

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**BASES FISIOLÓGICAS
PARA A CONSERVAÇÃO A LONGO PRAZO
DE SEMENTES DE *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze**

Daniela Cleide Azevedo de Abreu

Bióloga

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Maio de 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**BASES FISIOLÓGICAS
PARA A CONSERVAÇÃO A LONGO PRAZO DE SEMENTES
DE *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze**

Daniela Cleide Azevedo de Abreu

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Souza Medeiros

Co-orientador: Prof. Dr. Ivor Bergemann de Aguiar

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção e Tecnologia de Sementes).

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Maio de 2009

A162b Abreu, Daniela Cleide Azevedo de
Bases fisiológicas para a conservação a longo prazo de sementes
Cariniana legalis (Mart.) O. Kuntze / Daniela Cleide Azevedo de
Abreu. -- Jaboticabal, 2009
ix, 80 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009

Orientador: Antonio Carlos de Souza Medeiros

Banca examinadora: Antonio Carlos Nogueira, Claudio José
Barbedo, Rinaldo Cesar de Paula, Teresinha de Jesus Deléo
Rodrigues

Bibliografia

1. Sementes florestais. 2. jequetibá-rosa. 3. Armazenamento. 4.
soluções salinas saturadas. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.531:634.0.2

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

DANIELA CLEIDE AZEVEDO DE ABREU - Nasceu em Curitiba, em 13 de janeiro de 1974. Concluiu o ensino médio na Escola Técnica da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em 1992. cursou a Graduação em Biologia nas Faculdades Integradas Espírita (FACIBEM), com colação de grau em 2000. Foi bolsista de Iniciação Científica do Banco de Sementes Florestais (BASEMFLO), do Laboratório de Análise de Sementes da Embrapa Florestas, nos anos de 1999 e 2000. cursou o Mestrado em Engenharia Florestal na Universidade Federal do Paraná (UFPR) como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), na Área de Concentração em Silvicultura, concluído em 2002. Foi estagiária de Pós-Graduação no período de 2000 a 2008 no BASEMFLO. A partir de agosto de 2004, cursou o Doutorado em Agronomia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal – São Paulo, na Área de Produção e Tecnologia de Sementes, também como bolsista da CAPES. Desde março de 2008, é professora responsável pelas Disciplinas de Sementes Florestais e de Produção e Tecnologia de Sementes, dos Cursos de Graduação em Engenharia Florestal e Agronomia, respectivamente, da Universidade Estadual de Goiás, Unidade Universitária de Ipameri.

"Se não puder se destacar pelo talento, vença pelo esforço."
(Dave Weinbaum)

*Aos meus pais
Esni e Celso (in memoriam)
pelo amor eterno*

*Aos meus avós
Maria (vó Neuza in memoriam) e
João (vô Zuza)
pelo exemplo de vida e sabedoria.*

DEDICO

*Aos meus irmãos
Fabiana e Celsinho*

*À minha madrinha
Lidia
Pelos seus cuidados
e incentivos para seguir em frente*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- a DEUS, pela vida;
- ao Dr. ANTONIO CARLOS DE SOUZA MEDEIROS, pela valiosa orientação, ensinamento, incentivo e confiança em meu trabalho, merecedor do meu respeito, a quem serei eternamente grata;
- ao Prof. Dr. IVOR BERGEMANN DE AGUIAR, pela co-orientação, credibilidade, dedicação e zelo dispensados à realização deste trabalho, minha admiração;
- ao Prof. Dr. DAVID ARIIVALDO BANZATTO, pela co-orientação nas análises estatísticas, sugestões e correções deste trabalho, presteza e amizade;
- à FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS (FCAV/UNESP) de Jaboticabal, pela oportunidade oferecida para cursar o doutorado;
- à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;
- ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo material adquirido com os recursos do Adicional de Bancada da Bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida ao co-orientador;
- à Profa. Dra. TERESINHA DE JESUS DELÉO RODRIGUES pela amizade, bondade e colaboração, principalmente na disponibilização do espaço físico necessário para a realização deste trabalho;
- ao Prof. Dr. RINALDO CESAR DE PAULA, pelo apoio e permissão para a utilização de seu laboratório, que possibilitou a realização dos experimentos;
- aos professores da FCAV/UNESP pela transmissão de seus conhecimentos, em especial aos professores RUBENS SADER, ROBERVAL DAITON VIEIRA, JAIME MAIA SANTOS, NELSON MOREIRA DE CARVALHO e KATHIA PIVETTA;
- à minha FAMÍLIA, pelo apoio e paciência;
- às minhas duas irmãs do coração, DANIELA SARTI e MARCIA SOUSA, pela convivência e amizade verdadeira;
- aos queridos amigos RICARDO PIMENTA, VALDECI, CRISTIAN, FABIANA, ÉRICA, MARCELO MARCHI, CLÁUDIA DEMÉTRIO, PRISCILLA, MICHELE, LILIAM,

ADRIANA, ROSE, EDU e a minha prima FLÁVIA, pelo carinho e momentos compartilhados;

- à Sr^a. MARIA HELENA DUTRA DE AGUIAR pela bondade, sempre gentil com suas palavras de conforto e colaboração demonstrados em qualquer situação;

- à EMBRAPA FLORESTAS, pelos estágios concedidos;

- aos pesquisadores da EMBRAPA FLORESTAS, Dr. ÀLVARO FIGUEREDO DOS SANTOS do Laboratório de Fitopatologia e Dr. LEORNARDO FERREIRA DUTRA do Laboratório de Cultura de Tecidos, pela amizade, apoio e presteza;

- aos funcionários da EMBRAPA FLORESTAS, em especial aos químicos MARIA LÚCIA FERREIRA SIMEONE e FABRÍCIO AUGUSTO HANSEL, ao técnico do Laboratório de Sementes Florestais ADILSON TOMASHITZ e às bibliotecárias LIDIA WORONKOFF e ELIZABETH CÂMARA TREVISAN, pela incontestável amizade e presteza sempre que solicitado;

- à ALCAN EMBALAGENS DO BRASIL LTDA., pelo fornecimento das lâminas utilizadas na confecção das embalagens impermeáveis para a condução dos experimentos de armazenamento;

- ao Engenheiro do Instituto Florestal de São Paulo HONÓRIO CARLOS FACHIN, responsável pelas Estações Experimentais de Araraquara e de Mogi-Guaçu, pela coleta dos frutos;

- às secretárias NÁDIA LYNN OLIVEIRA, MARIANGELA DE GENÇO CORREA LACERDA e MARISA COGA, pela paciência e colaboração;

- aos Técnicos da FCAV/UNESP, LAZARO, GERALDO, MAURO, NÉIA e JAMIL, pela colaboração sempre que necessário;

- aos funcionários da FCAV/UNESP, NICE, LUIZ, ALDO, LUCINDA e WAGNER, por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável;

- às funcionárias da SEÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO, pela atenção no atendimento;

- às bibliotecárias da FCAV/UNESP pela confecção da ficha catalográfica;

- aos membros da COMISSÃO EXAMINADORA, pela análise da tese e sugestões apresentadas;

- a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	x
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Características da espécie estudada.....	4
2.2. Isotermas de sorção de água.....	5
2.3. Comportamento fisiológico das sementes em relação ao armazenamento.....	8
2.4. Efeitos da secagem na viabilidade das sementes durante o armazenamento.....	9
2.5. Efeitos da baixa temperatura na viabilidade das sementes durante o armazenamento.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Colheita dos frutos, extração e beneficiamento das sementes.....	16
3.2. Isoterma de sorção de água.....	17
3.3. Reidratação lenta.....	19
3.4. Avaliações.....	20
3.4.1. Teor de água.....	20
3.4.2. Germinação.....	20
3.4.3. Condutividade elétrica.....	22
3.4.4. Viabilidade.....	22
3.5. Armazenamento.....	24
3.6. Delineamento experimental.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Qualidade inicial das sementes.....	26
4.2. Isoterma de sorção de água.....	27
4.3. Reidratação lenta.....	32
4.4. Efeito imediato da desidratação e hidratação.....	33
4.5. Armazenamento das sementes.....	36
4.5.1. Resultados após 30 dias de armazenamento.....	37
4.5.2. Resultados após 180 dias de armazenamento.....	43
4.5.3. Resultados após 360 dias de armazenamento.....	49
4.6. Comportamento das sementes durante o armazenamento.....	56
5. CONCLUSÕES	67
6. REFERÊNCIAS	68

**BASES FISIOLÓGICAS
PARA A CONSERVAÇÃO A LONGO PRAZO
DE SEMENTES DE *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze**

RESUMO - É essencial conhecer o comportamento fisiológico das sementes, para que se possa definir a técnica apropriada para o armazenamento seguro. Contudo, um dos principais problemas é a falta de informações precisas sobre esse assunto, para muitas espécies florestais nativas do Brasil. O teor de água das sementes e a temperatura do ambiente de armazenamento são fatores decisivos para a conservação da qualidade fisiológica das sementes. Este trabalho teve como objetivo geral estudar a possibilidade de conservar as sementes de *Cariniana legalis* a longo prazo, com vistas ao armazenamento em bancos de germoplasma. Os objetivos específicos foram: (a) estudar a tolerância das sementes à desidratação e hidratação com o uso de soluções salinas saturadas; (b) classificar o comportamento fisiológico das sementes em relação ao armazenamento e (c) avaliar a qualidade fisiológica das sementes armazenadas com diferentes teores de água durante 360 dias em freezer (-20°C) e em nitrogênio líquido (-196°C). Concluiu-se que (a) a construção da isoterma de sorção com soluções salinas saturadas foi eficiente para determinar diferentes teores de água de equilíbrio; (b) as sementes toleram a desidratação e suportam temperaturas inferiores a zero, apresentando comportamento ortodoxo; (c) o teor de água mais adequado para o armazenamento das sementes no freezer e no nitrogênio líquido foi de 3,7%; (d) as sementes armazenadas com esse teor de água se conservaram melhor no nitrogênio líquido; (e) a criopreservação das sementes desidratadas evidenciou a possibilidade de armazenar a longo prazo as sementes de *C. legalis* em bancos de germoplasma.

Palavras-Chave: jequetibá-rosa, armazenamento, criopreservação, semente florestal, soluções salinas saturadas, teor de água.

**PHYSIOLOGICAL BASES
FOR LONG-TERM PRESERVATION OF
Cariniana legalis (MART.) O. KUNTZE SEEDS**

SUMMARY – The understanding of the physiological behavior of seeds is essential to define the appropriated safe storage technique. However, one of the main problems, for many Brazilian native forest species, is the lack of accurate information about this issue. The seeds moisture content and storage temperature are crucial factors for the preservation of the physiological quality of the seeds. The general objective of the present work was to study the possibility of a long term conservation of *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze seeds, in a germplasm bank. The specific objectives were: (a) study the seeds tolerance to dehydration and hydration using saturated saline solutions; (b) classify the physiological behavior of the seeds regarding the storage and (c) evaluate the physiological quality of the seeds with different moisture contents for 360 days in freezer (-20°C) and liquid nitrogen (-196°C). The results showed that (a) the construction of the isotherm sorption with saturated saline solutions was efficient to determine different levels of water balance; (b) seeds tolerate dehydration and negative temperature, presenting an orthodox behavior; (c) the most suitable moisture content for seed storage in freezer and liquid nitrogen was of 3,7% (d) the seeds stored with this moisture content were better preserved in liquid nitrogen; (e) the cryopreservation of *C. legalis* dried seeds showed the possibility of long-term storage in germplasm banks.

Keywords: jequetibá-rosa, storage, cryopreservation, forest seed, saturated saline solutions, moisture content.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui a flora mais rica em espécies do mundo; porém, os remanescentes florestais encontram-se drasticamente perturbados, devido à exploração descontrolada executada pelo homem nas últimas décadas. O desaparecimento das espécies vegetais, em sua área de ocorrência, impossibilita a regeneração natural e a sobrevivência de futuras gerações, causando sérios problemas ambientais. Algumas alternativas para amenizar essa situação são a colheita e o armazenamento adequado das sementes, visando o reflorestamento de áreas devastadas.

Com o armazenamento adequado, é possível conservar as sementes das espécies ainda remanescentes em bancos ativos de germoplasma, preservando os recursos genéticos e proporcionando sustentabilidade aos programas de recuperação dos ecossistemas degradados. Para que essa prática seja adotada, é necessária a disponibilidade de sementes com boa qualidade, especialmente no aspecto fisiológico, bem como o conhecimento do comportamento fisiológico das sementes em relação ao armazenamento. Entretanto, um dos principais problemas é a falta de informações precisas sobre esse assunto, para muitas espécies florestais nativas do Brasil.

ROBERTS (1973) inicialmente classificou as sementes quanto ao comportamento fisiológico durante o armazenamento em duas categorias: recalcitrantes e ortodoxas. Sementes recalcitrantes são aquelas que não podem ser desidratadas abaixo de um teor de água relativamente elevado (12 a 31%) e não suportam o armazenamento em baixa temperatura, na qual ocorrem danos fisiológicos. Sementes ortodoxas são aquelas que podem ser desidratadas a baixo teor de água (2 a 5%), podendo permanecer armazenadas em temperatura baixa sem serem fisiologicamente danificadas. Posteriormente, ELLIS et al. (1990, 1991a, 1991b) verificaram que sementes de algumas espécies apresentam comportamento fisiológico que não se enquadra no grupo das recalcitrantes nem no das ortodoxas, sugerindo uma terceira categoria. Essas sementes foram classificadas como intermediárias, que podem ser desidratadas até 8 a 11% de água e armazenadas a médio prazo, geralmente em temperatura superior a zero grau.

Dessa forma, o teor de água das sementes e a temperatura do ambiente de armazenamento são fatores decisivos para a conservação da qualidade fisiológica das sementes. HONG & ELLIS (1996) salientaram que, para definir o comportamento das sementes para fins de armazenamento, é fundamental estudar a tolerância à dessecação e à temperatura inferior a zero.

O uso de soluções salinas saturadas permite estudar as relações entre a umidade relativa do ar, a temperatura e o grau de umidade de equilíbrio das sementes, bem como construir as isotermas de sorção (relação entre a umidade relativa do ar e o grau de umidade das sementes, em determinada temperatura), estudar a tolerância das sementes à desidratação, classificar as sementes quanto ao comportamento fisiológico durante o armazenamento, definir o nível crítico de água das sementes com vistas ao armazenamento em diferentes temperaturas, verificar como a longevidade é afetada pela retirada de água das sementes e estudar a deterioração controlada das sementes (MEDEIROS, 2006). Contudo, são escassos os trabalhos de pesquisa desenvolvidos com espécies arbóreas nativas do Brasil utilizando soluções salinas saturadas.

A criopreservação, ou seja, o armazenamento em nitrogênio líquido a -196°C , oferece potencial para a conservação de sementes de determinadas espécies, sem limite de tempo (KARTHA, 1985). Nessa temperatura, os processos metabólicos das sementes estariam essencialmente reduzidos e as fontes de deterioração imensamente diminuídas ou até cessadas, sugerindo uma preservação “infinita”. Nas condições convencionais de conservação a longo prazo (teor de água das sementes de 4 a 6% e temperatura de armazenamento de -18°C), o metabolismo ainda ocorre e a viabilidade pode ser comprometida (STANWOOD & BASS, 1981). No entanto, para adotar a criopreservação, é necessário avaliar a resposta fisiológica das sementes à desidratação, uma vez que o conteúdo de água é o fator mais crítico relacionado com o armazenamento em nitrogênio líquido (STANWOOD, 1980).

Outro fator que afeta a conservação das sementes é a sua composição química. Devido à instabilidade química dos lipídios, as sementes lipídicas se deterioram mais rapidamente do que as amiláceas e protéicas (HARRINGTON, 1972). HU et al. (1998) constataram uma relação inversa entre o teor de água de equilíbrio após a desidratação

e o teor de lipídios existente nas sementes, já relatado anteriormente por VERTUCCI & ROOS (1990).

A desidratação está envolvida com os tipos de água existente nas sementes, que são identificados com base no potencial hídrico e no modo de ligação da água com as macromoléculas (VERTUCCI, 1993; VERTUCCI & FARRANT, 1995). Durante a desidratação pode haver danos nas membranas celulares das sementes (BERJAK & PAMMENTER, 2000).

A Floresta Atlântica é um dos ecossistemas com maior biodiversidade do planeta e entre as espécies arbóreas que ocorrem nesse bioma, merece atenção *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze (jequetibá-rosa), pelo elevado potencial de uso na recuperação de áreas cujos ecossistemas estejam degradados, além de ser importante planta medicinal (LORENZI, 2002). Embora esteja ameaçada de extinção (IUCN, 2008), na literatura as informações sobre o armazenamento de suas sementes são escassas.

Este trabalho teve como objetivo geral estudar a possibilidade de conservar as sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze a longo prazo, com vistas ao armazenamento em banco de germoplasma. Entre os objetivos específicos, foi estudar a tolerância das sementes à desidratação e hidratação com o uso de soluções salinas saturadas; classificar o comportamento fisiológico das sementes em relação ao armazenamento; e avaliar a qualidade fisiológica das sementes com diferentes teores de água, armazenadas durante 360 dias em freezer (-20°C) e em nitrogênio líquido (-196°C).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características da espécie estudada

Cariniana legalis (Martius) O. Kuntze é uma espécie arbórea pertencente à família Lecythidaceae, com distribuição geográfica restrita ao litoral da região nordeste do Brasil e aos estados de São Paulo e Minas Gerais (CARVALHO, 2005). Árvore símbolo do estado de São Paulo ocorre nas baixadas e encostas úmidas, em pequenos grupos, no estrato superior da Floresta Ombrófila Densa, na formação Baixo-Montana e na Floresta Estacional Semidecidual (NOGUEIRA, 1977; CARVALHO, 2005). A árvore é semicaducifólia e possui tronco reto, com fuste de até 50 m de altura e diâmetro à altura do peito de até 1 m, e copa em forma de guarda-chuva (RIZZINI, 1978; REITZ, 1981).

Segundo CARVALHO (2005), no estado de São Paulo o florescimento ocorre de dezembro a março e os frutos amadurecem de maio a outubro. O processo reprodutivo se inicia em torno de 20 anos de idade, em plantios. O fruto é um pixídio capsular alongado e lenhoso, com aproximadamente 7,0 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro, encimado por um opérculo com abertura íntegra e circular (BELTRATI et al., 1982). De acordo com BARROSO et al. (1999), os frutos classificados como pixídios se caracterizam pela deiscência transversal, com a formação de uma urna e um opérculo. Segundo GONÇALVES & LORENZI (2007), pixídio é o termo que designa um fruto seco que se abre transversalmente na extremidade, separando uma “tampa” apical (opérculo) do restante do fruto (ânfora).

A coleta deve ser realizada quando os frutos mudam para a coloração castanha e iniciam a abertura espontânea do opérculo; em cada fruto encontram-se de 10 a 15 sementes aladas de até 3,0 cm de comprimento, com núcleo seminal basal (BELTRATI et al., 1999; LORENZI, 2002; CARVALHO, 2005). Após a coleta, recomenda-se deixar os frutos expostos ao sol em ambiente ventilado, para a complementação da sua abertura, e bater os frutos para a liberação das sementes. Para fins de semeadura, é recomendada a retirada da ala das sementes (LORENZI, 2002; CARVALHO, 2005).

Sua madeira é moderadamente pesada, possui superfície lustrosa e ligeiramente áspera ao tato, baixa resistência ao ataque de organismos xilófagos, quando expostas a condições adversas. A madeira é usada em carpintaria, marcenaria, tabuados em geral, artigos escolares, cabos de vassoura, compensados, laminados, celulose e papel. Da casca se extrai a resina, o tanino, que tem grande poder desinfetante, sendo muito usado na medicina popular, contra as afecções da boca, inflamação da garganta, amigdalites e faringites. Suas flores apresentam potencial apícola e suas sementes são usadas na dieta de animais e a espécie é útil para plantios mistos (LORENZI, 2002; CARVALHO, 2005).

Entre os grupos ecológicos, a espécie é classificada por FERRETTI et al. (1995) e CARVALHO (2005) como secundária tardia. Segundo PIÑA-RODRIGUES et al. (1990) e KAGEYAMA & VIANA (1991), as sementes das espécies secundárias tardias ou oportunistas geralmente não apresentam dificuldades para a germinação e não são afetadas, dentro da faixa adequada, por fatores como temperatura, luz e umidade do substrato.

Essa espécie está na lista oficial da flora brasileira ameaçada de extinção, categoria vulnerável, em decorrência da exploração desordenada sem plantios de reposição (IUCN, 2008). Contudo, são escassas as informações na literatura sobre o armazenamento de suas sementes.

