diferença significativa entre o tratamento testemunha e 24 horas de envelhecimento.

Murata *et al.* (1981) observando as mudanças genéticas durante o envelhecimento de sementes de cevada submetidas a altas temperaturas mostraram que, a frequência de anáfases aberrantes aumentou com o aumento do tempo e condições de envelhecimento. Essas aberrações também foram relacionadas com a perda de germinabilidade, que foi acelerada com o aumento da temperatura de 21°C para 32°C e 38°C.

Vários autores relataram que o envelhecimento acelerado aumenta a frequência de anomalias cromossômicas, (Abdalla e Roberts, 1968 e Murata *et al* 1981) trabalhando com cevada; (Roberts, 1973b e Villiers, 1974) estudando as alterações bioquímicas em sementes conservadas.

Ribeiro *et al.* (2010) estudando alterações citogenéticas em sementes de trigo armazenadas relataram que, o envelhecimento das sementes pode estar relacionado com quebras no DNA e as alterações no seu metabolismo. Isso explicaria a queda acentuada na porcentagem de germinação das sementes de trigo e o aparecimento de células anormais à medida que as sementes envelheceram. De acordo com Warner e Price (1989) o envelhecimento de sementes levaria a uma crescente redução da capacidade operacional dos mecanismos de sua restauração.

Para avaliar a queda na germinação em função das anormalidades utilizou-se a equação PROBIT, demonstrando que para sementes do acesso II são necessárias poucas anormalidades para que a germinação caia 50% (Figura 6.8).

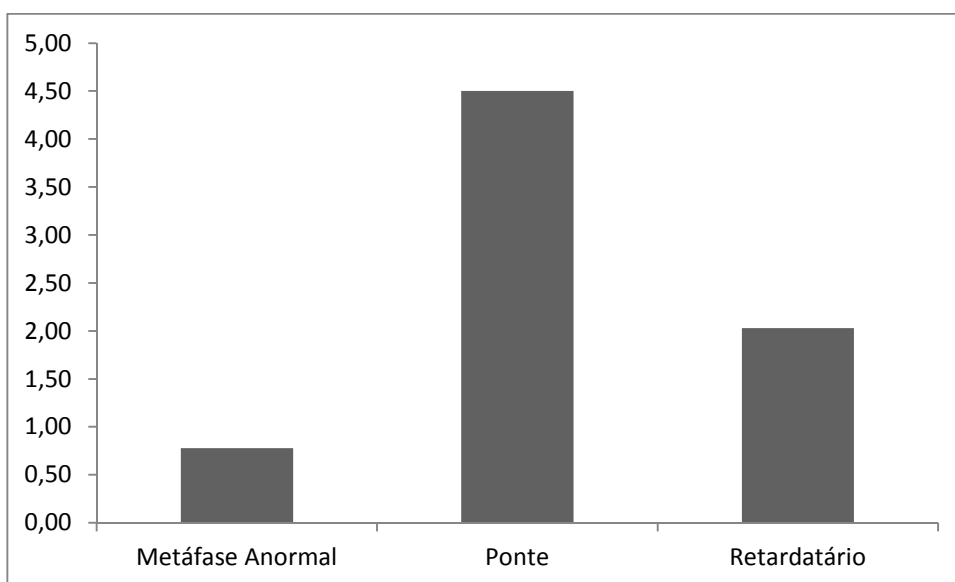


Figura 6.8: Quantidade de anormalidades necessárias para que a germinação de sementes de *Dalbergia nigra* caia 50%.

Para esse lote de sementes a presença de uma alteração na metáfase já é suficiente para que a germinação de sementes de *D. nigra* decaia 50%; isso indica que essa variável é determinante para o insucesso da germinação de sementes armazenadas e envelhecidas artificialmente. Isso provavelmente ocorreu devido à baixa qualidade inicial desse lote de sementes.

Para as sementes do acesso II são necessárias cinco células com alterações na anáfase (ponte) ou duas células com cromossomos retardatários (Figura 6.8) para que a germinação caia 50%. Esse lote é extremamente sensível a alterações nucleares; isso poderia explicar a ausência de germinação em sementes envelhecidas artificialmente por

96 horas. Na Figura 6.9 podem-se observar as alterações celulares encontradas nas células meristemáticas de sementes armazenadas de jacarandá da Bahia (*Dalbergia nigra*).

