



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

MARTA VANISE BORDIGNON

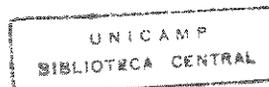
ANÁLISE MORFO-FISIOLÓGICA EM SEMENTES
DE *Eugenia uniflora* L. E *Campomanesia*
xanthocarpa Berg (MYRTACEAE)

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Marta Vanise Bordignon
e aprovada pela Comissão Julgadora.

10/01/00

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para a obtenção do título
de Mestre em Biologia Celular e
Estrutural na área de Biologia
Celular.

Orientador: Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo



2000.08.09

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	I/UNICAMP
	B644h
V. Ex.	
TOMBO BC/	40407
PROC.	278/2000
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	17-02-00
N.º CPD	

CM-00133167-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Bordignon, Marta Vanise

B644h Análise morfo-fisiológica de sementes de *Eugenia uniflora* L. e *Campomanesia xanthocarpa* Beg (MYRTACEAE)/Marta Vanise Bordignon.-- Campinas, SP: [s.n.], 2000
94f: ilus.

Orientador: Angelo Luiz Cortelazzo

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

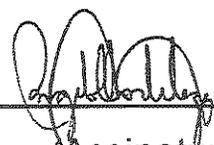
1. Sementes. 2. Germinação. 3. Viabilidade. I. Cortelazzo, Angelo Luiz. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

DATA DA DEFESA: 10 / 01 / 2000

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo (orientador)



(Assinatura)

Profª Dra. Cristiana Noronha Begnami



(Assinatura)

Profª Dra. Thelma Regina Gabriel da Silva



(Assinatura)

SUPLENTE:

Profª Dra. Mary Anne Heidi Dolder



(Assinatura)

DEDICATÓRIA

Aqueles que me deram vida , amor e exemplo de persistência, meus pais Lidio (*in memorian*) e Delly.

À pequena amada Vaniza que, desde cedo, soube aceitar meus momentos de ausência.

Ao Adil meu esposo e colega de curso, que com amor e carinho compartilhou comigo mais essa etapa de nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Angelo Luiz Cortelazzo, meu orientador, agradeço pelos ensinamentos, dedicação e amizade.

À UNICAMP pela oportunidade.

À Direção do Instituto de Ciências Biológicas – UPF, pelo apoio.

À colega Prof^ª. MSc. Branca Maria Aimí Severo, pela opinião na escolha das espécies pesquisadas e acima de tudo pelo apoio e incentivo.

À colega Prof^ª. Dra. Simone Meredith Scheffer Basso, pela convivência, ajuda nas análises estatísticas e sugestões na redação.

À Prof^ª. MSc. Dileta Cecchetti, pelo importante auxílio nos cálculos estatísticos.

À Prof^ª. Dra. Mary Anne Heidi Dolder pelas correções no abstract.

À Prof^ª. Dra. Thaís Leiroz Codenotti, pelo estímulo e confiança.

Às funcionárias Elaine Neckel Ferraz e Dirce Maria Bonez pelo apoio nos Laboratórios de Confecção de Lâminas e Laboratório de Sementes da Universidade de Passo Fundo.

À Marcia da Silva Jorge, funcionária do Banco de Dados, pela ajuda na montagem da tese.

Aos colegas doutorandos em Biologia Celular, Maria Isabel Gallão e João Marcos de Araújo pela hospitalidade, carinho, amizade e ajuda, durante a execução da parte experimental em Campinas.

Aos colegas de Mestrado pelos momentos de convivência.

Aos professores do curso, pelo apreendido e amizade.

Aos meus alunos pelo incentivo na busca do saber e pela compreensão.

A minha família, pela valiosa ajuda nos cuidados com a minha filha, nos períodos de minha ausência.

ÍNDICE

Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	x
Resumo	xi
Abstract	xii
1. Introdução	01
2. Objetivos	11
3. Material e Métodos	12
3.1. Material Vegetal.....	12
3.2. Coleta.....	12
3.3. Testes de germinação.....	13
3.4. Determinação da Massa de matéria fresca e Massa de matéria seca.....	14
3.5. Métodos citoquímicos de análise.....	14
3.5.1. Fixação.....	14
3.5.2. Processamento pós-fixação.....	15

3.5.3. Colorações.....	16
3.5.3.1. Azul de Toluidina pH 4,0 (AT).....	16
3.5.3.2. Xylidine Ponceau pH 2,5 (XP).....	17
3.5.3.3. Método do PAS.....	17
3.5.3.4. Ferrocianeto Férrico.....	18
3.6. Grãos de amido.....	18
3.7. Métodos bioquímicos de análise.....	19
3.7.1. Extração e dosagem de lipídios e açúcares livres.....	19
3.7.2. Extração e dosagem de açúcares solúveis.....	19
3.7.3. Extração e dosagem de amido.....	20
3.7.4. Dosagens de açúcares.....	21
3.7.5. Extração e dosagem de proteínas totais.....	21
4. Resultados.....	23
4.1. Germinação.....	23
4.2. Massa de matéria fresca e Massa de matéria seca.....	26
4.3. Métodos citoquímicos.....	26
4.3.1. <i>Eugenia uniflora</i> - pitanga.....	28
4.3.1.1. Coloração com Azul de Toluidina a pH 4,0 (AT)...	28
4.3.1.2 Coloração com Xylidine Ponceau a pH 2,5 (XP)....	28
4.3.1.3. Método do PAS.....	31
4.3.2. <i>Campomanesia xanthocarpa</i> - guabiroba.....	31
4.3.2.1. Coloração com Azul de Toluidina pH 4,0 (AT).....	31

4.3.2.2 Coloração com Xylidine Ponceau pH 2,5 (XP).....	34
4.3.2.3. Método do PAS.....	34
4.3.2.4. Reação do Ferrocianeto Férrico.....	37
4.4. Quantidade de grãos de amido.....	37
4.5. Métodos bioquímicos de análise.....	41
4.6. Resultados comparativos entre as duas espécies.....	46
5. Discussão.....	51
5.1. Germinação.....	51
5.2. Citoquímica.....	55
5.3. Bioquímica.....	61
6. Conclusões.....	66
6. Referências Bibliográficas.....	68
Apêndices	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Histograma da germinação de sementes de <i>E. uniflora</i>	24
Figura 2. Histograma da germinação de sementes <i>C. xanthocarpa</i>	25
Figuras 3 e 4. Cortes transversais de cotilédones de sementes de <i>E. uniflora</i> corados pelo AT a pH 4,0.....	29
Figuras 5 e 6. Cortes transversais de cotilédones de sementes de <i>E. uniflora</i> corados pelo XP a pH 2,5.....	30
Figuras 7 e 8. Cortes transversais de cotilédones de sementes de <i>E. uniflora</i> corados pelo PAS.....	32
Figuras 9 e 10. Cortes transversais de cotilédones de sementes de <i>C. xanthocarpa</i> corados pelo AT a pH 4,0.....	33
Figuras 11 e 12. Cortes transversais de cotilédones de sementes de <i>C. xanthocarpa</i> corados pelo XP a pH 2,5.....	35
Figuras 13 e 14. Cortes transversais de cotilédones de sementes de <i>C. xanthocarpa</i> corados pelo PAS.....	36
Figuras 15 e 16. Cortes transversais de cotilédones de sementes de <i>C. xanthocarpa</i> corados com Ferrocianeto Férrico.....	38
Figuras 17 e 18. Cortes transversais de cotilédones de sementes de <i>C. xanthocarpa</i> corados com Ferrocianeto Férrico.....	39
Figura 19. Análise da variância da regressão polinomial para a quantidade de grãos de amido em células cotiledonares de <i>E. uniflora</i>	40
Figura 20. Análise da variância da regressão polinomial para o conteúdo de açúcares livres e açúcares solúveis em <i>E. uniflora</i>	44
Figura 21 e 22. Cortes transversais de cotilédones corados pelo Azul de toluidina a pH 4.0.....	49
Figuras 23 e 24. Cortes transversais de cotilédones corados pelo Reativo de Schiff sem pré-tratamento.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Determinação da massa de matéria fresca (Mf) e massa de matéria seca (Ms) de sementes de <i>C. xanthocarpa</i> e <i>E. uniflora</i>	27
Tabela 2. Determinação do conteúdo de açúcares livres, açúcares solúveis, amido e proteínas em sementes de <i>E. uniflora</i>	43
Tabela 3. Determinação do conteúdo de açúcares livres, açúcares solúveis, amido e proteínas em sementes de <i>C. xanthocarpa</i>	45
Tabela 4. Conteúdo de lipídios em sementes de <i>C. xanthocarpa</i>	47

RESUMO

No presente trabalho, foram utilizadas sementes de *Eugenia uniflora* (pitanga) e *Campomanesia xanthocarpa* (guabiroba), coletadas em matas nativas do município de Carazinho – RS, e armazenadas em vidros a 4°C. As sementes quiescentes foram colocadas para germinar e caracterizadas citoquímica e bioquimicamente quanto as suas principais reservas. A cada quinze dias foram realizados novos testes de germinação, com respectivo processamento do material para análises microscópicas e dosagens das reservas. Sementes de *E. uniflora* permaneceram viáveis durante todo o período analisado (105 dias), mantendo índices de germinação superiores a 70%. *C. xanthocarpa* apresentou-se viável apenas nos primeiros quinze dias, indicando característica fortemente recalcitrante. As duas espécies apresentaram-se com mais de 40% de umidade em seus frutos maduros. Para a pitanga elas têm massa 3 vezes maior do que para guabiroba e tem como principal reserva o amido (36%), seguido de proteínas (20%). Nesta última ocorre praticamente o inverso, com proteínas representando mais de 37% da matéria seca e quantidades consideráveis de carboidratos (18%). Os resultados indicaram ainda um elevado teor lipídico nas sementes de guabiroba. Em nível celular, as principais alterações observadas em guabiroba durante a perda de viabilidade foram devidas à fusão do material protéico e aumento do poder redutor do material fenólico presente nas células cotiledonares. Em pitanga, apesar de não ter havido perda de viabilidade, observou-se uma diminuição significativa dos grãos de amido e maior reatividade do material protéico ao longo do tempo de estocagem decorrente

de um aumento na disponibilidade de radicais amina. Verificou-se ainda um aumento significativo no conteúdo de açúcares livres e solúveis, provavelmente decorrente da hidrólise do amido presente nas células das sementes de pitanga. Em termos comparativos, além das características apontadas, foi observada uma maior disponibilidade de material pécico nas paredes celulares das sementes de guabiroba.

ABSTRACT

Seeds of *Eugenia uniflora* (pitanga) and *Campomanesia xanthocarpa* (guabiroba) were collected in native forest of district Carazinho – RS, and stored in glass at 4°C. Germination tests of quiescent seeds were carried out every 15 days. The viability of *E. uniflora* continued for the investigation period of 105 days, with germination index above 70%, while in *C. xanthocarpa* the viability was 15 days, characteristic of recalcitrant seeds. Moisture content of seeds was maintained around 40% in mature fruits. The main storage component of pitanga is starch (36%). Another important reserve is protein (20%), while guabiroba presents more than 37% of their fresh weight in proteins and considerable quantity of carbohydrates (18%). These seeds contain high lipid content. The cellular alterations of guabiroba during the loss of viability were the fusion of protein material and increase the reductibility of phenolic material present in cotyledon cells. Pitanga with continued viability, showed a significant reduction of starch grains and increase of protein reactivity during storage. An increase in free and soluble sugar was detected, as a result of the starch hydrolysis of pitanga cells. Wall cells of guabiroba seeds showed more disponibility of pectic material in pitanga.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das sementes como um órgão especializado para a nutrição, proteção e dispersão da próxima geração foi um importante caminho da evolução no mundo das plantas. Na sua organização geral, elas contêm um eixo embrionário acompanhado por material de reserva e são revestidas por uma testa (casca) que as protege e pode apresentar-se muito resistente ou apenas como uma camada superficial. A sua formação e crescimento ocorre concomitante com a frutificação (Mauseth, 1988).

Segundo Popinigis (1985), o eixo embrionário desenvolve-se durante a maturação da semente, até que seu crescimento cessa e o teor de umidade diminui, restando apenas uma baixa atividade metabólica, caracterizando o estado denominado quiescente. A germinação vem a ser o reinício do crescimento através da retomada do metabolismo e para que ela ocorra, o eixo embrionário e as estruturas de reserva devem estar vivos. Os passos desse processo dependem de muitos fatores fisiológicos, bioquímicos e de condições ambientais satisfatórias, como temperatura, luz, umidade e disponibilidade de água, para que sejam desencadeados todos os mecanismos de diferenciação.

Roberts (1972a) considera que a perda da viabilidade é uma mudança degenerativa a qual é irreversível e representa a morte da semente. Longevidade, é o período em que a semente se mantém viva, capaz de

germinar quando colocada em condições favoráveis e quando não houver algum tipo de dormência (Toledo & Marcos Filho, 1977). Espécies cujas sementes apresentam alta longevidade necessitam muitas vezes, de grandes intervalos de tempo para terem garantidas condições apropriadas de germinação.

Com o advento da agricultura surgiu a necessidade da estocagem de sementes para o plantio em larga escala e em situações climáticas adequadas. Isso gerou um grande desafio para o homem, que passou a ter a necessidade de garantir a viabilidade das sementes para o plantio, por períodos de tempo maiores do que os apresentados em seu ambiente natural (Begnami, 1991).

Algumas sementes germinam mesmo após longos períodos de estocagem. Essas sementes, classificadas como ortodoxas, resistem a baixos teores de umidade sem perder sua viabilidade, sendo que para espécies de clima temperado a viabilidade aumenta quando a umidade e a temperatura do ambiente de armazenamento diminuem (Roberts, 1972b). Sementes ortodoxas sofrem processo de secagem durante a sua maturação no fruto, sendo liberadas com 20% ou menos de água e podem sofrer posteriormente uma perda de água para valores de até 2 a 5% na sua estrutura e foram classificadas por Harrington (1972) como de grande longevidade. Outras, consideradas pelo mesmo autor como de curta longevidade, são classificadas como recalcitrantes e apresentam alto teor de umidade. Quando o teor de umidade no ambiente diminui abaixo de um nível crítico, essas sementes morrem. Elas são produzidas por dois tipos de plantas: as de ambiente aquático e que normalmente não secam e as de algumas plantas perenes que frutificam em ambientes relativamente úmidos (Valio & Ferreira, 1992).

Muitos trabalhos têm apontado comportamentos intermediários quanto à classificação das sementes em ortodoxas e recalcitrantes, mostrando a

existência de um gradiente de classificação entre os extremos anteriormente considerados como únicos (Farrant *et al.*, 1988).

Essa diferença entre as sementes pode ser considerada como resultado do processo de seleção natural, em concordância com as condições ambientais em que as espécies se desenvolveram. O ambiente no qual as sementes recalcitrantes foram selecionadas apresentava, provavelmente, condições para o desenvolvimento das plântulas durante todo o ano, fazendo com que as mesmas germinassem logo após a sua queda, facilitando com isso a concorrência com sementes de outras espécies (Barbedo & Marcos Filho, 1998). Em florestas tropicais é comumente observada uma germinação rápida e simultânea de sementes, logo após a sua dispersão. Essa seria uma maneira de fugir à predação e aos parasitas, embora, as plântulas também estejam sujeitas a situações que possam impedir o seu desenvolvimento tais como sombreamento, competição e predação dentre outros (Vásquez-Yanes & Orozco-Segovia, 1993).

Sementes consideradas ortodoxas passaram possivelmente, durante o seu processo de seleção, por períodos inadequados ao desenvolvimento das plantas. Foram então beneficiadas as sementes que germinavam quando as condições do meio fossem favoráveis. Assim, à espera do momento adequado, o baixo teor de água teria sido fundamental para evitar a deterioração das mesmas. (Barbedo & Marcos Filho, 1998). Esses autores mencionam ainda a importância da água na formação e maturação das sementes. A água participa na expansão e divisão celular e como veículo para a formação dos tecidos, permanecendo até o final do desenvolvimento com um alto teor no interior do órgão. Somente no final da maturação é que os dois tipos de comportamento, ortodoxo e recalcitrante são observados, baseados no teor de água das mesmas. Sementes ortodoxas têm uma rápida redução na quantidade de água enquanto que nas recalcitrantes, o teor de água

permanece elevado. Entretanto, inúmeras situações intermediárias podem ter levado a um gradiente de comportamento entre as ortodoxas propriamente ditas e as altamente recalcitrantes (Neves, 1994).

Harrington (1972), apresenta uma tabela de espécies com sementes consideradas recalcitrantes. Entre as citadas, estão duas espécies de Myrtaceae: *Eugenia uniflora* e *Myrciaria cauliflora*. Confirmando a inclusão nessa classificação, *M. cauliflora* apresenta frutos que apesar de caírem logo abaixo da árvore, raramente germinam (Valio & Ferreira, 1992). Sementes recalcitrantes perdem rapidamente a viabilidade após a sua separação dos frutos e experimentos com *Eugenia calycina* comprovam essa colocação. Após diferentes tipos de armazenamento por tempo variado e tratamentos com produtos anti-fungos, foram feitos testes de germinação com sementes da referida espécie. A conclusão foi que a perda de viabilidade e a diminuição da velocidade de germinação são aumentadas após alguns dias, mostrando que sementes que apresentam características como essas devem ter sua semeadura o mais rápido possível após a coleta (von Bülow *et al.*, 1994). Farrant *et al.* (1988), colocam que nesse tipo de sementes, logo após o seu desprendimento da planta, ocorrem mudanças subcelulares as quais são similares aquelas ocorridas durante o início da germinação. Essas modificações, continuam apenas por um curto prazo na ausência de água adicional.

A preocupação com o prolongamento da vida das sementes recalcitrantes vem sendo explicada em trabalhos de pesquisa. Seu armazenamento torna-se problemático devido ao alto teor de umidade, já que nessas condições os fungos constituem a maior causa de deterioração no processo de estocagem. Nthabiseng *et al.*, (1997) estudando sementes de *Avicenia marina*, considerada recalcitrante, conseguiram reduzir o ataque de fungos naquelas que, durante o armazenamento, foram cobertas com gel de

alginate de potássio. A germinação teve mais êxito nesse caso, comparada a taxa de germinação de sementes que não tiveram essa proteção.

A maioria dos estudos para caracterização das principais reservas de sementes, são feitos em espécies cultivadas, especialmente de cereais e leguminosas, que são das mais importantes fontes de alimento utilizadas pelo homem, apresentando como principais substâncias de reserva, proteínas, carboidratos e lipídios (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1989). A proporção dessa composição pode variar de espécie para espécie e até entre espécies de uma mesma família. Os carboidratos podem ser armazenados na forma de amido, em organelas chamadas amiloplastos. Bewley & Black (1982b) descrevem a molécula de amido, composta de dois tipos de polímeros de D-glicose: a amilose e a amilopectina. As proporções dos dois polímeros variam entre as sementes de diferentes espécies e podem variar mesmo dentro da mesma espécie. A amilose é um polímero linear formado por ligações glicosídicas α (1→4) e apresenta um peso molecular em torno de 60.000 Daltons e é considerado o menor dos dois componentes. A amilopectina é um polímero ramificado, composto também de unidades de glicose α (1→4), apresentando em geral 20 a 30 resíduos de glicose entre dois pontos de ramificação sendo que nesses locais, as ligações entre as unidades de glicose são do tipo α (1→6). É considerada uma grande molécula, com peso em torno de 1 milhão de Daltons (Annison & Topping, 1994). As propriedades funcionais do amido são decorrentes desses dois componentes e da organização dessas macromoléculas na sua estrutura granular.