2.2. Isotermas de sorção de água

O estudo de sorção de água por substâncias sólidas, como as sementes, é realizado por meio de isotermas. Como todo material higroscópico, as sementes cedem ou absorvem água do ar que as envolve. Se a pressão de vapor d'água contida na semente for menor que a do ar, ocorre a absorção de água (adsorção) e, no caso inverso, a semente cede água para o ar (dessorção). Quando a pressão da água da superfície da semente se iguala à pressão de vapor do ar ambiente, obtém-se a umidade de equilíbrio (NELLIST & HUGHES, 1973).

A curva de sorção é uma isoterma que descreve a quantidade de água adsorvida ou dessorvida por uma substância, estabelecendo-se uma função de equilíbrio entre a pressão de vapor e a atividade da água ou umidade relativa de equilíbrio (PALACIN et al., 2005). Por serem higroscópicas, as sementes apresentam comportamento diferenciado nas isotermas de sorção (FANTINATTI et al., 2005).

Foram descritos cinco tipos de água que podem estar presentes nas sementes e os intervalos correspondentes de potencial hídrico e teor de água, conforme a mobilidade da molécula e as propriedades termodinâmicas da água (VERTUCCI & FARRANT, 1995). MARCOS FILHO (2005) descreve que a água classificada como tipo 1 é encontrada em sementes muito secas (teor de água inferior a 7,5% e potencial hídrico inferior a -150 MPa), onde a atividade metabólica é restrita e a sua remoção pode causar deterioração nos tecidos. A água do tipo 2 (teor de água das sementes de 7,5% a 20% e potencial hídrico de -11 a -150 MPa) tem função de solvente, porém, apresenta-se ainda como água não congelável dentro do tecido. A partir da água tipo 3 (sementes com 20% a 33% de água e potencial hídrico de -4 a -11 MPa), a atividade fisiológica das sementes começa a se alterar de forma prejudicial. A água do tipo 4 (33% a 41% de água e potencial hídrico de -2 a -4 MPa) proporciona características de solução concentrada e nessa condição a germinação já pode ter início. A água do tipo 5 (teor de água superior a 41% e potencial hídrico inferior a -1,5 MPa) apresenta característica de uma solução diluída e o processo germinativo ocorre somente na presença desse tipo de água.

Portanto, o conhecimento de isotermas de umidade de equilíbrio higroscópico das sementes é essencial, por estarem diretamente ligadas principalmente às técnicas de secagem e armazenamento (ROA & ROSSI, 1977).

O teor de água de equilíbrio estabelece parâmetros (temperatura e umidade relativa do ar) que determinam em que nível as sementes podem ser desidratadas e armazenadas com segurança (MESQUITA et al., 2001). A partir de experimentos nos quais amostras de sementes são submetidas a diferentes umidades relativas, torna-se possível a construção de isotermas de sorção, demonstrando a quantidade de água adsorvida ou dessorvida em cada umidade relativa do ar, sob determinada temperatura.

As umidades relativas do ar constantes são obtidas normalmente por meio do uso de soluções de ácido sulfúrico em diferentes concentrações (McMIN et al., 2005) ou pelo uso de soluções salinas saturadas preparadas com diferentes sais (MERRIT et al., 2003; MEDEIROS, 2006).

Pesquisas com soluções salinas saturadas podem ser conduzidos para determinar as relações entre a umidade relativa do ar, a temperatura e o grau de umidade de equilíbrio das sementes e o estabelecimento de isotermas (umidade relativa do ar *versus* grau de umidade das sementes, sob determinada temperatura), conforme VERTUCCI & ROOS (1990), VERTUCCI et al. (1994), WALTERS (1998), WALTERS et al. (1998) e EIRA et al. (1999). Podem também definir o nível crítico de água das sementes com vistas ao armazenamento em diferentes temperaturas (VERTUCCI et al., 1994; WALTERS et al., 1998), mostrar como a longevidade é afetada pela retirada de água das sementes, abaixo de valores considerados críticos (WALTERS & ENGELS, 1998) e possibilitar estudos de deterioração controlada das sementes (MEDEIROS et al., 1998).

VERTUCCI & ROOS (1990) e WALTERS-VERTUCCI & ROOS (1995) relataram que a temperatura e o conteúdo de água com que as sementes são armazenadas constituem importante determinante para a sua longevidade. Os autores consideraram a função da água no envelhecimento das sementes em termos termodinâmicos e chegaram à conclusão de que existe um nível ótimo de água para a sua conservação.

O uso de soluções salinas saturadas pode se constituir em ótima técnica para a identificação do ponto crítico de água de sementes de espécies arbóreas, para fins de armazenamento em bancos de germoplasma. Essa técnica permite, ainda, a caracterização fisiológica em relação ao armazenamento, estudando-se a tolerância da semente à desidratação e os danos decorrentes da secagem (MEDEIROS, 2006). Contudo, ainda são poucas as pesquisas realizadas com sementes de espécies nativas do Brasil, utilizando essa técnica. Nesse sentido, ABREU & MEDEIROS (2005a) submeteram sementes de *Sebastiania commersoniana* com teor de água inicial de 8,5% a soluções preparadas com cinco sais. As sementes alcançaram teores de água de 2,3 a 17,3%, mantendo a germinação com 96% durante o armazenamento. Da

mesma forma, ABREU & MEDEIROS (2005b) submeteram sementes de *Miconia cabucu* com teor de água inicial de 12,5% a soluções preparadas com seis sais e obtiveram teores de água entre 6,4 e 16,5%, mantendo alta porcentagem de germinação. Ambas as espécies apresentaram comportamento ortodoxo e o período de armazenamento foi de um ano.

2.3. Comportamento fisiológico das sementes em relação ao armazenamento

Entre os fatores de fundamental importância no controle da longevidade das sementes estão a água, a temperatura e o oxigênio (ROBERTS & ELLIS, 1989). A água assume importante papel na formação e na maturação das sementes, de tal modo que as modificações no conteúdo de água podem definir o comportamento das sementes tanto no que se refere à conservação quanto à germinação (BARBEDO & MARCOS-FILHO, 1998).

ROBERTS (1973) inicialmente classificou as sementes, quanto ao comportamento fisiológico durante o armazenamento, em duas categorias: recalcitrantes e ortodoxas. Sementes recalcitrantes são aquelas que não podem ser desidratadas abaixo de um teor de água relativamente elevado (12 a 31%) e não suportam o armazenamento em baixa temperatura, sem que ocorram danos fisiológicos. Sementes ortodoxas são aquelas que podem ser desidratadas a baixo teor de água (2 a 5%), podendo permanecer armazenadas em temperatura baixa, sem serem fisiologicamente danificadas. Posteriormente, ELLIS et al. (1990, 1991a, 1991b) verificaram que sementes de algumas espécies apresentam comportamento fisiológico que não se enquadra no grupo das recalcitrantes nem no das ortodoxas, sugerindo uma terceira categoria. Essas sementes foram classificadas como intermediárias, que podem ser desidratadas até 8 a 11% de água e armazenadas a médio prazo, geralmente em temperatura superior a 0°C.

As sementes foram classificadas por STANWOOD (1980) em relação ao armazenamento, usando a criopreservação, em três categorias: ortodoxas resistentes ao congelamento (as sementes não são danificadas pelo congelamento), ortodoxas

sensíveis ao congelamento (as sementes são danificadas pelo congelamento) e recalitrantes (as sementes são danificadas pela secagem e pelo congelamento).

De acordo com HONG & ELLIS (1996), para classificar as sementes quanto ao comportamento fisiológico durante o armazenamento, é imprescindível estudar a tolerância à dessecação e à temperatura inferior a 0°C.

2.4. Efeitos da secagem na viabilidade das sementes durante o armazenamento

Quando as sementes são armazenadas com conteúdo de água acima do desejado, ocorre a elevação da taxa respiratória, liberando energia através do esgotamento das substâncias de reserva. Essa energia liberada poderá faltar quando as sementes necessitarem dela para o processo de germinação (TOLEDO & MARCOS FILHO, 1977). Dessa forma, as sementes devem ser submetidas à secagem antes do armazenamento.

Em trabalhos de pesquisa desenvolvidos com o objetivo de desidratar sementes de espécies florestais nativas do Brasil, avaliar a tolerância à desidratação e o posterior armazenamento, comumente foram empregados métodos adequados, como os de câmara seca e de sílica gel.

A desorganização do sistema de membranas é a primeira consequência de danos térmicos (DANIEL et al., 1969). De acordo com POPINIGIS (1985), o uso da temperatura elevada na secagem em estufa muitas vezes causa a redução imediata no vigor das sementes, enquanto a diminuição na capacidade germinativa se manifesta apenas durante o armazenamento.

Em tecidos hidratados, a água é fundamental como solvente para diversas reações químico-enzimáticas realizadas em membranas celulares, as quais são essenciais à manutenção da sua estrutura macromolecular (VERTUCCI & LEOPOLD, 1987). Sementes de muitas espécies tropicais apresentam a estabilidade das membranas celulares comprometida ao sofrerem o processo de dessecação, liberando o conteúdo intracelular (compostos fenólicos e oxidases fenólicas) que, após oxidação,

acarreta a formação de complexos de proteína/fenol, com conseqüente perda da atividade enzimática (Loomis & Battaile, 1966, citados por CHIN, 1988).

Considerando que as sementes possuem água livre, facilmente removida por meio da secagem, e água de constituição, fortemente associada às macromoléculas, a desidratação acentuada das sementes recalcitrantes ocasiona não só a água livre, mas parte da água de constituição, resultando na perda da estabilidade dos componentes subcelulares, inclusive membranas. Isto levaria à perda de integridade do plasmalema, tonoplasto e outras membranas e, conseqüentemente, à perda da viabilidade das sementes (BERJAK et al., 1984).

Baseado na hipótese de que as sementes sensíveis à dessecação são incapazes de reorganizar o sistema de membranas durante a embebição, ao contrário das sementes tolerantes à dessecação, BECWAR et al. (1982) realizaram pesquisas sobre os mecanismos de deterioração possivelmente associados à liberação de exsudatos em sementes de *Acer saccharium* e *Chysalidocarpus lutescens*. Esses autores observaram aumento na liberação de exsudatos quando o teor de água das sementes de *A. saccharium* foi reduzido de 45% para 35%, com conseqüente redução na porcentagem de germinação de 97% para 5%. As membranas dos tecidos de sementes sensíveis à dessecação foram danificadas pela desidratação quando o conteúdo de água atingiu valor crítico de 55% em embriões de *Chysalidocarpus lutescens*, contribuindo para a perda da viabilidade.

Para a avaliação da integridade das membranas, podem ser utilizados alguns métodos como o teste de condutividade elétrica (MARCHI & CÍCERO, 2002). O fluxo de eletrólitos indica o nível de retenção de solutos pela membrana (Simon & Raja-Harum, 1974, citados por BILIA, 1997). Baixos níveis de liberação de solutos caracterizam a semipermeabilidade natural das membranas, enquanto altos níveis sugerem a existência de danos nas membranas (BECWAR et al., 1982). OLIVEIRA & VALIO (1994) observaram correlação negativa entre a germinação e o fluxo de eletrólitos e substâncias orgânicas, tanto para sementes como para embriões de *Hancornia speciosa*, e sugeriram que a perda da viabilidade dessas sementes durante o

armazenamento pode ser causada por danos nas membranas celulares, como resultado da desidratação.

LEPRINCE et al. (1993) relataram que estudos ultra-estruturais dos tecidos após a dessecação têm revelado que as membranas celulares são um dos primeiros sítios a sofrer injúrias, causando alterações na integridade estrutural e funcional das membranas. Estudos de ultra-estrutura, conduzidos nos últimos anos, contribuíram para a compreensão das diferentes respostas à secagem apresentadas por sementes recalcitrantes e ortodoxas. As membranas das organelas celulares, o citoesqueleto e o núcleo esquelético são essenciais para o perfeito funcionamento da célula e danos a essas estruturas, durante a secagem, podem levar à perda de viabilidade (BERJAK & PAMMENTER, 2000).

2.5. Efeitos da baixa temperatura na viabilidade das sementes durante o armazenamento

Além do conteúdo de água, a temperatura é outro fator muito importante na preservação da viabilidade das sementes durante o armazenamento. O Internacional Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) foi fundado em 1974 e uma de suas primeiras providências foi recomendar, para a conservação de recursos genéticos a longo prazo, o acondicionamento de sementes ortodoxas com teor de água de 4 a 6% em embalagem hermética e armazenamento na temperatura de -18°C ou menos. Posteriormente, a Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO) e o International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) decidiram ampliar essa faixa para 3 a 7% de água, com base em pesquisa desenvolvida com maior número de espécies (ELLIS et al., 1996).

De acordo com MEDEIROS (1996) e MEDEIROS et al. (1998), alguns estudos já foram desenvolvidos com o objetivo de identificar a melhor temperatura para o armazenamento de sementes. Em um deles, foi observado que as sementes ortodoxas são, comumente, acondicionadas em embalagem hermética e conservadas a longo prazo em bancos de germoplasma, em câmaras com temperatura de -18°C ou -20°C .

Vêm, também, sendo conservadas em botijões com nitrogênio líquido a -196°C , com o objetivo de prolongar ainda mais sua longevidade (EIRA, 1996).

Nas últimas décadas, diferentes métodos foram propostos para a conservação a longo prazo de sementes recalcitrantes, mas todos eles apresentam uma série de problemas. Na melhor das hipóteses, as sementes recalcitrantes podem ser armazenadas pelo período máximo de um ano, de modo que a sua conservação em banco de germoplasma é impraticável (EIRA, 1996). Contudo, sementes de *Hevea brasiliensis*, classificadas como recalcitrantes, apresentaram de 20 a 69% de sobrevivência quando seus embriões foram desidratados para 14 a 20% de água e armazenados em nitrogênio líquido (NORMAH et al., 1986). Para as espécies cujas sementes apresentam características intermediárias, ainda vêm sendo realizados estudos que visam o desenvolvimento de protocolos para a sua conservação.

Mesmo para sementes tolerantes à dessecação, um valor ótimo de conteúdo de água deve ser atingido antes do congelamento. Se o conteúdo de água for muito alto, formam-se cristais de gelo à medida que a temperatura se torna inferior a 0°C , causando danos letais às sementes (ROBERTS, 1973). Portanto, existe um limite de água para o congelamento, acima do qual ocorre a redução da viabilidade das sementes durante os processos de congelamento e descongelamento. Esse limite deve, também, ser considerado quando o armazenamento é realizado em nitrogênio líquido (STANWOOD, 1985). Sementes de *Astronium urundeuva* são ortodoxas e por isso podem ser desidratadas até 6% para serem imersas diretamente em nitrogênio líquido, e conservadas pelo método de criopreservação (MEDEIROS et al., 1992).

Estudando os efeitos do teor de água das sementes de *Ulmus carpinifolia* e de *Terminalia brassii* e da temperatura de armazenamento na viabilidade, TOMPSETT (1986) verificou não haver diferença aparente para as sementes de *U. carpinifolia* armazenadas a -13°C e a -75°C , quando o teor de água era constante. Observou, ainda, haver pouca evidência em relação à qualidade das sementes, quando utilizou temperatura inferior a -20°C . Comportamento semelhante já havia sido constatado por HARRISON & CARPENTER (1977) em sementes de cebola, quando a temperatura de -20°C foi comparada com a do nitrogênio líquido.

DICKIE et al. (1991), trabalhando com espécies do gênero *Acer*, verificaram que as sementes apresentaram comportamento fisiológico diferenciado, pois as de *A. pseudoplatanos* se enquadraram na classe das recalcitrantes, enquanto as de *A. platanoides* revelaram-se tipicamente ortodoxas. HONG & ELLIS (1992) armazenaram com sucesso as sementes de *A. platanoides* a -20°C por nove meses, sem redução da germinação.

ELLIS et al. (1991a) estudaram o efeito da temperatura de armazenamento na germinação de sementes de mamão (*Carica papaya*) com 7,9 a 9,4% de água. Os autores observaram que a germinação inicial não foi alterada durante os 12 meses em que as sementes permaneceram armazenadas a 15°C . Entretanto, muitas das sementes armazenadas em ambiente frio e seco perderam a viabilidade, mais rapidamente quando armazenadas a -20°C do que a 0 ou 15°C . Resultados semelhantes já haviam sido relatados para sementes de café (ELLIS et al., 1990) e palmeira (ELLIS et al., 1991b) e os autores sugeriram que as sementes fossem classificadas como intermediárias, em relação ao comportamento fisiológico durante o armazenamento.

Ao estudarem o efeito do conteúdo de água e da temperatura de armazenamento na sobrevivência de sementes de *Coffea* sp., EIRA et al. (1999) não constataram diferença na tolerância à desidratação e à baixa temperatura entre cultivares de *C. arabica*. As espécies desse gênero apresentaram comportamento diverso, sendo *C. racemosa* a mais tolerante e *C. liberica* a menos tolerante à desidratação. O conteúdo crítico de água foi mais elevado em temperaturas mais baixas. Sementes de *C. arabica* e de *C. congensis* apresentam maior sobrevivência a 20°C , enquanto as de *C. liberica* não sobreviveram quando expostas a essa temperatura, em quaisquer dos níveis de água testados. Sementes de *C. arabica* e de *C. racemosa* sobreviveram à criopreservação, embora danos por desidratação tenham sido observados.

De acordo com SALOMÃO (2002), todas as etapas da criopreservação necessitam de preparação da estrutura vegetal a ser conservada para a imersão em nitrogênio líquido. Essa preparação deve promover a desidratação do material para

evitar a formação de cristais de gelo no interior das células, que é letal. A desidratação pode ser induzida por cristalização do meio externo durante uma fase lenta de resfriamento até atingir a temperatura de -30°C a -40°C . Na transferência rápida do material vegetal para o nitrogênio líquido, obtém-se a vitrificação da célula, isto é, os componentes celulares passam do estado líquido para o sólido amorfo e meta-estável, evitando a formação de cristais de gelo no interior da célula, que podem causar ruptura das membranas, resultando em colapso e morte, como consequência da perda da semipermeabilidade e da compartimentação celular.

O uso de crioprotetores é uma alternativa fundamental para a aplicação dessa técnica. O material vegetal é submetido a agentes crioprotetores à base de dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, etileno glicol, metanol e propileno glicol. Porém, esses crioprotetores podem ser tóxicos ou causar estresse osmótico, levando as células à morte (KARTHA, 1985; SAKAI, 1995). Inicialmente, foram utilizadas soluções de baixa concentração para que ocorra absorção dos componentes permeáveis na célula, e posteriormente, soluções concentradas de crioprotetores para promover a vitrificação; em seguida, o material é imerso no nitrogênio líquido (MOLINA et al., 2006). Recentemente, têm sido utilizados açúcares como a sacarose, trealose e glucose como substâncias crioprotetoras, que são considerados excelentes agentes vitrificadores. Além disso, não apresentam toxicidade para as células vegetais, mesmo quando se acumulam em grande quantidade no citoplasma. Os açúcares apresentam alta eficiência na estabilização das membranas celulares durante o congelamento, em comparação com os crioprotetores tradicionais, e seu efeito protetor está associado à vitrificação das membranas celulares no citoplasma (LEOPOLD, 1990).

GONZALEZ (2004) salientou que os crioprotetores reduzem os danos celulares causados pelos efeitos da concentração dos sais e possuem estruturas que permitem fazer ligações de hidrogênio com a molécula de água, reduzindo a formação de cristais de gelo e a concentração de solutos nos meios extra e intracelular. Essas ligações de hidrogênio também promovem a estabilização da estrutura quaternária das proteínas das membranas, preservando-as da desidratação; além disso, os crioprotetores em células com alta permeabilidade, contribuem para a sobrevivência das sementes.

Outro fator a ser considerado na criopreservação é o método de descongelamento. Quanto mais rápido ocorrer o descongelamento das sementes, melhor será a preservação das suas características fisiológicas (MOLINA et al., 2006).

Dessa forma, a criopreservação de sementes e embriões permite vislumbrar boas perspectivas para o futuro, uma vez que oferece efetivas vantagens sobre os métodos tradicionais de conservação. Essa técnica apresenta potencial para a manutenção da alta qualidade do material preservado por longo período de tempo, de grande utilidade não só para o presente, mas, principalmente, para as futuras gerações (MIRANDA, s.d.).