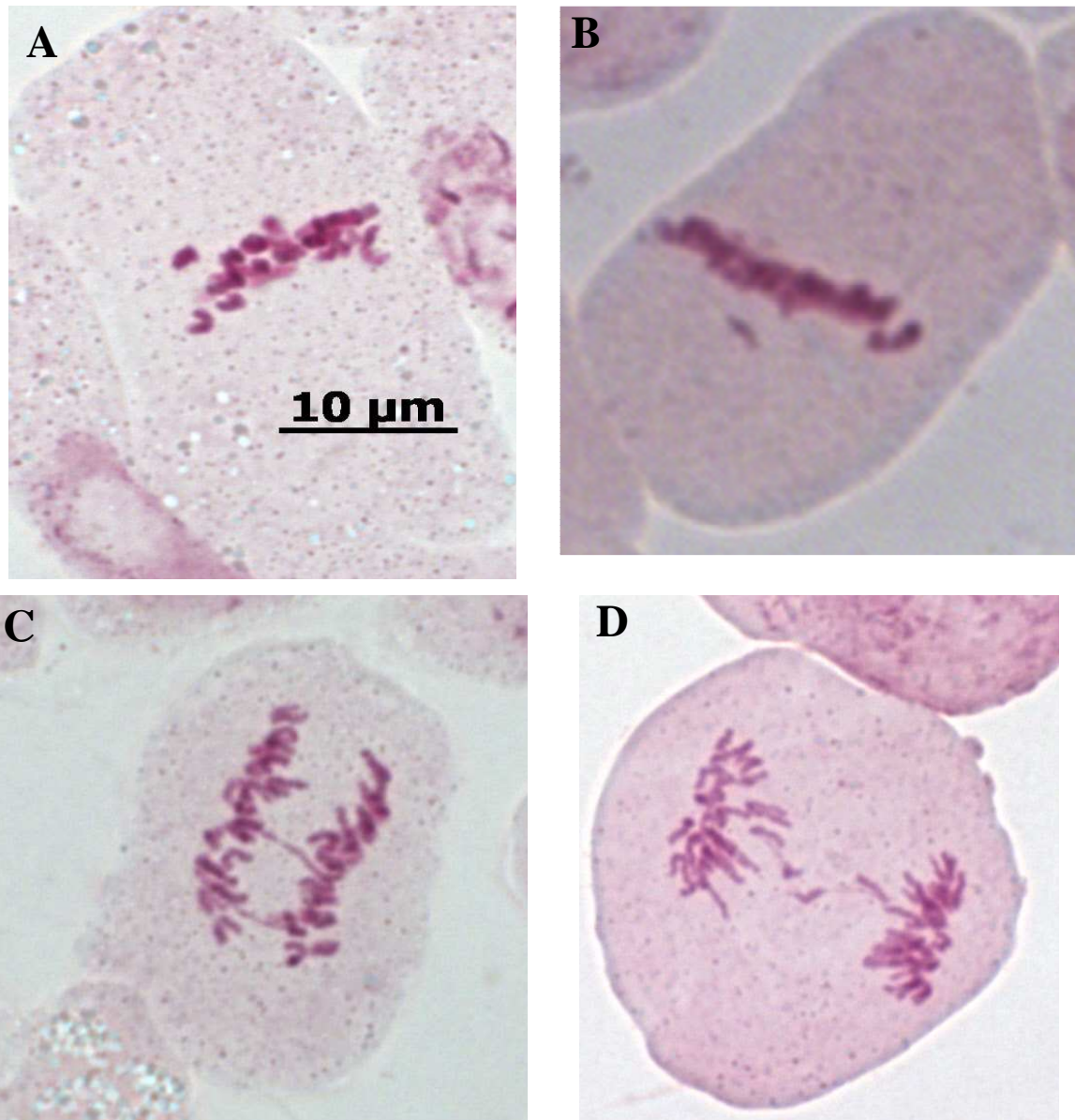


Figura 6.9: Aberrações nucleares em sementes de *Dalbergia nigra* envelhecidas artificialmente A e B: metáfase anormal, C: anáfase com ponte e D: anáfase com retardatário.

É interessante notar o aparecimento de três tipos de alterações cromossômicas (Figura 6.9). Essas alterações celulares podem ser decorrentes de quebras de DNA, ou seja, podem ser consequências da ocorrência de deficiências e inversões de segmentos provocados pelas quebras (CHEACH e OSBORN, 1978).

O envelhecimento teria como uma de suas principais causas às quebras do DNA e as alterações no metabolismo do DNA. Paralelamente a isso, haveria uma crescente

redução da capacidade operacional dos mecanismos de sua restauração, especificamente a velocidade com que atua e a fidelidade com que reproduz a estrutura afetada (WARNER e PRICE, 1989).

Analisando-se a correlação multivariada entre germinação versus anormalidades e condutividade elétrica, percebe-se que a queda na porcentagem de germinação das sementes de *Dalbergia nigra*, o aumento de células anormais e a quantidade de lixiviados liberados durante o teste de condutividade elétrica estão correlacionados, ou seja, se verifica que à medida que as sementes se deterioraram esses fatores são aumentados (Tabela 6.7).

Tabela 6.3: Coeficientes de correlação simples (r) entre os valores de **MA** (Metáfase Anormal); **A/T** (Anáfase/Telófase); **R** (Retardatário); **P** (Ponte); **G** (Germinação) e **CE** (Condutividade Elétrica), para sementes de *Dalbergia nigra* do acesso II.

	A/T	R	P	G	CE	TZ
MA	0,350302	0,611211	0,650678	-0,27214	-0,3194	-0,17031
A/T		0,711515	0,628182	0,313116	-0,50558	0,324731
R			0,859117	-0,10868	-0,39709	-0,05042
P				-0,26844	-0,29355	-0,22616
G					0,64018	0,983822
CE						-0,74292

Foram observadas correlações significativas entre a variável germinação e os valores de anáfase/telófase, condutividade elétrica e de tetrazólio (Tabela 6.7), indicando que o comportamento da germinação pode estar associado às alterações celulares encontradas nas fase anáfase/telófase, durante o envelhecimento artificial das sementes de *Dalbergia nigra*.