Em leguminosas, o amido é uma forma de reserva bastante comum, normalmente depositada nas células dos cotilédones, podendo atingir mais de 50% da massa seca, como em *Pisum* e *Vicia faba* (Halmer, 1985). Seno *et al.* (1996), caracterizaram o material de reserva de sementes de três espécies de

leguminosas e confirmaram a predominância de amido como reserva principal, seguido de proteínas.

Em certas sementes, porém, a maior quantidade de carboidratos de reserva não é formada por amido, mas por outros polissacarídeos como mananos, galactanos e xiloglicanos. Os mananos são encontrados normalmente no endosperma de algumas espécies de *Palmae*, *Umbeliferae* e *Leguminosae*; galactomananos ocorrem em cotilédones, sendo muito abundantes no gênero *Lupinus*, enquanto que os xiloglicanos aparecem em grandes quantidades em cotilédones de sementes de leguminosas da família *Caesalpinaceae* (Meier & Reid, 1982).

As proteínas de reserva normalmente se encontram depositadas em organelas denominadas corpos protéicos e são classificadas em função da sua solubilidade. Em leguminosas, as globulinas representam a maior parcela das proteínas de reserva. A principal função destas proteínas é a de fornecer aminoácidos ou nitrogênio para as plântulas (Pernollet & Mossé, 1983). Albuminas são outro tipo de proteínas, principalmente enzimáticas, que ocorrem em sementes, sendo que as glutelinas e as prolaminas também são comuns. A quantidade e o tipo de proteínas varia entre os grupos de plantas, como por exemplo, a ocorrência de prolaminas em gramíneas, não sendo tão comuns em outras sementes, como no caso das sementes de *Magnoliopsidas*, mais especificamente as leguminosas, que apresentam um predomínio de globulinas em suas reservas (Bewley & Black, 1982b).

Os lipídios constituem o terceiro composto de reserva encontrado em sementes, como as de *Arachis*, *Helianthus* e *Glycine*. Eles estão normalmente presentes em forma de triacilglicerídios ou lipídios neutros que constituem a maior parte das reservas da semente. Outros tipos de lipídios, que podem ter função estrutural ou metabólica nas membranas celulares, seriam os

fosfolipídios, os glicolipídios e os esteróides (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1989; Bewley & Black, 1982a; Slabas *et al.*, 1988).

A morfologia de sementes de espécies nativas ainda é pouco estudada, tornando restrito o conhecimento sobre a germinação das mesmas, tendo em vista que uma maior preocupação está voltada para espécies de interesse econômico, principalmente alimentar. Entretanto, é necessário que outros problemas sejam evidenciados, como o estudo de espécies arbóreas por exemplo, não só devido a urgência de recuperação de áreas devastadas, mas também para se conhecer a estratégia de evolução e adaptação de sementes dessas espécies, desconhecidas até o momento, e que sirvam para elucidar possíveis problemas na dinâmica de populações vegetais.

No estado do Rio Grande do Sul, segundo Reitz *et al.* (1988) existem oito regiões fitogeográficas, todas elas com espécies arbóreas representadas. Mesmo as regiões de Campo têm matas ciliares que abrigam árvores das mais diversas famílias. A área do Planalto no Rio Grande do Sul, caracteriza-se como região fitogeográfica do tipo Floresta do Planalto com presença de Araucária. Está representada pela mistura de pinheiros com elementos da floresta do Alto Uruguai e contato com vegetação de campo. Os pinheiros ocupam o extrato superior e têm abaixo um denso subosque constituído de Lauráceas, Mirtáceas, Aquifoliáceas, Sapindáceas e outras. Klein (1984) nomeou essa formação como Floresta Ombrófila Mista.

As mirtáceas desempenham papel relevante na fitofisionomia dos diversos tipos florestais do Rio Grande do Sul. Dos 24 gêneros representados na flora brasileira, 19 contam como espécies nativas desse estado, dentre eles *Campomanesia* e *Eugenia* (Marchiori & Sobral, 1997). A maioria das espécies dessa família tem seu período de florescimento e frutificação entre setembro e maio, podendo ocorrer duas frutificações no ano em alguns casos (Lorenzi, 1992). Seus frutos tem uma a duas sementes, podendo apresentar mais que

duas. A textura do tegumento das sementes também varia de membranácea e coriácea até muito firme, polida e brilhante (Barroso *et al.*, 1991).

A família Myrtaceae consiste, segundo Cronquist (1981), de aproximadamente 150 gêneros e 3600 espécies. Encontrada em regiões tropicais e subtropicais em todos os continentes, é também desenvolvida na região temperada da Austrália. Destacam-se, na família, alguns gêneros numerosos como *Eucalyptus*, *Eugenia*, *Myrcia*, *Syzygium* e *Psidium*. Compreende duas subfamílias: Myrtoideae e Leptospermoideae. Segundo Marchiori & Sobral (1997), as Mirtoídeas encontram-se dispersas em todos os continentes, com exceção da Antártida. As Leptospermoídeas predominam na Australásia e têm no *Eucalyptus* seu representante mais conhecido. Há uma fácil separação das duas subfamílias baseada em caracteres morfológicos, como por exemplo o tipo de fruto, pois, Myrtoideae apresenta frutos carnosos e sementes relativamente grandes e Leptospermoideae têm frutos secos e sementes muito pequenas. Apesar do grande número de espécies nativas e da abundância das mesmas na vegetação brasileira, as Mirtoídeas geralmente não produzem madeiras valiosas, restringindo-se ao fornecimento de lenha, à utilização em pequenas peças ou objetos e outras formas de uso local. A essa subfamília, por outro lado, pertencem numerosas espécies frutíferas ou produtoras de especiarias. Barroso *et al.* (1991) classifica as mirtáceas com representantes lenhosos, arbustivos ou arbóreos. Plantas que têm óleos essenciais característicos, utilizados em perfumaria e como medicinais. Segundo Sanchotene (1989), as flores são na maioria melíferas e algumas espécies, são recomendadas como ornamentais por apresentarem porte ideal para arborização urbana e recuperação de bosques, tentando assim manter espécies adaptadas às condições regionais.

Sanchotene (1989), baseado em trabalhos sobre a avifauna relacionou famílias, dentre elas Myrtaceae, as quais com suas espécies frutíferas, integram através de seus frutos e sementes o regime alimentar de algumas aves. Ressaltou nessa família, espécies como *Campomanesia xanthocarpa*, *Eugenia uniflora*, *Eugenia involucrata*, *Myrcianthes pungens* e *Psidium cattleianum*, componentes da alimentação de sanhaçús, bem-te-vis, tiribas, sabiás, papagaios e outros. Algumas participam da alimentação de peixes frugívoros, pois essas plantas compõem matas ciliares. Além da utilidade na alimentação da fauna silvestre, os frutos são empregados também na alimentação humana, bem como na confecção de sucos e geléias para comercialização.

Eugenia uniflora, conhecida popularmente como pitanga, é freqüente em solos úmidos, arenosos e com boa drenagem, nas matas de galeria, capões e margens de cursos d'água. Desenvolve-se bem nas diferentes regiões climáticas do Rio Grande do Sul, suportando temperaturas inferiores a 0°C sendo que as matas do Planalto têm nessa espécie um bom representante (Sanchotene,1989). Longhi (1995), descreve as plantas dessa espécie como árvores de porte médio com 3 a 12 metros de altura. As flores são brancas, vistosas e geralmente polinizadas por abelhas. Os frutos do tipo baga, quando maduros adquirem a cor vermelha até quase preta e são muito apreciados principalmente pelos pássaros. Medem em torno de 1cm, são globosos, com sementes grandes geralmente uma por baga, com embrião esférico e homogêneo. A dispersão das mesmas é feita por gravidade e por animais específicos, como algumas aves e mamíferos. O mesmo autor coloca ainda que essa espécie é indicada para ser plantada para alimentação de animais e avifauna silvestre. Pode ser utilizada como planta ornamental em praças, jardins e residências para atrair pássaros e é indicada para o

reflorestamento nas margens dos rios e reservatórios de hidrelétricas, com o objetivo de minimizar a erosão.

C. xanthocarpa, popularmente chamada guabiroba, apresenta também vasta distribuição por todas as regiões do estado do Rio Grande do Sul. A região do Planalto e zonas dos Pinhais, mostram essa espécie como um dos principais representantes. É característica de solos úmidos e compactos de planícies, várzeas e solos de aclive suave. Compreende árvores que variam de 15 a 25m de altura, com flores brancas muito vistosas. As bagas globosas amarelas ou alaranjadas quando maduras apresentam inúmeras sementes cilíndricas e achatadas, medindo cerca de 5mm (Longhi, 1995). Vários estudos descreveram as sementes do gênero *Campomanesia*, dentre eles Berg (1855-1856, 1857-1859), citado por Landrum, 1982. Nesse estudo, o aspecto da testa da semente é descrito como membranácea verrucosa- glandulosa, o que tem sido indicado em trabalhos recentes como uma importante característica taxonômica, para definir o gênero na família.

Apesar da importância econômica das mirtáceas, e em particular da pitanga e guabiroba, como produtoras de frutos para o consumo humano *in natura* ou após processamento, sua presença marcante nas matas do Rio Grande do Sul (muitas vezes chamadas matas de mirtáceas), faz com que sejam extremamente importantes também para o reflorestamento e recuperação de áreas devastadas dessa região do estado. Para isso há necessidade de um aprofundamento nos estudos que abordem a longevidade e germinação de suas sementes, bem como suas características celulares e conteúdo bioquímico, como se pretendeu no presente trabalho.

2. OBJETIVOS

- Analisar morfológicamente as sementes de *E. uniflora* e *C. xanthocarpa*, relacionando aspectos citológicos com a longevidade das mesmas;
- Caracterizar a partir de diferentes métodos citoquímicos, o conteúdo das células cotiledonares das referidas espécies;
- Dosar, através de extrações bioquímicas, os componentes de reserva das células cotiledonares;
- Verificar as alterações morfofisiológicas ao longo da perda de viabilidade dessas sementes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Foram utilizadas sementes de *E. uniflora* (pitanga) e *C. xanthocarpa* (guabiroba), espécies nativas pertencentes a família Myrtaceae.

As análises experimentais foram realizadas no Laboratório de Sementes da Faculdade de Agronomia e Laboratório de Confecção de Lâminas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo e Departamento de Biologia Celular - IB - UNICAMP.

3.2. Coleta

A coleta das sementes foi feita no período de frutificação das espécies durante o mês de novembro de 1997, em matas nativas do município de Carazinho, na região do Planalto Médio do Rio Grande do Sul. Os frutos foram colhidos quando maduros diretamente da árvore.

Imediatamente após a coleta, as sementes foram retiradas dos frutos, lavadas em água corrente e secas superficialmente ao ar. O armazenamento foi feito em frascos de vidro transparente com tampa e mantidos em refrigerador ($\sim 4^{\circ}\text{C}$) (Ceccon, 1997)..

3.3. Testes de germinação

Os testes de germinação, foram realizados com dez repetições de vinte sementes cada, em caixa de plástico tipo Gerbox, contendo papel de filtro umedecido com solução de Micostatin (200 UI/ml). As sementes foram colocadas em germinador à temperatura de 25°C e luz constante. O acompanhamento foi diário, sendo registrado o número de sementes germinadas, as quais foram assim consideradas após apresentarem a emergência da radícula. A observação foi finalizada após sete dias sem ocorrência de germinação.

Foram realizados testes de germinação a partir do dia da coleta (t_0) e a cada 15 dias até a perda da viabilidade ou término do estoque de sementes (t_{15} , t_{30} , ..., t_{105}).

3.4. Determinação da massa de matéria fresca e massa de matéria seca

Para a determinação da massa de matéria fresca, foram separadas 10 repetições com 5 sementes limpas (retiradas dos frutos e lavadas em água corrente), e pesadas em balança analítica, com quatro casas decimais. A seguir, as amostras devidamente identificadas, foram levadas à estufa a 80°C, por 48 horas. A determinação da massa de matéria seca, ocorreu através da pesagem das repetições depois do tempo de permanência na estufa.

O teor de umidade das espécies foi calculado a partir da fórmula:

$$((M_f - M_s) / M_f) \times 100$$

onde M_f é o valor da massa de matéria fresca e M_s é o valor da massa de matéria seca (Begnami, 1991),.

3.5. Métodos citoquímicos de análise

3.5.1. Fixação

Foi realizada nos materiais em t_0 e em diferentes intervalos de tempo após a coleta, sendo os principais, aqueles utilizados para os testes de germinação (t_{15} , t_{30} , etc.) e ainda, em tempos intermediários a esses (t_7 , t_{22} , etc.).

Três amostras de cada tempo utilizado, contendo três sementes cada, foram colocadas nos seguintes fixadores (Kiernan, 1981):

- a) etanol absoluto por 4 horas;
- b) solução de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0, por 48 h a 4°C;
- c) solução de ácido crômico a 1% e formaldeído 8% por 24 h a 4°C e um mínimo de 14 dias à temperatura ambiente.

3.5.2. Processamento pós-fixação

Após o tempo de fixação em etanol absoluto as sementes passaram por novo banho de 15 min no mesmo álcool e, 15 a 30 min em xilol , à temperatura ambiente. A inclusão das mesmas foi feita em parafina (95%) e cera de abelha (5%) em estufa, a 60°C por 16 h, seguida de dois outros banhos da mesma mistura, de duas horas cada e emblocamento.

Completado o tempo de fixação em solução de paraformaldeído/ glutaraldeído, ocorreram duas lavagens (2h cada), em solução tampão fosfato (pH 7,0) 0,1M. Em seguida, as sementes foram desidratadas pelo etanol em ordem crescente de 70% até 100% de concentração, durante 60 minutos cada. A partir desse estágio, essa técnica de fixação seguiu os mesmos passos da fixação em etanol, até chegar à formação dos blocos de parafina. A permanência em álcool 70%, em geladeira, por até dez dias, foi adotada algumas vezes como alternativa.

A solução fixadora de ácido crômico e formaldeído foi removida com 4 banhos de água destilada num total de 60 min, até a água ficar límpida. A

seguir, o material foi desidratado em banhos de etanol com concentrações crescentes (70% a 100%) e seguindo-se os mesmos passos apresentados nas técnicas de fixação acima descritas.

A partir de 45 dias depois da coleta, as sementes após passarem pelo xilol, foram imersas em óleo de cedro, para facilitar a confecção dos cortes. A permanência nesse óleo durou 20 a 30 dias e sua remoção foi feita através de quatro banhos de xilol de 5 min cada. Após esses banhos, os materiais foram colocados na solução de parafina, seguindo-se os demais passos para o emblocamento como descrito anteriormente (Cortelazzo, 1992).

Os materiais assim processados foram seccionados em micrótomo em cortes longitudinais ou transversais com 8 μm de espessura.

As lâminas foram então desparafinizadas utilizando-se xilol por 30 min., álcool-xilol 1:1 (v/v) por 30 min.; metanol-clorofórmio 1/1 (v/v) por 2 h., e hidratação em álcool etílico em série decrescente de concentração (de 100% a 70%), seguida de lavagem em água destilada (Johansen, 1940).

3.5.3. Colorações

3.5.3.1. Azul de Toluidina a pH 4,0 (AT)

O Azul de Toluidina é um corante usado para evidenciar grupos aniônicos totais.

A coloração pelo AT em tampão McIlvaine a pH 4, ocorreu durante 15min à temperatura ambiente, seguindo-se três banhos rápidos em água

destilada, secagem ao ar, diafanização em xilol durante 10 min e montagem em Entellan (Vidal, 1977).

3.5.3.2. Xylidine Ponceau a pH 2,5 (XP)

Esse corante é usado para detecção de grupos catiônicos totais.

A solução de XP foi preparada a 0,1% em ácido acético glacial a 3%, pH 2,5. No presente trabalho a coloração foi feita durante 15 min à temperatura ambiente, seguindo-se lavagem em ácido acético 3% durante 30 min, água destilada (2 min), desidratação em etanol 95% e 100% (2 min cada), diafanização em xilol durante 10 min e montagem em Entellan (Cortelazzo & Vidal, 1991).

3.5.3.3. Método do PAS

Esse método é utilizado para a detecção de polissacarídeos e glicoproteínas. No presente trabalho, foi utilizado com o objetivo de evidenciar amido e polissacarídeos de parede celular.

Os cortes foram oxidados com ácido periódico 0,5% durante 9 min, lavados em água destilada e cobertos com reativo de Schiff durante 30 min, a temperatura ambiente e no escuro. A seguir, foram lavados em água sulfurosa (3 banhos de 3 min cada), desidratados em etanol 95% e 100%, diafanizados em xilol e montados em Entellan (Cortelazzo *et al.*, 1983).

3.5.3.4. Ferrocianeto Férrico

O ferrocianeto férrico evidencia material redutor, através de reação cujo produto é o Azul da Prússia.

Os cortes foram tratados por 10 min em solução corante preparada com 10 ml de solução de ferricianeto de potássio 1% e 15 ml de solução de cloreto férrico em água destilada. A seguir, foram lavados em ácido acético 1%, imersos em água, desidratados em etanol a 95% e 100% (2 min cada), diafanizados em xilol durante 10 min e montados em Entellan (Seno *et al.*, 1996).

3.6. Grãos de amido

Os materiais de *E. uniflora* referentes ao dia da coleta (t0), t22, t52, t75 e 105 dias (t105) após a coleta submetidos ao método do AT a pH 4,0, foram utilizados para contagem do número de grãos de amido por célula. A contagem foi feita em 250 células escolhidas em campos aleatórios de diferentes cortes obtidos para todos os tempos acima indicados.

Os valores obtidos foram submetidos a análise da variância (Zonta & Machado - SANEST – software estatístico de domínio público).

3.7. Métodos bioquímicos de análise

Durante o tempo de ocorrência dos testes de germinação, amostras de 100 gramas cada, envolvidas em papel alumínio, foram devidamente identificadas e armazenadas em freezer. A primeira amostra foi acondicionada no dia da coleta e as demais foram retiradas do frasco de armazenamento a 4°C. As extrações ocorreram a partir de sementes moídas (farinha), procedentes das amostras armazenadas. Foram feitas extrações de lipídios, carboidratos e proteínas. Para *C. xanthocarpa*, foram utilizadas amostras do dia da coleta e do término da viabilidade da mesma (60 dias). Para *E. uniflora*, foram feitas análises em sementes recém coletadas, sementes com 60 (t60) e 105 dias (t105) a partir da coleta.

3.7.1. Extração e dosagem de lipídios e açúcares livres

O processo de extração foi iniciado a partir do material resultante da moagem das sementes. Para cada tempo foram utilizadas três repetições, cada uma com 0,1g de material moído. A cada repetição, foram adicionados 5ml de uma mistura de metanol, clorofórmio e água -MCW- (12:5:3 v/v/v), para extrair lipídios e açúcares livres. Após a homogeneização com Polytron, procedeu-se a centrifugação por 10 min a 4.000 rpm, em centrífuga de mesa Excelsa 3. Foram realizadas centrifugações até obtenção de um sobrenadante límpido (três vezes para guabiroba e duas para pitanga).

Após cada centrifugação os precipitados foram ressuspensos em 5ml de MCW. Os sobrenadantes tiveram seus volumes medidos e registrados.

Foram a seguir colocados em funil de separação por 48 horas. Para cada quatro volumes de sobrenadante acrescentou-se um volume de metanol e 1,5 volumes de água destilada. A fração inferior do funil foi coletada e, após a evaporação, pesada em balança semi-analítica para a determinação gravimétrica de lipídios. A fração superior, foi recuperada e utilizada para as dosagens de açúcares livres conforme descrito no ítem 3.7.4.