O armazenamento das sementes com baixo conteúdo de água, em condições de baixa temperatura, vem sendo indicado como uma das técnicas mais eficientes para a conservação de recursos genéticos de plantas a médio e longo prazos. É considerado um procedimento padrão para a maioria dos bancos de germoplasma, permitindo garantir a sobrevivência por períodos que variam de 10 a mais de 100 anos (ROBERTS & ELLIS, 1989).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Colheita dos frutos, extração e beneficiamento das sementes

Os frutos de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze foram coletados durante o mês de setembro de 2006, quando iniciaram a abertura, conforme recomendação de LORENZI (2002) e CARVALHO (2005). A coleta foi realizada em dez árvores localizadas na Estação Experimental do Instituto Florestal do Estado de São Paulo, no município de Mogi-Guaçu. Essa estação está situada a 22° 18' S e 48° 13' W, na altitude média de 600 m; segundo a classificação climática de Köpen, o clima é do tipo Cwa, ou seja, quente de inverno seco (VENTURA et al., 1965/1966).

Após coleta, os frutos foram transportados para o Laboratório de Sementes Florestais da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, para fins de extração e beneficiamento das sementes e desenvolvimento das atividades experimentais.

Para a extração das sementes, os frutos foram espalhados sobre uma lona e deixados expostos ao sol durante o dia e recolhidos ao entardecer. À medida que ocorria a abertura do opérculo, as sementes liberadas foram recolhidas e colocadas em bandejas de plástico e deixadas à sombra. Para liberar as sementes que permaneceram nos frutos, estes foram batidos manualmente na bancada do laboratório. Esse procedimento foi realizado ao longo de cinco dias, até que todos os frutos abrissem e liberassem suas sementes.

O beneficiamento constou da retirada manual da ala. As sementes aparentemente sadias foram separadas e homogeneizadas, constituindo um lote representativo da população. Uma amostra foi utilizada na condução dos testes de umidade, germinação, condutividade elétrica e viabilidade, a fim de determinar a qualidade inicial das sementes. O remanescente do lote foi acondicionado em embalagem de papel e armazenado em câmara seca ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $40 \pm 1\%$ de UR) até a instalação das demais atividades experimentais.

3.2. Isoterma de sorção de água

Para a elaboração da curva de equilíbrio do teor de água das sementes, foram utilizados Pentóxido de fósforo, Hidróxido de sódio e soluções salinas saturadas preparadas com nove sais. O Hidróxido de sódio é uma base, mas para fins de redação, serão consideradas dez soluções salinas saturadas. O Pentóxido de fósforo foi utilizado seco, ao qual nunca se deve adicionar água (MEDEIROS, 2006). As soluções foram preparadas de acordo com a solubilidade de cada substância química, seguindo procedimento descrito no manual MERCK (1989) e por MEDEIROS (2006). O excesso de água retirado de cada substância foi depositado em embalagem própria, devidamente identificada e datada e, posteriormente, levada para o depósito de lixo químico do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/ UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

As substâncias químicas foram colocadas em placas de Petri sob a placa de porcelana perfurada, no interior de dessecadores de vidro mantidos em sala a 20°C. Para evitar variação acentuada na temperatura da sala, foi acoplado ao condicionador de ar um controlador eletrônico de temperatura a fim de manter variação de $\pm 1^\circ\text{C}$. Nessa temperatura, cada substância química proporcionou umidade relativa do ar própria, especificada na Tabela 1.

As sementes foram mantidas sobre a placa de porcelana perfurada até que ocorresse o equilíbrio entre o teor de água da semente e a umidade relativa do ar na temperatura adotada. Para o monitoramento do equilíbrio higroscópico foram colocadas em cada dessecador quatro recipientes de metal sem tampa contendo 25 sementes cada. As amostras foram pesadas diariamente em balança de precisão (0,0001g) até atingir peso constante.

Estabelecido o equilíbrio higroscópico, entre o teor de água das sementes e a umidade relativa do ar de cada solução, foram retiradas amostras de 500 sementes para avaliar o efeito imediato da desidratação e hidratação na qualidade física (teor de água) e fisiológica (teste de germinação, teste de tetrazólio e condutividade elétrica) das mesmas. A outra parte foi constituída por seis repetições de 500 sementes embaladas

hermeticamente e armazenadas por 30, 180 e 360 dias em freezer (-20°C) e nitrogênio líquido (-196°C). Em cada período foi determinado o teor de água, teste de germinação, teste de tetrazólio e condutividade elétrica a fim de avaliar o comportamento das sementes durante o armazenamento.

Tabela 1. Umidade relativa de equilíbrio (UR) do Pentóxido de fósforo e das soluções salinas saturadas, a 20°C.

Substância química	Fórmula	UR (%)
Pentóxido de fósforo	P ₂ O ₅	1,0
Hidróxido de sódio	NaOH	6,0
Cloreto de lítio	LiCl.H ₂ O	12,5
Acetato de potássio	CH ₃ COOK	23,0
Cloreto de magnésio	MgCl ₂	33,0
Carbonato de potássio	K ₂ CO ₃	44,0
Nitrato de cálcio	Ca(NO ₃) ₂	56,0
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	65,5
Cloreto de sódio	NaCl	75,3
Cloreto de potássio	KCl	85,3
Nitrato de potássio	KNO ₃	94,0

Fonte: WINSTON & BATES (1960); ROCKLAND (1960); YOUNG (1967); VERTUCCI & ROOS (1993); WALTERS et al. (1998); SUN (2002).

3.3. Reidratação lenta

Após o estabelecimento do equilíbrio higroscópico, amostras de sementes com teores de água igual e abaixo do valor obtido para o tratamento testemunha foram lentamente reidratadas, a fim de evitar injúrias por embebição, antes da condução dos testes de qualidade fisiológica, como ressaltado por VERTUCCI & ROOS (1990) e CHAI et al. (1998).

O período de reidratação foi definido em um teste preliminar, no qual 120 sementes foram espalhadas sobre uma tela de aço inox dentro de caixas de plástico tipo “gerbox”. No interior dessas caixas, abaixo da tela, foram colocados 40 mL de água destilada (Figuras 1A e 1B).

O teste foi conduzido em sala de laboratório (ambiente não controlado), sendo testados cinco períodos de reidratação: 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas. Em seguida foi determinado o teor de água das sementes, com oito repetições de 15 sementes.



Figura 1. Reidratação lenta de sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze. Legenda: (A) Sementes espalhadas sobre a tela de aço inox e (B) vista lateral da caixa mostrando a água destilada no fundo.

3.4. Avaliações

3.4.1. Teor de água

O teor de água das sementes foi determinado pelo método de estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ por 17 horas, conforme prescrito nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992). Foram utilizadas seis repetições contendo 15 sementes. Os resultados foram calculados e expressos em porcentagem, com base no peso das sementes úmidas (base úmida).

3.4.2. Germinação

O teste de germinação foi conduzido em germinadores de câmara tipo BOD, na temperatura constante de 25°C , em presença de luz contínua. O substrato utilizado foi a vermiculita de granulometria média, sendo colocados em cada caixa tipo “gerbox” 40 g de substrato e 20 mL de água destilada. É importante ressaltar que as sementes de jequetibá-rosa (*Cariniana legalis*). As contagens foram realizadas diariamente e considerou-se germinadas as sementes que apresentaram plântulas normais.

Foram avaliados a capacidade germinativa (porcentagem de plântulas normais ao final do teste de germinação) e o tempo médio de germinação das sementes. Foram consideradas plântulas normais (Figura 2A), as plântulas intactas com todas as estruturas essenciais bem desenvolvidas, completas, proporcionais e saudáveis, conforme descrição da ISTA (1999). Plântulas apresentando anormalidades encontram-se na Figura 2B.

Para o cálculo do tempo médio (T), foram realizadas contagens de plântulas normais em dias alternados. Foi utilizada a equação adotada por WALTERS et al. (1998): $T = \sum(tn) / \sum n$, onde n = número de sementes germinadas e t = tempo de germinação (dias).

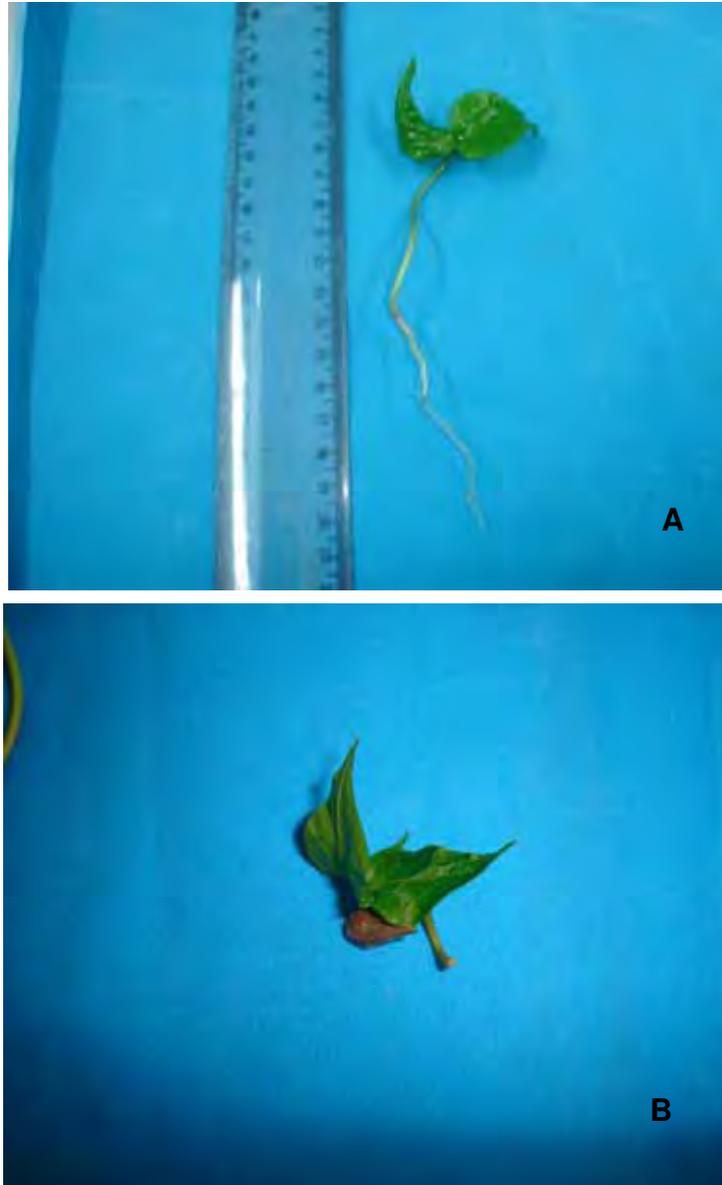


Figura 2. (A) Plântula normal e (B) Plântula anormal de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze.

3.4.3. Condutividade elétrica

Para o teste de condutividade elétrica, as sementes permaneceram imersas por 24 horas em 50 mL de água destilada a 25°C. Foi conduzido com quatro repetições de 25 sementes, conforme recomendação de ABREU et al. (2007a). Após esse período, mediu-se a condutividade elétrica da água em que as sementes permaneceram embebidas. Os valores de condutividade elétrica foram expressos em $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ (VIEIRA & KRZYZANOWSKI, 1999; MARCHI & CICERO, 2002).

3.4.4. Viabilidade

A viabilidade das sementes foi determinada pelo teste bioquímico de tetrazólio (BRASIL, 1992; PIÑA-RODRIGUES & VALENTINI, 1995). Foram adotadas as condições recomendadas por ABREU et al. (2007b).

As sementes (quatro repetições de 25 sementes) foram pré-condicionadas em recipientes de plástico contendo 50 mL de água destilada, onde permaneceram embebidas durante 12 horas na temperatura de 25°C. As sementes foram colocadas em solução de sal de tetrazólio na concentração de 0,2%, na qual elas foram mantidas a 30°C em câmara tipo BOD, na ausência de luz, durante quatro horas, a fim de que ocorresse a coloração adequada para a avaliação da viabilidade das sementes.

Após a imersão, as sementes foram lavadas em água destilada, onde permaneceram submersas até o momento da avaliação. Em seguida, as sementes foram retiradas da água e cortadas no sentido longitudinal, sendo analisadas individualmente as duas partes, de acordo com ABREU et al. (2007b).

O critério adotado para a avaliação das sementes viáveis e não viáveis (Figura 3) foi realizado de acordo com Abreu et al. (2007b).

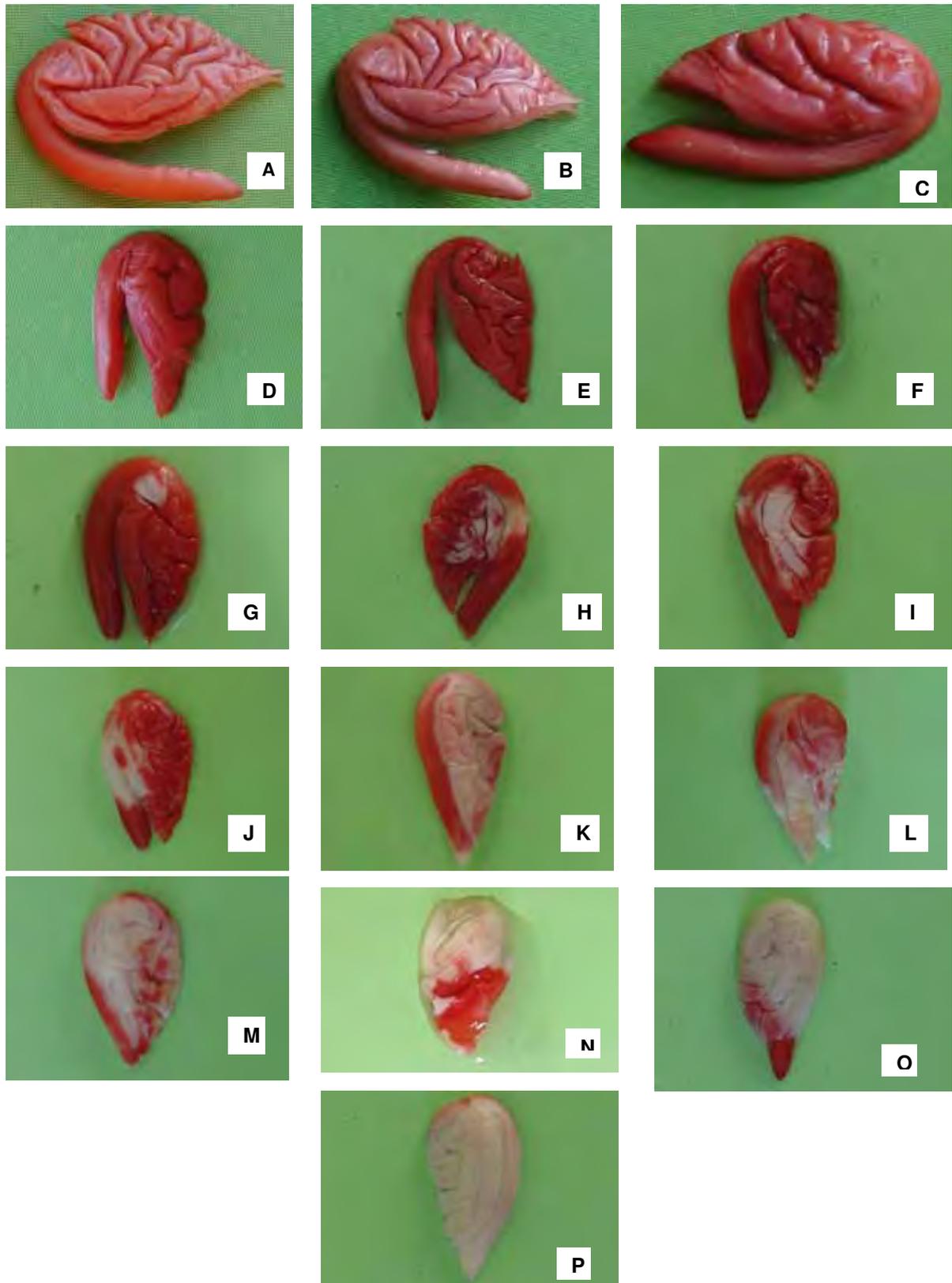


Figura 3 - A-E (viável) embrião com coloração vermelho, tecido com aspecto normal e firme; F-L (não viável) embrião com coloração vermelho-intenso, região descolorida afetando a ponta dos cotilédones e/ou a área de ligação entre os cotilédones e eixo-embriônico; regiões descoloridas afetando parte dos cotilédones e o eixo-embriônico; M-N (não viável) embrião com mais de 50% dos cotilédones e eixo embriônico descoloridos; regiões com coloração vermelho-intenso e tecidos flácidos com aspecto de deterioração; O-P (não viável): embrião com a ponta da radícula de coloração vermelho-intenso e cotilédones descoloridos e/ou completamente descoloridos.

3.5. Armazenamento

Também após o estabelecimento do equilíbrio higroscópico sobre o Pentóxido de fósforo e soluções salinas, seis amostras de 500 sementes equilibradas e uma amostra de sementes retiradas da câmara seca foram acondicionadas em embalagens herméticas e armazenadas em freezer doméstico (-20°C) e em nitrogênio líquido (-196°C).

As embalagens foram confeccionadas com uma lâmina trifoliada (poliester/alumínio/polietileno) de 84,4 μ de espessura, padronizadas no tamanho de 12 cm de comprimento por 6 cm de largura utilizando máquina seladora para plástico. Após o acondicionamento das sementes, as embalagens foram termo-soldadas antes de serem armazenadas. O rolo de lâmina trifoliada (poliester/alumínio/polietileno) para a confecção das embalagens foi gentilmente cedida pela ALCAN EMBALAGENS DO BRASIL LTDA.

Avaliações do teor de água e da qualidade fisiológica das sementes foram feitas no início e após 30, 180 e 360 dias de armazenamento.

Durante a criopreservação, as sementes foram imersas em nitrogênio líquido sem o uso de crioprotetor. Após a criopreservação, as sementes foram descongeladas por 10 min em banho-maria, a 35 °C (MOLINA et al., 2006).

3.6. Delineamento experimental

Os valores de teor de água das sementes não foram submetidos à análise estatística, com exceção daqueles referentes ao melhor teor de água de equilíbrio para o armazenamento seguro.

No experimento referente ao efeito imediato da desidratação e hidratação na qualidade fisiológica das sementes, foi feita análise de variância simples para cada característica fisiológica. Para os períodos de armazenamento, foram realizadas análises de variância para cada característica fisiológica, no esquema fatorial 12 x 2 (doze soluções, incluindo a testemunha e o pentóxido de fósforo, e dois ambientes de

armazenamento). A comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (BANZATTO & KRONKA, 2006).

Para estudar o comportamento das sementes durante o período de armazenamento, foi feita análise de regressão polinomial com os dados de teor de água e das características fisiológicas obtidas com o melhor teor de água de equilíbrio, em cada ambiente de armazenamento. Foi adotada a equação de mais alto grau significativo e com o maior valor de coeficiente de determinação. Os gráficos referentes ao teor de água e tempo médio de germinação foram elaborados usando o programa Sigma Plot 2001, enquanto que as demais características fisiológicas foram elaboradas utilizando o programa Excel.

Os experimentos foram instalados de acordo com o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento. Os valores de porcentagem foram transformados em arco seno $\sqrt{x/100}$, mas nas tabelas e figuras os resultados foram expressos sem transformação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Qualidade inicial das sementes

Na Tabela 2 estão apresentados os valores médios referentes ao teor de água e a qualidade fisiológica das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze obtidos após a sua extração e antes das mesmas serem incubadas a 20°C sobre o Pentóxido de fósforo e soluções salinas saturadas, para o estabelecimento do equilíbrio higroscópico.

Tabela 2. Qualidade das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze após a extração e antes de serem submetidas ao equilíbrio higroscópico.

Características	Após a extração	Antes do equilíbrio higroscópico
Teor de água (%)	7,0	5,4
Germinação (%)	94,0	92,0
Viabilidade (%)	-	88,0
Tempo médio de germinação (dias)	25,0	27,0
Condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)	-	45,0

Não foram apresentados os resultados de condutividade elétrica e de viabilidade após a extração, porque amostras de sementes foram utilizadas no desenvolvimento dos respectivos protocolos, constantes em ABREU et al., 2007a, 2007b, posteriormente adotados nas avaliações apresentadas nesta pesquisa.

Os frutos de *C. legalis* são secos e deiscentes (SILVA et al., 1993; GONÇALVES & LORENZI, 2007). Eles iniciam a secagem e a deiscência na própria árvore

(LORENZI, 2002; CARVALHO, 2005), razão pela qual as sementes devem ser dispersas com baixo teor de água. Tanto que, após a extração, elas se apresentavam com 7,0% de água. Os resultados referentes aos testes de germinação, condutividade elétrica e viabilidade evidenciaram boa qualidade fisiológica do lote.

