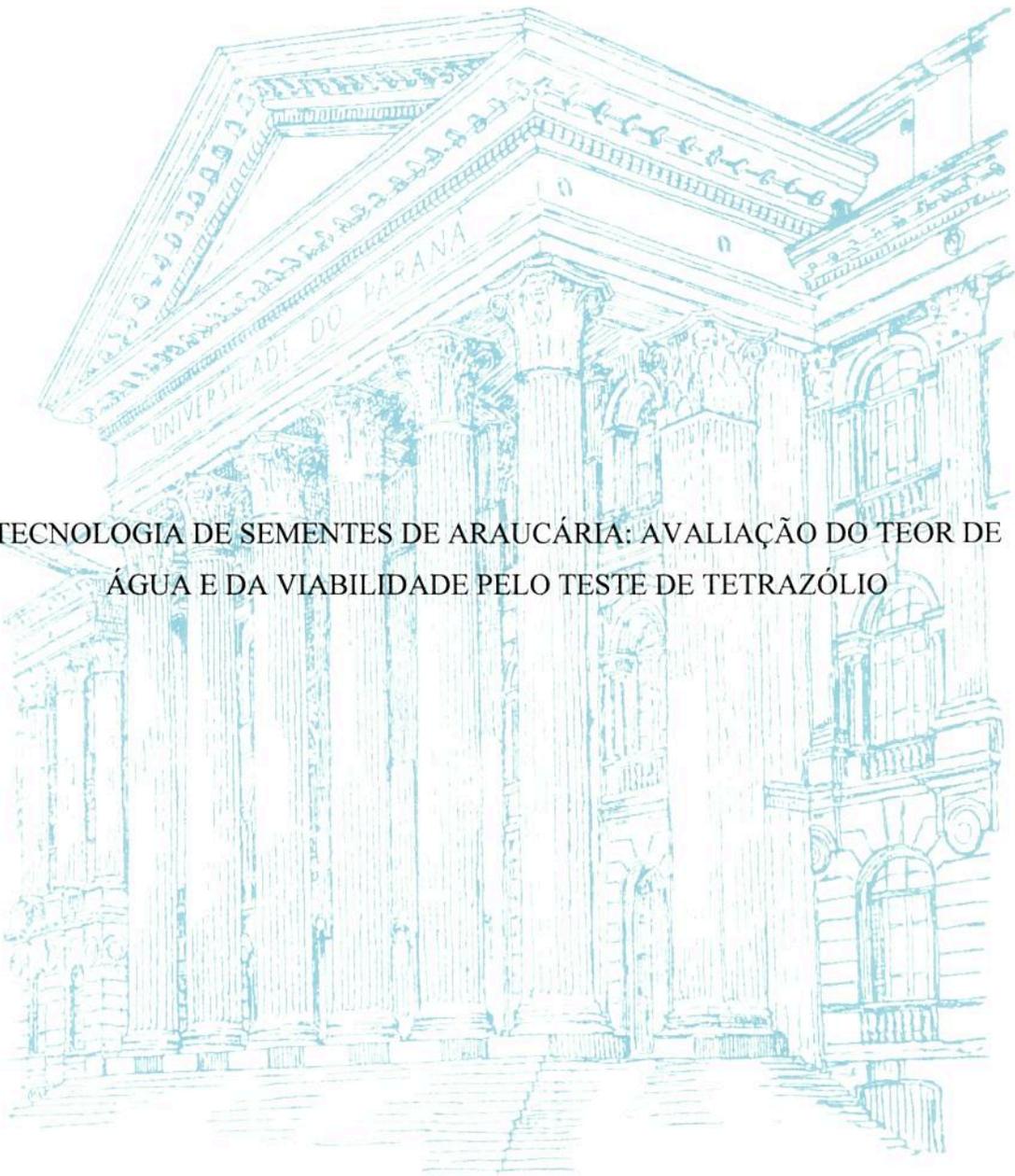


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA ARIANE DA SILVA



TECNOLOGIA DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA: AVALIAÇÃO DO TEOR DE
ÁGUA E DA VIABILIDADE PELO TESTE DE TETRAZÓLIO

CURITIBA

2015

BRUNA ARIANE DA SILVA

TECNOLOGIA DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA: AVALIAÇÃO DO TEOR DE
ÁGUA E DA VIABILIDADE PELO TESTE DE TETRAZÓLIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maristela Panobianco Vasconcellos.

CURITIBA

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL



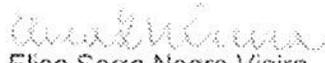
PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **BRUNA ARIANE DA SILVA**, sob o título "TECNOLOGIA DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA: AVALIAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA E DA VIABILIDADE PELO TESTE DE TETRAZÓLIO", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

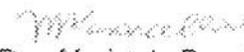
Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "APROVAÇÃO" da Dissertação.

Curitiba, 23 de Fevereiro de 2015.