3.7.2. Extração e dosagem de açúcares solúveis

O precipitado (fração insolúvel), restante da extração com MCW, foi ressuspendido em 5ml de Etanol 10%, com o objetivo de extrair açúcares solúveis em água. Após a centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente, o sobrenadante foi mantido a 4°C para posterior dosagem, conforme especificado no ítem 3.7.4.

3.7.3. Extração e dosagem de amido

O precipitado obtido após a centrifugação com etanol para cada uma das espécies e tempos analisados, teve a adição de 5ml de Ácido Perclórico 30% (PCA), segundo método de McCreedy *et al.* (1950). Esse conteúdo foi deixado durante 16h a 4°C e, em seguida, submetido a duas centrifugações de 10min cada, a 4.000rpm. O sobrenadante teve o volume medido e foi armazenado em geladeira para posterior dosagem, conforme descrito em 3.7.4.

3.7.4. Dosagens de açúcares

As dosagens de açúcares foram realizadas utilizando-se o reagente de Antrona, obtido a partir de 200mg de antrona em 100ml de ácido sulfúrico a 95% (McCready *et al.*, 1950). Alíquotas de 1ml de cada extrato foram acrescidas de 2ml do reagente em tubos de ensaio, agitadas vigorosamente, mantidas a 100°C por 5min e resfriadas em água, segundo Scott & Melvin (1953).

As leituras de todas as amostras foram feitas em espectrofotômetro, a 620 nm. Quando necessário, utilizou-se água destilada para as diluições. Os cálculos para as dosagens, foram feitos a partir da reta padrão obtida de soluções com 10, 30, 50 e 70 µg de glicose por ml. Para o cálculo da quantidade de amido, os valores obtidos foram multiplicados pelo fator 0,9 (McCready *et al.*, 1950).

3.7.5. Extração e dosagem de proteínas totais

Para a obtenção do extrato protéico total, foi utilizado 0,1g de sementes moídas (3 repetições cada, das mesmas amostras utilizadas para as extrações anteriores), colocadas em MCW, homogeneizadas e colocadas em repouso. Após três horas foram feitas três centrifugações de 10 min a 4.000 rpm, com intervalo de duas horas entre as mesmas.

Os precipitados obtidos foram ressuspensos em 5 ml de NaOH 0,1 N, permanecendo por 16h. Após esse tempo, foram feitas quatro centrifugações a 4.000 rpm durante 15 min cada para ambas as espécies, nas mesmas condições.

As dosagens do material protéico foram realizadas segundo o método do Coomassie Blue (Bradford, 1976). A solução foi preparada com 20mg de Coomassie Brilliant Blue G- 250 (Sigma - B-1131) em 10 ml de etanol 95%. A esta mistura, foram acrescentados 20 ml de ácido ortofosfórico a 85%, completando-se o volume com água destilada para 200 ml.

Os cálculos para as dosagens foram feitos utilizando-se a reta padrão obtida a partir de soluções com 10, 30 e 50 $\mu\text{g/ml}$ de soro albumina bovina (BSA). As alíquotas obedeceram a distribuição de 100 μl da amostra e 1000 μl de solução corante nos tubos que, após agitação, foram lidos a 595nm em espectrofotômetro.

3.7.6. Análise estatística

Foi aplicada a análise da variância para as médias obtidas a partir das extrações bioquímicas de açúcares livres, açúcares solúveis, amido e proteínas encontrados nas duas espécies. Para as médias do conteúdo de açúcares livres e solúveis em *E. uniflora*, foi utilizada a análise da variância da regressão polinomial (SANEST - software estatístico de domínio público).

4. RESULTADOS

4.1. Germinação

Os dados da germinação das sementes de *E. uniflora* e *C. xanthocarpa*, foram transformados em valor angular correspondente ao arcoseno da raiz quadrada da porcentagem (Apêndice 1 e 2).

Na figura 1, estão representados os resultados da germinação de sementes de *E. uniflora*. A germinação inicial foi de 88% e se manteve praticamente inalterada durante todo o período do experimento. Em t0, a germinação iniciou 8 dias após o início da embebição, se prolongando até o 35º dia. Esses valores foram aumentando e, com 105 dias (t105) de estocagem, a primeira semente germinou 18 dias após o início da embebição e a última, após 51 dias.

Sementes de *C. xanthocarpa* apresentaram uma porcentagem inicial de germinação de 89%. Após 15 dias (t15), esse valor decresceu para 33% e aos 30 dias (t30), foi de apenas 2% e após essa data, a perda da viabilidade foi total (Fig. 2). Em termos de início da germinação, em t0 ocorreu no 8º dia após a embebição, estendendo-se até o 17º dia. Em t15, o início se deu no 9º dia e o término aos 23 dias após a embebição. Em t30, quando apenas 4 sementes germinaram, esses valores foram obtidos no 14º e 24º dia. Em t45 e t60 as sementes não apresentaram germinação.

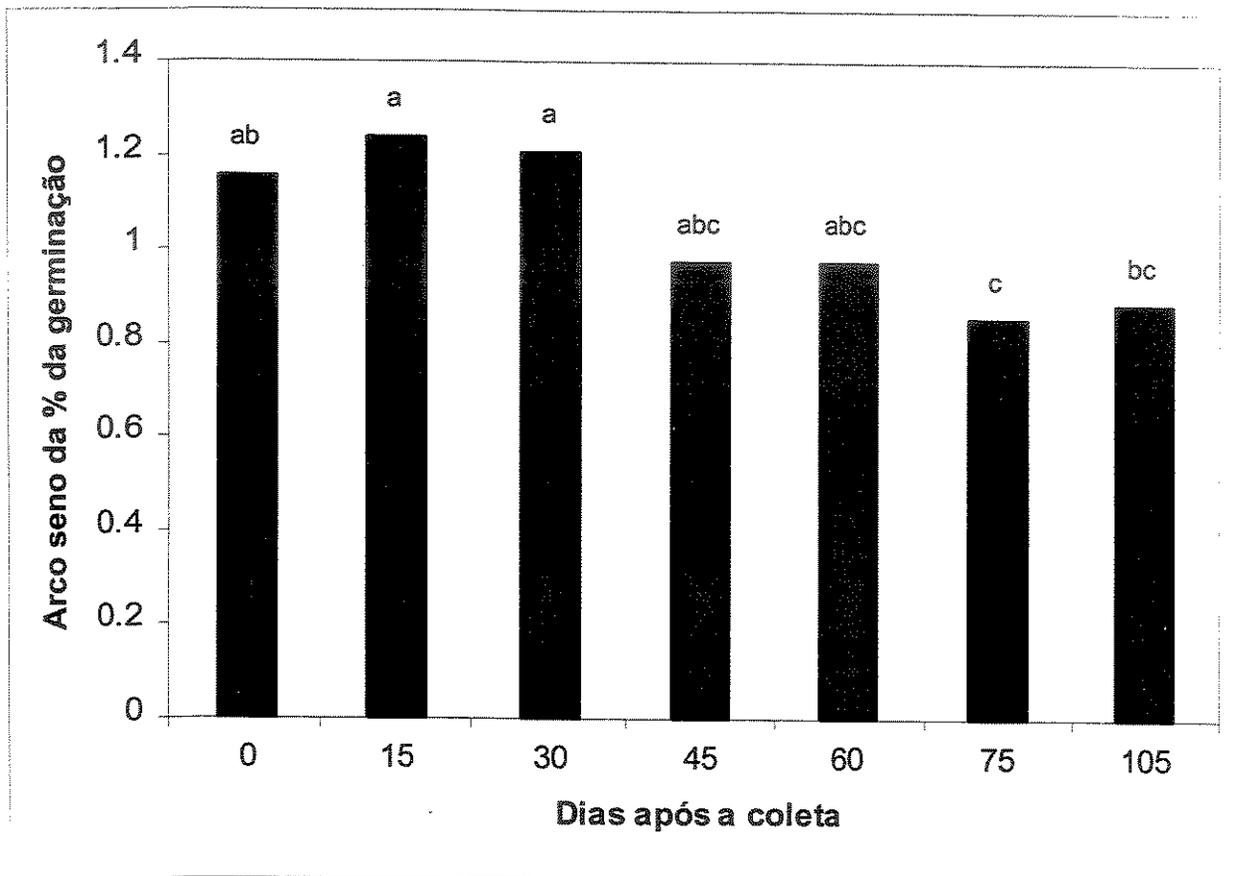


Figura 1. Porcentagem média cumulativa da germinação (valor angular) de sementes de *E. uniflora*, na luz, a 25°C.

Cada ponto representa a média de 10 repetições. As comparações médias foram feitas através do cálculo da DMS 5% (Tukey).

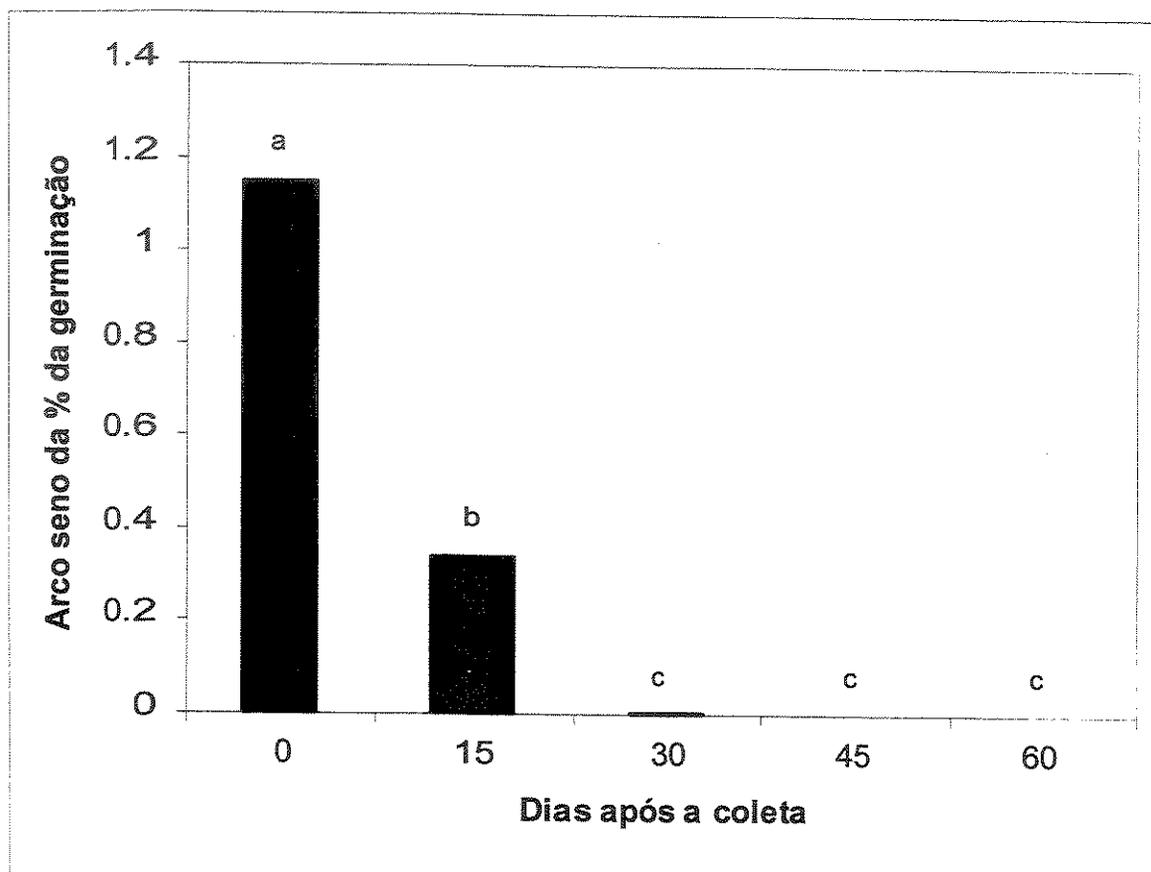


Figura 2. Porcentagem média cumulativa da germinação (valor angular) de sementes de *C. xanthocarpa*, na luz, a 25°C.

Cada ponto representa a média de 10 repetições. As comparações médias foram feitas através do cálculo de DMS 5% (Tukey).

4.2. Massa de matéria fresca e massa de matéria seca

As quantidades de massa de matéria fresca (Mf) e massa de matéria seca (Ms) das sementes recém coletadas, são encontradas na Tabela 1.

E. uniflora apresentou sementes quiescentes com uma massa matéria fresca de 217 mg. A massa de matéria seca foi de 117 mg e o teor de umidade de 46,2 %.

Sementes quiescentes de *C. xanthocarpa*, apresentaram uma massa de matéria fresca de 68 mg e a massa de matéria seca de 39 mg por semente. O teor de umidade foi de 42,3 %.

Os resultados revelaram que as sementes de *E. uniflora* tem uma massa fresca ou seca, cerca de três vezes maior do que *C. xanthocarpa* e que ambas apresentaram uma umidade semelhante quando colhidas.

4.3. Métodos citoquímicos

Foram analisadas células cotiledonares de sementes de *E. uniflora* e *C. xanthocarpa*.

Os resultados serão apresentados por espécie e, para cada uma, os métodos de coloração utilizados.

Tabela 1 – Determinação da massa de matéria fresca (Mf) e massa de matéria seca (Ms) de sementes de *C. xanthocarpa*. e *E. uniflora*.

Espécie	Mf (mg)	Ms (mg)	Umidade (%)
<i>C. xanthocarpa</i>	68 ± 8	39 ± 5	42,3 ± 3,2
<i>E. uniflora</i>	217 ± 37	117 ± 20	46,2 ± 1,0

Obs.: Os dados representam a média de 10 repetições ± desvio padrão.

4.3.1. *Eugenia uniflora* – pitanga

A reserva mais abundante encontrada nas sementes de pitanga correspondeu a carboidratos.

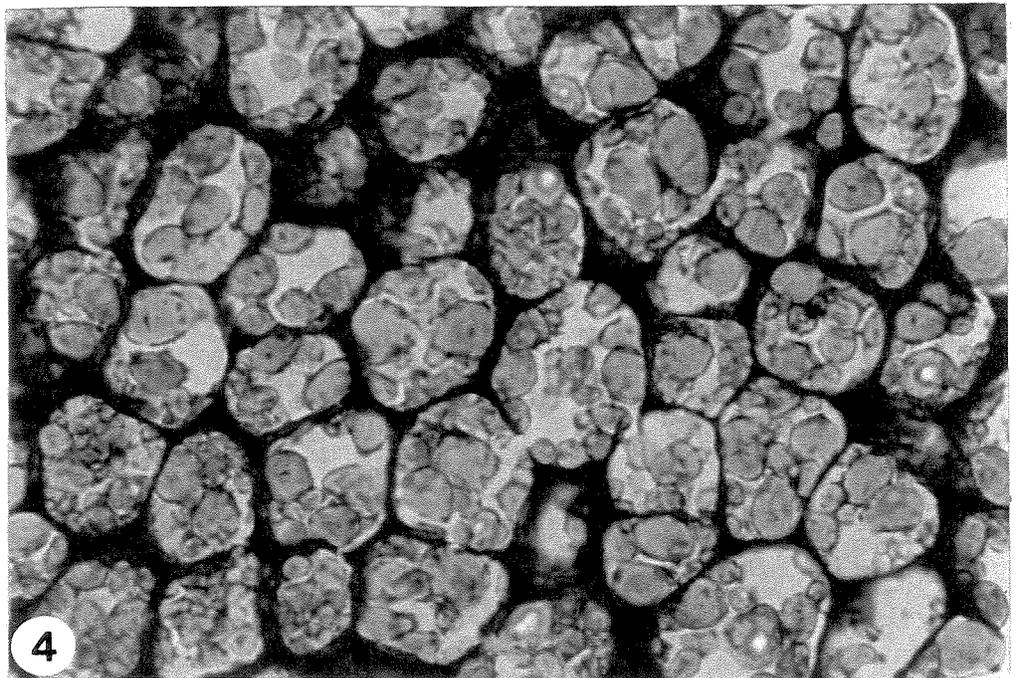
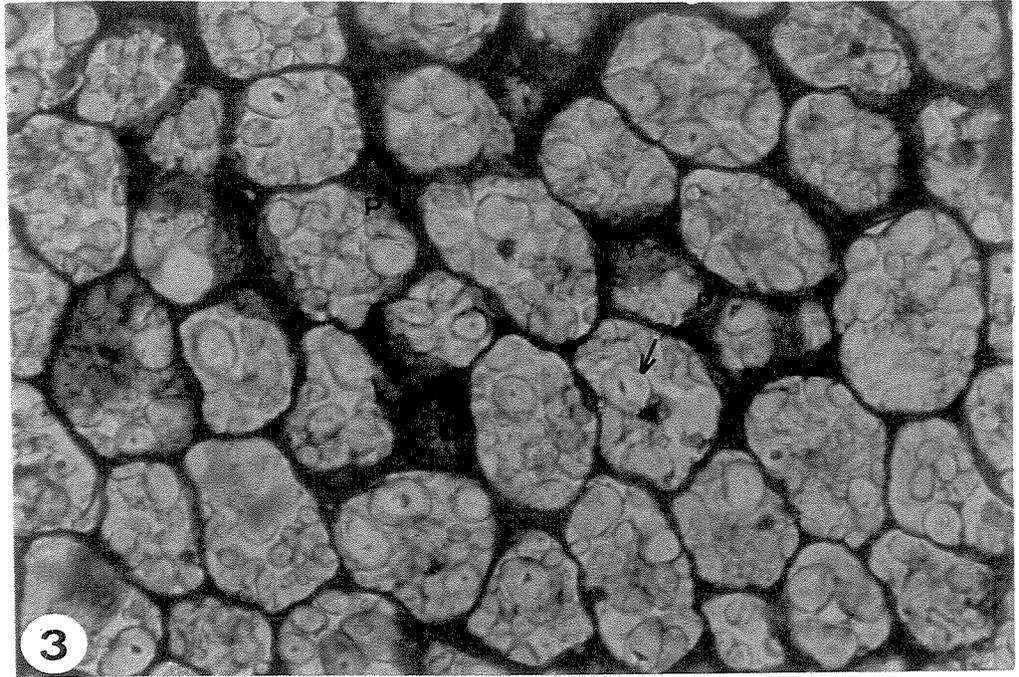
4.3.1.1. Coloração com Azul de Toluidina a pH 4,0 (AT)