4.2. Isoterma de sorção de água

Para cada substância química há um período necessário para que as sementes atinjam o teor de água de equilíbrio. No caso da espécie estudada, os períodos obtidos constam na Tabela 3.

Tabela 3. Período no qual as sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze atingiram o equilíbrio higroscópico sobre o Pentóxido de fósforo e as nove soluções salinas saturadas, a 20°C.

Substância química	Fórmula	UR (%)	Teor de água de equilíbrio (%)	Período (dias)
Pentóxido de fósforo	P ₂ O ₅	1,0	1,6	66
Hidróxido de sódio	NaOH	6,0	2,6	57
Cloreto de lítio	LiCl.H ₂ O	12,5	3,7	50
Acetato de potássio	CH ₃ COOK	23,0	4,5	34
Cloreto de magnésio	MgCl ₂	33,0	5,6	31
Carbonato de potássio	K ₂ CO ₃	44,0	7,6	27
Nitrato de cálcio	Ca(NO ₃) ₂	56,0	8,3	25
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	65,5	11,2	16
Cloreto de sódio	NaCl	75,3	13,1	10
Cloreto de potássio	KCl	85,3	16,4	05
Nitrato de potássio	KNO ₃	94,0	18,3	03

Segundo MARCOS FILHO (2005), o período necessário para que o equilíbrio higroscópico seja alcançado é influenciado pela temperatura e umidade relativa do ar (UR) do ambiente e do teor de água e da permeabilidade do tegumento das sementes.

Para sementes de *Sebastiania commersoniana* e *Miconia cabucu* mantidas em solução de Acetato de potássio, o teor de água de equilíbrio foi alcançado em 30 dias (ABREU & MEDEIROS, 2005ab). CADDAH et al. (2005) verificaram para sementes de *Talauma ovata* mantidas nesse mesmo sal, que o teor de equilíbrio foi estabelecido em 56 dias. MARQUES (2007) verificou que sementes de *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* demoraram 38 dias para atingir o teor de equilíbrio, quando expostas à solução preparada com Cloreto de lítio, e 44 dias quando preparada com Acetato de potássio ou Carbonato de potássio. Nesses trabalhos, as soluções foram mantidas a 20°C. A diferença no período necessário para que o teor de água de equilíbrio seja estabelecido, mesmo quando se emprega o mesmo sal, pode também ser atribuída à diferença na composição química das sementes, além dos fatores mencionados anteriormente.

O teor de água de equilíbrio, obtido com as mesmas soluções também variou com a espécie. Para as sementes de *Sebastiania comersoniana* (ABREU & MEDEIROS, 2005a), o teor de água foi semelhante ao das *C. legalis*, principalmente em ambiente até 23% de umidade relativa do ar. As sementes de *Miconia cabucu* (ABREU & MEDEIROS, 2005b), quando expostas nesses ambientes, equilibram com teor de água superior ao das outras espécies (Tabela 4); quando expostas a umidade relativa do ar mais elevada, equilibram com o teor de água até menor que das outras duas espécies.

Tabela 4. Umidade relativa do ar (UR) proporcionada por diferentes soluções salinas saturadas, a 20°C, e teor de água de equilíbrio obtido para sementes de diferentes espécies.

Substância química	UR (%)	Teor de água de equilíbrio (% b.u.)		
		<i>C. legalis</i>	<i>S. commersoniana</i>	<i>M. cabucu</i>
Hidróxido de sódio	6,0	2,6	2,3	6,4
Cloreto de lítio	12,5	3,7	3,8	8,1
Acetato de potássio	23,0	4,5	4,5	10,5
Nitrato de cálcio	56,0	8,3	-	-
Brometo de sódio	57,8	-	13,3	12,7
Cloreto de sódio	75,3	13,1	-	-
Cloreto de amônio	79,0	-	-	13,8
Cloreto de potássio	85,3	16,4	-	-
Nitrato de potássio	94,0	18,3	17,3	16,5

Fonte: ABREU & MEDEIROS (2005a); ABREU & MEDEIROS (2005b).

A isoterma de sorção de água das sementes de *C. legalis* obtida nas diferentes umidades relativas do ar a 20°C, está apresentada na Figura 4.

Inicialmente as sementes apresentavam 5,4% de água, praticamente o mesmo teor proporcionado pelo Cloreto de magnésio (5,6%). Os resultados obtidos mostram que ocorreu perda de água (dessorção) sobre as quatro primeiras soluções e ganho de água (adsorção) sobre as últimas seis soluções relacionadas na Tabela 3. Segundo NELLIST & HUGUES (1973), por serem higroscópicas, as sementes absorvem água do

ar que as envolve quando a pressão de vapor d'água na semente for menor do que a do ar, e cedem água para o ar quando ocorre o inverso.

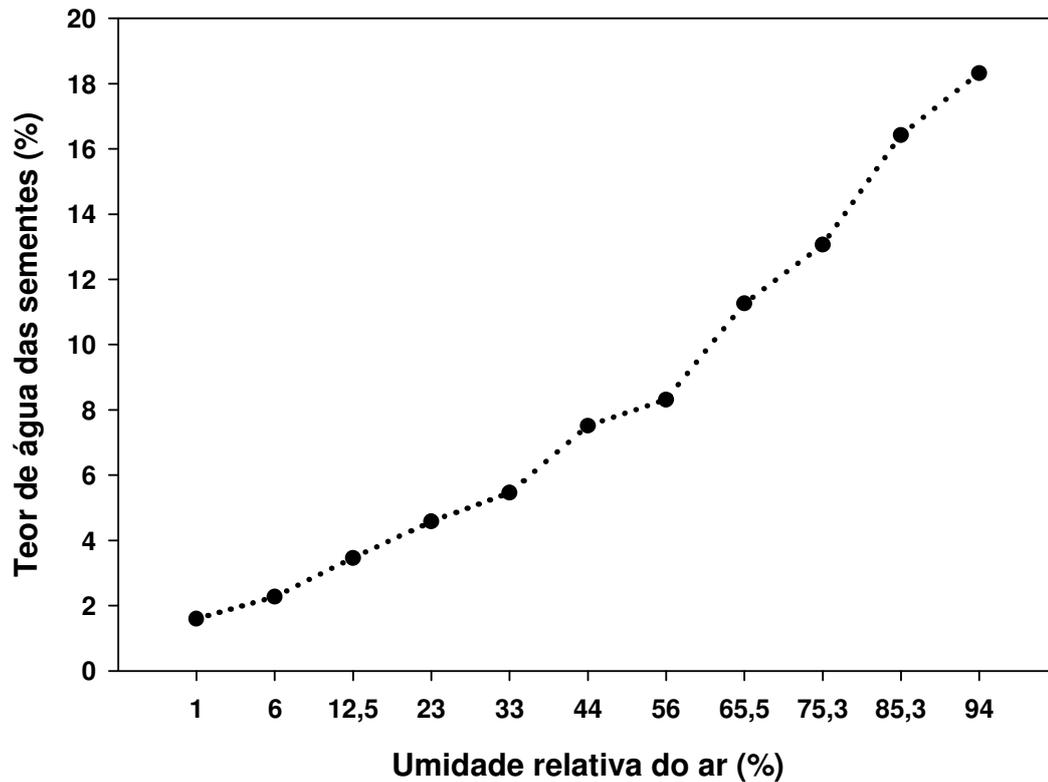


Figura 4. Curva de equilíbrio higroscópico das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze a 20°C.

O teor de água das sementes aumentou proporcionalmente com a umidade relativa do ar, seguindo uma tendência sigmóide, conforme observado em trabalhos realizados para outras espécies por LEOPOLD & VERTUCCI (1989) e relatado por MARCOS FILHO (2005).

A relação de equilíbrio entre o teor de água da semente e a umidade relativa do ar, sob uma dada temperatura constante, é descrita por uma curva sigmóide reversa chamada isoterma de sorção, caracterizada por três regiões distintas. Duas regiões são extremas, onde o teor de água aumenta rapidamente com um pequeno incremento na

umidade relativa do ar, e uma região é intermediária, onde este incremento é menos intenso (VERTUCCI & LEOPOLD, 1987; VERTUCCI & ROOS, 1993; WALTERS, 1998).

Os dois pontos de maior curvatura sobre a isoterma delimitam três regiões distintas, indicando como a água é mantida na semente e, conseqüentemente, suas propriedades termodinâmicas e o nível de atividade fisiológica relacionada (VERTUCCI & LEOPOLD, 1987).

Para as sementes de *C. legalis*, os teores de água mais baixos, entre 1 e 5%, representam a região I. De acordo com VERTUCCI & LEOPOLD (1987) e ROBERTS & ELLIS (1989), na primeira região da isoterma (água tipo 1), a água está fortemente associada às superfícies macromoleculares através de ligações iônicas, sendo considerada do tipo estrutural.

VERTUCCI & LEOPOLD (1987) e ROBERTS & ELLIS (1989) descreveram que na segunda região da curva (água tipo 2), a água readquire suas propriedades solventes, podendo ocorrer algumas atividades metabólicas, onde suas propriedades térmicas parecem se assemelhar àquelas de uma solução concentrada.

Para as sementes de *C. legalis* essa região da curva corresponde aos teores de água de 6 a 11%. Segundo LEOPOLD & VERTUCCI (1989), a água presente não é congelável e tem sua mobilidade aumentada, com o aumento do teor de água exercendo papel de solvente e exibindo propriedades semelhantes às da água livre, na medida em que a curva se aproxima da região III.

O início da terceira região da curva ocorre quando as sementes apresentam teor de água 11% ou superior a esse valor. Nessa região (água tipo 3), a água apresenta propriedades térmicas semelhantes às das soluções diluídas. Acima de 60% de umidade relativa do ar, os tecidos da semente estão completamente hidratados e o processo de germinação é iniciado (VERTUCCI & LEOPOLD, 1987; ROBERTS & ELLIS, 1989; LEOPOLD & VERTUCCI, 1989).

Segundo VERTUCCI (1993) e FARRANT et al. (1995), os tipos de água nas sementes são identificados com base no potencial hídrico e no modo de ligação da água com as macromoléculas, sendo o teor de água e a temperatura os fatores determinantes do comportamento fisiológico das sementes.

4.3. Reidratação lenta

A Figura 5 apresenta os valores médios de teor de água de equilíbrio das sementes de *C. legalis* com teor de água igual e abaixo da testemunha (5,4%), submetidas à reidratação em sala de laboratório por diferentes períodos.

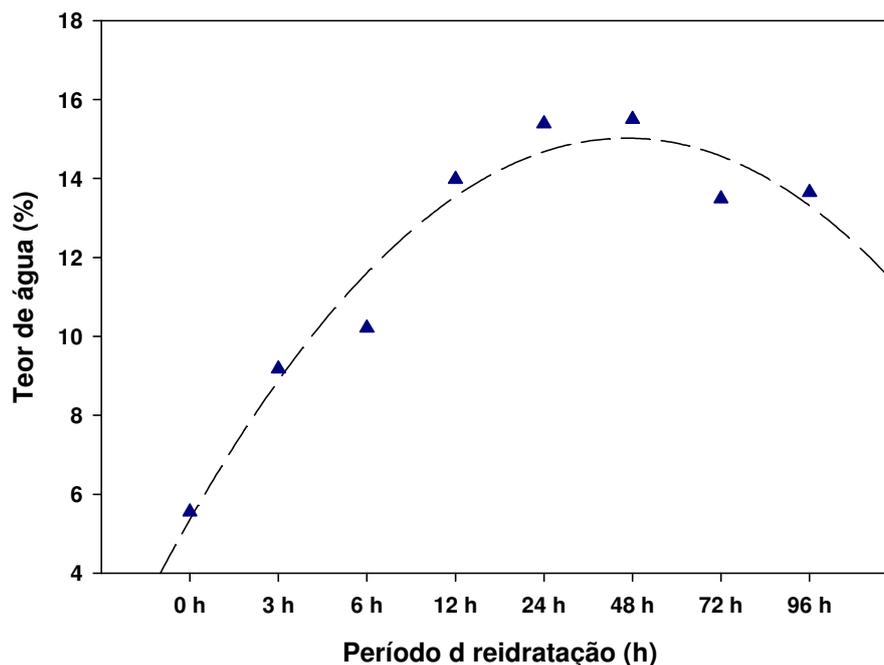


Figura 5. Teor de água das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze reidratadas por diferentes períodos em sala de laboratório.

A partir de 24 horas de reidratação as sementes alcançaram o valor máximo (15,8% de água), que permaneceu constante até 48 horas. Com o aumento do período de embebição, houve uma pequena redução do teor de água. Essa configuração deve-se ao fato de que as sementes, antes da reidratação, apresentavam potencial hídrico muito baixo e, quando absorveram água, a primeira fase foi muito rápida,

provavelmente pela diferença de potencial existente entre as sementes e o meio externo. Segundo VERTUCCI (1989), o gradiente de umidade diminui com um concomitante declínio na taxa de absorção.

De acordo com KANO et al. (1978), as variações de temperatura e umidade relativa do ar são bastante acentuadas em ambiente de laboratório, variando em função do dia, mês e ano. No período noturno, as temperaturas geralmente são mais baixas, enquanto que no período diurno há um aumento na temperatura e uma redução na umidade relativa do ar.

Esse estudo foi realizado de forma a ajustar o teor de água das sementes antes da avaliação da qualidade fisiológica pelo teste de germinação, a fim de evitar injúrias às sementes, causadas por embebição rápida. HU et al. (1998) citam que para garantir que as sementes com teor de água muito baixo não sejam danificadas durante a embebição, as sementes devem ser reidratadas lentamente antes de cada teste de germinação.

Segundo MARCOS FILHO (2005), diferenças muito acentuadas entre o potencial hídrico das sementes e do substrato podem ocasionar sérios problemas, devido à entrada muito rápida de água nas sementes, principalmente nas menos vigorosas. Isso poderá ocasionar danos por embebição, ou seja, a liberação de grande quantidade de exsudados e ruptura da estrutura celular. O autor ressalta que as sementes mais secas são mais sensíveis a essas injúrias.

Com base nos resultados obtidos, as sementes foram reidratadas lentamente durante 24 horas antes das subseqüentes avaliações da qualidade fisiológica das sementes. Esse período de reidratação também foi o mais utilizado nos trabalhos desenvolvidos por HU et al. (1998) e WALTERS (1998).

4.4. Efeito imediato da desidratação e hidratação

O efeito imediato da desidratação e hidratação na qualidade fisiológica das sementes de *C. legalis* está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Teor de água de equilíbrio (TA) obtido sobre o Pentóxido de fósforo e cada solução salina saturada, a 20°C, porcentagem (G) e tempo médio (TM) de germinação, condutividade elétrica (CE) e viabilidade (V) das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze obtidos logo após o estabelecimento do equilíbrio higroscópico.

Substância química	TA (%)	G (%)	TM (dias)	CE ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)	V (%)
Testemunha	5,4	92 AB	27 B	45 A	88 AB
Pentóxido de fósforo	1,6	81 CD	34 H	50 C	77 E
Hidróxido de sódio	2,6	84 ABCD	34 H	50 C	80 CDE
Cloreto de lítio	3,7	94 A	28 C	48 B	90 A
Acetato de potássio	4,5	81 CD	31 F	48 B	77 E
Cloreto de magnésio	5,6	90 AB	27 B	48 B	86 ABC
Carbonato de potássio	7,6	82 BCD	29 D	50 C	78 DE
Nitrato de cálcio	8,3	80 D	29 D	50 C	77 E
Nitrato de amônio	11,3	85 ABCD	30 E	51 D	81 BCDE
Cloreto de sódio	13,1	86 ABCD	32 G	52 E	82 BCDE
Cloreto de potássio	16,4	90 AB	27 B	52 E	86 ABC
Nitrato de potássio	18,4	92 AB	26 A	54 F	88 AB
Valor de F		5,60**	339,24**	349,42**	9,06**
Coeficiente de variação (%)		5,65	1,24	0,49	3,03

Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

(**) Significativo a 1% de probabilidade.

As sementes se mostraram tolerantes à desidratação, tanto que mesmo quando elas foram desidratadas a teores de água extremamente baixos, como 1,6 e 2,6%, apresentaram germinação superior a 80%.

Os resultados de porcentagem de germinação foram proporcionais aos de viabilidade. A única diferença foi que os valores de viabilidade foram numericamente inferiores aos de germinação.

Para a porcentagem de germinação oito teores de água, variando de 2,6 a 18,4%, não diferiram da testemunha. Para a viabilidade, desses oito teores de água, apenas dois diferiram da testemunha (2,6%, obtido sobre Hidróxido de sódio e 7,6% obtido sobre Carbonato de potássio). Os teores de água de 1,6% (obtido sobre Pentóxido de fósforo), 4,5% (obtido sobre Acetato de potássio) e 8,3% (obtido sobre Nitrato de cálcio) diferiram da testemunha, tanto para a germinação quanto para a viabilidade.

Para as características que expressam o vigor das sementes (tempo médio de germinação e condutividade elétrica), os resultados não foram proporcionais. Por exemplo, para umidade relativa do ar proporcionada pelo Nitrato de potássio, que hidratou as sementes a 18,4% de água, foi obtido o menor tempo médio de germinação (26 dias) e o maior valor de condutividade elétrica ($54 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$).

Para essas características, diferença de um dia ou $1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ acusará diferenças significativas, porque os valores de coeficiente de variação foram muito baixos.

Para o tempo médio de germinação sete teores de água, variando de 3,7 a 18,4%, conduziram à germinação final em 26 a 29 dias; nesse grupo encontra-se a testemunha, com 5,4% de água. Cinco teores de água, variando de 1,6 a 13,1%, conduziram à germinação final em 30 a 34 dias. É interessante ressaltar que teor de água inferior ao da testemunha, com exceção do proporcionado pelo Cloreto de lítio (3,7%), faz parte desse grupo de sais com menor velocidade de germinação. O teor de água proporcionado pelo Cloreto de sódio (13,1%) também faz parte desse grupo, sugerindo um possível efeito da composição química desse sal, uma vez que sementes com teores de água inferior e superior a esse também germinaram em maior velocidade.

Para a condutividade elétrica foram obtidos resultados mais coerentes. O melhor resultado foi apresentado pela testemunha ($45 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) e teores de água próximos

ao dela (3,7 a 5,6%) apresentaram bom resultado ($48 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Teores de água mais inferiores (1,6 e 2,6%) e superiores (7,6 e 8,3%) ao da testemunha (5,4%) apresentaram resultado intermediário ($50 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). As quatro soluções que conduziram a teor de água superior a 11% apresentaram os piores resultados (51 a $54 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$).

De modo geral, para todas as características fisiológicas avaliadas, não foi constatado efeito muito prejudicial da desidratação e da hidratação das sementes.

Vários mecanismos como a presença de açúcares solúveis, enzimas que atuam contra o sistema de oxidação lipídica, anti-oxidantes e de proteínas específicas (*Late embryogenesis abundant proteins* – LEA proteínas), têm sido envolvidos na aquisição e manutenção da tolerância à desidratação, conferindo proteção contra as conseqüências da perda de água, em diferentes níveis de hidratação (GUIMARÃES, 1999). Segundo WALTERS et al. (2001), pelo fato de a água afetar as células de várias maneiras, os tecidos que sobrevivem à sua remoção têm uma combinação de estratégias para limitar os danos resultantes da desidratação e a sobrevivência à remoção da água; seus constituintes estão protegidos ou podem ser reparados.

Há dificuldade para identificar com precisão os mecanismos de reparo associados com a tolerância à desidratação e diferenciá-los de eventos que governam a germinação e o início do desenvolvimento das plântulas. Existem fortes evidências da ocorrência de reparo do DNA e do sistema de membranas, no início da embebição, e dos danos à síntese de proteínas, em caso de ação deficiente desses mecanismos (MARCOS FILHO, 2005).

4.5. Armazenamento das sementes

Tal como ocorreu logo após o estabelecimento do equilíbrio higroscópico, diferença de um dia no tempo médio de germinação e de $1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ na condutividade elétrica foi significativa, por causa do baixo valor de coeficiente de variação obtido para essas características que expressam o vigor das sementes, nos três períodos de armazenamento (30, 180 e 360 dias).

Da mesma forma, para esses três períodos, os valores de porcentagem de germinação foram proporcionais aos de viabilidade, sendo os de porcentagem de germinação sempre um pouco maior.

Para todos os períodos de armazenamento e para todas as características fisiológicas, a interação entre a solução salina saturada (com a testemunha e o Pentóxido de fósforo) e o ambiente de armazenamento foi significativa.