As alterações celulares encontradas nesse estudo podem explicar a queda na germinação de sementes de *D. nigra* envelhecidas artificialmente. Coello (1996) estudando sementes de milho deterioradas observou que ocorreram danos no mecanismo de reparo do DNA em sementes envelhecidas artificialmente.

O envelhecimento de sementes pode estar relacionado com a deficiência no mecanismo de reparo das sementes de jacarandá da bahia (*Dalbergia nigra*) e conseqüentemente com o aumento das alterações cromossômicas observadas nos lotes com o maior tempo de envelhecimento.

7- CONCLUSÕES

O emprego de testes complementares ao teste de germinação mostrou-se muito importante para agregar informações no sentido de se evitar a perda de sementes em razão da redução da germinabilidade, e conseqüentemente minimizar os efeitos da erosão genética nas coleções de germoplasma.

O teste de tetrazólio foi capaz de detectar a perda de viabilidade em sementes conservadas de *Dalbergia nigra*.

O teste de condutividade elétrica mostrou-se eficiente para distinção de lotes com destacada diferença de qualidade fisiológica, porém, mostrou-se ineficiente em distinguir lotes de qualidades intermediárias.

O teste citogenético, baseado na mensuração de anormalidades mitóticas, mostrou-se altamente correlacionado com a qualidade fisiológica de sementes de *Dalbergia nigra*, principalmente ao empregar-se a soma de anormalidades.

O índice de velocidade de germinação mostrou-se como o teste mais promissor para identificar lotes com perda de qualidade fisiológica, seja pela sua facilidade de implementação, quanto pela capacidade de predição de perda de germinabilidade.

7.1 RECOMENDAÇÕES

Recomenda-se que coleções de germoplasma adotem testes complementares aos testes de germinação com o objetivo de se minimizar o efeito da erosão genética em virtude da perda de sementes causada pelo envelhecimento natural do germoplasma.

O teste de viabilidade bioquímica deve ser realizado com solução de 2, 3, 5- trifenil cloreto de tetrazólio, na concentração de 0,75%, com o embrião isolado dos outros tecidos da semente, por 24 horas em câmara de germinação, com temperatura constante de 25°C e ausência de luz.

Para o teste citogenético recomenda-se a coleta de raízes as 16:00h, fixação em solução de Carnoy II por 24 horas, hidrólise em HCl 1N por 10 min, em temperatura constante de 60°C, coradas com Reativo de Schiff por no mínimo 2 horas e as lâminas devem ser preparadas com orceína acética a 2%.

Recomenda-se a utilização do índice de velocidade de germinação associado com o teste de germinação, pois este se mostrou altamente correlacionado com a redução da germinação. A vantagem da utilização deste teste é a sua capacidade preditiva, pois foi possível identificar de forma precoce, lotes de sementes, que apesar de apresentarem um bom percentual de germinação, já apresentavam considerável queda de vigor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, F. H.; ROBERTS, E. H. Effects of temperature, moisture, and oxygen on the induction of chromosome damage in seeds of barley, broad beans, and pea during storage. **Annals of Botany**, New York, v. 32, p. 119-136, 1968.
- ABDUL-BAKI, A. A.; ANDERSON, J. D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOZLOWSKI, T. T. **Seed Biology**: Academic Press. New York: [s.n.], v. 2, 1972. p. 298-315.
- ANDRADE et al. Substrato, temperatura de germinação e desenvolvimento pós-seminal de sementes de *Dalbergia nigra*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 517-523, Mar 2006.
- ANDRADE, A. C. S. et al. Substrato, temperatura de germinação e desenvolvimento pós-seminal de sementes de *Dalbergia nigra*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 517-523, 2006.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos**: teoria e prática. 3. ed. Viçosa: UFV, 2004.
- ATAÍDE et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Pterogyne nitens* tull. durante o envelhecimento artificial. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 1, p. 71-76, jan./mar. 2012.
- ATAÍDE, G. M.; FLORES, A. V.; BORGES, E. E. L. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Pterogyne nitens* tull. durante o envelhecimento artificial. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 1, p. 71-76, jan./mar. 2012.
- BARBEDO, C. J.; CÍCERO, S. M. Utilização do teste de condutividade elétrica para previsão do potencial germinativo de sementes de ingá. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 55, n. 2, p. 249-259, 1998.
- BARBEDO, J. B.; BILIA, D. A. C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. D. C. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. **Revista Brasileira Botânica**, v. 25, n. 4, p. 431-439, 2002.
- BARROS, A. S. R.; MARCOS FILHO, J. Testes para avaliação rápida da viabilidade de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 10, p. 1447-1459, 1990.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Ecological meaningful germination studies**. New York : Academic Press, 1998.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994.