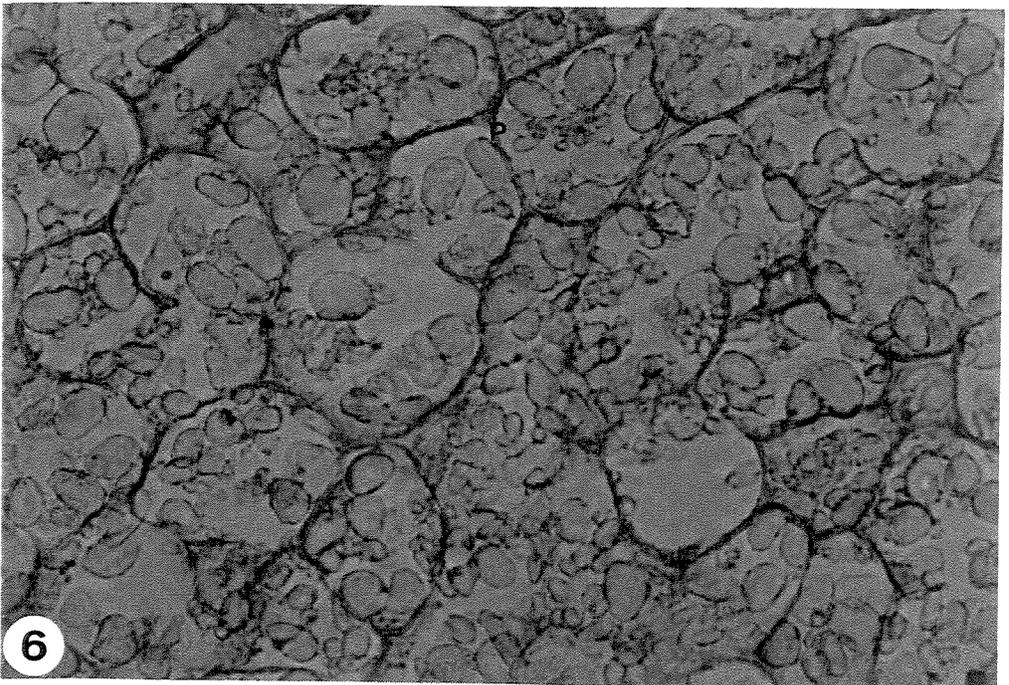
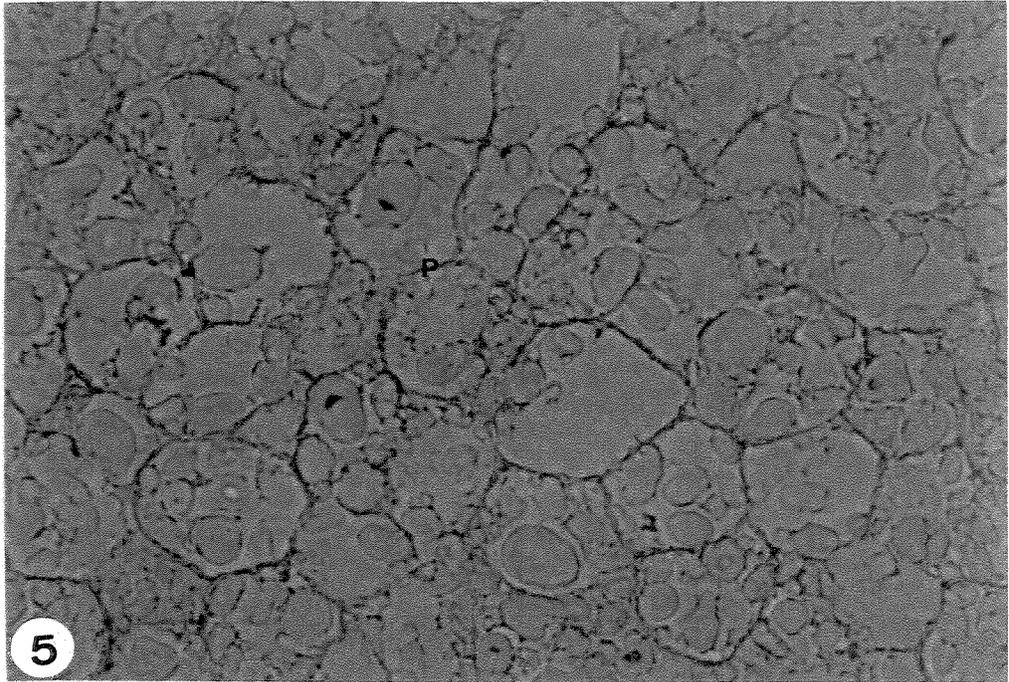
Os resultados de análises em *E. uniflora*, mostraram poucas alterações entre o material de sementes recém coletadas e após 105 dias, ainda viáveis. As paredes celulares apresentaram coloração roxa e o conteúdo celular evidenciou corpúsculos incolores em grande quantidade (Fig. 3) os quais, após 105 dias, aparentaram redução no seu número (Fig. 4).

4.3.1.2. Coloração com Xylidine Ponceau a pH 2,5 (XP)

Sementes quiescentes de *E. uniflora*, em presença de XP, apresentaram, corpúsculos citoplasmáticos sem coloração que também não haviam se corado com azul de toluidina (Fig. 5).

O material ainda viável (105 dias) revelou, como no material quiescente, pouca quantidade de proteínas. Entretanto, a resposta ao método foi maior, principalmente nas paredes celulares (Fig.6).





4.3.1.3. Método do PAS

Sementes de *E. uniflora* revelaram uma grande quantidade de corpúsculos corados, tanto no material recém coletado (Fig.7) quanto naquele com 105 dias. Nesse estágio mostraram-se apenas mais compactados (Fig.8).

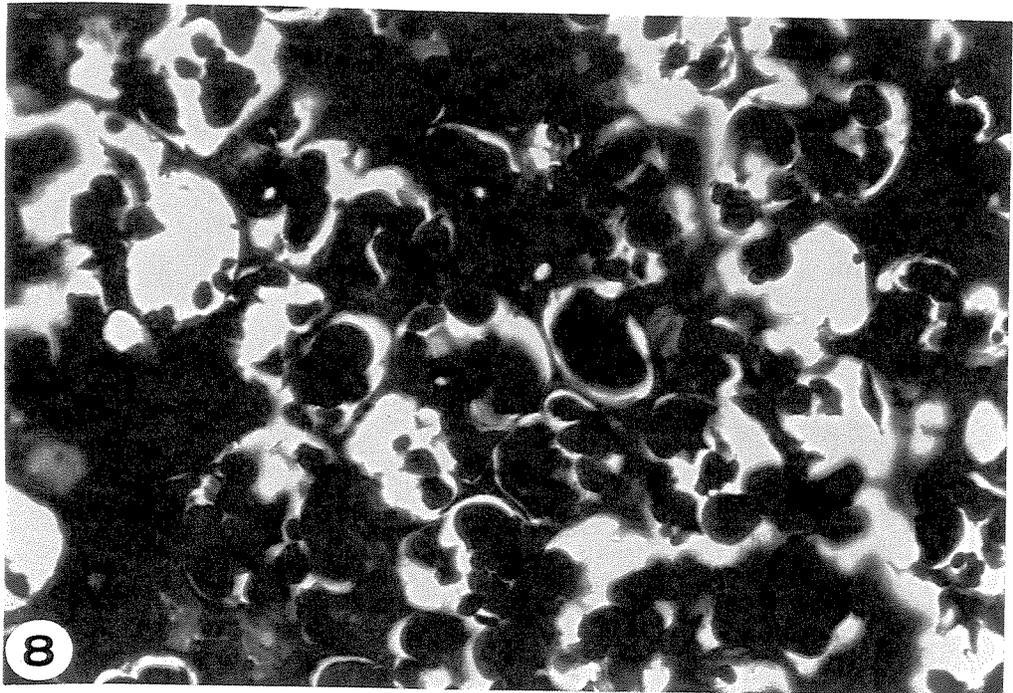
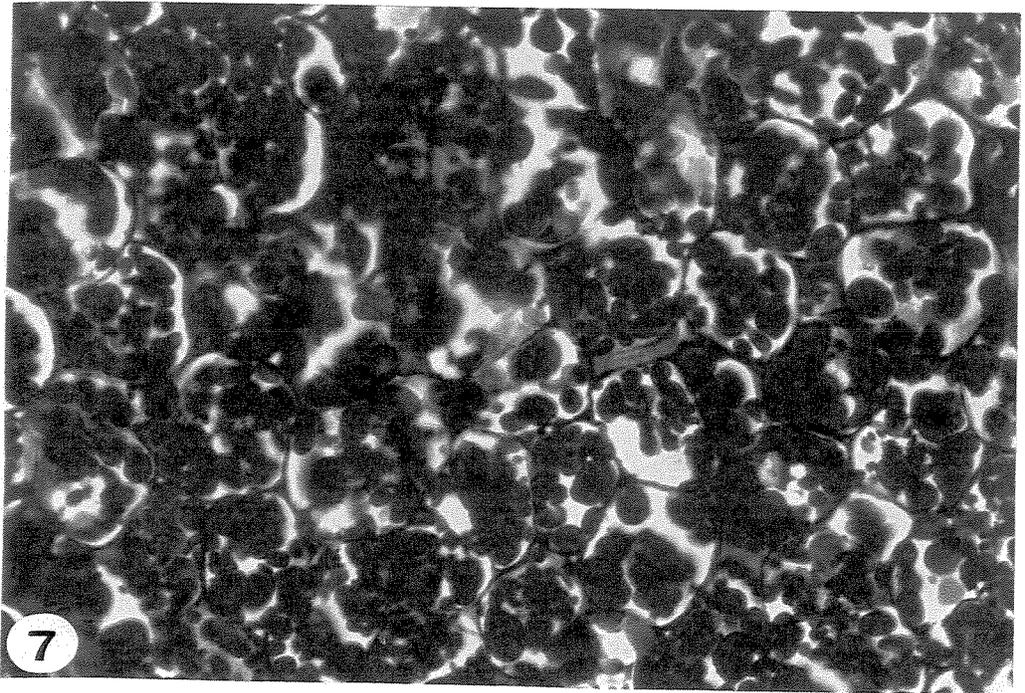
4.3.2. *C. xanthocarpa* – guabiroba

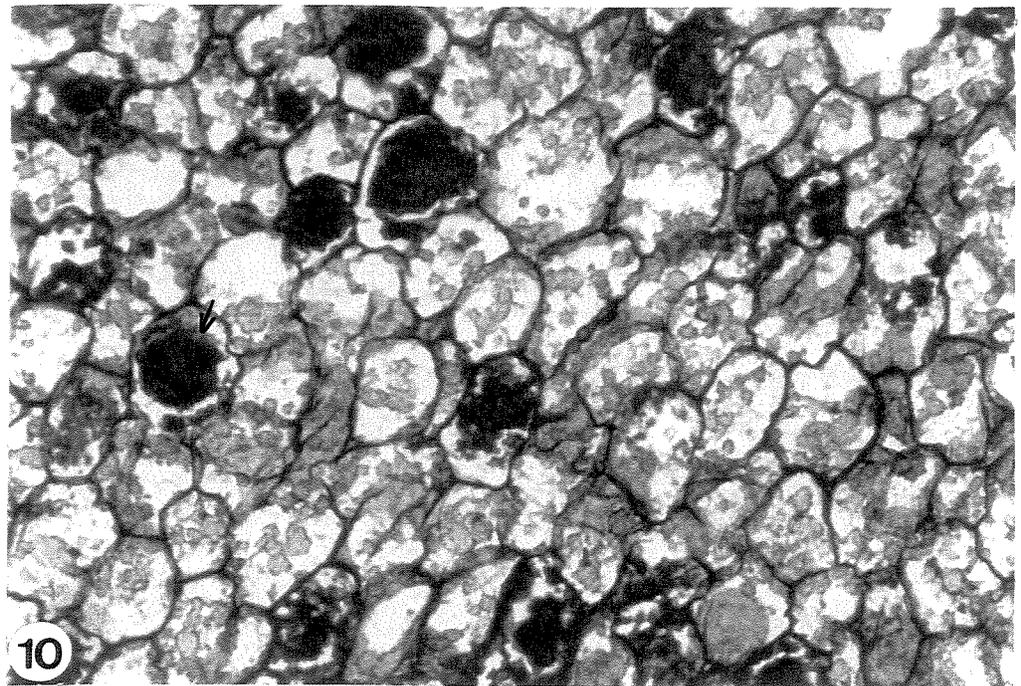
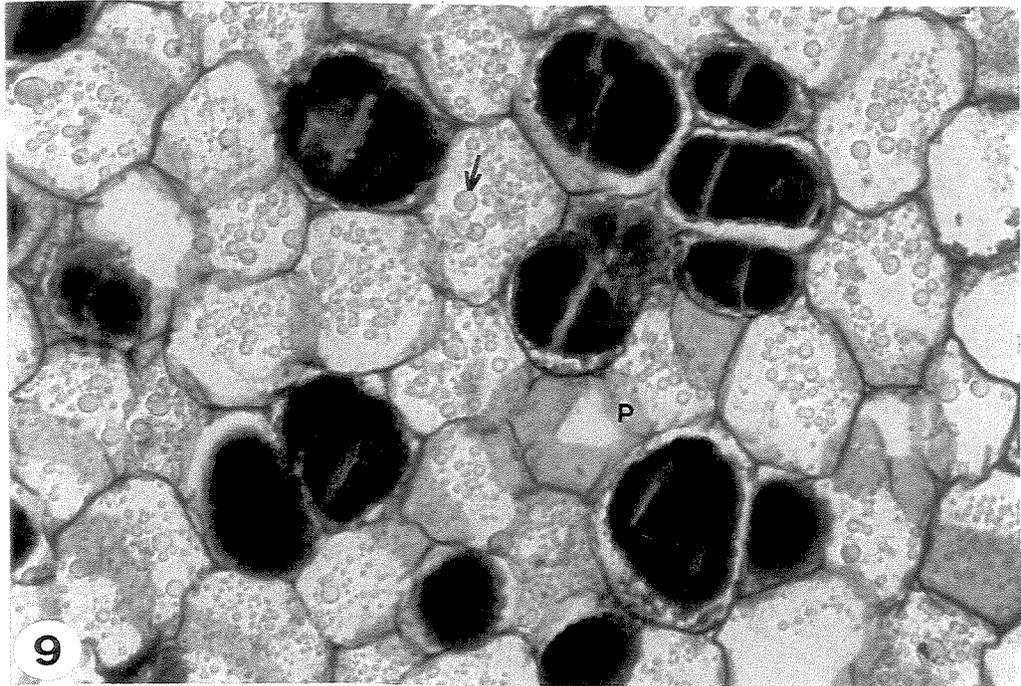
A reserva mais abundante encontrada nas sementes de guabiroba correspondeu a proteínas.

4.3.2.1. Coloração com Azul de Toluidina a pH 4,0 (AT)

As análises microscópicas das sementes de *Campomanesia xanthocarpa* revelaram paredes celulares metacromáticas em sementes quiescentes e muitos grânulos corados em verde ocupando grande parte do volume celular. Ainda nas mesmas sementes, foram encontrados pequenos glóbulos pouco corados (Fig.9).

Com a perda de viabilidade (60 dias) as células cotiledonares apresentaram os mesmos grânulos corados, agora em azul e mais compactados (Fig.10).





4.3.2.2. Coloração com Xylidine Ponceau a pH 2,5 (XP)

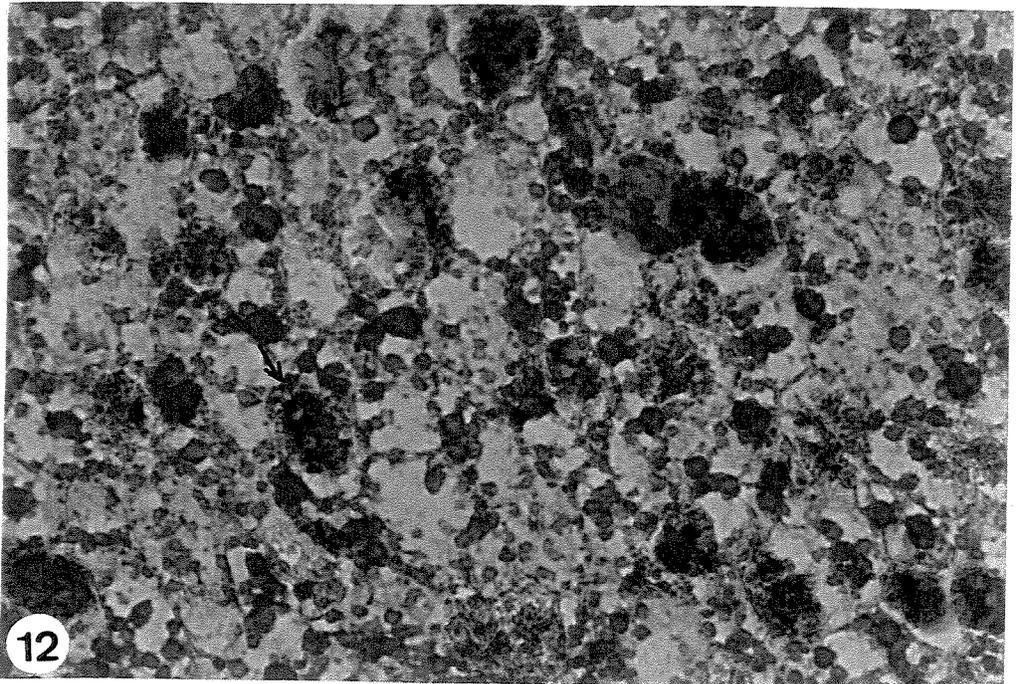
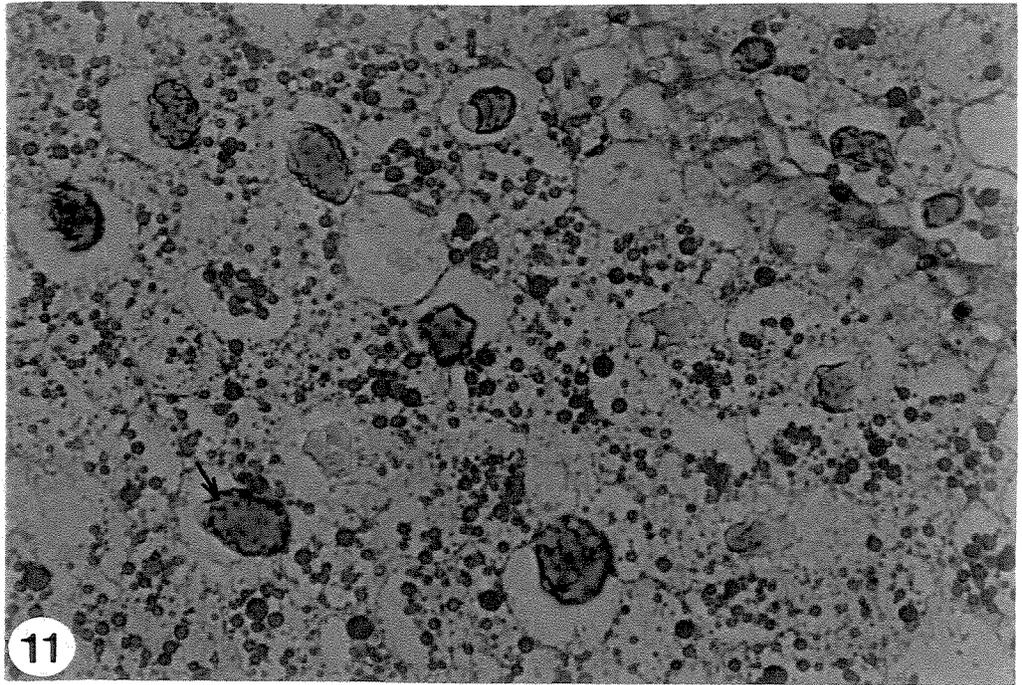
Sementes quiescentes de *C. xanthocarpa* coradas pelo XP, apresentaram inúmeros glóbulos corados em vermelho, representando o material protéico. Os grandes grânulos que foram corados em verde com AT, apresentaram-se corados em amarelo-alaranjado (Fig.11).