4.5.1. Resultados após 30 dias de armazenamento

Maiores porcentagens de germinação e de viabilidade foram obtidas quando as sementes foram desidratadas a 3,7% de água, equilibradas sobre o Cloreto de lítio (Tabelas 6 e 7). Quando as sementes foram armazenadas no freezer, os resultados obtidos com 3,7% de água (89% de germinação e 85% de viabilidade) não diferiram daqueles obtidos com 5,4% (testemunha), de 84% de germinação e 80% de viabilidade e com 5,6% (equilibradas sobre o Cloreto de magnésio), de 85% de germinação e 81% de viabilidade. Quando as sementes foram armazenadas no nitrogênio líquido, apenas a testemunha (88% de germinação e 84% de viabilidade) não diferiu das sementes equilibradas sobre o Cloreto de lítio (91% de germinação e 84% de viabilidade).

Comparando os dois ambientes de armazenamento, para essas duas características, não foi constatada diferença significativa quando as sementes foram armazenadas com 3,7% de água (equilibradas sobre o Cloreto de lítio). Para a testemunha (5,4% de água), as porcentagens de germinação e de viabilidade foram maiores quando conservadas no nitrogênio líquido do que no freezer. Para o Cloreto de magnésio (5,6%), a porcentagem de germinação foi maior do que a de viabilidade, quando as sementes foram armazenadas no freezer, mas para a viabilidade não houve diferença significativa entre os dois ambientes de armazenamento. Um aspecto interessante é que o teor de água intermediário (4,5%), equilibrado sobre o Acetato de potássio, não conduziu a resultados tão bons (80% de germinação e 76% de viabilidade no freezer e 84% de germinação e 80% de viabilidade no nitrogênio líquido) após esse período de armazenamento. Os piores resultados, para as duas características e para

os dois ambientes, foram obtidos quando as sementes foram equilibradas a teores de água superiores a 13,0% (sobre o Cloreto de sódio, Cloreto de potássio e Nitrato de potássio), de 35 a 72% no freezer e de 31 a 68% no nitrogênio líquido. Para o tempo médio de germinação e a condutividade elétrica, os melhores valores foram obtidos também com as sementes armazenadas com 3,7% de água (equilibradas sobre o Cloreto de lítio).

Tabela 6. Teor de água de equilíbrio e porcentagem de germinação das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze equilibradas em cada solução salina saturada, e armazenadas em diferentes ambientes por 30 dias.

Substância química	Teor de água de Equilíbrio (%)	Ambiente de armazenamento					
		Freezer (-20°C)			Nitrogênio líquido (-196°C)		
Testemunha	5,4	84	b	AB	88	a	AB
Pentóxido de fósforo	1,6	79	a	BC	80	a	CDE
Hidróxido de sódio	2,6	82	a	B	85	a	BC
Cloreto de lítio	3,7	89	a	A	91	a	A
Acetato de potássio	4,5	80	b	B	84	a	BCD
Cloreto de magnésio	5,6	85	a	AB	83	b	BCD
Carbonato de potássio	7,6	80	a	B	81	a	CDE
Nitrato de cálcio	8,3	82	a	B	78	a	DE
Nitrato de amônio	11,2	80	a	B	75	b	E
Cloreto de sódio	13,1	72	a	C	66	b	F
Cloreto de potássio	16,4	52	a	D	49	a	G
Nitrato de potássio	18,3	42	a	E	35	b	H
F para solução salina saturada (S)					170,80**		
F ambiente de armazenamento (A)					0,97 ^{ns}		
F para interação (S X A)					3,50**		
Coeficiente de variação (%)					3,50		

Em cada linha, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

(**) Significativo a 1% de probabilidade. (^{ns}) Não significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 7. Teor de água de equilíbrio e viabilidade (%) das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze equilibradas em cada solução salina saturada, e armazenadas em diferentes ambientes por 30 dias.

Substância química	Teor de água de Equilíbrio (%)	Ambiente de armazenamento					
		Freezer (-20°C)			Nitrogênio líquido (-196°C)		
Testemunha	5,4	80	b	AB	84	a	AB
Pentóxido de fósforo	1,6	75	a	BC	76	a	CD
Hidróxido de sódio	2,6	78	a	B	81	a	ABC
Cloreto de lítio	3,7	85	a	A	87	a	A
Acetato de potássio	4,5	76	b	B	80	a	BC
Cloreto de magnésio	5,6	81	a	AB	77	a	BCD
Carbonato de potássio	7,6	76	a	B	77	a	CD
Nitrato de cálcio	8,3	78	a	B	74	a	CD
Nitrato de amônio	11,2	76	a	B	71	b	D
Cloreto de sódio	13,1	68	a	C	62	b	E
Cloreto de potássio	16,4	48	a	D	45	a	F
Nitrato de potássio	18,3	38	a	E	31	b	G
F para solução salina saturada (S)					168,10**		
F ambiente de armazenamento (A)					1,96 ^{ns}		
F para interação (S X A)					3,40**		
Coefficiente de variação (%)					3,55		

Em cada linha, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

(**) Significativo a 1% de probabilidade. (^{ns}) Não significativo a 5% de probabilidade.

Essas sementes, armazenadas nos dois ambientes, demoraram 28 dias para germinar (Tabela 8). As sementes do lote testemunha germinaram tão rapidamente quanto aquelas armazenadas com 3,7%, quando armazenadas no freezer, mas quando armazenadas no nitrogênio líquido germinaram em menor velocidade (31 dias). Neste último ambiente, as sementes armazenadas com 8,3% de água (equilibradas sobre o

Nitrato de cálcio) também germinaram em boa velocidade (29 dias), mas com menores porcentagens de germinação e de viabilidade.

Tabela 8. Teor de água de equilíbrio e tempo médio de germinação (dias) das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze equilibradas em cada solução salina saturada, e armazenadas em diferentes ambientes por 30 dias.

Substância química	Teor de água de Equilíbrio (%)	Ambiente de armazenamento					
		Freezer (-20°C)			Nitrogênio líquido (-196°C)		
Testemunha	5,4	28	a	A	31	b	C
Pentóxido de fósforo	1,6	37	b	E	34	a	F
Hidróxido de sódio	2,6	34	a	D	34	a	F
Cloreto de lítio	3,7	28	a	A	28	a	A
Acetato de potássio	4,5	32	a	C	32	a	D
Cloreto de magnésio	5,6	30	a	B	31	b	C
Carbonato de potássio	7,6	30	a	B	33	b	E
Nitrato de cálcio	8,3	31	b	C	29	a	B
Nitrato de amônio	11,2	37	a	E	39	b	F
Cloreto de sódio	13,1	42	a	F	46	b	G
Cloreto de potássio	16,4	42	a	F	49	b	H
Nitrato de potássio	18,3	58	b	G	57	a	I
F para solução salina saturada (S)					7725,82**		
F ambiente de armazenamento (A)					422,51**		
F para interação (S X A)					188,84**		
Coeficiente de variação (%)					0,83		

Em cada linha, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).
Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).
(**) Significativo a 1% de probabilidade.

As sementes armazenadas com teor de água superior a 11,0%, nos dois ambientes, foram as que apresentaram menor velocidade de germinação, demorando de 37 a 57 dias para germinar. Quando armazenadas no freezer, as sementes

armazenadas com 1,6% de água (equilibradas sobre o Pentóxido de fósforo) também demoraram 37 dias para germinar.

Quanto à condutividade elétrica (Tabela 9), as sementes desidratadas a 3,7% de água e armazenadas no freezer mantiveram a integridade da membrana celular ($61 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) em níveis semelhantes aos das desidratadas a 1,6% (sobre o Pentóxido de fósforo), 2,6% (sobre o Hidróxido de sódio) e 4,5% (sobre o Acetato de potássio), de (62 e $63 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). As sementes com 5,4% de água (testemunha) e com 5,6% de água (equilibradas sobre o Cloreto de magnésio) evidenciaram maior deterioração que as comentadas anteriormente ($69 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$).

Quando armazenadas no nitrogênio líquido, as sementes armazenadas com 3,7% de água evidenciaram vigor superior às demais ($54 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Nos dois ambientes de armazenamento, maior redução no vigor foi constatado para as sementes armazenadas com mais de 7,0% de água (72 a $80 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$).

Comparando os dois ambientes de armazenamento, para as sementes armazenadas com 3,7% de água, não foi constatada diferença significativa para o tempo médio de germinação (28 dias), mas para a condutividade elétrica as sementes mantiveram maior vigor no nitrogênio líquido ($54 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) do que no freezer ($61 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Com exceção das sementes equilibradas sobre o Nitrato de potássio (18,3% de água), para os demais tratamentos as sementes armazenadas no nitrogênio líquido apresentaram maior vigor que as armazenadas no freezer.

Tabela 9. Teor de água de equilíbrio e condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze equilibradas em cada solução salina saturada, e armazenadas em diferentes ambientes por 30 dias.

Substância química	Teor de água de Equilíbrio (%)	Ambiente de armazenamento					
		Freezer (-20°C)			Nitrogênio líquido (-196°C)		
Testemunha	5,4	69	b	D	66	a	E
Pentóxido de fósforo	1,6	62	b	B	60	a	C
Hidróxido de sódio	2,6	62	b	B	59	a	B
Cloreto de lítio	3,7	61	b	A	54	a	A
Acetato de potássio	4,5	63	b	C	62	a	D
Cloreto de magnésio	5,6	69	b	D	66	a	E
Carbonato de potássio	7,6	74	b	E	72	a	F
Nitrato de cálcio	8,3	76	b	F	73	a	G
Nitrato de amônio	11,2	77	b	G	75	a	H
Cloreto de sódio	13,1	77	b	G	76	a	I
Cloreto de potássio	16,4	79	b	H	77	a	J
Nitrato de potássio	18,3	80	A	I	80	a	K
F para solução salina saturada (S)					5762,25**		
F ambiente de armazenamento (A)					1564,34**		
F para interação (S X A)					60,40**		
Coeficiente de variação (%)					0,42		
Em cada linha, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).							
Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).							
(**) Significativo a 1% de probabilidade.							

4.5.2. Resultados após 180 dias de armazenamento

Após esse período, os melhores resultados continuaram sendo constatados para as sementes armazenadas com 3,7% de água (equilibradas sobre o Cloreto de lítio), nos dois ambientes.

Entre as sementes armazenadas no freezer, dos dois tratamentos que após 30 dias de armazenamento apresentaram resultados de porcentagens de germinação (Tabela 10) e de viabilidade (Tabela 11) semelhantes aos obtidos com as sementes desidratadas a 3,7%, apenas as sementes armazenadas com 5,6% de água (equilibradas sobre o Cloreto de magnésio) mantiveram esse resultado, apresentando 86% de germinação e 82% de viabilidade. As sementes armazenadas com 5,4% de água (testemunha) conduziu a valores significativamente inferiores (82% de germinação e 78% de viabilidade) aos das sementes armazenadas com 3,7% de água (88% de germinação e 78% de viabilidade).

Da mesma forma, quando as sementes foram armazenadas no nitrogênio líquido, os valores constatados para a testemunha (84% de germinação e 80% de viabilidade) também passaram a ser inferiores. Nesse ambiente de armazenamento, constatou-se para as sementes armazenadas com 3,7% valores bem superiores (95% de germinação e 91% de viabilidade) aos dos demais tratamentos.

Os piores tratamentos para os dois ambientes, que após 30 dias de armazenamento eram aqueles referentes às sementes armazenadas com teores de água superiores a 13%, após 180 dias passaram a ser aqueles cujas sementes foram armazenadas com teor de água superior a 11% (04 a 75% de germinação e 0 a 71% de viabilidade). Esses resultados evidenciam a manutenção da germinação e da viabilidade das sementes armazenadas com 3,7% e a redução dessas características para os demais tratamentos.

Comparando os dois ambientes de armazenamento, as sementes armazenadas com 3,7% apresentaram, no nitrogênio líquido, maiores valores de germinação e viabilidade do que no freezer. As sementes armazenadas com teor de água superior a 13%, entretanto, se conservaram melhor no freezer do que no nitrogênio líquido.

Tabela 10. Teor de água de equilíbrio e porcentagem de germinação das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze equilibradas em cada solução salina saturada, e armazenadas em diferentes ambientes por 180 dias.

Substância química	Teor de água de Equilíbrio (%)	Ambiente de armazenamento					
		Freezer (-20°C)			Nitrogênio líquido (-196°C)		
Testemunha	5,4	82	a	BC	84	a	B
Pentóxido de fósforo	1,6	79	a	CD	76	a	DE
Hidróxido de sódio	2,6	82	a	BC	81	a	BCD
Cloreto de lítio	3,7	88	b	A	95	a	A
Acetato de potássio	4,5	80	a	CD	82	a	BC
Cloreto de magnésio	5,6	86	a	AB	83	a	BC
Carbonato de potássio	7,6	80	a	CD	80	a	BCDE
Nitrato de cálcio	8,3	80	a	CD	78	a	CDE
Nitrato de amônio	11,2	75	a	D	75	b	E
Cloreto de sódio	13,1	65	a	E	54	b	F
Cloreto de potássio	16,4	41	a	F	27	a	G
Nitrato de potássio	18,3	17	a	G	4	b	H
F para solução salina saturada (S)					835,75**		
F ambiente de armazenamento (A)					45,61**		
F para interação (S X A)					25,13**		
Coeficiente de variação (%)					2,66		

Em cada linha, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

(**) Significativo a 1% de probabilidade.

Tabela 11. Teor de água de equilíbrio e viabilidade (%) das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze equilibradas em cada solução salina saturada, e armazenadas em diferentes ambientes por 180 dias.

Substância química	Teor de água de Equilíbrio (%)	Ambiente de armazenamento					
		Freezer (-20°C)			Nitrogênio líquido (-196°C)		
Testemunha	5,4	78	a	BC	80	a	B
Pentóxido de fósforo	1,6	75	a	CD	72	a	DE
Hidróxido de sódio	2,6	78	a	BC	77	a	BCD
Cloreto de lítio	3,7	84	b	A	91	a	A
Acetato de potássio	4,5	76	a	CD	78	a	BC
Cloreto de magnésio	5,6	82	a	AB	75	b	BCD
Carbonato de potássio	7,6	76	a	CD	76	a	BCDE
Nitrato de cálcio	8,3	76	a	CD	74	a	CDE
Nitrato de amônio	11,2	71	a	D	71	a	E
Cloreto de sódio	13,1	61	a	E	50	b	F
Cloreto de potássio	16,4	37	a	F	23	b	G
Nitrato de potássio	18,3	13	a	G	0	b	H
F para solução salina saturada (S)					972,00**		
F ambiente de armazenamento (A)					90,85**		
F para interação (S X A)					41,83**		
Coefficiente de variação (%)					2,78		

Em cada linha, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).
Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).
(**) Significativo a 1% de probabilidade.

Para o tempo médio de germinação (Tabela 12), as sementes equilibradas a 3,7% também se destacaram em comparação com as demais, germinando em 28 dias nos dois ambientes de armazenamento. As sementes armazenadas no freezer com 5,4% de água (testemunha), que após 30 dias havia geminado tão rapidamente quanto às desidratadas a 3,7%, apresentaram após 180 dias de armazenamento menor velocidade de germinação, demorando 31 dias para germinar. As sementes

equilibradas a teores de água superiores a 11% continuaram a ser as que germinaram mais lentamente, demorando de 40 a 70 dias para germinar.

Tabela 12. Teor de água de equilíbrio e tempo médio de germinação (dias) das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze equilibradas em cada solução salina saturada, e armazenadas em diferentes ambientes por 180 dias.

Substância química	Teor de água de Equilíbrio (%)	Ambiente de armazenamento					
		Freezer (-20°C)			Nitrogênio líquido (-196°C)		
Testemunha	5,4	31	a	B	33	b	CD
Pentóxido de fósforo	1,6	37	b	F	35	a	F
Hidróxido de sódio	2,6	35	b	D	34	a	E
Cloreto de lítio	3,7	28	a	A	28	a	A
Acetato de potássio	4,5	32	a	B	32	a	C
Cloreto de magnésio	5,6	31	a	B	32	b	C
Carbonato de potássio	7,6	33	a	C	33	a	D
Nitrato de cálcio	8,3	33	b	C	31	a	B
Nitrato de amônio	11,2	40	a	E	43	b	G
Cloreto de sódio	13,1	45	a	F	46	b	H
Cloreto de potássio	16,4	51	a	G	52	b	I
Nitrato de potássio	18,3	59	a	H	70	b	J
F para solução salina saturada (S)					9457,25**		
F ambiente de armazenamento (A)					229,46**		
F para interação (S X A)					249,95**		
Coeficiente de variação (%)					0,80		

Em cada linha, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

(**) Significativo a 1% de probabilidade.

Para a condutividade elétrica (Tabela 13), as sementes equilibradas a 3,7% também se destacaram em comparação com as demais, apresentando ($61 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) quando armazenadas no freezer e ($56 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) no nitrogênio líquido. As sementes armazenadas no freezer com (1,6, 2,6 e 4,5% de água), que após 30 dias de armazenamento apresentaram valores de condutividade elétrica próximos do constatado para as sementes armazenadas com 3,7%, após 180 já se mostraram mais deterioradas.

Redução mais drástica, nos dois ambientes, foi constatada para as sementes armazenadas com teor de água superior a 8,3% de água (78 a $86 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ no freezer e 78 a $101 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ no nitrogênio líquido). Dessa forma, a condutividade elétrica foi a característica fisiológica mais afetada após 180 dias de armazenamento.

Comparando os dois ambientes, as sementes armazenadas com teor de água inferior a 8,0% mantiveram suas membranas com maior integridade no nitrogênio líquido (56 a $73 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) do que no freezer (61 a $75 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Ao contrário, as sementes armazenadas com teor de água superior a 16% tiveram suas membranas mais injuriadas no nitrogênio líquido (93 a $101 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) do que no freezer (83 a $86 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$).

Tabela 13. Teor de água de equilíbrio e condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze equilibradas em cada solução salina saturada, e armazenadas em diferentes ambientes por 180 dias.

Substância química	Teor de água de Equilíbrio (%)	Ambiente de armazenamento					
		Freezer (-20°C)			Nitrogênio líquido (-196°C)		
Testemunha	5,4	73	b	F	71	a	F
Pentóxido de fósforo	1,6	68	a	D	69	a	E
Hidróxido de sódio	2,6	65	b	B	63	a	B
Cloreto de lítio	3,7	61	b	A	56	a	A
Acetato de potássio	4,5	67	b	C	65	a	C
Cloreto de magnésio	5,6	71	b	E	68	a	D
Carbonato de potássio	7,6	75	b	G	73	a	G
Nitrato de cálcio	8,3	78	a	H	78	a	H
Nitrato de amônio	11,2	79	a	I	79	a	I
Cloreto de sódio	13,1	82	a	J	82	a	J
Cloreto de potássio	16,4	83	a	K	93	b	K
Nitrato de potássio	18,3	86	a	L	101	b	L
F para solução salina saturada (S)					3378,95**		
F ambiente de armazenamento (A)					49,93**		
F para interação (S X A)					259,68**		
Coeficiente de variação (%)					0,67		
Em cada linha, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).							
Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).							

(**) Significativo a 1% de probabilidade.

4.5.3. Resultados após 360 dias de armazenamento

Tal como ocorreu nos períodos anteriores, nos dois ambientes os melhores resultados foram constatados para as sementes armazenadas com 3,7% de água.

As sementes armazenadas no freezer com 5,6% de água (86% de germinação e 82% de viabilidade) continuaram com valores significativamente semelhantes aos das armazenadas com 3,7% de água (88% de germinação e 84% de viabilidade), como mostram os resultados apresentados nas Tabelas 14 e 15.

Quando armazenadas no nitrogênio líquido, as sementes armazenadas com 3,7% de água continuaram se destacando em comparação com as demais (94% de germinação e 89% de viabilidade).

Quando armazenadas no freezer, os piores resultados foram obtidos com as sementes armazenadas com mais de 11,0% de água (08 a 72% de germinação e 04 a 68% de viabilidade). Quando armazenadas no nitrogênio líquido, os piores resultados de germinação foram obtidos com as sementes armazenadas com teor de água superior a 7,0% (04 a 77%) e os de viabilidade com as armazenadas com teor de água superior a 5,5% (0 a 71%). Esses resultados evidenciam que as sementes com maior teor de água tiveram maior redução na germinação e na viabilidade quando armazenadas no nitrogênio líquido do que no freezer. No nitrogênio líquido, as sementes desidratadas a 1,6% de água também tiveram considerável redução na germinação e na viabilidade.