- BINGHAM, S. A.; HARRIS, A.; MC DONALD, L. A. Comparative study of radicle and coleoptile extension in maize seedling from age and unaged seed. **Seed Science and Technology**, Zurich , v. 22, p. 127-139 , 1994.
- BIRUEL, R. P. **Caracterização e germinação de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart ex Tull. var. *leiostachya* Benth.** Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, p. 70. 2001. (2001).
- BONNER, F. T. Woody Plant Seed Manual. **Nurseries, & Genetics Resources**, n. USDA ForestService's/Reforestation, 2001.
- BORDIGNON, B. C. S. Relação das condições de armazenamento com qualidade fisiológica de sementes e composição do óleo extraído de cultivares de soja. **Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria**, Santa Maria, RS, p. 90, 2009.
- BORGES, E. E. L.; BORGES, R. C. G.; BUCKERIDGE, M. S. Alterações nas composições de carboidratos e de ácidos graxos em sementes de jacarandá da bahia osmocondicionadas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. 1, p. 10-16, 2000.
- BORGES, E. E. L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p. 83-136.
- BOTELHO, S. A. et al. Aplicação do teste de tetrazólio em sementes de angico-amarelo (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub). In: SEMENTES, C. B. D. **Informativo Abrates**. 2. ed. Florianópolis - Curitiba: [s.n.], v. 5, 1995.
- BOUBRIAK, I. et al. The requirement for DNA repair in desiccation tolerance of germinating embryos. **Seed Science Research**, Wallingford, n. 2, p. 97-105, 1997.
- BRACCINI, A. L.; BRACCINI, M. C. L.; SCAPIM, C. A. Mecanismos de deterioração de sementes: Aspectos bioquímicos e fisiológicos. **Informativo ABRATES**, v. 11, n. 1, p. 10-15, 2001.
- BRAMMER, S. P.; ZANOTTO, M.; ANDRÉIA CAVERZAN, A. **Citogenética vegetal: da era clássica à molecular**. Embrapa Trigo. Documentos Online, 85. Passo Fundo, p. 9. 2007. (Disponível em:.).
- BRASIL, M. D. A. E. D. R. A. **Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. Regra para Análise de Sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009.
- BRASIL, M. D. A. E. D. R. A. **Regra para Análise de Sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009.
- CABRAL, E. L.; BARBOSA, D. C. D. A.; SIMABUKURO, E. A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore. **Acta botanica**, Brasília, v. 17, p. 609-617, 2003.

- CAMARGO, M. L. P. et al. Atividade enzimática em plântulas de eucalyptus grandis provenientes de sementes envelhecidas artificialmente e naturalmente. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 10, n. 2, p. 113-122, 2000.
- CARNEIRO, J. G. A.; AGUIAR, I. B. Armazenamento de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. **Sementes Florestais Tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p. 350.
- CARVALHO, D. et al. Eletroforese de proteínas e isoenzimas em sementes de Copaifera Langsdorffii Desf. (leguminosae caesalpinioideae) envelhecidas artificialmente. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 1, Jan- Feb 2006.
- CARVALHO, L. R.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, 2006.
- CARVALHO, N. M. Vigor de sementes. In: CÍCERO, S. M.; MARCOS FILHO, J.; SILVA, W. R. **Semana de atualização em produção de sementes**. Piracicaba: [s.n.], 1986. p. 207-223.
- CARVALHO, N. M. D.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal : FUNEP, 2000.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes, ciência, tecnologia e produção**. 3. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília: Colombo: Embrapa-CNPQ, 1994.
- CHAITANYA, K. S. K.; NAITHANI, T.; NAITHANI, S. C. Ascorbic acid metabolism in ageing recalcitrant sal (Shorea robusta Gaertn. F.). **Indian Journal Experimental of Botany seeds**, v. 38, p. 1031-1035, 2000.
- CHANG, S. M.; SUNG, J. M. Deteriorative changes in primed sweet corn seeds during storage. **Seed Science and Technology**, v. 26, p. 613-626, 1998.
- CHEACH, K. S.; OSBORN, D. DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing sycamore seed.. **Nature**, London, v. 272, n. 5654, p. 593-599, 1978.
- CHING, T. M. Metabolism of germinating seeds. In: KOZLOWSKI, T. T. **Seed Biology**. New York: Academic Press, v. 2, 1972. p. 103-218.
- COELLO, P. & V.-R. M. Maize DNA polymerase 2 (an α -type enzyme) suffers mayor damage after seed deterioration. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 6, n. 1, p. 1-7, 1996.
- CORTE, V. B. et al. Estudo enzimático da deterioração de sementes de Melanoxylon brauna submetidas ao envelhecimento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1, p. 83-91, Abril 2010.