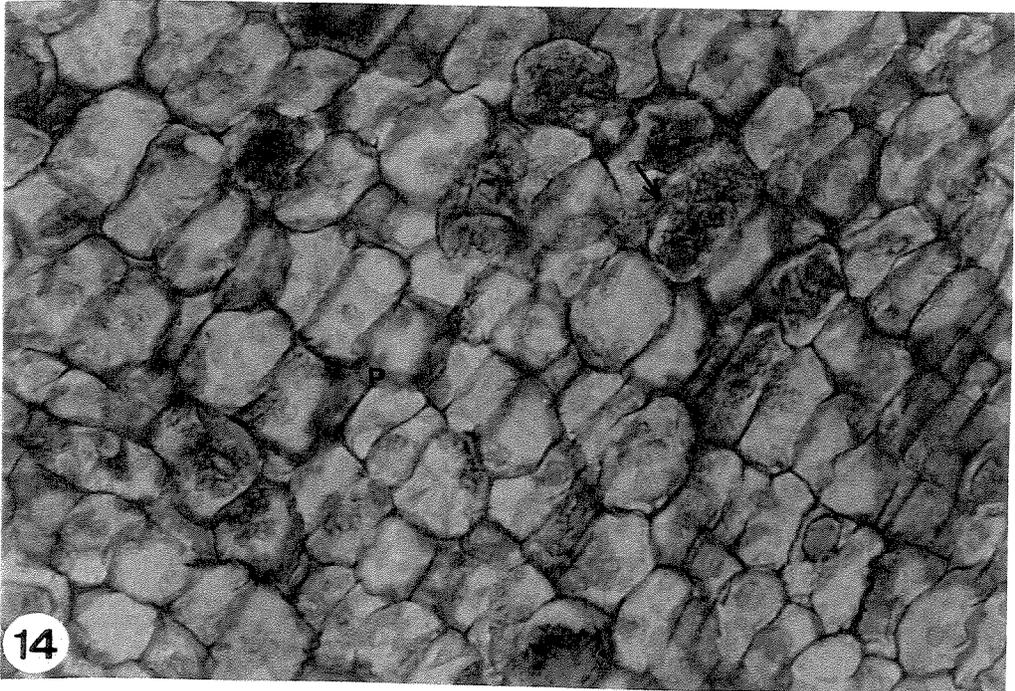
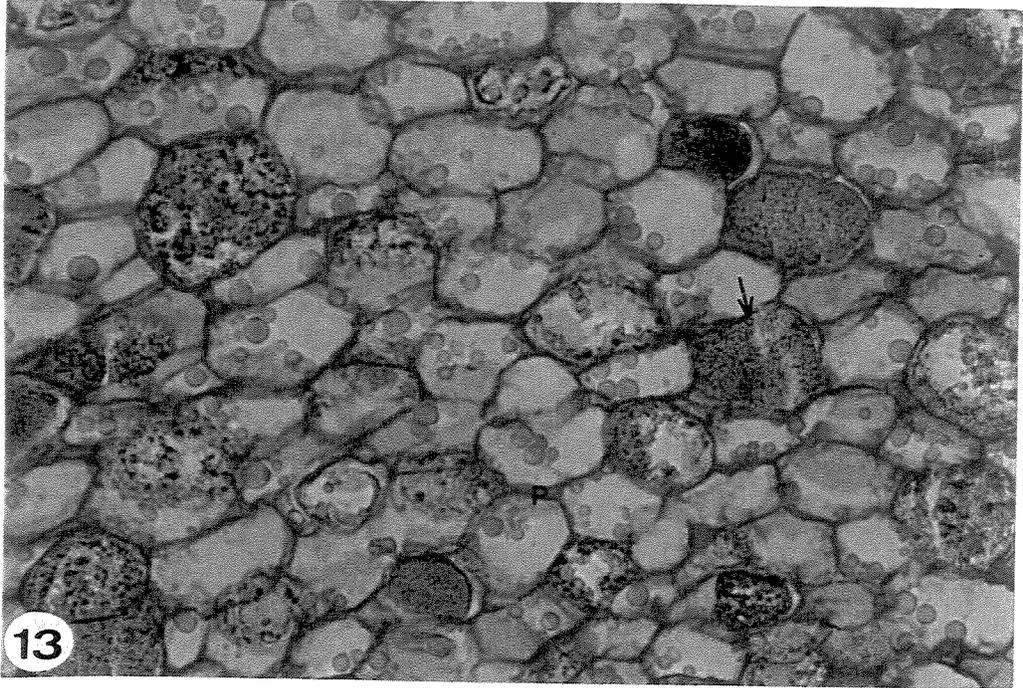
Nas sementes inviáveis, esses grânulos reagiram ao corante apresentando uma coloração avermelhada. Além disso, houve uma aparente dispersão dos mesmos em grânulos menores e mais espalhados por outras células em tons mais arroxeados.

Com a perda da viabilidade, os inúmeros glóbulos de proteína sofreram modificações, tornando-se aparentemente maiores (Fig.12).

4.3.2.3. Método do PAS

Em *C. xanthocarpa*, o método PAS mostrou apenas as paredes celulares coradas e os grandes grânulos foram visualizados em ocre nas sementes quiescentes (Fig.13). Com a perda da viabilidade, esses grânulos pareceram difundidos nas células, não tendo mais a localização e forma definidas. Além disso, passaram a responder de forma positiva ao corante(Fig.14).





4.3.2.4. Reação do Ferrocianeto Férrico

A utilização da reação do Ferrocianeto férrico revelou em *C. xanthocarpa* uma fraca coloração para os grandes grânulos presentes nas células do material quiescente (Fig.15). O padrão de resposta foi mais positivo ao método para o material em t15 que corou mais intensamente(Fig.16).

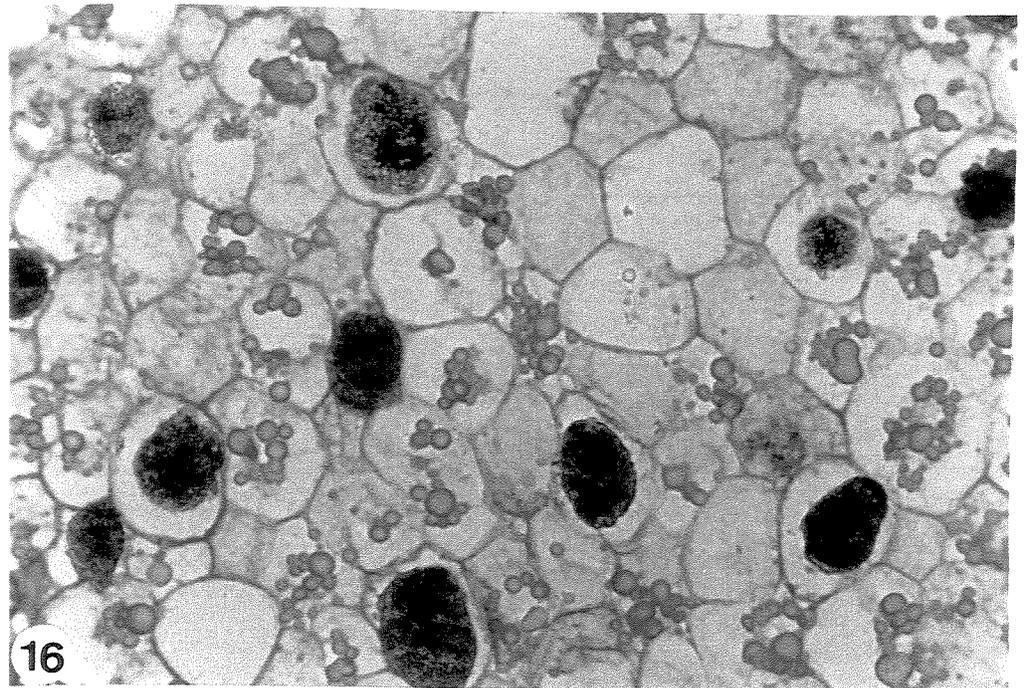
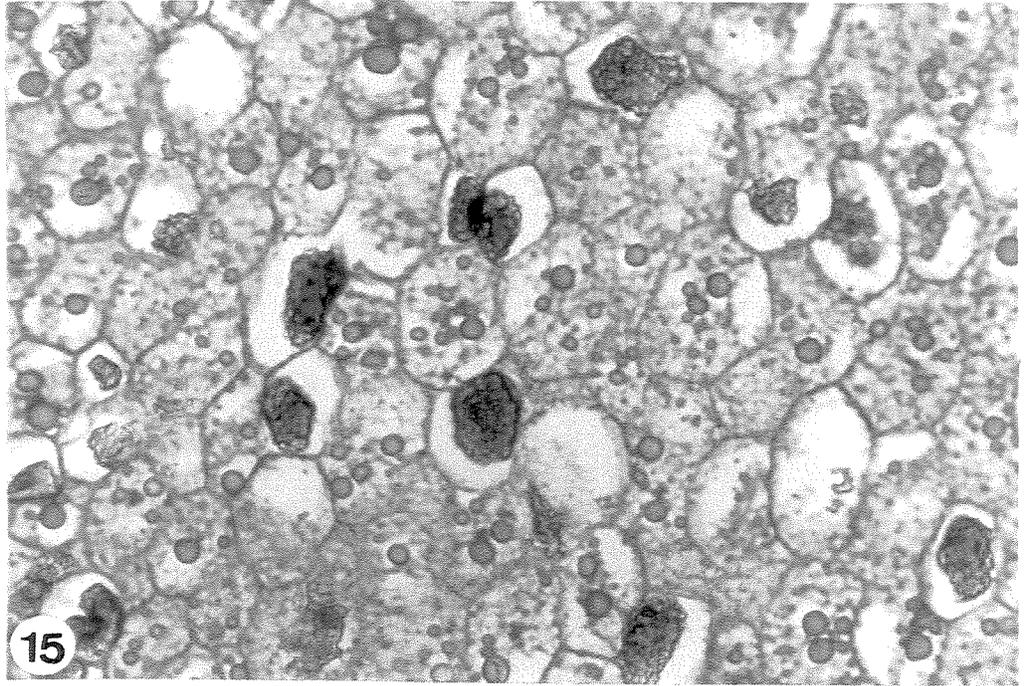
A medida que o tempo de estocagem aumentou, pode-se observar uma resposta cada vez mais intensa desse material, que foi se mostrando mais e mais azulado em t30 e em t60. Além disso, observou-se uma difusão do material corado pelas células do cotilédone (Fig. 17 e 18).

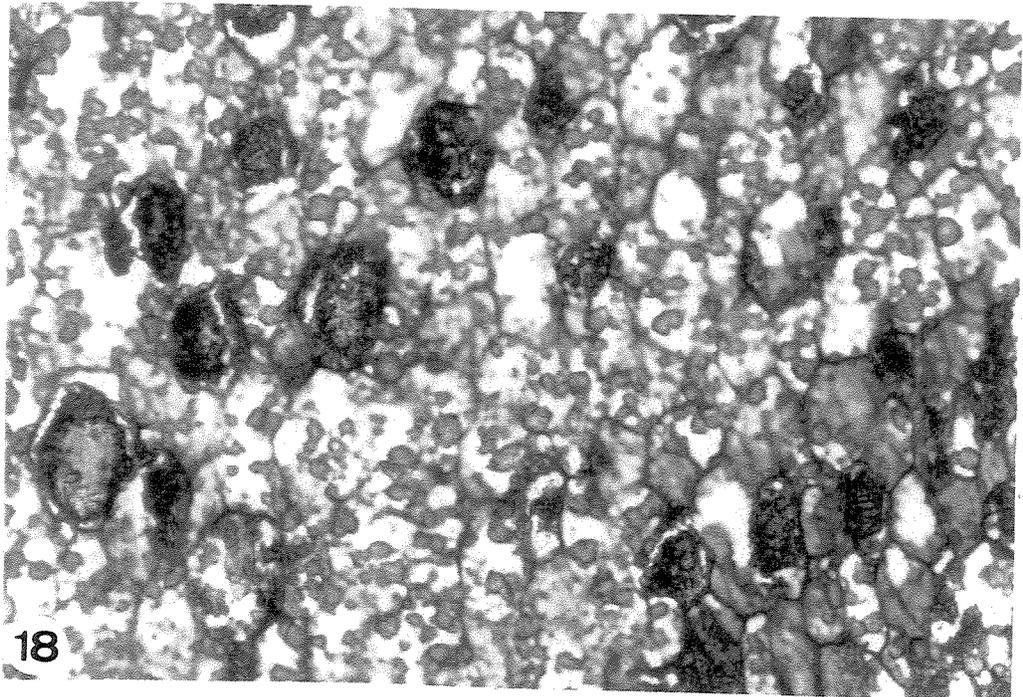
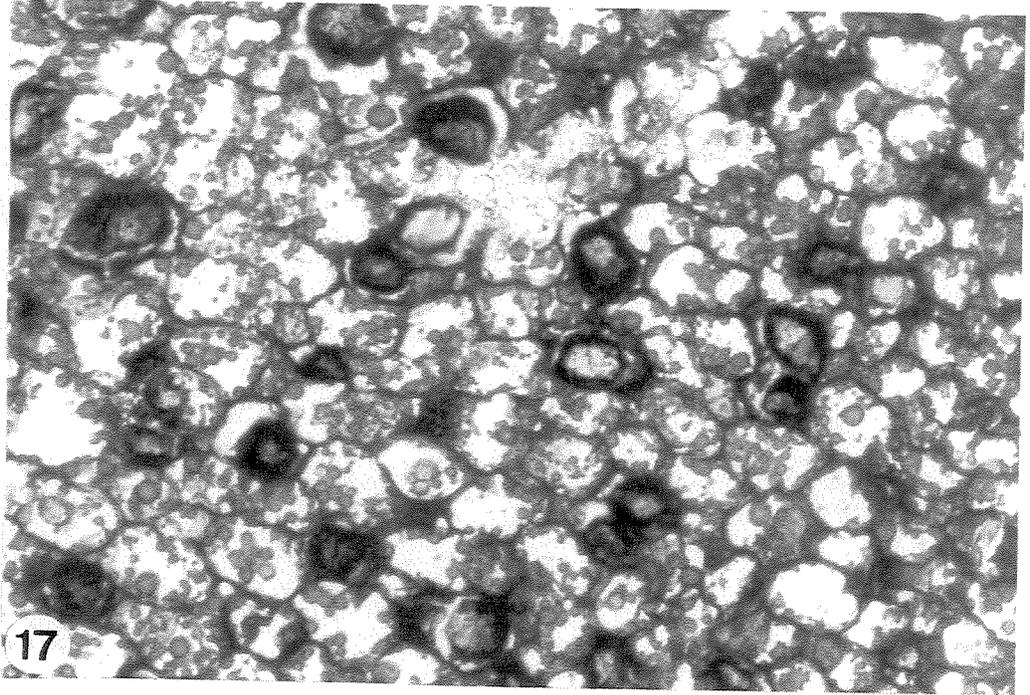
4.4. Quantidade de grãos de amido

A contagem dos grãos de amido foi feita apenas para a pitanga, tendo em vista que na guabiroba não foi detectada a presença de amido através da reação do PAS.

Foi notado um decréscimo significativo na média do número de grãos de amido por célula a partir do dia da coleta (12,82) até 105 dias (9,74), revelado pela análise de variância (Apêndice 5).

Na figura 19, a análise de regressão polinomial dos resultados, explica que a diminuição do número de grãos foi evidente até 52 dias, ocorrendo após esse período uma tendência à estabilização.





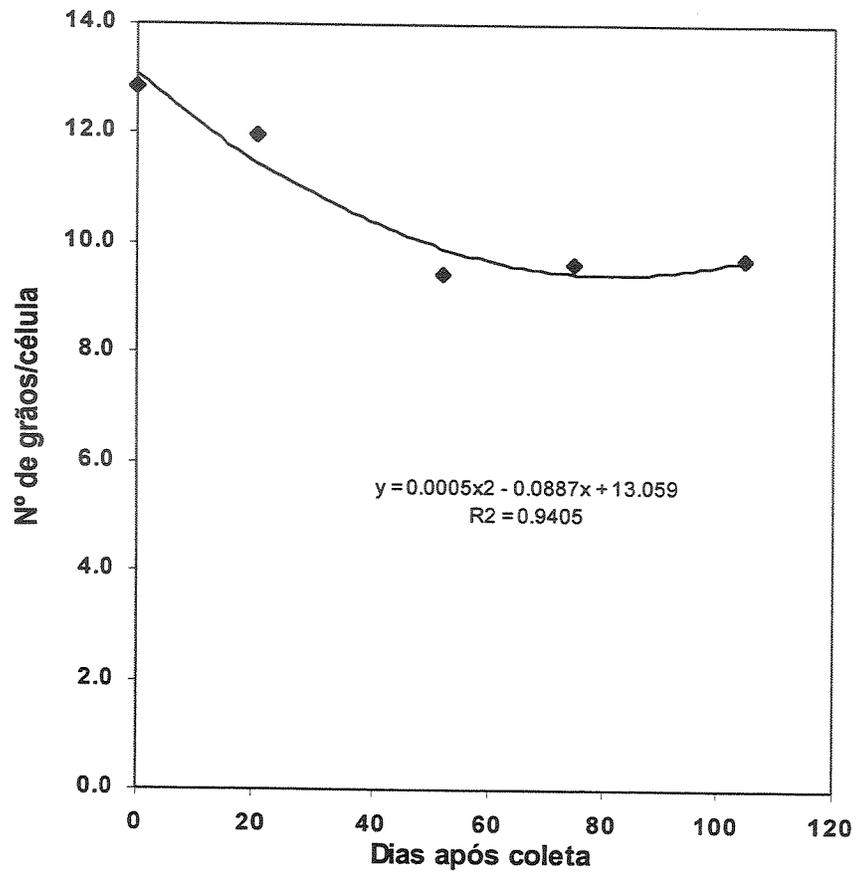


Figura 19. Análise da variância da regressão polinomial para as médias obtidas da quantidade de grãos de amido encontrados em células cotiledonares de *E. uniflora* durante o período de 105 dias de estocagem.

4.5. Métodos bioquímicos de análise

As dosagens realizadas em sementes de *E. uniflora* encontram-se descritas na Tabela 2.

A análise de variância (Apêndice 3) realizada mostrou efeito significativo ($P < 0,05$) do tempo após a coleta apenas sobre o conteúdo de açúcares livres e açúcares solúveis. Para amido e proteína não foram detectadas diferenças significativas entre os diferentes tempos analisados. No caso do amido, apesar de não ter sido notada diferença significativa, houve uma aparente diminuição do conteúdo nas sementes dessa espécie, como pode ser observado na Tabela 2.

A relação entre o tempo após a coleta e o conteúdo de açúcares livres e açúcares solúveis, foi linear e positiva (Apêndice 4) e está representada na Figura 20. Foi observado que o aumento de açúcares livres foi bastante acentuado, apresentando uma taxa de incremento de 1,12 mg/g por dia de estocagem. Os açúcares solúveis nas sementes aumentaram em 0,21mg/g ao dia (Fig. 20).

Como citado acima, a diminuição do conteúdo de amido não foi significativa. Entretanto, a taxa de diminuição média observada foi pouco superior a 1 mg/g ao dia de estocagem (Tabela 2).

Os valores obtidos para proteínas de *E. uniflora* mantiveram-se praticamente inalterados, na faixa dos 207 mg/g de material em todos os tempos analisados (Tabela 2).

Tabela 2. Determinação do conteúdo de açúcares livres, açúcares solúveis, amido e proteínas (mg/g Mf) em sementes intactas de *E. uniflora*.

Tempo (dias)	Açúcares livres	Açúcares solúveis	Amido	Proteínas
0	17 a	28 a	362 a	208 a
60	67 b	43 a,b	302 a	201 a
105	137 c	51 b	254 a	206 a

Os dados representam a média de 3 repetições. Valores em uma mesma coluna acompanhados da mesma letra, não apresentam diferenças significativas ($P < 0,05$).