Tabela 14. Teor de água de equilíbrio e porcentagem de germinação das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze equilibradas em cada solução salina saturada, e armazenadas em diferentes ambientes por 360 dias.

Substância química	Teor de água de Equilíbrio (%)	Ambiente de armazenamento					
		Freezer (-20°C)			Nitrogênio líquido (-196°C)		
Testemunha	5,4	80	b	B	84	a	B
Pentóxido de fósforo	1,6	79	a	B	76	b	D
Hidróxido de sódio	2,6	80	a	B	80	a	CD
Cloreto de lítio	3,7	88	b	A	94	a	A
Acetato de potássio	4,5	80	a	B	80	a	CD
Cloreto de magnésio	5,6	86	a	A	83	a	BC
Carbonato de potássio	7,6	80	a	B	77	b	D
Nitrato de cálcio	8,3	80	a	B	78	a	D
Nitrato de amônio	11,2	72	b	C	75	a	E
Cloreto de sódio	13,1	60	a	D	30	b	F
Cloreto de potássio	16,4	22	a	E	10	b	G
Nitrato de potássio	18,3	8	a	F	4	b	H
F para solução salina saturada (S)					1879,67**		
F ambiente de armazenamento (A)					145,48**		
F para interação (S X A)					51,40**		
Coeficiente de variação (%)					2,20		

Em cada linha, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).
Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

(**) Significativo a 1% de probabilidade.

Tabela 15. Teor de água de equilíbrio e viabilidade (%) das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze equilibradas em cada solução salina saturada, e armazenadas em diferentes ambientes por 360 dias.

Substância química	Teor de água de Equilíbrio (%)	Ambiente de armazenamento					
		Freezer (-20°C)			Nitrogênio líquido (-196°C)		
Testemunha	5,4	76	b	B	80	a	B
Pentóxido de fósforo	1,6	75	a	B	72	b	CD
Hidróxido de sódio	2,6	76	a	B	76	a	BC
Cloreto de lítio	3,7	84	b	A	89	a	A
Acetato de potássio	4,5	76	a	B	76	a	BC
Cloreto de magnésio	5,6	82	a	A	71	b	CD
Carbonato de potássio	7,6	76	a	B	73	b	CD
Nitrato de cálcio	8,3	76	a	B	74	a	CD
Nitrato de amônio	11,2	68	a	C	60	b	E
Cloreto de sódio	13,1	56	a	D	26	b	F
Cloreto de potássio	16,4	18	a	E	6	b	G
Nitrato de potássio	18,3	4	a	F	0	b	H
F para solução salina saturada (S)					2080,10**		
F ambiente de armazenamento (A)					294,88**		
F para interação (S X A)					58,70**		
Coefficiente de variação (%)					2,37		

Em cada linha, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).
Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).
(**) Significativo a 1% de probabilidade.

Nos dois ambientes, as sementes desidratadas a 3,7% continuaram germinando em apenas 28 dias (Tabela 16), com velocidade superior à dos demais tratamentos. Germinação mais lenta foi observada para as sementes hidratadas a mais de 11,0% de água, demorando de 41 a 68 dias para germinar quando armazenadas no freezer e de 45 a 70 dias no nitrogênio líquido. Assim, as sementes com maior teor de água germinaram mais lentamente quando armazenadas no nitrogênio líquido do que no

freezer, com exceção das hidratadas a 16,4% que germinaram praticamente com a mesma velocidade nos dois ambientes.

Tabela 16. Teor de água de equilíbrio e tempo médio de germinação (dias) das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze equilibradas em cada solução salina saturada, e armazenadas em diferentes ambientes por 360 dias.

Substância química	Teor de água de Equilíbrio (%)	Ambiente de armazenamento					
		Freezer (-20°C)			Nitrogênio líquido (-196°C)		
Testemunha	5,4	32	a	B	34	b	E
Pentóxido de fósforo	1,6	38	a	G	38	a	G
Hidróxido de sódio	2,6	36	b	F	35	a	F
Cloreto de lítio	3,7	28	a	A	28	a	A
Acetato de potássio	4,5	33	b	C	32	a	C
Cloreto de magnésio	5,6	35	b	E	33	a	D
Carbonato de potássio	7,6	34	b	D	33	a	D
Nitrato de cálcio	8,3	34	b	D	31	a	B
Nitrato de amônio	11,2	41	a	H	45	b	H
Cloreto de sódio	13,1	48	a	I	53	b	I
Cloreto de potássio	16,4	64	b	J	63	a	J
Nitrato de potássio	18,3	68	a	K	70	b	K
F para solução salina saturada (S)					20772,00**		
F ambiente de armazenamento (A)					86,12**		
F para interação (S X A)					153,93**		
Coefficiente de variação (%)					0,62		

Em cada linha, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

(**) Significativo a 1% de probabilidade.

As sementes armazenadas com 3,7% de água apresentaram valores de condutividade elétrica próximos aos obtidos com 180 dias de armazenamento ($62 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. no freezer) e ($57 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. no nitrogênio líquido), como pode ser observado na Tabela 17. Esses valores foram significativamente superiores aos constatados para os demais tratamentos, como ocorreu no período anterior.

Tabela 17. Teor de água de equilíbrio e condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze equilibradas em cada solução salina saturada, e armazenadas em diferentes ambientes por 360 dias.

Substância química	Teor de água de Equilíbrio (%)	Ambiente de armazenamento					
		Freezer (-20°C)			Nitrogênio líquido (-196°C)		
Testemunha	5,4	77	b	F	74	a	E
Pentóxido de fósforo	1,6	73	a	D	76	b	G
Hidróxido de sódio	2,6	69	b	B	64	a	B
Cloreto de lítio	3,7	62	b	A	57	a	A
Acetato de potássio	4,5	71	b	C	68	a	C
Cloreto de magnésio	5,6	76	b	E	71	a	D
Carbonato de potássio	7,6	80	b	G	75	a	F
Nitrato de cálcio	8,3	82	b	H	81	a	H
Nitrato de amônio	11,2	83	a	I	83	a	I
Cloreto de sódio	13,1	85	a	J	86	b	J
Cloreto de potássio	16,4	93	a	K	98	b	K
Nitrato de potássio	18,3	128	b	L	122	a	L
F para solução salina saturada (S)					26904,05**		
F ambiente de armazenamento (A)					942,01**		
F para interação (S X A)					315,50**		
Coefficiente de variação (%)					0,36		

Em cada linha, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).
Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

(**) Significativo a 1% de probabilidade.

Redução mais drástica no vigor das sementes foi constatada para as sementes armazenadas com mais de 5,0% de água no freezer (76 a 128 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) e no nitrogênio líquido (71 a 122 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Neste último ambiente, as sementes desidratadas a 1,6% também tiveram o vigor sensivelmente reduzido.

Comparando os dois ambientes de armazenamento, as sementes desidratadas a 3,7% de água mantiveram as suas membranas com maior integridade no nitrogênio líquido do que no freezer. Para os demais tratamentos, não houve uma tendência geral que permitisse indicar o melhor ambiente de armazenamento.

Os resultados obtidos neste item, para os três períodos e para os quatro características fisiológicas, mostraram que nos dois ambientes de armazenamento as sementes de *C. legalis* se conservaram melhor quando desidratadas a 3,7% de água. Mostraram, também, que as sementes armazenadas com esse teor de água se conservaram melhor no nitrogênio líquido do que no freezer.

Os resultados mostraram, ainda, que as sementes são tolerantes à desidratação e à temperatura extremamente baixa, tanto que mais de 75% das sementes desidratadas a 1,6% de água e armazenadas por um ano no freezer a -20°C e no nitrogênio líquido a -196°C germinaram e produziram plântulas normais. Assim, as sementes de *C. legalis* tiveram, durante o armazenamento, comportamento fisiológico típico das classificadas por ROBERTS (1973) como ortodoxas.

As sementes dessa espécie iniciam a dispersão com baixo teor de água, uma vez que logo após a extração as sementes se apresentaram com 7,0% de água (Tabela 2). Como os frutos são secos e deiscentes (SILVA et al., 1993; GONÇALVES & LORENZI, 2007), é provável que as espécies com frutos desse tipo produzam sementes ortodoxas.

Para GEMARQUE et al. (2005), durante o processo de seleção natural, as sementes ortodoxas necessitariam atravessar períodos inadequados ao desenvolvimento de suas plântulas. Dessa forma, as sementes que germinassem logo após a sua formação e maturação, produziriam plântulas que poderiam não suportar as condições adversas, sobrevivendo as plântulas originadas de sementes que germinassem apenas quando as condições do meio fossem favoráveis ao seu

desenvolvimento. Assim, além de limitar a germinação, o baixo teor de água das sementes ortodoxas é fundamental para reduzir a deterioração das sementes.

Quando as sementes de *C. legalis* foram armazenadas com teor de água muito elevado, a deterioração foi maior. HARRINGTON (1973) já relatava que para serem acondicionadas em embalagem impermeável, as sementes amiláceas precisavam ter de 6 a 12% de água e as oleaginosas de 4 a 9% de água. Se o teor de água for muito elevado, a respiração das sementes e a ação de microrganismos podem acelerar a deterioração das sementes.

Neste trabalho as sementes foram armazenadas a -20 e -196°C, tendo o seu metabolismo acentuadamente reduzido. Mesmo a -20°C, algum metabolismo ainda ocorre e a viabilidade das sementes pode ser reduzida com o aumento do período de armazenamento (STANWOOD & BASS, 1981; STANWOOD, 1985). A -196°C as fontes de deterioração são grandemente reduzidas ou mesmo cessadas (STANWOOD & BASS, 1981; KARTHA, 1985). Entretanto, se o teor de água for muito alto, formam-se cristais de gelo à medida que a temperatura se torna inferior a zero, causando danos letais às sementes (ROBERTS, 1973). Portanto, há um limite de água acima do qual ocorre a redução da viabilidade das sementes durante o congelamento e o descongelamento; esse limite deve ser considerado, também, quando o armazenamento é realizado em nitrogênio líquido (STANWOOD, 1985).

Dessa forma, as sementes armazenadas com mais de 16,0% de água apresentaram germinação e viabilidade inferiores a 50% após 180 dias de armazenamento (Tabelas 10 e 11). Quando armazenadas com 18,3% de água, no nitrogênio líquido, nessa avaliação a germinação foi praticamente nula e não foram constatadas sementes viáveis. Esses resultados diferem daqueles obtidos por ABREU et al. (2005a) para *Sebastiania commersoniana* e ABREU et al. (2005b) para *Miconia cabucu*. Os autores constataram que, após 180 dias de armazenamento a 5°C, -5°C, -18°C e -196°C, as sementes dessas espécies equilibradas entre 2,3 e 17,3% de água tiveram a germinação mantida entre 92 e 98%.

De acordo com DANIEL et al. (1969), a desorganização do sistema de membranas é a primeira consequência de danos térmicos. Por isso os valores de

condutividade elétrica (Tabelas 9, 13 e 17) foram sempre maiores para as sementes de *C. legalis* armazenadas com maior teor de água; conseqüentemente, a velocidade de germinação também diminuiu (Tabelas 8, 12 e 16). Essas sementes foram mais injuriadas quando armazenadas no nitrogênio líquido do que no freezer.

Segundo ROBERTS & ELLIS (1989), existe uma estreita relação entre os níveis de hidratação apresentados pelas isotermas de sorção em sementes ortodoxas e sua longevidade. Para os teores de água correspondentes à região II da isoterma (entre 30 e 75% de umidade relativa do ar ou 5 a 18% de água), dependendo do teor de lipídios das sementes, existe uma relação linear negativa entre o logaritmo da longevidade e o logaritmo do teor de água. Assim, o teor de água tem um efeito considerável na longevidade das sementes.

4.6. Comportamento das sementes durante o armazenamento

A isoterma de sorção de água estabelece características (temperatura e umidade relativa do ar) que determinam em que nível as sementes podem ser desidratadas e armazenadas seguramente (MESQUITA et al., 2001). Os resultados apresentados no item anterior mostraram que para *C. legalis*, o teor de água mais adequado para o armazenamento das sementes no freezer a -20°C e no nitrogênio líquido a -196°C está em torno de 3,7%. Além disso, a umidade relativa do ar em torno de 12,5% conferiu ótimo nível de água das sementes, mantendo a qualidade fisiológica das sementes durante o período de armazenamento. Esse teor de água está dentro da faixa recomendada pelo IPIGRI, de 3,0 a 7,0%, para o armazenamento a longo prazo em ambiente com temperatura de -18°C ou menos (ELLIS et al., 1996; WETZEL, 2003). Segundo HARRINGTON (1972), a manutenção da capacidade germinativa e do vigor das sementes durante o armazenamento depende de condições anteriores, principalmente do teor de água das sementes. A longevidade de uma semente ortodoxa é função, dentre outros fatores, do conteúdo de umidade da semente e da temperatura de armazenamento (BEWLEY & BLACK, 1984). Assim, os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com as colocações feitas por esses autores.

Houve pequena variação no teor de água das sementes após o equilíbrio higroscópico ser atingido sobre o Pentóxido de fósforo e as soluções salinas saturadas utilizadas, durante o período de armazenamento adotado. Tanto que a união entre os pontos referentes a cada substância resultou em curvas sobrepostas, quando o armazenamento foi realizado tanto no freezer (Figura 5) como no nitrogênio líquido (Figura 6).

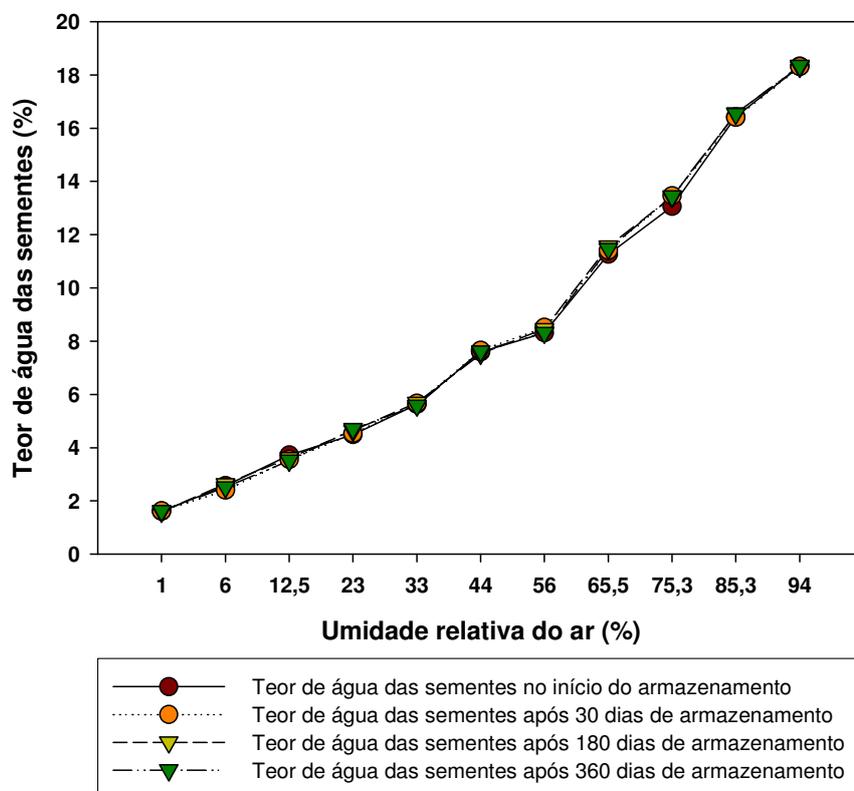


Figura 5. Teor de água das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze armazenadas por diferentes períodos em freezer -20°C.

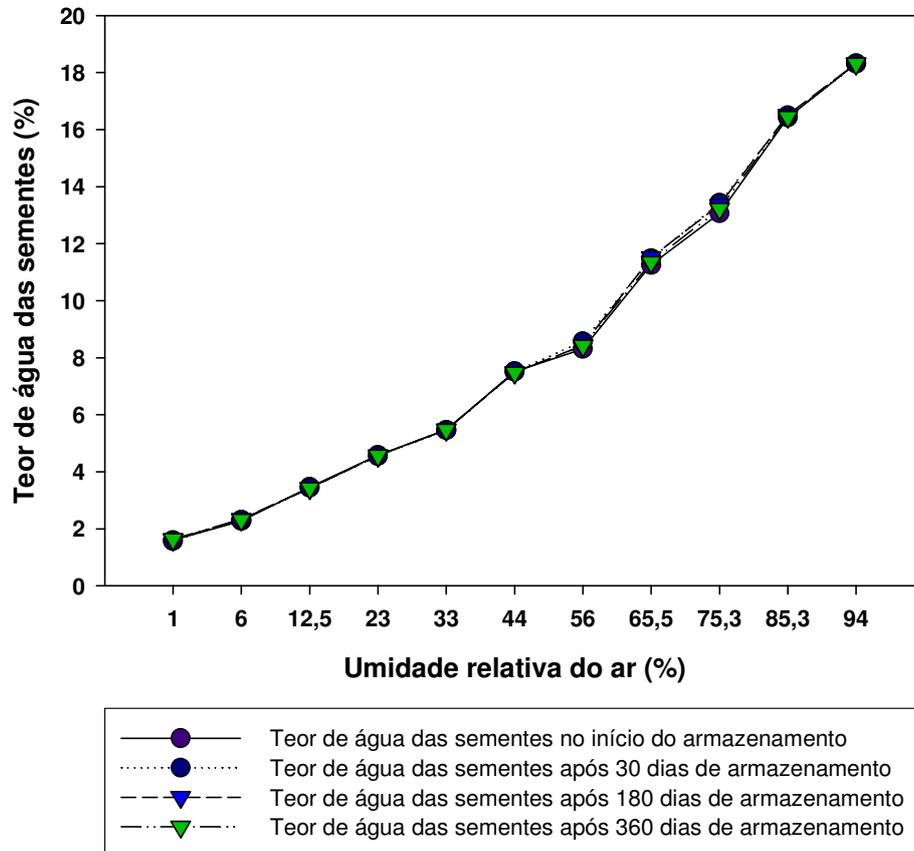


Figura 6. Teor de água das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze armazenadas por diferentes períodos em nitrogênio líquido -196°C .

Esse resultado mostra que a embalagem utilizada foi eficiente para evitar a troca de vapor d'água entre as sementes e o ambiente de armazenamento; a embalagem impermeável deve ter essa propriedade (TOLEDO & MARCOS FILHO, 1977; CARNEIRO & AGUIAR, 1993; MEDEIROS, 2000). Esse é outro fator que afeta a longevidade das sementes durante o armazenamento. O IPIGRI recomenda que as sementes desidratadas devam ser acondicionadas em embalagem hermética para serem armazenadas em temperatura de -18°C ou menos (ELLIS et al., 1996). Assim, a conservação menos eficiente das sementes de *C. legalis* equilibradas a outros teores

de água se deveu ao próprio teor de água com que elas foram armazenadas e não à variação do teor de água durante o armazenamento.

As sementes equilibradas sobre o Cloreto de lítio mantiveram, durante todo o período de armazenamento, o teor de água de 3,7% (Figura 7) nos dois ambientes de armazenamento, resultando em equações de regressão não significativas. A manutenção desse teor de água foi conseguida por causa da eficiente impermeabilidade da embalagem utilizada.