- CORTES, V. B. et al. Estudo enzimático da deterioração de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ao envelhecimento natural e acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1, p. 83-91, 2010.
- DAS, G.; SEM-MANDI, S. Scutellar amylase activity in naturally aged and accelerated aging wheat seed. **Annals of Botany**, v. 69, n. 6, p. 497-501, 1992.
- DELOUCHE, J. C. Seed deterioration. **Seed World**, v. 92, n. 4, p. 14-5, 1963.
- DELOUCHE, J. C. Seed deterioration. **Seed World**, v. 92, n. 4, p. 14-5, 1963.
- DELOUCHE, J. C. Deterioração de sementes. **SEED News**, Pelotas, v. 6, n. 6, p. 24-31, 2002.
- DELOUCHE, J. C. et al. O Teste de tetrazólio para a viabilidade da semente. Brasília: **AGIPLAN**, 1976.
- DELOUCHE, J. C.; BASKIN, C. C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 2, p. 427-452, 1973.
- DHAKAL, M. R.; PANDEY, A. K. Storage potential of niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) seeds under ambient conditions.. **Seed Science Technology**, v. 29, p. 205-213, 2001.
- DIAS, D. C. F. S.; MARCOS FILHO, J. Testes de vigor baseados na permeabilidade das membranas celulares. Condutividade elétrica. 1. ed. Londrina: **Abrates**, v. 5, 1995. 26-36 p.
- DONADIO, N. M.; DEMATTÊ, M. E. S. P. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) e jacarandá-da-bahia bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr.All. Ex Benth.) – Fabaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 64-73, 2000.
- EL-KASSABY, Y. A.; EDWARDS, D. G. W. Genetic control of germination and the effects of accelerated aging in mountain hemlock seeds and its relevance to gene conservation.. **Forest Ecology and Management.**, v. 112, p. 203-211, 1998.
- ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. Improved equations for the prediction of seed longevity. **Annals of Botany**, London, v. 4, n. 45, p. 13-30, 1980.
- FANTI, S. C.; PEREZ, S. C. J. G. A. Efeitos do envelhecimento precoce no vigor de sementes de *Chorisia speciosa* St. Hil. – Bombacaceae. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p. 345-352, 2005.
- FERREIRA, A. G.; BORGUETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

- FERREIRA, R. A. et al. Qualidade fisiológica de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae Caesalpinioideae) envelhecidas artificialmente. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, n. 1, p. 82-86, 2004.
- FOGAÇA, C. A. et al. Teste de tetrazólio em sementes de *Copaifera langsdorffii* E *Schizolobium parahyba*. **FLORESTA**, Curitiba PR, v. 41, n. 4, p. 895 - 904, out./dez 2011.
- FONTES, B. P. D.; DAVIDE, L. C.; DAVIDE, A. C. Fisiologia e citogenética de sementes envelhecidas de *Araucaria angustifolia*., v.25, n.2. **Ciências agrotecnicas**, Lavras, v. 25, n. 2, p. 346-355, mar./abr 2001.
- FRANCO, D. F.; PETRINI, J. A. Testes de vigorem sementes de arroz. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, v. **Comunicado Técnico**, 68, 2002.
- FRATIN, P.; MARCOS FILHO, J. **Teste de envelhecimento acelerado de sementes de soja em “gerbox” adaptados. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA 3.**, 1984, Campinas. Anais. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1984.
- GARCIA, A.; VIEIRA, R. D. Germinação, armazenamento e tratamento de sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, n. 2, p. 128-133, 1994.
- GARCIA, L. C.; A.C, N.; ABREU, D. C. A. Influência do envelhecimento acelerado no vigor de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan - Mimosaceae. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 14, n. 1, p. 85-90, 2004.
- GASPAR-OLIVEIRA, C. M.; MARTINS, C. T.; NAKAGAWA, J. Método de preparo das sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) para o teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 160-167, 2009.
- GOEL, A. K.; SHEORAN, I. S. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. **Journal Plant Physiology**, v. 160, p. 1093-1100, 2003.
- GOEL, A.; SHEORAN. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. **Biologia Plantarum**, v. 46, n. 3, p. 429-434, 2003.
- GOMES, R. P. et al. Jacarandá-da-bahia -*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. Allem. **Cerrado**, Brasília, v. 8, n. 32, p. 4-6, 1976.
- GONÇALVES, E. P. et al. Potencial fisiológico de sementes de mutambo (*Guazuma ulmifolia* Lam.) em diferentes procedências.. **Caatinga**, Mossoró, v. 22, p. 218-222, 2009.
- GONZALES, J. L. S.; PAULA, R. C. S.; VALERI, V. TESTE DE CONDUTIVIDADE ELÉTRICA EM SEMENTES DE *Albizia hassleri* (Chodat) Burkart. FABACEAE-MIMOSOIDEAE. **Árvore**, Viçosa-MG, v. 33, n. 4, p. 625-634, 2009.