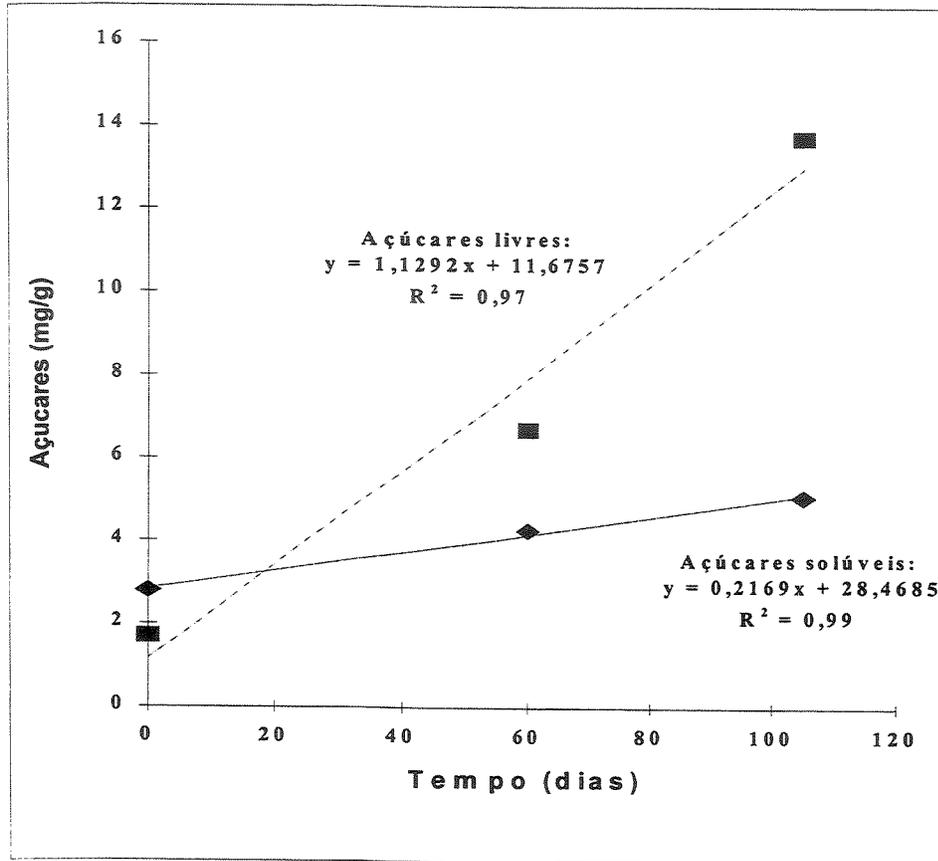


Figura 20. Análise da variância da regressão polinomial para o conteúdo de açúcares livres e açúcares solúveis em sementes de *E. uniflora*.

As dosagens realizadas em sementes de *C. xanthocarpa* encontram-se descritas na Tabela 3.

A análise de variância (Apêndice 6) mostrou que apenas o conteúdo de açúcares solúveis foi afetado significativamente ($P < 0,01$) pelo tempo após a coleta. Em sementes recém coletadas observou-se uma quantidade de 12 mg/g e com 60 dias (t60), elas apresentaram 32 mg/g de açúcares solúveis. Os demais componentes bioquímicos investigados permaneceram com seus conteúdos inalterados (Tabela 3).

Para sementes de *C. xanthocarpa* a análise de variância mostrou que apenas o conteúdo de açúcares solúveis foi afetado significativamente ($P < 0,01$) pelo tempo após a coleta. Em sementes recém coletadas observou-se uma quantidade de 12 mg/g e com 60 dias (t60), elas apresentaram 32 mg/g de açúcares solúveis. Os demais componentes bioquímicos investigados permaneceram com seus conteúdos inalterados (Tabela 3).

Os resultados obtidos nas extrações de lipídios encontram-se na Tabela 4. O conteúdo desses componentes em sementes de *C. xanthocarpa* recém coletadas foi de 40,0 mg/g e, 60 dias (t60) após, nas sementes inviáveis foi de 75,0 mg/g.

Os valores de lipídios obtidos para *E. uniflora* foram extremamente baixos, fugindo assim da resolução do método gravimétrico utilizado.

Tabela 3. Determinação do conteúdo de açúcares livres, açúcares solúveis, amido e proteínas (mg/g Mf) em sementes intactas de *C. xanthocarpa*.

Tempo (dias)	Açúcares livres	Açúcares solúveis	Amido	Proteínas
0	128 a	12 a	42 a	372 a
60	85 a	32 b	48 a	411 a

Os dados representam a média de 3 repetições. Valores em uma mesma coluna acompanhados da mesma letra, não apresentam diferenças significativas ($P < 0,01$).

Tabela 4. Conteúdo de lipídios em sementes de *C. xanthocarpa*.

Tempo (dias)	mg/g
0	40,0 *
60	75,0*

* Dados não submetidos à análise estatística.

4.6. Resultados comparativos entre as duas espécies:

Os resultados revelam uma grande diferença entre as duas espécies analisadas, em diversos aspectos, seja em termos de longevidade, seja em termos citoquímicos e bioquímicos.

E. uniflora se manteve viável durante todo o período do experimento (t105) enquanto que *C. xanthocarpa*, a partir de t15 teve um efetivo decréscimo de germinação, que culminou em t30, em uma taxa de germinação de apenas 2% (Figuras 1 e 2).

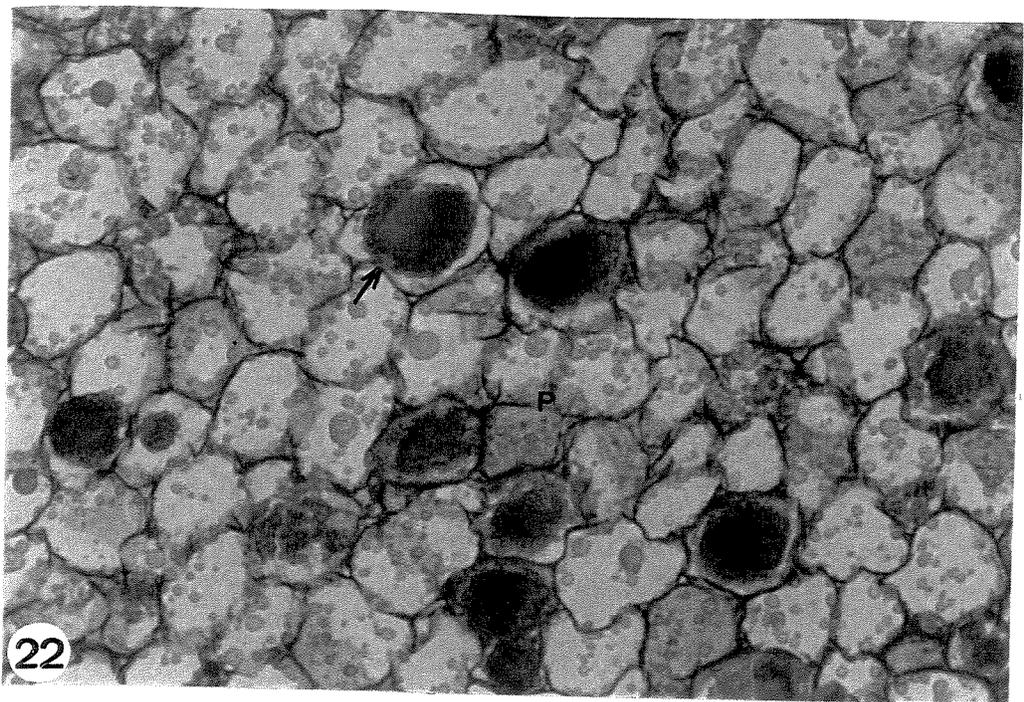
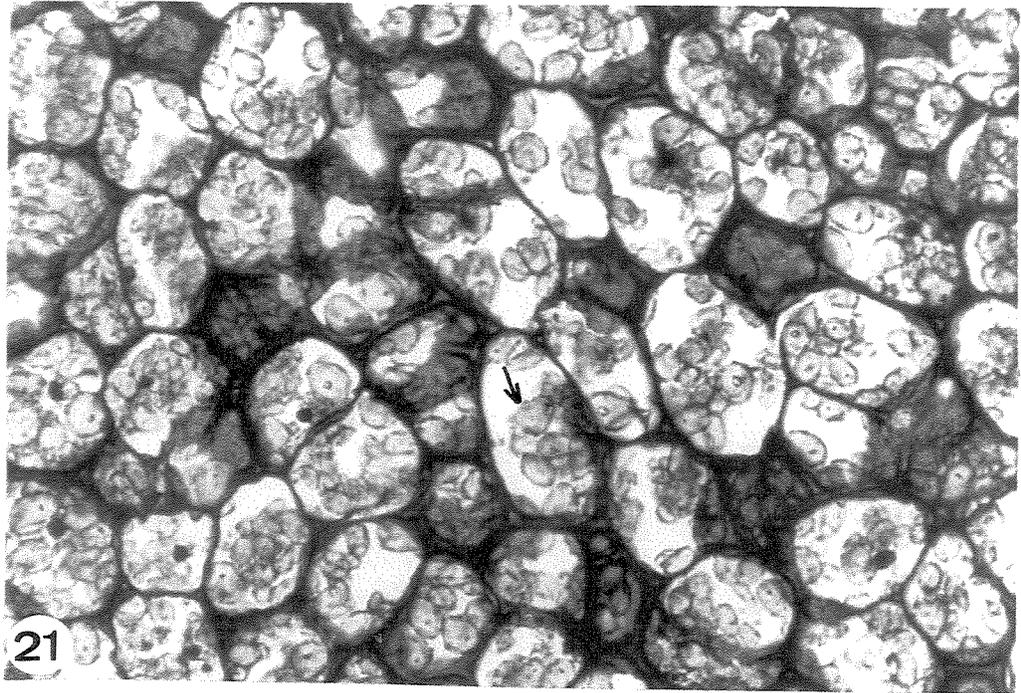
Em termos de reservas, sementes quiescentes de *E. uniflora* apresentaram um alto teor de amido (~36%, Tabela 2) que não foi efetivo para *C. xanthocarpa*, cujas sementes apresentaram-se ricas em proteínas (~37%, Tabela 3).

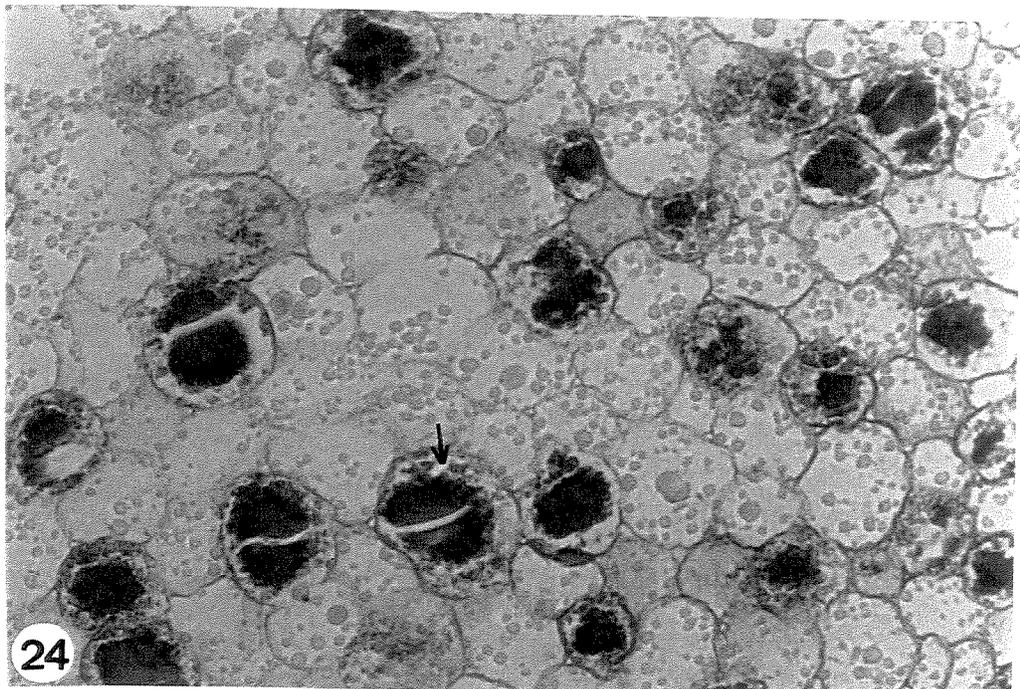
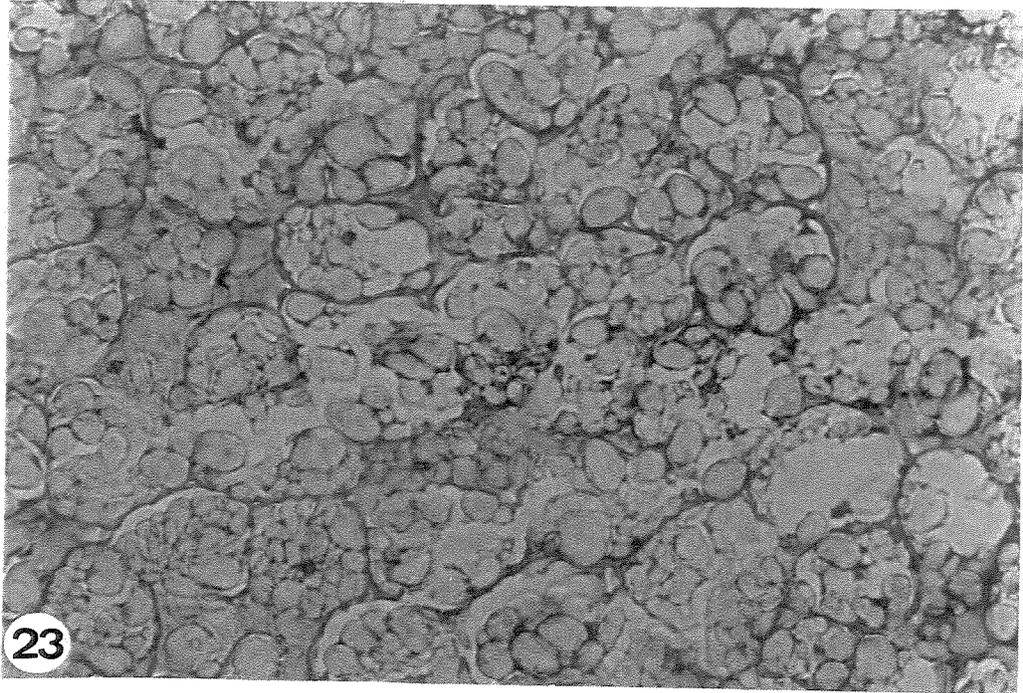
Os resultados citoquímicos obtidos pelas colorações com AT revelam também que a pitanga (Fig. 21) apresenta paredes celulares menos metacromáticas do que as da guabiroba (Fig. 22).

Sementes quiescentes de pitanga não apresentam reservas de tanino. Entretanto, foram muito evidentes nos cortes de guabiroba, a presença de células de reserva totalmente preenchidas com esse composto. As colorações pelo Azul de toluidina revelaram um aumento na metacromasia desse material, que passa de cor intensa verde (Fig.9) para coloração azul em t30 (Fig. 22), que se acentua em t60 (Fig. 10).

Esses resultados obtidos para *C. xanthocarpa* foram confirmados quando esse material foi submetido ao método do ferrocianeto férrico o que não ocorreu com *E. uniflora* (resultados não mostrados). Além disso, os

grânulos contendo material redutor (ácido tânico) são corados diretamente pelo reativo de Schiff sem prévio tratamento (oxidação pelo ácido periódico), o que não ocorre para as sementes de pitanga (Fig. 23 e 24).





5. DISCUSSÃO

5.1. Germinação

Várias investigações a respeito do comportamento de sementes quanto à sua longevidade, levaram a uma separação clássica entre aquelas ditas ortodoxas, que resistem a teores baixos de umidade e as chamadas recalcitrantes, que apresentam um teor elevado de água, abaixo do qual perdem rapidamente sua viabilidade. Harrington (1972) listou espécies cujo comportamento recalcitrante, deveria ser revisto através de estudos mais conclusivos e, dentre as espécies listadas, encontra-se a pitanga (*E. uniflora*).

Sementes denominadas ortodoxas, são aquelas que sofrem um processo de perda de água durante a sua maturação dentro do fruto e são liberadas ou colhidas com menos de 20% de água. Posteriormente sofrem uma perda de água para valores de até 2 a 5% e nessa condição tem seu período de viabilidade aumentado (Neves, 1994). Várias espécies apresentam sementes ortodoxas, principalmente aquelas que são economicamente utilizadas na agricultura como o feijão, milho, arroz, etc. que resistem por vários anos sem que haja perda de viabilidade e vigor, desde que mantidos à temperatura e umidade relativa baixos (Begnami, 1991).

Sementes recalcitrantes têm sua viabilidade assegurada quando sua umidade é alta. Caracterizam-se por não sofrer perda de água natural na planta-mãe e são liberadas com elevado teor de umidade (Neves, 1994). Quando colocadas em condições dessecantes, essas sementes podem perder rapidamente sua viabilidade, como *Araucaria angustifolia* e *Scadoxus membranaceous*, que apresentaram declínio nas taxas de germinação após 15 dias de estocagem nessas condições (Farrant *et al.*, 1989). A classificação dessas sementes foi inicialmente genérica avaliando-se apenas a intolerância à dessecação e a baixa longevidade.

A reclassificação das sementes recalcitrantes em função de alguns outros aspectos, vem sendo feita através de diversos estudos. Farrant *et al.* (1988), observaram diferenças entre espécies recalcitrantes sugerindo um enquadramento em três níveis: Sementes altamente recalcitrantes, que germinam imediata e rapidamente após sua liberação da planta-mãe, não tolerando praticamente nenhuma perda de água; sementes moderadamente recalcitrantes, suportam o armazenamento desde que mantidas com alto teor de umidade e germinam mais lentamente que as anteriores; finalmente, sementes pouco recalcitrantes, podem suportar uma maior perda de água do que as anteriores e assim, serem estocadas por mais tempo e ainda conseguirem manter sua viabilidade. Os diferentes níveis de recalcitrância sugerem que as sementes podem ser agrupadas por características intermediárias entre ortodoxas e recalcitrantes (Farrant *et al.*, 1997).

As sementes recalcitrantes apresentam, portanto, grandes problemas com o armazenamento, o que dificulta a sua utilização na agricultura em larga escala, exceto com a tomada de inúmeros cuidados em seu manejo. Entretanto, dada a diversidade já apontada nos níveis de recalcitrância, alguns métodos de estocagem têm sido considerados mais eficientes, tendo em vista levarem em consideração fatores como a perda de água, teor de umidade,

prevenção contra microorganismos e suprimento de oxigênio (King & Roberts, 1980). Os métodos que têm sido mais eficientes são aqueles que utilizam sacos de polietileno, recipientes selados, frascos de vidro e outros (Neves, 1994).

Estudos referentes à longevidade de sementes de pitanga sob diferentes condições de estocagem, realizados no Departamento de Biologia da Universidade de Passo Fundo, revelaram uma perda de viabilidade a partir de 15 dias de estocagem em sacos de papel e temperatura ambiente (Ceccon, 1997). Do mesmo modo, há informações sobre a baixa longevidade dessas sementes na literatura (Harrington, 1972, Lorenzi, 1992, Longhi, 1995). Além disso, observações feitas por Oliveira & Pereira (1984) em sete espécies de Myrtaceae, dentre elas, quatro do gênero *Eugenia* trazem a informação que todas variaram o seu período de viabilidade de muito curta e sem possibilidade de estocagem, a curta, suportando um período de armazenamento em torno de 20 a 30 dias.

As coletas realizadas, previam testes de pouco mais de um mês para a comparação entre o comportamento germinativo de *E. uniflora* e *C. xanthocarpa*. Entretanto, os resultados obtidos no presente trabalho foram extremamente diferentes, o que acarretou o término das sementes coletadas, após 105 dias de trabalho, com testes de germinação levados a cabo a cada 15 dias.