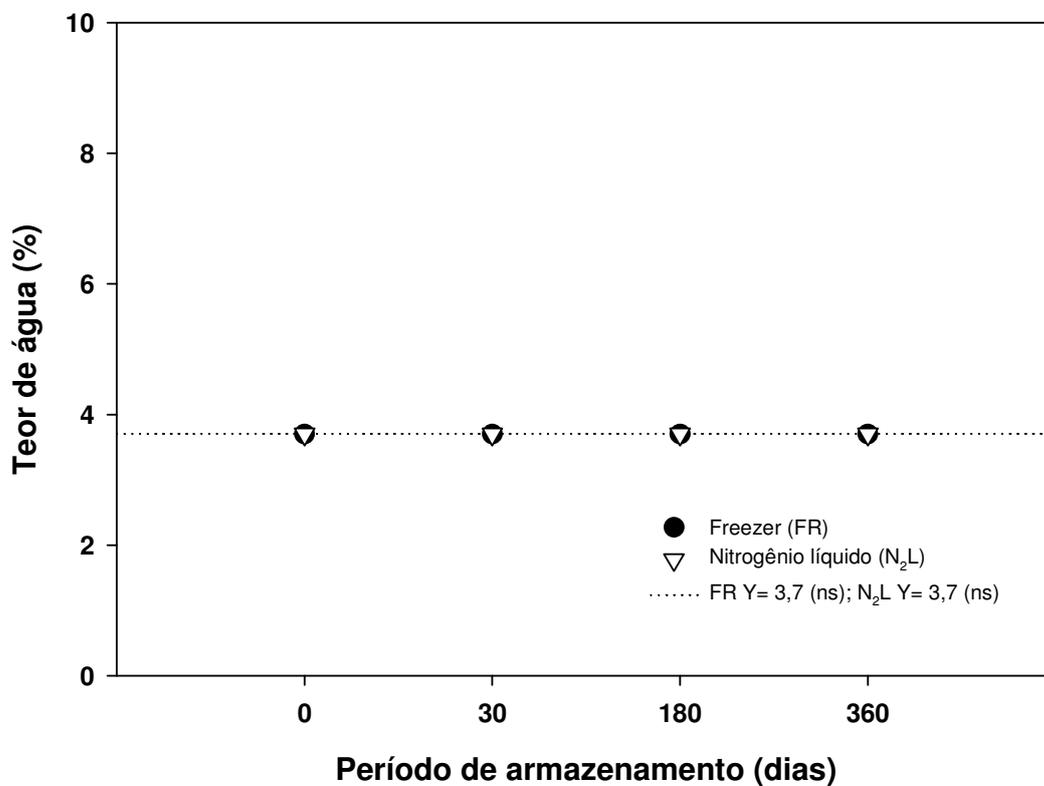


Figura 7. Teor de água das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze equilibradas sobre Cloreto de lítio e armazenadas em freezer (-20°C) e nitrogênio líquido (-196°C) por diferentes períodos.

Para as porcentagens de germinação (Figura 8) e de viabilidade (Figura 9), as análises de regressão revelaram que os dados constatados no freezer se ajustaram ao modelo cúbico; assim, os valores oscilaram durante o período de armazenamento. As equações de regressão obtidas para os dados constatados no nitrogênio líquido não foram significativas e os valores permaneceram constantes durante o período de armazenamento.

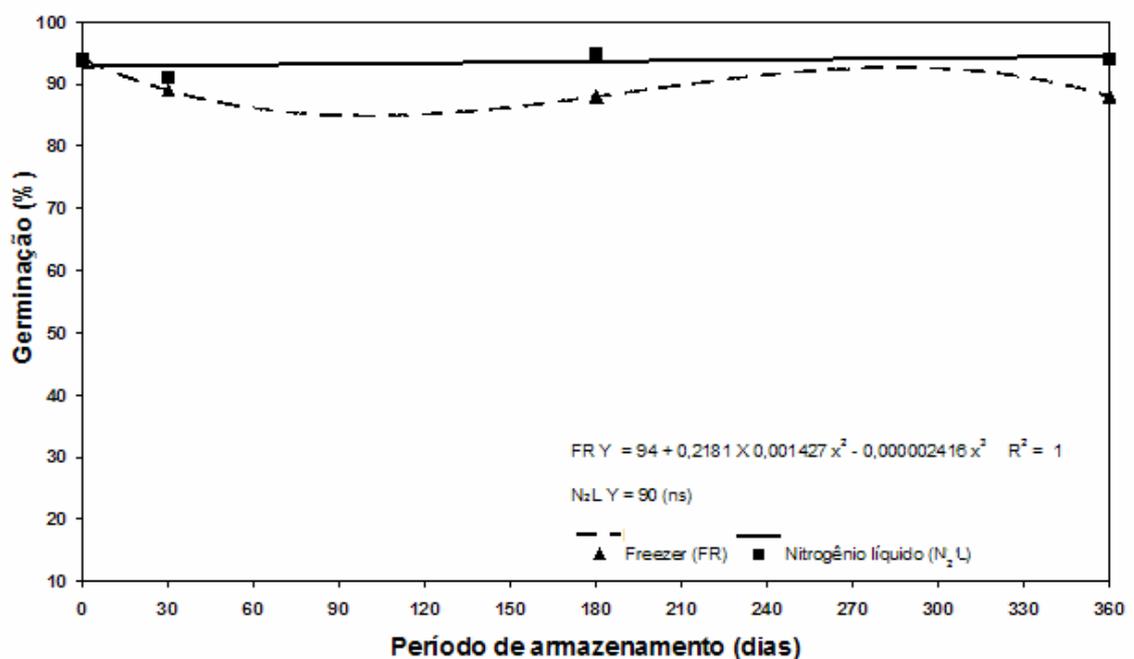


Figura 8. Porcentagem de germinação das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze armazenadas com 3,7% de água em freezer (-20°C) e nitrogênio líquido (-196°C) por diferentes períodos.

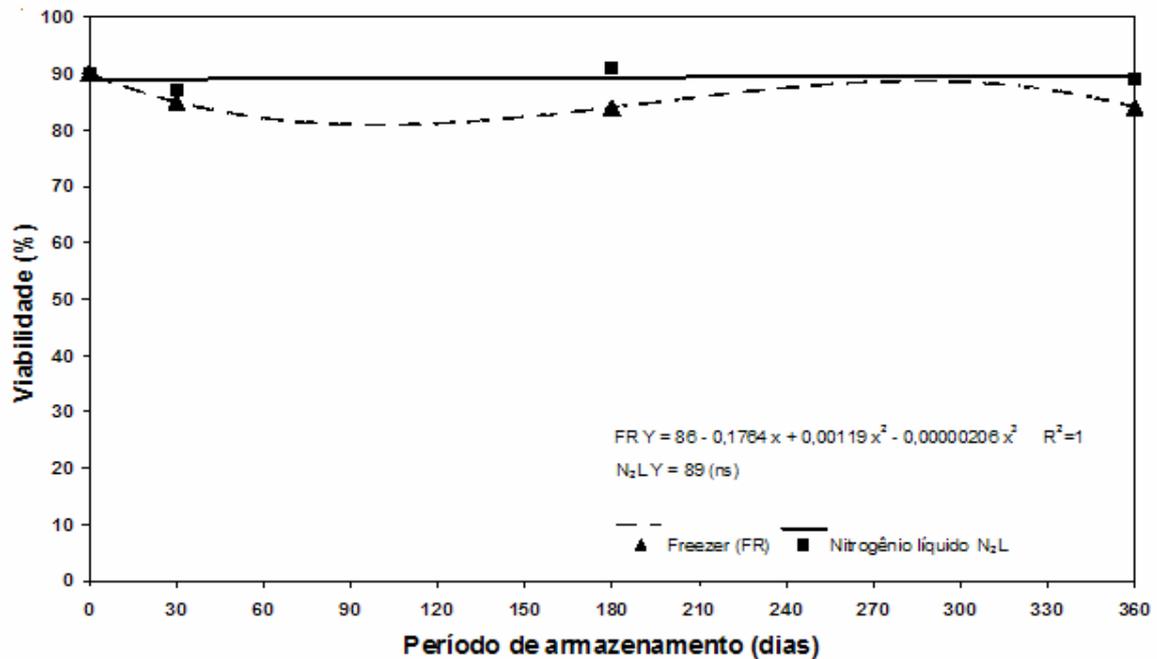


Figura 9. Viabilidade das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze armazenadas com 3,7% de água em freezer (-20°C) e nitrogênio líquido (-196°C) por diferentes períodos.

Os resultados obtidos no nitrogênio líquido foram superiores aos obtidos no freezer, evidenciando menor deterioração das sementes armazenadas a -196°C. Estudando o comportamento das sementes de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. (angico-vermelho) com diferentes teores de água e armazenadas em três ambientes (normal de laboratório, freezer a -20°C e nitrogênio líquido a -196°C), REIS & CUNHA (1997) também constataram melhor desempenho germinativo das sementes com 5,6% de água hidratadas a 8,2% e armazenadas em nitrogênio líquido. Segundo PRITCHARD et al. (1988), a exposição ao nitrogênio líquido aumenta a absorção de água por meio de fissuras no tegumento das sementes, formadas durante o congelamento, com conseqüente incremento na germinação.

Entretanto, SALOMÃO & FUJICHIMA (2002) verificaram que a porcentagem de germinação das sementes de *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. F. ex S. Moore (ipê-amarelo) desidratadas a 4,0% de água mantiveram de forma similar a porcentagem de germinação após o armazenamento a -20°C e a -196°C. Estudando a desidratação das sementes em câmara seca por diferentes períodos, os autores constataram que o melhor teor de água, de 4%, foi obtido após 24 h de desidratação. Comportamento semelhante foi constatado para sementes de *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* (Benth.) Altschul (angico-do-cerrado) por MARQUES (2007). As sementes equilibradas sobre sílica gel a 4,5% de água mantiveram a capacidade germinativa durante o armazenamento em freezer e em nitrogênio líquido. Esses teores de água também estão dentro da faixa recomendada pelo IPIGRI, para o armazenamento a longo prazo em temperatura inferior a -18°C, como já foi comentado anteriormente.

Para algumas espécies, não houve um determinado teor de água mais adequado para o armazenamento em temperatura inferior a zero. Tanto no freezer como no nitrogênio líquido, a germinação das sementes de *Sebastiania commersoniana* foi mantida em elevada porcentagem quando armazenadas com teor de água de 2,3 a 17,3% (ABREU & MEDEIROS, 2005a) e a das *Miconia cabucu* com 6,4 a 16,5% de água (ABREU & MEDEIROS, 2005b).

A perda do poder germinativo é a consequência final da deterioração das sementes; durante esse processo, ocorrem alterações físicas, fisiológicas, químicas e bioquímicas nas sementes (CARNEIRO & AGUIAR, 1993). Dessa forma, o vigor das sementes pode ser afetado, durante o armazenamento, antes da sua capacidade germinativa. Contudo, no presente trabalho o tempo médio de germinação, que é um índice de vigor, não foi afetado quando as sementes foram armazenadas com 3,7% de água nos dois ambientes (Figura 10). As sementes de *C. legalis* germinaram em 28 dias durante todo o período de armazenamento, resultando em equações de regressão não significativas.

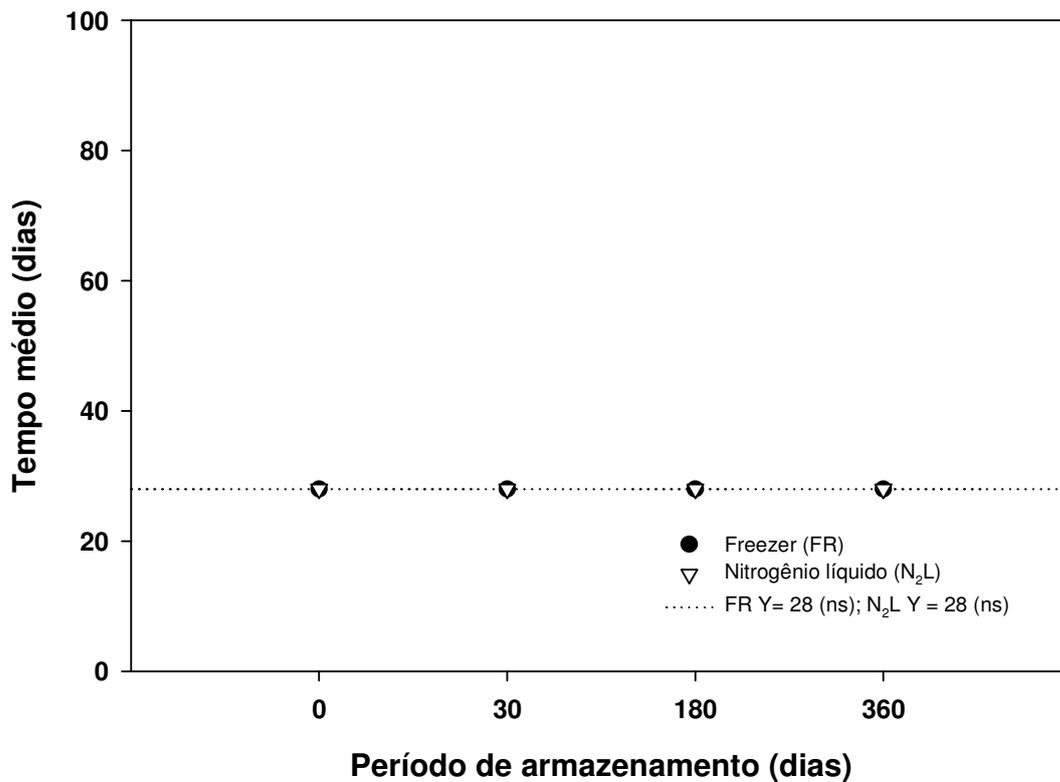


Figura 10. Tempo médio de germinação das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze armazenadas com 3,7% de água em freezer (-20°C) e nitrogênio líquido (-196°C) por diferentes períodos.

MARQUES (2007) também verificou que as sementes de *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* (Benth.) Altschul (angico-do-cerrado) mantiveram o índice de velocidade de germinação inalterado durante o armazenamento no freezer e no nitrogênio líquido. Provavelmente as fissuras formadas no tegumento das sementes, pela exposição ao nitrogênio líquido (PRITCHARD et al., 1988), também sejam formadas no freezer, durante o congelamento. Talvez por esse motivo as sementes armazenadas no freezer tenham germinado tão rapidamente quanto as armazenadas no nitrogênio líquido.

Resultados diferentes foram constatados por REIS & CUNHA (1997) com sementes de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. (angico-vermelho). Os autores verificaram que as sementes armazenadas no nitrogênio líquido apresentaram maiores valores de germinação do que as armazenadas no freezer. O que esses autores denominaram de “valor de germinação” foi denominado por AGUIAR (1984) de “índice valor germinativo”, que reúne em um único valor numérico, proposto por CZABATOR (1962), a porcentagem e a velocidade de germinação das sementes.

Da mesma forma, CORLETT (2004) verificaram que as sementes de *Bixa orellana* L. (urucum) acondicionadas com 7,0% de água em embalagem de alumínio apresentaram, após 360 dias, maiores valores de primeira contagem de germinação e de índice de velocidade de germinação quando armazenadas no nitrogênio líquido do que no freezer.

As análises de regressão referentes à condutividade elétrica das sementes de *C. legalis* armazenadas com 3,7% de água mostraram que os dados se ajustaram ao modelo cúbico, nos dois ambientes (Figura 11); assim, os valores oscilaram durante o período de armazenamento. A oscilação foi pequena, indicando pouca desorganização no sistema de membranas, principalmente quando as sementes foram armazenadas no nitrogênio líquido.

Para *Bixa orellana* L. (urucum), os valores de condutividade elétrica das sementes acondicionadas em embalagem de alumínio e armazenadas no freezer foram menores do que no nitrogênio líquido, indicando menor desorganização no sistema de membranas naquele ambiente (CORLETT, 2004). O autor armazenou as sementes com apenas um teor de água (7,0%) e certamente esse teor de água não é o mais adequado para o armazenamento das sementes dessa espécie a -196°C .

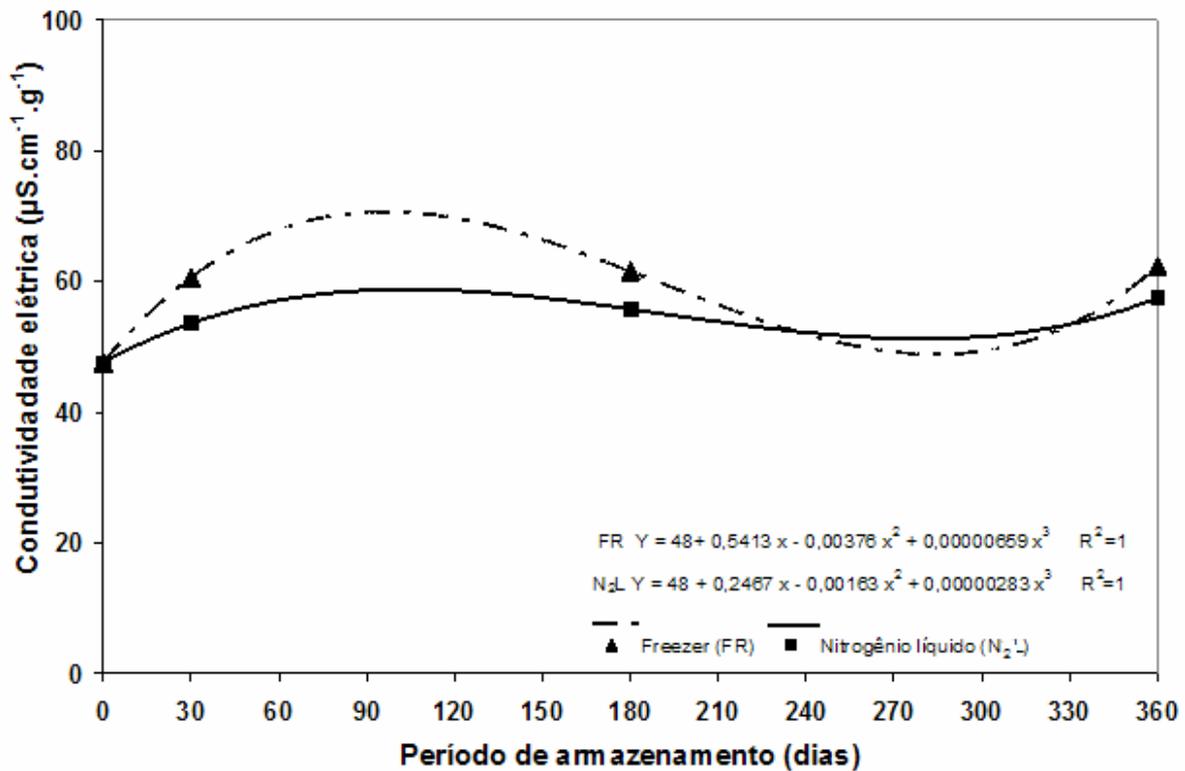


Figura 11. Condutividade elétrica das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze armazenadas com 3,7% de água em freezer (-20°C) e nitrogênio líquido (-196°C) por diferentes períodos.

De modo geral, as sementes de *C. legalis* desidratadas a 3,7% de água conservaram satisfatoriamente sua qualidade fisiológica durante o período de armazenamento estudado, principalmente quando armazenadas no nitrogênio líquido. Provavelmente a associação entre o teor de água das sementes e a temperatura do ambiente de armazenamento foi adequada, promovendo maior organização das membranas celulares e, conseqüentemente, reduzindo os danos fisiológicos às sementes.

A deterioração das sementes é um processo inevitável e a qualidade das sementes não melhora durante o armazenamento (POPINIGIS, 1985). Mesmo quando

armazenadas em condições ótimas de teor de água e de temperatura, as sementes estão sujeitas à redução gradativa da sua viabilidade e do seu vigor (MARCOS FILHO, 2005). O armazenamento adequado permite manter as sementes com um mínimo de deterioração, prolongando a sua longevidade (CARNEIRO & AGUIAR, 1993).

A criopreservação das sementes de *C. legalis* desidratadas a 3,7% de água foi a alternativa mais viável para o armazenamento a longo prazo, em banco(s) de germoplasma. No trabalho de SALOMÃO & FUJICHIMA (2002), o período de exposição das sementes ao nitrogênio líquido foi de um dia; no de REIS & CUNHA (1997) foi de três dias; nos de ABREU et al. (2005a,b) foi de 180 dias, no de CORLETT (2004) e no presente trabalho foi de 360 dias e no de MARQUES (2007) foi de 600 dias. STANWOOD (1985) salientou que se uma amostra de sementes pode ser congelada em nitrogênio líquido e descongelada sem danos, o armazenamento por dias, semanas, anos ou séculos, não deverá alterar a sua viabilidade. Conforme relataram STANWOOD & BASS (1981) e KARTHA (1985), o armazenamento em nitrogênio líquido oferece potencial para uma preservação sem limites de tempo, com a redução do metabolismo das sementes a níveis tão baixos que os processos bioquímicos são essencialmente reduzidos e a deterioração biológica é virtualmente paralisada.

5. CONCLUSÕES

(a) a construção da isoterma de sorção com soluções salinas saturadas foi eficiente para obter diferentes teores de água de equilíbrio;

(b) as sementes toleram a desidratação e suportam temperaturas inferiores a zero, apresentando comportamento ortodoxo;

(c) o teor de água mais adequado para o armazenamento das sementes no freezer e no nitrogênio líquido foi de 3,7%;

(d) as sementes armazenadas com 3,7% de teor de água se conservaram melhor no nitrogênio líquido;

(e) a criopreservação das sementes desidratadas evidenciou a possibilidade de armazenar a longo prazo as sementes de *C. legalis* em bancos de germoplasma.