- GRIS, C. F.; CARVALHO, M. L. M.; OLIVEIRA, A. S. **Adequação do Teste de Tetrazólio para Avaliação da Qualidade Fisiológica de Sementes de Pinhão Manso (*Jatropha curcas* L.)** In: www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/caracterizacao/2.pdf. [S.l.]: [s.n.], 2007.
- GUEDES, R. S. et al. Envelhecimento acelerado na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 443-450, abr/jun 2011 b.
- GUEDES, R. S. et al. Germinação de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 33, n. 4, p. 445-450, 2011.
- GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; OLIVEIRA, L. S. B. TESTE DE ENVELHECIMENTO ACELERADO EM SEMENTES DE *Chorisia glaziovii* (Kuntze) (Malvaceae). **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 29, n. 2, p. 378-385, Mar./Abr 2013.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC, 2002. 131 p.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. D. **Como observar cromossomos: Um Guia de Técnicas em Citogenética Vegetal, Animal e Humana**. Ribeirão Preto, SP: Fundação de Pesquisas: FUNPEC, 2002.
- HAMPTON, J. G.; TEKRONY, D. M. **Handbook of the vigour test methods**. 3. ed. Zurich: [s.n.], 1995.
- HARRINGTON, J. F. Seed storage longevity. **Seed Biology, New York: Academic Press, 1972. v.3, p.145-245.**, New York: Academic Press, v. 3, p. 145-245, 1972.
- HENDRY, G. A. F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, v. 3, p. 141-153, 1993.
- HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Tropical Tree Seed Manual. In: USDA FOREST SERVICE'S REFORESTATION NURSERIES, & G. R. **Storage**. [S.l.]: [s.n.], 2003. Cap. 3.
- IBAMA. <http://www.ibama.gov.br>, 2008. Acesso em: 18 Setembro 2011.
- ISELY, D. Vigor tests. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, v. 47, p. 177-182, 1957.
- KAGEYAMA, P. Y.; MARQUEZ, F. C. M. **Comportamento de sementes de curta longevidade armazenadas com diferentes teores de umidade inicial: gênero *Tabebuia***. Reunion sobre problemas en semillas forestales tropicales. San Felipe-Bacalar, México: INIF. 1981. p. 347-352.
- KRAMER, P. J.; KOZLOWSKI, T. **Fisiologia das árvores**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1972.

- KRYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA NETO, J. B. S. Vigor de sementes. **Informativo ABRATE**, Londrina, 2001. 61-84.
- KRYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A. **Relato dos testes de vigor disponíveis para as grandes culturas**. 2. ed. [S.l.]: Informativo Abrates, v. 1, 1991.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: RIMA, v. 2, 2004.
- LAZAROTTO, M. et al. correlação entre testes para avaliação da qualidade de sementes de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) e a germinação. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 15, n. 1, p. 43-53, 2008.
- LAZAROTTO, M. et al. Adequação do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Ceiba speciosa*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1243-1250, out./dez 2011.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Brasil: Nova Odessa: Plantarum, v. II, 1992.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de Identificação de plantas e árvores nativas do Brasil**. São Paulo: Plantarum, 2002.
- MAGUIRRE, J. D. Speed of germination - aid seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar./Apr. 1962.
- MALAVASI, M. M. et al. Desenvolvimento do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade em sementes de açúcará (*Gleditschia amorphoides* Taub. – FABACEAE-CAESALPINOIDEAE). **CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES**, Foz do Iguaçu, v. 9, 1999.
- MARCOS FILHO, J. **Avaliação da qualidade de sementes**. Piracicaba-SP: FEALQ, 1987.
- MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. **Vigor de sementes: conceitos e testes.**, Londrina, p. 1-24, 1999.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005.
- MARQUES, M. A.; PAULA, R. C.; RODRIGUES, T. J. D. diferenciação de lotes de sementes de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr.All. ex Benth.) pelo teste de germinação em laboratório e viveiro. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p. 244-247, 2002.
- MARQUES, M. A.; PAULA, R. C.; RODRIGUES, T. J. D. Adequação do teste de condutividade elétrica para determinar a qualidade fisiológica de sementes de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. ex.Benth). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 271-278, 2002a.

MARQUES, M. A.; PAULA, R. C.; RODRIGUES, T. J. D. Efeito do número de sementes e do volume de água na condutividade elétrica de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. ex. Benth.. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 254-262, 2002b.

MARTINS, I. C. F.; MATOS, J. M. M. **Estudo do tempo de embebição de sementes para o método de condutividade elétrica para análise da viabilidade e vigor das sementes de *Caesalpinia ferrea* Martius, *Pterogyne nitens* Tul e *Copaifera langsdorffii* Desf.** Universidade de Brasília. Brasília, p. Monografia do Curso de Engenharia Florestal. 2011.

MARTINS, S. L.; SILVA, D. D. Maturação e época de colheita de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All.ex Benth. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 96-99, 1997.

MATHEWS, S.; POWELL, A. "A electrical conductivity test. In: PERRY, D.A. (Ed.). Handbook of vigor test methods". **International Seed Testing Associaty**, Zurich, p. 37-42, 1981.

MCDONALD, M. D. Seed deterioration, physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, v. 22, n. 3, p. 531-539, 1999.

MURATA, M.; ROSS, E. E.; TSUCHIYA, T. Chromosome damage induced by artificial seed aging in barley. I. Germinability and frequency of aberrant anaphases at first mitosis. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 23, n. 2, p. 267-280, 1981.

MURATA, M.; TSCUCHIYA, T. Mitotic Chromosomal Aberrations in Barley Induced by Accelerated Seed Aging. **Barley Genetics Newsletter Reserach Notes**, Colorado, v. 8, n. 2, p. 79-82, 1980.