Assim, a manutenção de uma taxa de germinação relativamente alta (73%), leva a supor que o armazenamento das sementes em frascos de vidro tampados tenha contribuído para essa longevidade, tendo em vista a possível manutenção de sua umidade. Esse comportamento contrastou com o de *C. xanthocarpa* que, após 15 dias de armazenamento, apresentou seu índice de germinação próximo a zero, já que as duas receberam iguais condições de estocagem.

A hipótese de que *E. uniflora* apresenta sementes com comportamento intermediário entre a recalcitrância e a ortodoxia não pode ser descartada. Variações nas condições de estocagem de sementes, principalmente no que diz respeito à umidade e temperatura, podem aumentar ou diminuir a longevidade das mesmas. Em *Coffea arabica* por exemplo, estudos recentes revelaram um comportamento intermediário para essa espécie, coletadas com 45% de umidade e estocadas em sacos de polietileno (Begnami, 1998).

O fato de não ter havido perda de viabilidade nas sementes estocadas de pitanga, acabou provocando uma mudança de abordagem do presente trabalho: inicialmente, esperava-se um estudo comparativo entre duas espécies recalcitrantes; entretanto a partir do comportamento observado, ela não pôde ser considerada como fortemente recalcitrante.

Outro fato observado, foi quanto ao tempo médio de germinação, o qual em pitanga se manteve constante no início, aumentando entretanto com o passar do período de estocagem. Em guabiroba esse comportamento foi mais marcante, com a diminuição do vigor e o aumento do tempo médio de germinação, reforçando assim as características que acompanham a perda de viabilidade de sementes (Begnami & Cortelazzo, 1996).

No presente trabalho, as sementes de *C. xanthocarpa* perderam rapidamente sua viabilidade. Esses resultados estão de acordo com aqueles relatados por Ceccon (1997) onde a autora demonstra a perda de viabilidade das sementes após 15 dias de estocagem, em sacos de papel ou polietileno, em ambiente natural, em câmara seca ou em geladeira. Assim, fica descartada a hipótese de que a estocagem em geladeira provoca injúrias de resfriamento nas sementes de guabiroba como ocorre em manga e cacau, outras sementes altamente recalcitrantes (Roberts & King, 1980).

Pode-se concluir afirmando que as sementes de *E. uniflora* permaneceram viáveis e com altos índices de germinação durante 105 dias

após a coleta. *C. xanthocarpa* apresentou viabilidade curta (até 15 dias), indicando um hábito fortemente recalcitrante, já que as condições de armazenamento foram as mesmas para ambas as espécies.

5.2. Citoquímica

Sabe-se que a celulose é o principal componente das paredes celulares das plantas superiores, seguida de hemicelulose e substâncias pécticas. Celulose é um polissacarídeo composto de moléculas de glicose unidas por ligações β 1-4 que formam longas cadeias, as quais se condensam na forma de fibrilas extremamente resistentes (Carpita, 1996). Das hemiceluloses, os componentes mais comumente encontrados em paredes primárias de dicotiledôneas são os xiloglicanos, que têm em sua composição básica uma longa cadeia de glicose β 1-4 como na celulose mas com ramificações de xilose e ainda galactose (Hayashi, 1989). Finalmente, as substâncias pécticas são polímeros de açúcares ácidos, com destaque para o ácido poligalacturônico (Roberts, 1990).

Em vegetais, a presença de radicais aniônicos nas substâncias pécticas, promove a coloração das paredes celulares em tom arroxeadado pelo AT a pH 4,0. O azul de toluidina (AT), é um corante básico que apresenta radicais NH_3^+ livres, sendo usado em soluções de pH 2 até pH 11-12, quando o próprio corante perde seu caráter catiônico. Assim, o pH da solução tampão exerce uma importância muito grande na solução corante. Os grupos carboxila de carboidratos são corados a partir do pH 2,5; o DNA e o RNA coram-se a partir do pH 3,5 e, finalmente, carboxilas de proteínas, acima do pH 4,0. Pelo exposto, o número de grupos carboxila de proteínas desprotonados a pH 4,0 é

pequeno, mas nesse pH, íons fosfato dos ácidos nucléicos e radicais sulfato e carboxila dos polissacarídeos ácidos, são corados pelo azul de toluidina (Vidal, 1977).

O fenômeno de metacromasia é comum a inúmeros corantes básicos incluindo o AT. Caracteriza-se por uma diminuição no pico de absorção da solução do corante (hipocromismo), a medida que ocorre aumento na sua concentração em solução. Isso faz com que a disponibilidade de radicais aniônicos e proximidade dos mesmos no substrato a ser corado, seja estimada pela visualização da cor obtida, que em função dessas interações passa do verde (monômeros de AT), para azul, azul arroxeadado e róseo a medida em que mais e mais moléculas do corante se empilham no substrato (Vidal, 1987).

A metacromasia apresentada nas paredes das células cotiledonares de *E. uniflora*, coradas com AT a pH 4,0, revelaram a presença de substâncias pécticas. A coloração arroxeadada indica o empilhamento das moléculas do corante em relação a grande disponibilidade de radicais aniônicos nas paredes celulares. As sementes quiescentes e com 105 dias, não mostraram alterações na coloração, indicando haver uma manutenção na disponibilidade de carboxilas coráveis pelo AT.

A ocorrência de substâncias pécticas nas paredes das células cotiledonares de *C. xanthocarpa* foi comprovada com o fenômeno da metacromasia obtida pela coloração com o AT. A presença de radicais aniônicos foi indicada também pela coloração arroxeadada das paredes celulares no material inviável a partir do t30.

O método do PAS é geralmente utilizado para evidenciar polissacarídeos neutros. Em vegetais, através do PAS, evidenciam-se celulose, hemiceluloses e amido. Essa reação baseia-se na oxidação de grupos hidroxila de carbonos vicinais pelo ácido periódico (HIO_4), formando dois radicais aldeídicos. Em um segundo momento, esses radicais se ligam ao reativo de Schiff, que é uma

solução incolor, preparada a partir da fucsina básica. Esse corante, apresenta cor magenta e, sob ação do anidrido sulfuroso, tem o seu grupo cromofórico alterado, originando uma solução sem cor. Essas moléculas incolores ligam-se aos grupos carbonila (formados pela oxidação das hidroxilas), restabelecendo assim, a região cromofórica do corante (Cortelazzo *et al.* 1983; Vidal, 1987).

As células cotiledonares das sementes das duas espécies estudadas tiveram os polissacarídeos de parede celular evidenciados citoquimicamente pela reação do PAS, caracterizando assim seu material celulósico, hemicelulósico e mesmo o material péctico, tendo em vista que o ácido poligalacturônico apresenta em sua estrutura as hidroxilas vicinais dos carbonos 2 e 3 do ácido galacturônico, possibilitando assim a oxidação pelo ácido periódico.

Os constituintes químicos das sementes em geral são dominados por materiais de estocagem, com destaque para carboidratos, proteínas e lipídios.

Entre os carboidratos, os mais comuns são o amido, açúcares solúveis, oligossacarídeos e polissacarídeos das paredes celulares. Desses, o amido é o mais freqüente, embora para algumas sementes de leguminosas isso não seja verdadeiro. Essas apresentam galactomananos e xiloglicanos como principais reservas de endosperma ou de seus cotilédones, como parte integrante da parede celular secundária (Buckeridge & Reid, 1996).

Em termos de conteúdo citoplasmático, o amido se distribui na forma de glóbulos de diferentes tamanhos e é formado por quantidades variáveis de amilose e amilopectina. Essas quantidades, mais ou menos determinadas para cada espécie, interferem em dois níveis de organização: o primeiro, ou nível molecular, se refere à quantidade de estrutura fina, tamanho e forma das moléculas; o segundo, a estrutura supramolecular ou granular. A relação amilose/amilopectina define as propriedades funcionais do amido (Billaderis, 1991).

A amilose é um polímero linear formado por glicoses unidas por ligações α 1-4 e é considerada formadora das regiões amorfas no grão de amido (Morris, 1990). A amilopectina possui uma cadeia principal idêntica a da amilose, com ramificações α 1-6 de novos resíduos de glicose unidos da mesma forma que na cadeia principal. Amilopectina, segundo o mesmo autor, forma as regiões cristalinas do grão de amido, embora suas ramificações participem da região amorfa (Morris, 1990; Gallant *et al.*, 1992).

Os grãos evidenciados pela reação do PAS se referem a grãos de amido, dada a sua forte reação ao método, à sua natureza globular e também por apresentarem-se negativos ao AT e ao XP (Cortelazzo, 1992).

Sementes quiescentes de *E. uniflora* revelaram grande quantidade de amido. O material ainda viável (105 dias), mostrou uma certa compactação dos grãos no interior da célula, além de uma diminuição na sua quantidade. Begnami & Cortelazzo (1996) encontraram resultados diferentes para sementes de *Phaseolus vulgaris* submetidas ao envelhecimento acelerado por 16 dias, com um aumento significativo do número de grãos de amido, apesar de não haver diferença significativa na dosagem dessa reserva. A hidrólise parcial do amido através da ação da α -amilase, foi apontada como possível causa. Entretanto, no caso do trabalho citado, houve perda total de viabilidade das sementes, o que não ocorreu para o presente estudo.

Os cotilédones de *C. xanthocarpa* não apresentaram grãos corados através da reação do PAS, indicando não se tratar de semente em que o amido seja uma reserva abundante ou mesmo que os grãos formados são suficientemente pequenos para não serem detectados pelo método utilizado.

Xylidine Ponceau é um corante ácido, que apresenta dois radicais sulfato. A pH 2,5, as proteínas podem ser visualizadas, pois neste pH seus grupos amino estão protonados e ligam-se eletrostaticamente ao XP, que por

sua vez, apresenta seus radicais sulfato desprotonados (Cortelazzo & Vidal, 1991).

A coloração pelo XP a pH 2,5 revelou, para as duas espécies aqui analisadas, paredes celulares de sementes quiescentes pouco coradas.

Em *E. uniflora*, a maior intensidade de coloração para tempos mais longos de estocagem, indica uma disponibilização dos grupos amina das proteínas ao longo do tempo, seja pelo aumento das mesmas ou, mais provavelmente, pela menor interação desses grupos com os demais materiais da parede celular.

Em *C. xanthocarpa*, não pode ser visualizada uma resposta diferente ao corante, entre as sementes viáveis e inviáveis. Entretanto, esse fato pode ser decorrente da grande quantidade de material corado no interior das células, o que poderia estar dificultando a observação de alterações nas paredes celulares.

As proteínas são apresentadas como material de reserva em sementes, normalmente na forma de corpos protéicos. Esses corpos podem diferir grandemente na sua morfologia e conteúdo químico, que variam de acordo com a espécie (Pate *et al.*, 1985). São envolvidos por uma membrana simples e podem apresentar somente uma matriz proteinácea ou conter inclusões no interior dessa matriz (Cutter, 1986). Essas inclusões quando ocorrem são, via de regra, de origem mineral, como é o caso do tecido cotiledonar de algumas espécies de Proteaceae que apresentaram particularmente Cálcio, Magnésio, Potássio e Fosfato (Pate *et al.*, 1985).

A quantidade de material protéico no interior das células cotiledonares de pitanga após reação pelo XP apresentou-se pequena e sem alterações perceptíveis ao longo do tempo de estocagem. Entretanto, células das sementes de guabiroba evidenciaram grande quantidade de pequenos

grânulos no citoplasma, identificando como proteína a principal reserva da mesma. Com a perda da viabilidade ocorreu um aparente aumento na intensidade de coloração, sugerindo a ocorrência de alterações na estrutura e organização desses corpos protéicos, através do aumento de disponibilidade de grupos amina.

Os lipídios são importantes componentes das sementes e podem ser classificados como material de estocagem ou constituintes estruturais. Os lipídios de estocagem são necessários no processo de germinação como suplemento de energia. Já os lipídios estruturais, participam da formação das inúmeras membranas existentes na célula (Huang & Grunwald, 1990).

As reservas lipídicas estão presentes em sementes geralmente na forma de triacilgliceróis. Ocorrem também em proporções significativas os glicolipídios e fosfolipídios (Bewley & Black, 1982b). A quantidade de óleo em diferentes espécies pode variar grandemente a partir de 1% até 60% do total de peso seco da semente (Ohlrogge & Browse, 1995). No presente trabalho, foi notada pequena quantidade de material lipídico em pitanga, em contraste com a grande quantidade observada em guabiroba.

Assim, conclui-se que as sementes de pitanga apresentam como principal reserva o amido, seguido de alguma quantidade de material protéico; em guabiroba, a principal reserva é protéica, seguida de quantidades significativas de lipídios e açúcares.

A mistura de ferricianeto de potássio e cloreto férrico, forma o ferrocianeto férrico que oxida mono e polifenóis, além de grupos pirrol, indol, ácido ascórbico e lipídios não saturados presentes nos tecidos. A reação com essa mistura tem valor positivo quando é formado o azul da Prússia (ferrocianeto férrico) que ocorre pela ação de redutores fortes como é o caso dos componentes acima citados. Pode também formar o verde da Prússia

(reduzores fracos) ou branco (reduzores muito fortes) de difícil identificação dada sua cor (Lison, 1963).

A presença de material redutor forte foi revelada nas sementes de *C. xanthocarpa*, sugerindo tratar-se de ácido tânico (natureza fenólica). Em sementes inviáveis, houve um aumento do seu poder redutor, através da coloração evidenciada ser azul mais intenso. Houve ainda a difusão desse material ao longo do período observado, tendo em vista sua localização em células especializadas para o material quiescente e, durante a perda de viabilidade, uma presença mais difusa em diferentes células do cotilédono. Fenômeno semelhante de difusão de material fenólico foi observado em sementes de cacau durante seu processo de fermentação (Brito *et al.*, 1998).

5.3. Bioquímica

A composição química das sementes mostra uma grande variabilidade. Os produtos de estocagem são quantitativamente dominantes e naturalmente mais significativos como parte da semente, no que diz respeito ao interesse econômico (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1989). As sementes caracteristicamente contêm grandes quantidades de reservas, as quais suprem o desenvolvimento das plântulas até que elas possam por si próprias, através da fotossíntese, estabelecerem-se como autotróficas (Bewley & Black, 1982b).

Sementes, como outros órgãos das plantas, envelhecem com o tempo e morrem. O estado fisiológico, a constituição genética e as condições ambientais de estocagem das mesmas interferem no seu tempo de vida. Seus componentes de reserva podem variar em quantidade, a medida que a

semente envelhece. Begnami (1998), analisando sementes de *C. arabica*, detectou várias modificações celulares durante a perda da viabilidade das mesmas.

As extrações bioquímicas feitas a partir de sementes de *E. uniflora*, apresentaram o amido como principal composto de reserva das células cotiledonares, confirmando assim os resultados obtidos com os métodos citoquímicos de análise. Houve uma diminuição do número de grãos de amido por célula e, apesar de não ter havido diferença significativa na variação do conteúdo desse composto durante o experimento, sua quantidade nas células reduziu sensivelmente nos 105 dias passados após a coleta. De todo o modo, os valores absolutos das dosagens revelam uma perda de praticamente 1mg de amido/ g de material / dia de estocagem, sugerindo assim a sua degradação. Como ele se apresenta em quantidades elevadas, a velocidade de sua degradação não foi suficiente para acusar resultados significativamente menores.

Trabalhos relativos ao envelhecimento em sementes de feijão (Begnami & Cortelazzo, 1996) revelaram alterações similares àquelas obtidas para as quantidades de amido, sem uma variação significativa. Entretanto, no caso de feijão, houve um aumento no número de grãos de amido, que se tornaram menores. Essa diferença pode estar relacionada ao fato de que, no caso dessa espécie, o envelhecimento e perda de viabilidade se deram em condições de saturação de umidade relativa (próxima aos 100%), contribuindo assim para a embebição da semente e, possivelmente a ação de enzimas hidrolíticas. De todo o modo, a ação dessas enzimas apenas contribuiu para a quebra de grãos de amido em estruturas menores e em maior número. Isto não ocorreu no presente trabalho, o que poderia ser explicado pela utilização de condições de estocagem diferentes.

Açúcares livres e açúcares solúveis de pitanga, embora apresentados em menor quantidade, apresentaram aumentos significativos durante o tempo de estocagem analisado. O acréscimo de açúcares livres foi maior (120 mg em 105 dias de estocagem), seguido pelo de açúcares solúveis (23 mg de acréscimo no período).

A quantidade de açúcares livres e solúveis encontrados, sugerem que essas moléculas aumentaram sua quantidade como resultado da quebra de moléculas formadoras do amido, o qual pode ter sofrido a ação da α -amilase ou de outra enzima hidrolítica, uma vez que a α -amilase tem sua atividade diminuída durante o envelhecimento de sementes, sendo ainda mais susceptível à degradação em sementes deterioradas do que a β -amilase (Gitali & Sem-Mandi, 1992).

Estudos com plantas revivescentes têm mostrado que o amido pode ser importante fonte de açúcares osmoticamente ativos para retardar a perda de água celular (Levitt, 1980; Rosseto, 1997). Isso poderia justificar o aumento das quantidades de açúcares livres observado no presente trabalho.

Como as reservas de amido apresentam-se em grande quantidade, a diminuição ocorrida no período não foi suficiente para levar a diferenças significativas. Para os açúcares livres, em quantidade muito menor, a mesma taxa de variação foi suficiente para significar resultados maiores e estatisticamente diferentes. Essa explicação é reforçada pelos resultados obtidos por Silva *et al.* (1998) para sementes de *D. miscolobium* durante a germinação, onde não foi detectada diminuição significativa do amido, apesar de ter havido aumento significativo nos açúcares livres.

Na análise do envelhecimento de tubérculos, Mikitzel e Knowles (1989), verificaram haver um equilíbrio entre as diferentes quantidades de carboidratos existentes. Quando jovens, estes apresentam o equilíbrio beneficiando a

presença de amido; com o envelhecimento, haveria um deslocamento desse equilíbrio no sentido de favorecer o acúmulo de açúcares redutores e sacarose. Esses resultados também reforçam aqueles obtidos no presente trabalho.

Em *E. uniflora*, a reserva amilácea é seguida pela reserva protéica que durante o período estudado não apresentou redução do seu conteúdo, mantendo-se ao redor de 20%.

O resultado da extração bioquímica das sementes de *C. xanthocarpa*, comparado aos outros componentes, revelou um predomínio de proteínas como principal reserva dessa espécie, atingindo valores próximos aos 40%.

Os teores de açúcares oscilaram na faixa dos 13% (somando-se os teores de amido, açúcares livres e solúveis). Não foi verificada a diminuição de amido durante o processo de envelhecimento e perda de viabilidade. Entretanto, assim como em *E. uniflora*, os valores de açúcares solúveis aumentaram.

Em guabioba, os lipídios podem ser considerados reservas importantes. Entretanto, a metodologia empregada não se revelou eficiente para a sua dosagem de forma contundente. Todos os resultados microscópicos obtidos revelaram espaços no citoplasma, não corados por nenhum dos métodos realizados, reforçando essa hipótese. Além disso, existem glândulas no tegumento da semente (Berg, 1855 a 1859, apud Landrum, 1982) que apresentam considerável quantidade de material oleoso, justificando a ocorrência desses componentes nas extrações bioquímicas. Os resultados obtidos, apesar de não terem sido analisados estatisticamente, sugerem um aumento dessa reserva durante o período.

Novos experimentos de extração de lipídios serão necessários no futuro, com sementes a serem colhidas, numa tentativa de eliminar a possível

distorção ocorrida no presente trabalho. De todo o modo, foi observado um aumento no teor dessa reserva, sugerindo sua maior capacidade de extração à medida que aumentou o período de estocagem e a semente perdeu a viabilidade.