6. REFÊRENCIAS

ABREU, D.C.A.; MEDEIROS, A.C.S. Comportamento fisiológico de sementes de branquilha (*Sebastiania commersoniana*), Euphorbiaceae em relação ao armazenamento. **Informativo ABRATES**, Pelotas, v.15, n.1, 2, 3, 2005a. p.291.

ABREU, D.C.A.; MEDEIROS, A.C.S. Comportamento fisiológico de sementes de pixiricão (*Miconia cabucu*) em relação ao armazenamento. **Informativo ABRATES**, Pelotas, v.15, n.1, 2, 3, 2005b. p.291.

ABREU, D.C.A.; MEDEIROS, A.C.S.; AGUIAR, I.B.; BANZATTO, D.A. Teste de condutividade elétrica em sementes de jequetibá-rosa (*Cariniana legalis*) O. Kuntze. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 6., 2007: Colombo. **Anais...** Colombo: Embrapa Florestas, 2007a. 1 CD-ROM.

ABREU, D.C.A.; AGUIAR, I.B.; MEDEIROS, A.C.S.; BANZATTO, D.A. Teste bioquímico para avaliação da viabilidade de sementes de jequetibá-rosa (*Cariniana legalis*). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA. 58., 2007, São Paulo. A botânica no Brasil: pesquisa ensino e políticas públicas ambientais: **Resumos**. [Porto Alegre]: Sociedade Botânica do Brasil, 2007b.

AGUIAR, I.B. Avaliação da qualidade fisiológica das sementes florestais. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL: MÉTODOS DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE SEMENTES E MUDAS FLORESTAIS, 1984, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPr/IUFRO, 1984. p.277-290.

BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237p.

BARBEDO, C.J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v.12, n.2, p. 145-164, 1998.

- BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L. ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa, 1999, 443p.
- BELTRATI, C.M.; PAOLI, A.A.S.; TIMONI, J.L. Morfologia e anatomia das sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze. e de *C. estrellensis* (Raddi) O. Ktze. (Lecytidaceae). **Silvicultura em São Paulo**, São Paulo, v.16-A, pt.1, p. 293-300, 1982.
- BEWLEY, J.B.; BLACK, M. **Seed**: physiology of development and germination. New York: Plenum Press, 1984. 445p.
- BECWAR, M.R; STANWOOD, C.E.; ROOS, E.F. Dehydration effects on imbibition leakage from desiccation-sensitive seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 69, p. 1132-1135, 1982.
- BERJAK, P.; DINI, M.; PAMMENTER, N.W. Possible mechanisms underlying dehydration responses in recalcitrant and orthodox seeds: desiccation-associated subcellular changes in propagules of *Avicennia marina*. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.12, p. 365-384, 1984.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, p. 22-55, 2000.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W.; VERTUCCI, C.W. Homeohydrous (recalcitrants) seeds: developmental status, desiccation sensitivity and the state of water in axes of *Landolphia kirkii* Dyer. **Plant**, New York, v.186, p.249-261, 1992.
- BILIA, D.A.C. **Tolerância e armazenamento de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et. Arn.** 1997. 88f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV. 1992. 365p.

CADDAH, M.K.; ANDRADE, B.O.; MEDEIROS, A.C.S. Efeitos da desidratação e do armazenamento em sementes de *Talauma ovata* St. Hil.- Magnolizceae. **Informativo ABRATES**, Pelotas, v.15, n.1,2,3, 2005. p.285.

CARNEIRO, J. G. A.; AGUIAR, I. B. Armazenamento de sementes. In: AGUIAR, I.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. (Coord.) **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p.333-350.

CARVALHO, P.E.R. **Jequitibá-rosa**. Colombo: Embrapa Florestas, 2005. 10 p. Embrapa Florestas. (Circular Técnica, 107).

CHAI, J.; MA, R.; LI, L.; DU, Y. Optimum moisture contents of seeds stored at ambient temperatures. **Seed Science Research**, Wallingford, v.8, Supplement n.1, p.23-28. 1998.

CHIN, H.F. **Recalcitrant seeds: a status report**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1988. 28p.

CORLETT, F.M.F. **Qualidade fisiológica de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) armazenadas em diferentes ambientes e embalagens**. Pelotas, 2004, 94f. Tese (Doutorado). Ciência e Tecnologia de Sementes. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2004.

CZABATOR, F.J. Germination value: an index combining speed and completeness of Pine seed germination. **Forest Science**, Madison, v.8, n.4, p.386-396, 1962.

DANIEL, J.W.; CHAPPELL, W.E.; COUCH, H.B. Effect of sub-lethal and lethal temperatures on plant cells. **Plant Physiology**, Rockville, v.44, p.1684-1689. 1969.

DICKIE, J. B.; MAY, K.; MOORIS, S. V. A; STLEY, S. E. The effects of desiccation on seed survival in *Acer platanoides* L. and *Acer pseudoplatanus* L. **Seed Science Research**, Wallingford, v.1, p.149-162. 1991.

EIRA, M.T.S. Classificação de sementes em ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias. In: PUIGNAU, J.P. (ed). **Conservación de germoplasma vegetal**. **Montevideo**: IICA, 1996. p.119-122. (IICA-PROCISUR, Diálogo, 45).

EIRA, M.T.S.; WALTERS, C.W.; CALDAS, L.S.; FAZUOLI, L.C.; SAMPAIO, J.B.; DIAS, M.C.L.L. Tolerance of *Coffea spp.* to desiccation at low temperature. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.11, n.2, p.97-105, 1999.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ASTLEY, A.; PINNEGAR, A.E.; KRAAK, H.L. Survival of dry and ultra-dry seeds of carrot, groundnut, lettuce, oilseed rape, and onion during five years' hermetic storage at two temperatures. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.24, n.2, p.347-358, 1996.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.41, n.230, p.1167-1174, 1990.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. Effect of storage temperature and moisture content on the germination of papaya seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.1, n.1, p.69-72, 1991a.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H.; SOETISNA, U. Seed storage behaviour in *Elaeis guineensis*. **Seed Science Research**, Wallingford, v.1, n.2, p.99-104, 1991b.

FANTINATTI, J.B.; USBERTI, R.; BROD, F.P.R. Isotermas de sorção de sementes de *Eucalyptus grandis* e *Pinus taeda*. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.27, n.2, p.06-11, 2005.

FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Germination-associated events and desiccation sensitivity of recalcitrant seeds – a study on three unrelated species. **Planta**, New York, v.178, p.189-198, 1989.

FERRETTI, A.R.; KAGEYAMA, P.Y.; ÁRBOCZ, G.F.; SANTOS, J.D.; BARROS, M.I.A.; LORZA, R.; OLIVEIRA, C. Classificação das espécies arbóreas em grupos ecológicos para revegetação com nativas no Estado de São Paulo. **Florestar Estatístico**, São Paulo, v.3, n.7, p.73-77, 1995.

FIGLIOLIA, M.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M. Manejo de sementes de espécies arbóreas. **IF Série Registros**, São Paulo, n.15, p.1-59, 1995.

GEMARQUE, R.C.R.; DAVIDE, A.C.; SILVA, E.A.A.; FARIA, J.M.R. Efeito das secagens lenta e rápida em sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.). **Cerne**, Viçosa, v.11, n.4, p.329-335, 2005.

GONÇALVES, E.G.; LORENZI, H. Pixídio. In: GONÇALVES, E.G.; LORENZI, H. **Morfologia vegetal**: organografia e dicionário ilustrado de morfologia de plantas vasculares. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 2007. p. 335.

GONZALEZ, R.A.F. **Efeito da criopreservação usando técnicas de congelamento e crioprotetores sobre características espermáticos e a integridade de membrana de espermatozoides bovino**. Pirassununga, 2004. 92p.

HARRINGTON, J.F. Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI, T.T. **Seed biology**. New York: Academic Press, 1972. v.3, p.145-245.

HARRINGTON, J.F. Packaging seed for storage and shipment. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.1, n.3, p.701-709, 1973.

HARRISON, B.J.; CARPENTER, R. Storage of *Allium cepa* seed at low temperatures. **Seed Science Technology**, Zürich, v.5, p.699-702, 1977.

HONG, T.D.; ELLIS, R.H. Development of desiccation tolerance in Norway maple (*Acer platanoides* L.) seeds during maturation drying. **Seed Science Research**, Wallingford, v.2, n.2, p.169-172, 1992.

HONG, T.D.; ELLIS, R.H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Rome: IRPGRI, 1996. 55 p. (Technical Bulletin 1).

HU, X.; ZHANG, Y.; HU, C.; TAO, M.; CHEN, S. A comparison of methods for drying seeds: vacuum freeze-drier versus silica gel. **Seed Science Research**, Wallingford, v.8, n.1, p.29-33, 1998.

HUNT, W.H.; PIXTON, S.W. Moisture – Its significance, behaviour and measurement. In: CHRISTENSEN, C. M. **Storage of cereal grains and their products**. Minnesota: AACCI, 1974. p.1-53.

ISTA. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. International rules for seed testing. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.27, suplemento, Regras, p.27, 1999.

IUCN (INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE). **Lista da flora ameaçada de extinção com ocorrência no Brasil**. Disponível em: <<http://www.biodiversistas.org.br/floraBr/iucn.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2008.

KAGEYAMA, P.Y.; VIANA, V.M. Tecnologia de sementes e grupos ecológicos de espécies arbóreas tropicais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE TECNOLOGIA DE SEMENTES FLORESTAIS, 2., 1989, Atibaia. **Anais...** São Paulo: Instituto Florestal, 1991. p.197-215.

KARTHA, K.K. Meristem culture and germoplasm preservation. In: KARTHA, K.K. **Criopreservação de células e órgãos**. Boca Raton: CRC Press., 1985. p115-134.

LEOPOLD, A.C. Coping with desiccation. In: ALSHER, J.G.; CUMMING, J.R. (Eds.). **Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms**. New York, Wiley-Liss, 1990. p.37-56.

LEOPOLD, A.C.; VERTUCCI, C.W. Moisture as a regulator of physiological reaction in seeds. Crop Science Society of America, Madison, USA, Seed Moisture, CSSA, Special Publication, n.14, 51-6p. 1989.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G.A.F.; MCKERSIE, B.D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, p.231-246, 1993.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v.2, 368p.

MARCHI, J.L.; CICERO, S.M. Procedimento para a condução do teste de condutividade elétrica em sementes. **Informativo ABRATES**, Pelotas, v.12, n.1, 2, 3, p.20-27, 2002.

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

MARQUES, M.A. **Secagem e armazenamento de sementes de *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* (Benth.) Altschul e *A. colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul**. 2007. 124f. Tese (Doutorado em Agronomia - Produção e Tecnologia de Sementes) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

McMIN, W. A. M.; AI-MUHTASEB, A. H.; MAGEE, T. R. A. Enthalpy-entropy compensation in sorption phenomena of starch materials. **Food Research International**, Ottawa, v.38, p.505-510, 2005.

MEDEIROS, A. C. S. **Comportamento fisiológico, conservação de germoplasma a longo prazo e previsão de longevidade de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl.)**. Jaboticabal, 1996. 127f. Tese (Doutorado em Agronomia - Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1996.

MEDEIROS, A.C.S. Armazenamento de sementes de espécies florestais da mata atlântica. In: VIBRANS, A.C.; GALVÃO, P. (Coord). **Curso de manejo e conservação de sementes de espécies arbóreas da mata atlântica – região sul, 1.** Blumenau:URB / FURB / EMBRAPA, 2000. p.48-59.

MEDEIROS, A.C.S. **Preparo e uso de soluções salinas saturadas para a caracterização fisiológica de sementes florestais.** Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 6p. (Circular Técnica, 125).

MEDEIROS, A.C.S.; CAVALLARI, D.A.N. Conservação de germoplasma de aroeira (*Astronium urundeuva* (FR. ALL.) ENG. I. Germinação de sementes após imersão em nitrogênio líquido (-196°C). **Revista Brasileira de Sementes**, v.14, n.1, p.73-75, 1992.

MEDEIROS, A.C.S.; PROBERT, R.J. SADER, R.; SMITH, R.D. The moisture relations of seed longevity in *Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.26, n.2, p.289-298, 1998.

MERCK. **The Merck Index:** an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 11.ed. New York: Merck, 1989, 1605p.

MERRIT, D.J.; TOUCHELL, D.H.; SENARATNA, T.; DIXON, K.W.; SIVASITHAMPARAM, K. Water sorption characteristics of seeds of four Western Australian species. **Australian Journal of Botany**, Victoria, v.51, p.85-92. 2003.

MESQUITA, J.B.; ANDRADE, E.T.; CORRÊA, P.C. Modelos matemáticos e curvas de umidade de equilíbrio de sementes de jacarandá-da-bahia, angico-vermelho e óleo-copaíba. **Cerne**, Viçosa, v.7, n.2, p.12-21, 2001.

MIRANDA, A. R. Criopreservação de germoplasma vegetal. Metodologias. Embrapa Cenargen, sd.

MOLINA, T.F.; TILLMANN, M.A.; DODE, B.L.; VIÉGAS, J. Crioconservação em sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.28, n.3, p.72-81, 2006.

NELLIST, M.E.; HUGHES, M. Physical and biological processes in the drying of seed. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.1, n.3, p.613-643, 1973.

NOGUEIRA, J.C.B. Reflorestamento heterogêneo com essências indígenas. **Boletim Técnico**, Instituto Florestal de São Paulo, São Paulo, v.24, p. 46-47, 1977.

NORMAH, M.N.; CHIN, H.F.; HOR, Y.L. Desiccation and cryopreservation of embryonic axes of *Hevea brasiliensis* Muell.- Arg., **Pertanika**, Selangor, v.9, n.3, p.299-303. 1986.

OLIVEIRA, L.M.; VALIO, I.F.M. Effects of moisture content on germination of seeds of *Hancornia speciosa* Gom. (Apocynaceae). **Annals of Botany**, London, v.9, p.91-100, 1994.

PALACIN, J.J.F.; LACERDA FILHO, A.F.; CECON, P.R. MONTES, E.J.M. Determinação das isotermas de equilíbrio higroscópico de milho (*Zea mays* L.). Nota Técnica. **Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa, v.31, n.2, p.197-205, 2005.

PAMMENTER. N.W.; VERTUCCI, C.W.; BERJAK, P. Homeohydrous (recalcitrant) seeds: dehydration, the state of water and viability in *Landolphia kirkii*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, p. 1093-1098, 1991.

PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; COSTA, L.G.S.; REIS, A. Estratégias de estabelecimento de espécies arbóreas e manejo de florestas tropicais. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., 1990, Campos do Jordão. **Anais...** São Paulo: SBS/SBEF, 1990. p.676-684.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2.ed. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

PRITCHARD, H.W.: MANGER, K.R.: PRENDERGAST, F.J. Changes in *Trifolium arvense* seed quality following alternating temperature treatment using liquid nitrogen. **Annals of Botany**, London, v.62, p.1-11, 1988.

REIS, A.M.M.; CUNHA, R. Efeito do congelamento sobre a viabilidade de sementes de *Anadenanthera perigrina* (L.) SPEG. com diferentes conteúdos de umidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n.10. p.1071-1079, 1997.

REITZ, P. **Leticidáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1981, 32p. (Flora Ilustrada Catarinense).

RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Ed. Blucher, 1978, 296p.

ROA, G.; ROSSI, S.J. Determinação experimental de curvas de teor de umidade de equilíbrio mediante a medição da umidade relativa de equilíbrio. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v.2, p.17-22, 1977.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.1, n.3, p.499-514, 1973.

ROBERTS, E.H. Storage environment and the control of viability. In: ROBERTS, E.H. (Ed.). **Viability of seeds**. New York: Syracuse University Press, 1972. p.14-58.

ROBERTS, E.H.; ELLIS, R.H. Water and seed survival. **Annals of Botany**, London, v.63, p.39-52. 1989.

ROCKLAND, L.B. Saturated salt solutions for static control of relative humidity between 5° and 40 °C. **Analytical Chemistry**, v.32, n.10, p.1375-1376, 1960.

SAKAI, A. Cryopreservation of germoplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry**. v.32. Cryopreservation on plant germoplasm I. Berlin: Springer-Verlag; New York, 1995. p.53-69.

SALOMÃO, A.N. Respostas de sementes de espécies tropicais a exposição ao nitrogênio líquido. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v.14, n.2, p.133-138, 2002.

SALOMÃO, A.N.; FUJICHIMA, A.G. **Respostas de sementes de *Tabebuia áurea* (Silva Manso) Benth. & Hook F. ex. S. Moore (Bignoniaceae) à dessecação e ao congelamento em temperaturas subzero**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Série Embrapa –Comunicado Técnico 76), 2002.

SILVA, P.A.; DINIZ, K.A.; OLIVEIRA, J.A.; VON PINHO, E.V.R. Análise fisiológica e ultra-estrutural durante o desenvolvimento e a secagem de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.29, n.2, p.15-22, 2007.

SILVA, FIGLIOLIA, M.B.; AGUIAR I.B. Secagem, extração e beneficiamento de sementes. In.: AGUIAR, I.B. PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. **Sementes florestais**, Brasília: ABRATES, 1993. p.303-331.

STANWOOD, P.C. Tolerance of crop seeds to cooling and storage in liquid nitrogen (-196°C). **Journal of Seed Technology**, Lansing, v.5, n.1, p.26-31, 1980.

STANWOOD, P.C.; BASS, L.N. Seed germoplasm preservation using liquid nitrogen. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.9, n.2, p.423-437, 1981.

STANWOOD, P.C. Cryopreservation of seed germoplasm for genetic conservation. In: KARTHA, K.K. (Ed.) **Cryopreservation of plant cell and organs**. Boca Raton: CRC Press. 1985. p.200-266.

SUN, W.Q. Methods for the study of water relations under desiccation stress. In: BLACK, M.; PITCHARD, H.W. **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. New York: CABI Publishing, 2002. p. 47-91.

TOLEDO, F.F.; MARCOS FILHO, J. **Manual das sementes**. Tecnologia da produção. São Paulo: Agronômica Ceres, 1977. 224 p.

TOMPSETT, P.B.; The effect of temperature and moisture content on the longevity of seeds. **Annals of Botany**, London, v.57, p.875-883, 1986.

VENTURA, A.; BERENGUT, G.; VICTOR, M.A.M. Características edafo-climáticas das dependências do Serviço Florestal do Estado de São Paulo. **Silvicultura em São Paulo**, São Paulo, v.4-5, n.4, p.57-140, 1965/1966.

VERTUCCI, C.W. Predicting the optimum storage conditions for seeds using thermodynamic principles. **Journal of Seed Technology**, Lansing, v.17, n.2, p.41-53, 1993.

VERTUCCI, C.W.; FARRANT, J.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York, 1995. p. 237-271.

VERTUCCI, C.W.; LEOPOLD, A.C. The relationship between water binding and desiccation tolerance in tissues. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, p. 232-238, 1987.

VERTUCCI, C.W.; ROOS, E.E. Theoretical basis of protocols for seed storage. **Plant Physiology**, Rockville, v.94, n.3, p.1019-1023, 1990.

VERTUCCI, C.W.; ROOS, E.E. Theoretical basis of protocols for seed storage II. The influence of temperature on optimal moisture levels. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, n.3, p.201-213. 1993.

VERTUCCI, C.W.; ROOS, E.E.; CRANE, J. Theoretical basis of protocols for seed storage III. Optimum moisture contents for pea seeds stored at different temperature. **Annals of Botany**, London, v.74, p.531-540, 1994.

VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164 p.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p.4.1-4.26.

WALTERS, C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. **Seed Science Research**, Wallingford, v.8, p.223-244, 1998.

WALTERS, C.; ENGELS, J. The effects of storing seeds under extremely dry conditions. **Seed Science Research**, Wallingford, v.8, Supplement n.1, p.3-8. 1998.

WALTERS, C.; RAO, N. K.; HU, X. Optimizing seed water content to improve longevity in *ex situ* genebanks. **Seed Science Research**, Wallingford, v.8, Supplement, n.1, p.15-22, 1998.

WALTERS-VERTUCCI, C.; ROOS, E.E. Seed moisture, seed drying and energy costs of a seed bank. In: ANNUAL CORN & SORGHUM INDUSTRY RESEARCH CONFERENCE, 50. 1995, Washington, DC. **Proceedings**, Washington, DC: **American Seed Trade Association**, 1995. p.243-255.

WALTERS, C.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P.; CRANE, J. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerance and sensitive seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.11, p.135-148, 2001.

WETZEL, M.M.V.S. **Metodologia para criopreservação de sementes de espécies florestais nativas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 5p. (Circular Técnica, 26).

WINSTON, P.W.; BATES, D.H. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. **Ecology**, Tempe, v.41, n.1, p.232-237. 1960.