MURATA, M.; TSUCHIYA, T.; ROOS, E. E. Mitotic Chromosomal Aberrations in Barley Induced by Accelerated Seed Aging. **BARLEY GENETICS NEWSLETTER**, Colorado, v. 8, n. II, p. 79-82, 1979.

NASCIMENTO, W. M. O.; CARVALHO, N. M. Determinação da viabilidade de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) através de teste de tetrazólio. **Revista Brasileira Sementes**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 470-474, 1998.

NASSIF, S. M. L. **Fatores externos (ambientais) que influenciam na germinação de sementes.** Informativo IPEF. São Paulo: ESALQ. 1998.

NILAN, R. A.; GUNTARDT, H. M. Studies on aged seeds III R. S. of aged wheat seeds to X irradiation. **Caryologia**, v. 8, p. 316-322, 1956.

OLIVEIRA FILHO, A. T. Estudos ecológicos da vegetação como subsídios para programa de revegetação com espécies nativas: uma proposta metodológica. **Cerne**, Lavras, v. 1, n. 1, p. 113-117, 1994.

OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO, M. L. M.; DAVIDE, A. C. **Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert-Leguminosae Caesalpinioideae**. 2. ed. Lavras: Cerne, v. 11, 2005.

OSBORNE, D. J.; BOUBRIAK, I. I. DNA and desiccation tolerance. **Seed Science Research**, Wallingfor, v. 4, p. 175-185, 1994.

PAIVA, A. S. E. A. Qualidade física e fisiológica de sementes da leguminosa forrageira *Macrotyloma axillare* cv. Java.. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 30, n. 2, p. 130-136, 2008.

PASHA, M. R.; DAS, R. K. Quick viability test of soybean seed by using tetrazolium chloride. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 10, n. 2, p. 651-655, 1982.

PEÑALOZA, A. P. S. **II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, p. 89. 2005.

PEREIRA, M. D.; FILHO, S. M.; LAVIOLA, B. G. ENVELHECIMENTO ACELERADO DE SEMENTES DE PINHÃO-MANSO. **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, jan./mar. 2012. 119-123.

PEREIRA, T. S.; ANDRADE, A. C. S.; COSTA, M. L. N. Resultados preliminares sobre o armazenamento e o efeito do dessecação em sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allem ex. Benth. **Informativo ABRATES, Brasília, v.1**, Brasília, v. 1, n. 4, p. 89, Setembro 1991.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. . V. S. R. T. Aplicação do teste de tetrazólio em sementes. In: SILVA, A. . P.-R. F. C. M. . F. M. B. **Manual técnico de sementes florestais**. São Paulo: Instituto Florestal, v. Série registro, 14, 1995. p. 74-84.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; PEREIRA, C. C. F. Comportamento germinativo de sementes de *Virola surinamensis* (Roll)Warb.em diferentes estádios de maturação. **Informativo ABRATES**, Brasília, v. 3, p. 110, 1993.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; PIRATELLI, A. J. Aspectos ecológicos da produção de sementes. In: AGUIAR, B. D. A.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLA, M. B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p. 47-81.

PINHO, D. S.; BORGES, E. E. L.; PONTES, C. A. Avaliação da viabilidade e vigor de sementes de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. submetidas ao envelhecimento acelerado e ao osmocondicionamento. **Revista Árvore**, Viçosa , v. 34, n. 3, May/June 2010.

POLIDO, C. A.; MORAES, A. P.; FORNI-MARTINS, E. R. **Caracterização cromossômica em espécies de Dalbergieae sensu Klitgaard & Lavin (Leguminosae – Papilionoideae) ocorrentes no Cerrado brasileiro**. 2ª REUNIÃO BRASILEIRA DE CITOGENÉTICA. Águas de Lindóia - SP: [s.n.]. 2011.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília, DF: AGIPLAN, 1977.

- PRIESTLEY, D. A. **Seed aging**. New York: Ithaca: Comstock Publishing Associates, 1986.
- PUZZI, D. Abastecimento e armazenamento de grãos. **Instituto Campineiro de Ensino Agrícola**, Campinas, Brasil, p. 666, 2000.
- R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07 0, URL <http://www.R-project.org>.
- REIS, E. R. Maturação de sementes florestais. In: HOPPE, J. M. **Produção de Sementes e Mudanças Florestais**. 2ª. ed. Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, RS - Brasil, v. I, 2004. Cap. 3, p. 388.
- RIBEIRO, M. R. et al. **Boletim de pesquisa e Desenvolvimento, 287: Análise citogenética em acessos de trigo armazenados a longo e médio prazo**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, p. 26. 2010.
- ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v. 1, p. 499-514, 1973a.
- ROBERTS, E. H. Loss of viability: ultrastructural and physiological aspects. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 3, p. 529-545, 1973b.
- ROBERTS, E. H. **Viability of seeds**. London: Chapman and Hall Ltd, 1974.
- SANTOS, S. R. G. P. C. F. C. A. M. F. V. C. R. S. Viabilidade de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith & Downs (branquilha) – Euphorbiaceae – pelo teste de tetrazólio. **Científica**, Jaboticabal, v. 34, n. 1, p. 39-45, 2006.
- SANTOS, S. R. G.; PAULA, R. C. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Bail.) Smith & Downs (branquilha) – Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 136-145, 2005.
- SANTOS, S. R. G.; PAULA, R. C. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes *Sebastiania commersoniana* (Bail.) Smith & Downs - Euphorbiaceae. **Revista brasileira de sementes [online]**, v. 27, 2005.
- SANTOS, S. R. G.; PAULA, R. C. Teste de envelhecimento acelerado para avaliação do vigor de lotes de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith & Downs (branquilha) – Euphorbiaceae. **Revista do Instituto Florestal**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2007.
- SANTOS, S. R. G.; PAULA, R. C. Testes de vigor para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith & Downs. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 81, p. 007-016, 2009.
- SILVA, J. D. S.; DONZELES, S. M. L.; AFONSO, A. D. Qualidade dos grãos. **Pré-processamento de produtos agrícolas - Instituto Maia**, Niterói, p. 24 - 29, 1995.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicologia**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SILVA, S. C.; SANTOS, D. S. B.; SANTOS FILHO, B. G. Avaliação da qualidade física e fisiológica de sementes de barbatimão (*Styphnodendron adstringens* (Mart.) Coville – Fabaceae – Mimosoideae), submetidas ao armazenamento. **Informativo ABRATES**, Curitiba, v. 7, n. 1, p. 207, 1997.