6. Conclusões

a) Referentes à longevidade das sementes

- 6.1. Sementes de *E. uniflora* não mostram características de recalcitrância no tempo e condições de armazenamento utilizados.
- 6.2. Sementes de *C. xanthocarpa* apresentam comportamento recalcitrante perdendo sua viabilidade a partir de 15 dias.

b) Referentes às características celulares

b.1) *Eugenia uniflora* (pitanga)

- 6.3. Apresenta suas sementes com predomínio de carboidratos como reserva, com destaque para amido (~36%), seguido de proteínas;
- 6.4. Durante a estocagem, o número de grãos de amido nas suas células cotiledonares diminui significativamente;
- 6.5. Mostram uma diminuição no conteúdo de amido e aumento na quantidade de açúcares livres e de açúcares solúveis durante o período de estocagem;

- 6.6. O material protéico, principalmente associado às paredes das células cotiledonares, torna-se mais reativo a corantes ácidos, por um aumento na disponibilidade de radicais amina presentes;

b.2) *Campomanesia xanthocarpa* (guabiroba)

- 6.7. As células cotiledonares dessa espécie têm como principal reserva as proteínas (~37%), seguidas de açúcares. Apresentam também material tânico no seu interior;
- 6.8. Durante a perda da viabilidade o material tânico presente aumenta o seu poder redutor e se difunde em parte para as demais células dos cotilédones;
- 6.9. Paredes celulares têm uma maior disponibilidade de pectina quando comparadas às células de sementes de *E. uniflora*.

b.3) Geral

O trabalho demonstra um comportamento diferente quanto a longevidade das sementes de *E. uniflora* e *C. xanthocarpa*.

Nas condições utilizadas, guabiroba mostrou-se fortemente recalcitrante enquanto pitanga não apresentou essa característica. Isso pode ser decorrente da variação do material de reserva presente e, possivelmente, da maior capacidade de retenção de água sugerida para a pitanga.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANNISON, G. & TOPPING, D.L. 1994. Nutritional role of resistant starch: chemical structure vs physiological function. *Annu. Rev. Nutr.*, 14: 297-320.
- BARBEDO, C.J. & MARCOS FILHO, J. 1998. Tolerância a dessecação em sementes. *Acta Bot. Bras.*, 12(2): 145-164.
- BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASO, C.L.F. GUIMARÃES, E.F.; LIMA, H.C. 1991. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. v.2. Viçosa. Imprensa Universitária. 377 p.
- BEGNAMI, C.N. & CORTELAZZO, A.L. 1996. Cellular alterations during accelerated aging of French bean seeds. *Seed Sci. Technol.*, 24: 295 - 303.
- BEGNAMI, C.N. 1991. Alterações celulares durante o envelhecimento em sementes de *Phaseolus vulgaris* L. e *Senna reticulata* (Willdenow) Irwin e Barneby. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Mestrado.

- BEGNAMI, C.N. 1998. Alterações estruturais, ultraestruturais e bioquímicas durante a perda da viabilidade em sementes de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1982a. Viability, dormancy and enviromental control. In: **Physiology and biochemistry of seeds** v.2. Berlin. Springer Verlag. 375 p.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1982b. The structure of seeds and their food reserves In: **Physiology and biochemistry of seeds** v.3. Berlin. Springer Verlag. 375 p.
- BILLADERIS, C.G. 1991. The structure and interactions of starch with food constituents. **Can.J.Physiol. Pharmacol.**, 69: 60-78.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248-254.
- BRITO, E.S.; PEZAOA-GARCIA, N.H.; GALLÃO, M.I. & CORTELAZZO, A.L. 1998. Avaliação da estrutura celular de cacau (*Theobroma cacao* L.) por microscopia eletrônica de varredura, durante a fermentação, secagem e torração. Anais do III Congresso Internacional de Alimentos, Rio de Janeiro, p. 82-85.

- BUCKERIDGE, M.S. & REID, J.S.G. 1996. Major cell wall storage polysaccharides in legume seeds: structure, catabolism and biological functions. **Ciênc. Cult.**, **48**: 153-162.
- CARPITA, N.C. 1996. Structure and biogenesis of cell walls of grasses. **Annu.Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.**, **47**: 445-476.
- CECCON, S. 1997. Importância do armazenamento de sementes de frutíferas nativas para produção de mudas a serem utilizadas na arborização urbana. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil, Iniciação científica.
- CORTELAZZO, A.L & VIDAL, B.C. 1991. Soybean seed proteins: detection in situ and mobilization during germination. **Rev. Bras.Bot.**, **14**: 27-34.
- CORTELAZZO, A.L. 1992. Detecção e quantificação de amido em cotilédones de *Canavalia ensiformes* e *Canavalia gladiata* durante o desenvolvimento inicial da planta. **Rev. Bras. Bot.** **15(2)**: 157-162.
- CORTELAZZO, A.L.; VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S. 1983. Basic fuchsins and the Schiff-aldehyde reaction. I. Spectral absorption characteristics in solution. **Acta histochem.**, **73**: 121-133.
- CRONQUIST, A. 1981. **An Integrated system of classification of flowering plants**. New York. Columbia University Press. 1261p.

- CUTTER, E.G. 1986. **Anatomia Vegetal. Parte I - Células e Tecidos.** São Paulo. Roca, 2ed. 304p.
- FARRANT, J.M. , PANMENTER, N.W. & BERJAK, P. 1988. Recalcitrance - a current assesment. **Seed Sci. Technol.**, **16**: 155-166.
- FARRANT, J.M., PANMENTER, N.W. & BERJAK, P. 1989. Germination associated events and the dessication sensitivity of recalcitrance seeds - a study on three unrelated species. **Planta**, **178**: 189-198.
- FARRANT, J.M., PANMENTER, N.W., BERJAK, P. & WALTERS, C. 1997 Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain diferent levels of desiccation tolerance. **Seed Sci. Res.**, **7**: 135-144.
- GALLANT, D.J.; BOUCHET, B.; BULÉON, A. & PEREZ, S. 1992. Physical characteristics of starch granules and suceptibility to enzymatic degradation. **Eur.J.Clin.Nutr.**, **46**: 3-16.
- GITALI, D. & SEM-MANDI, S. 1992. Scutellar amylase activity in naturally and acelerated aged wheat seeds. **Ann. Bot.**, **69**: 497-501.
- HALMER, P. 1985. The mobilization of storage carbohydrates in germinated seeds. **Physiol. Veg.**, **23**: 107-125.

- HARRINGTON, J.F. 1972. Seed storage and longevity. In:KOSLOWKI, T.T. (Ed.).**Seed Biology**. New York. Academic Press,v. VIII, p. 145-245.
- HAYASHI, T. 1989. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 40: 139-168.
- HUANG, L. & GRUNWALD, C. 1990. Lipid and fatty acid changes during germination of alfafa seeds. **Phytochemistry**, 29(5): 1 441-1 445.
- JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. New York. McGaw. 523p.
- KIERNAN, J.A. 1981. **Histological & Histochemical methods: theory and practice**. London. Pergamon. 344p.
- KING, M.W. & ROBERTS, E.H. 1980. A strategy for future research into the storage of recalcitrant seeds. In. CHIN, H.F. & ROBERTS, E.B., (Ed.). **Recalcitrant crop seeds**. Kuala Lampur. Tropical. p 90-110.
- KLEIN, R.M. 1984. Importância Sociológica das Mirtáceas nas florestas Riograndenses. **Anais do XXXIV Congresso Nacional de Botânica v.II:** 367-375.
- LANDRUM, L.R. 1982. The development of the fruits and seeds of *Campomanesia* (Myrtaceae). **Brittonia**, 34(2): 220-224.
- LEVITT, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. New York, Academic Press, 1ed.

- LISON, L. 1963. Histochemie e citochemie animales. Paris. Gauthier-Villars.396p.
- LONGHI, R.A. 1995. **Livro das árvores: árvores e arvoretas do sul.** Porto Alegre. L & PM. 176p.
- LORENZI, H. 1992. **Árvores Brasileiras. Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil.** São Paulo. Plantarum. 352p.
- MARCHIORI, J.N.C. & SOBRAL, M. 1997. **Dendrologia das Angiospermas: Myrtales.** Santa Maria: UFSM. 304p.
- MAUSETH, J. 1988. Seed. In: **Plant Anatomy.** Menlo Park. The Benjamin/Cummings,p. 415-437.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. 1989. **The germination of seeds.** 4.ed Oxford. Pergamon Press. 192 p.
- McCREADY, R.M.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA, V. & OWENS, H.S. 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. **Anal. Chem., 22:** 1556-1558.
- MEIER, H. & REID, J.S.G. 1982. Reserve polyssaccarides other than starch in higher plants. In: Loewus, F.A. & Turner, W. ed. **Plant carbohydrates I, Intracellular carbohydrates.** Berlin. Springer Verlang,p. 418-471.

- MIKITZEL, L.J. & KNOWLES, R.N. 1989. Potato seed-tuber influences protein synthesis during sprouting. **Physiol. Plant.**, 89: 262-270.
- MORRIS, V.J. 1990. Starch gelation and retrogradation. **Trends in Food Sci. & Technol.**, 7: 2-6.
- NEVES, C.S.V.J. 1994. Sementes recalcitrantes - Revisão de literatura. **Pesq. Agrop. Bras.**, 29(9): 1459-1467.
- NTHABISENG, M.; PANMENTER, N.V.; BERJAK, P. & FRÉDERIC, J.C. 1997. Response of the recalcitrant seeds of *Avicenia marina* to hydrated storage: events occurring at the root primordia. **Seed Sci. Res.**, 7: 169-178.
- OHLROGGE, J. & BROWSE, J. 1995. Lipid biosynthesis. **Plant Cell**, 7: 957-970.
- OLIVEIRA, E. de C. & PEREIRA, T S. 1984. Myrtaceae - morfologia da germinação de algumas espécies. **Anais do XXXIV Congresso Nacional de Botânica**, v.II: 501-520.
- PATE, J. S., RASINS, E., RULLO, J. & KUO, J. 1985. Seed nutrient reserves of Proteaceae with special reference to protein bodies and their inclusions. **Ann. of Bot.**, 57: 747-770.

- PERNOLLET, J.C. & MOSSÉ, J. 1983. Structure and location of legume and cereal seed storage proteins. In.: Dussant, J., Mossé, J. & Vaughan, 5.ed. **Seed proteins**. London. Academic Press, p. 155-191.
- POPINIGIS, F. 1985. **Fisiologia da Semente**. 2ed. Brasília. 289 p.
- REITZ, R.; KLEIN, R.M. & REIS, A. 1988. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre. Corag. 525p.
- ROBERTS, E. H. 1972b. Storage environment and the control of viability. In: ROBERTS, E.H. **Viability of Seeds**. London. Champman & Hall. p. 14-58.
- ROBERTS, E.H. 1972a. Introduction. In: ROBERTS, E.H. **Viability of Seeds**. London. Champman & Hall. p.10-13.
- ROBERTS, E.H. & KING, M.W. 1980. The characteristics of recalcitrant seeds. In: CHIN, H.F. & ROBERTS, E.H. **Recalcitrant Crop Seeds**. 1nd edition, Tropical Press SDN. BHD., Kuala Lumpur, Malaysia, pp. 1-5.
- ROBERTS, K. 1990. Structures at the plant cell surface. **Curr. Opinions Cell Biol.** 2: 920-928.
- ROSSETO, E.S. 1997. Comparação ultraestrutural entre folhas hidratadas e dessecadas de três espécies de Velloziaceae: duas revivescentes e uma sensível à dessecação. **Tese de Doutorado**, Unicamp, 88pp.

- SANCHOTENE, M.C.C. 1989. **Frutíferas Nativas Úteis à Fauna na Arborização Urbana**. Porto Alegre. Sagra. 306p.
- SCOTT Jr., T. A. & MELVIN, E. H. 1953. Determinaton of dextran with anthrone. **Anal. Chem.**, **25**: 1656-1661.
- SENO, M.S.; GOMES, L. & CORTELAZZO, A.L. 1996. Caracterização do material de reserva em feijão-guandu, lablabe e mucuna. **Bragantia**, **55(1)**: 57-65.
- SILVA, T.R. da; CORTELAZZO, A.L. ; DIETRICH, S.M.C. 1997. Cytological aspects of storage mobilization in seeds of *Dalbergia miscolobium* during germination and plantlet growth. **Ciec. Cult.** **49(3)**: 219-222.
- SILVA, T.R.G.; CORTELAZZO, A.L. & DIETRICH, S.M.C. 1998. Variations in storage compounds during germination and early plantlet growth of *Dalbergia miscolobium*. **Revta.brasil.Fisiol.Veg.**, **10**: 119-124.
- SLABAS, A.R.; DAVIES, C.; HELLYER, A.; MACKINTOSH, R.W.; SHELDEN, P.; HARDIE, D.G.; KERWICK, R.G.O. & SAFFORD, R. 1988. Molecular structure of fatty acid synthetizing enzymes from developing seeds of oil seed rape. In: PINFIELD, N. J. & STOBART, A. K. (Ed.). **Plant lipids: targets for manipulation**. London. Britsh Plant Growth Regulator Group, p.1-9.
- TOLEDO, F.F. de; & MARCOS FILHO, J. 1977. **Manual de Sementes: tecnologia e produção**. São Paulo. Ceres. 224p.

- VALIO, I.F.M. & FERREIRA Z.L. 1992. Germination of seeds of *Myrciaria cauliflora* (Mart.) Berg.(Myrtaceae). **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, 4(2): 95-98.
- VÁSQUEZ-YANES, C. & OROZCO-SEGOVIA, A.1993. Patterns of seed germination in the tropical rainforest. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, 24: 69-87.
- VIDAL, B.C. 1977. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell Mol. Biol.**, 22: 45-64.
- VIDAL, B.C. 1987. Métodos em Biologia Celular. IN: VIDAL, B. C. & MELLO, M.L.S.(Ed.). **Biologia Celular**. Rio de Janeiro. Atheneu p.5-39.
- von BÜLOW, J.F.W.; CARMONA, R. & PARENTE, T.V. 1994. Armazenamento e tratamento de sementes de Pitanga-vermelha-do-cerrado (*Eugenia calycina*). **Pesq. Agropec. Bras.**, 29(6): 961-970.

APÊNDICES

- Apêndice 1** - Análise da germinação de sementes de *E. uniflora*. Dados em valor angular, correspondente ao arco seno da raiz quadrada da porcentagem.
- Apêndice 2** - Análise da germinação de sementes de *C. xanthocarpa*. Dados em valor angular, correspondente ao arco seno da raiz quadrada da porcentagem.
- Apêndice 3** - Análise da variância para o conteúdo de açúcares livres, açúcares solúveis, amido e proteínas de sementes de *E. uniflora*.
- Apêndice 4** - Análise da variância da regressão polinomial para conteúdos de açúcares livres e açúcares solúveis de sementes de *E. uniflora*.
- Apêndice 5** - Análise da variância da regressão polinomial para quantidade de grãos de amido em células de cotilédones de sementes de *E. uniflora*.
- Apêndice 6** - Análise da variância da regressão polinomial para conteúdo de açúcares livres, açúcares solúveis, amido e proteínas de sementes de *C. xanthocarpa*.

Apêndice 1 – Análise da germinação de sementes de *E. uniflora*. Dados em valor angular, correspondente ao arco seno da raiz quadrada da porcentagem.

Repetição	Tratamentos (dias)						
	0	15	30	45	60	75	105
1	1,571	1,571	1,016	1,016	0,927	0,848	0,927
2	0,927	1,253	1,253	0,927	0,775	0,927	0,644
3	1,253	1,571	1,571	1,120	1,571	0,644	0,755
4	1,016	1,120	1,120	0,927	0,848	0,927	0,927
5	1,016	1,097	1,016	1,253	0,927	1,016	1,120
6	1,253	1,571	1,253	0,848	1,016	0,775	0,927
7	1,253	1,120	1,253	0,927	0,848	0,848	0,879
8	1,571	0,708	0,927	1,120	0,775	0,927	1,120
9	0,748	1,120	1,571	0,927	1,120	0,775	0,644
10	0,927	1,253	1,120	0,708	0,927	0,848	0,927
Média	1,154	1,238	1,210	0,977	0,974	0,854	0,889
Desvio Padrão	0,275	0,274	0,220	0,156	0,235	0,105	0,165

Apêndice 2 – Análise da germinação de sementes de *C. xanthocarpa*. Dados em valor angular, correspondente ao arco seno da raiz quadrada da porcentagem.

Repetição	Tratamentos (dias)				
	0	15	30	45	60
1	1,120	0,253	0,005	0,000	0,000
2	1,571	0,253	0,005	0,000	0,000
3	1,016	0,412	0,000	0,000	0,000
4	0,997	0,467	0,000	0,000	0,000
5	1,120	0,305	0,000	0,005	0,000
6	1,571	0,305	0,005	0,000	0,000
7	1,016	0,201	0,000	0,000	0,000
8	0,833	0,379	0,000	0,000	0,000
9	1,016	0,412	0,005	0,000	0,000
10	1,253	0,412	0,000	0,000	0,000
Média	1,151	0,340	0,002	0,001	0,000
Desvio Padrão	0,246	0,088	0,003	0,002	0,000

Apêndice 3 - Análise da variância para o conteúdo de açúcares livres (AL), açúcares solúveis (AS), amido (A) e proteínas (P) de sementes de *E. uniflora*.

Causas de variação	G.L	Q.M			
		AL	AS	A	P
Tempo (dias)	2	10 963,44 **	394,12 *	8840,11 ns	32,9929 n
Erro	6	214,78	70,52	2634,11	1121,0280
Total	8				
C.V.(%)		19,86	20,79	16,77	16,32

** $P < 0,01$ * $P < 0,05$ ns = não significativo

Apêndice 4 - Análise da variância da regressão polinomial para conteúdos de açúcares livres e açúcares solúveis de sementes de *E. uniflora*.

a) Açúcares livres

Causas de variação	Açúcares livres		
	GL	QM	F
Tempo (dias)	2	10 963,44	51,04 **
Regressão linear	1	21 227,62	98,83 **
Regressão quadrática	1	699,26	3,26 ns
Erro	6	214,78	
Total	8		

C.V.(%) 19,86

**P < 0,01 ns = não significativo

b) Açúcares solúveis

Causas de variação	Açúcares solúveis		
	GL	QM	F
Tempo (dias)	2	394,123	5,59 *
Regressão linear	1	783,576	11,11 *
Regressão quadrática	1	4,670	0,07 ns
Erro	6	70,515	
Total	8		

C.V.(%) 20,79

*P < 0,05 ns = não significativo

Apêndice 5 - Análise da variância da regressão polinomial para quantidade de grãos de amido em células de cotilédones de sementes de *E. uniflora*.

Causas de variação	Grãos de amido		
	GL	QM	F
Tempo (dias)	4	12,189	34,39 *
Regressão linear	1	36,095	101,86 *
Regressão quadrática	1	9,756	27,53 *
Erro	20	0,354	
Total	24		

C.V.(%) = 5,55
* P<0,05

Apêndice 6 - Análise da variância para o conteúdo de açúcares livres (AL), açúcares solúveis (AS), amido (A) e proteínas (P) de sementes de *C. xanthocarpa*.

Causas de variação	G.L	Q.M			
		AL	AS	A	P
Tempo (dias)	1	2 816,67ns	574,28 **	73,50ns	2 301,0895ns
Erro	4	490,17	3,11	34,83	714,5593
Total	5				

C.V.(%) 20,82 8,05 13,07 6,82

** P< 0,01 ns = não significativo