SMITH, M. T.; BERJAK, P. Deteriorative changes associated with loss of viability of stored desiccation tolerant and desiccation-sensitive seeds. In: KIEGEL, J.; GALILI, G.; DEKKER, M. **Seed development and germination**. New York: [s.n.], 1995. p. 701-746.

SOARES-SCOTT, M. D. et al. Citogenética clássica e molecular em passifloras. In: FALEIRO, F. G.; BRAGA, M. F.; JUNQUEIRA, N. T. V. **Maracujá: Germoplasma e Melhoramento Genético**. 1ª. ed. Brasília: Embrapa, v. I, 2005. Cap. 9, p. 677.

SOROL, C. B.; PÉREZ, M. A. Determinacion de la viabilidad de las semillas de araucaria (*Araucaria angustifolia* Bert. O. Ktze.) através de la prueba topográfica por tetrazolio. **Informativo ABRATES**, Curitiba, v. 11, n. 2, 2001.

SUNG, J. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging in soybean seeds during aging. **Physiologia Plantarum**, v. 97, p. 85-89, 1996.

SUNG, J. M.; JENG, T. L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated ageing of peanut seed. **Physiologia Plantarum**, v. 91, p. 51-55, 1994.

TAYLOR, A. G. et al. Aminoacid leakage from aged vegetable seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 23, p. 113-122, 1995.

TOLEDO, F. F.; MARCOS FILHO, J. **Manual das sementes - Tecnologia da produção**. 1ª. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1, 1977.

TOLEDO-FILHO, D. V.; PARENTE, P. R. Arborização urbana com essências nativas. In: _____ **Boletim Técnico do Instituto Florestal**. São Paulo: [s.n.], v. 42, 1988.

TORRES, S. B.; MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de maxixe (*Cucumis anguria* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 23, n. 2, p. 108-112, 2001.

UFMS. **Armazenamento de sementes**, 2004. Disponível em: <<http://www.ufsm.br/sementes>>. Acesso em: 24 Março 2013.

USBERTI, R.; GOMES, R. B. G. Seed viability constants for groundnut. **Annal of Botany**, London, v. 82, n. 5, p. 691-694, 1998.

VALENTINI, S. R. T.; PINÃ-RODRIGUES, F. C. M. Aplicação do teste de vigor em sementes. In: SILVA, A.; PINÃ-RODRIGUES, F. C. M.; FIFLIOLIA, M. B. **Manual técnico de sementes florestais**. São Paulo: Instituto Florestal, 1995. p. 74-84.

- VÁZQUEZ-YANES, C.; OROZCO-SEGOVIA, A. Physiological ecology of seed dormancy and longevity. In: In: MULKEY, S. S.; CHAZDON, R. L. **Tropical forest plant ecophysiology**. London: Chapman and Hall, 1996. p. 535-558.
- VIEIRA, A. H. et al. Técnicas de produção de sementes florestais. **Embrapa**, Porto Velho, 2001.
- VIEIRA, R. D. **Teste de condutividade elétrica**. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. Testes de vigor em sementes. Jaboticabal: FUNEP, 1994.
- VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. **Teste de condutividade elétrica**. In: VIEIRA, R.D; CARVALHO, N.M. Teste de vigor em sementes. Jaboticabal: FUNEP, 1999.
- VILLIERS, T. A. Seed aging: chromosome stability and extended viability of seed stored fully imbibed. **Plant Physiology**, Osney Mead, v. 53, p. 875-878, 1974.
- WALKER, S. Cytogenetics. In: SHEPPARD, P. M. **Practical Genetics**. New York, Wiley: [s.n.], 1973.
- WARNER, H. R.; PRICE, A. R. Involvement of DNA repair in cancer and aging. **Journal of Gerontology: Biological Sciences**, v. 44, n. 6, p. 45- 54, 1989.