Professor Dr. Cicero Deschamps
Coordenador do Programa


Dra. Elisa Serra Negra Vieira
Primeira Examinadora


Professora Dra. Adriana Martinelli Seneme
Segunda Examinadora


Professora Dra. Maristela Panobianco Vasconcelos
Presidente da Banca e Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pela força que me foi dada, permitindo alcançar os meus objetivos.

A professora e orientadora Maristela Panobianco Vasconcellos, pela amizade e orientação em todos esses anos.

Aos meus pais, Nelson Vanderlei da Silva e Ilete Maria Angioletti da Silva, pela dedicação, apoio e amor.

A minha nona, Anselma Maria Barni Angioletti, pelo apoio, carinho, dedicação.

A José Luiz Nogueira, pelo companheirismo, dedicação e apoio nos momentos difíceis, pela ajuda oferecida na escrita e pelas opiniões sempre úteis, pelas palavras de incentivo e por todo o carinho oferecido.

Aos meus co-orientadores, Dr^a. Elisa Serra Negra Vieira, e ao professor. Dr. Flávio Zanette pela orientação e ajuda.

Ao pessoal do Laboratório de Análise e Tecnologia de Sementes, Camila Ribeiro de Souza Grzybowski, Rosemeire de Carvalho da Silva, Tereza Cristina de Carvalho, Andreza Cerioni Belniaki, Roseli Rocio Biora, e Mariana Faber Flores.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, que me forneceu o material com o qual eu realizei este trabalho.

A todos os professores, técnicos administrativos, e funcionários da Universidade Federal do Paraná que me apoiaram nesta jornada.

A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho.

RESUMO

A *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze é uma espécie nativa, ameaçada de extinção, com importância socioambiental devido a sua utilização na alimentação humana e animal e em áreas de reflorestamento. Objetivou-se neste trabalho ajustar uma metodologia específica para determinação do teor de água de sementes de araucária e estudar um método prático para a avaliação da qualidade das sementes por meio do teste de tetrazólio, propondo maior rapidez de execução e permitindo o estabelecimento de grupos de viabilidade. Para a determinação do teor de água foram testados quatro formas de preparo da semente (sementes íntegras, cortadas em três partes, cortadas em quatro partes e cortadas em fragmentos menores do que 7,0 mm), dois métodos de secagem (estufa a 105 °C e estufa a baixa temperatura a 101-105 °C), por diferentes períodos, além da realização do peso de mil sementes. No estudo de avaliação da viabilidade das sementes, foram conduzidos, inicialmente, os testes de germinação e de tetrazólio, com metodologia recomendada nas Regras para Análise de Sementes para *Araucaria* spp. Em seguida, testou-se um método prático para condução do teste de tetrazólio, sem o pré-umedecimento das sementes e utilizando-se embriões excisados imersos diretamente na solução de tetrazólio, sendo estudadas três concentrações da solução (0,075%, 0,2% e 0,5%), três períodos de coloração (uma, duas e quatro horas) e duas temperaturas de coloração (30°C e 40°C). O procedimento mais indicado para a determinação do teor de água de *Araucaria angustifolia* é a utilização do preparo das sementes cortando-as em três partes, pelo método de estufa a baixa temperatura, durante 17 h. O teste de tetrazólio pode ser empregado com eficiência por meio da excisão dos embriões e imersão direta na solução de tetrazólio, empregando-se as seguintes combinações de metodologia: 0,5%/2h/30°C, 0,075%/4h/40°C ou 0,5%/2h/40°C, permitindo a identificação de dois grupos de viabilidade.

Palavras-chave: *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze, método de estufa, embriões excisados, grupo de viabilidade.

ABSTRACT

Araucaria angustifolia (Bertol) Kuntze is a native endangered species, with socio-environmental importance due to its use for human and animal food and in reforested areas. The aim of this study was to fit a specific methodology for determination of moisture content of *Araucaria* seeds and study a practical method for evaluation of seed quality through the tetrazolium test, for the purpose of greater speed in execution and allowing the establishment of viability groups. For that reason, four forms of seed preparation (whole seeds, seeds cut in three parts, seeds cut in four parts, and seeds cut in fragments of less than 7.0 mm) and two drying methods (laboratory oven at 105°C and low temperature oven at 101-105°C) for different periods were tested, as well as evaluation of thousand seed weight. In evaluation of seed viability, the germination and tetrazolium tests were initially conducted, with the methodology recommended in the Seed Analysis Rules for *Araucaria* spp. After that, a practical method for carrying out the tetrazolium test was tested, without pre-wetting of the seeds, using excised embryos directly immersed in the tetrazolium solution, studying three concentrations of the solution (0.075%, 0.2%, and 0.5%), three staining periods (one, two, and four hours), and two staining temperatures (30°C and 40°C). The procedure most recommended for determination of moisture content of *Araucaria angustifolia* is the use of seed preparation, cutting them in three parts, with use of the laboratory oven at low temperature, for 17 h. The tetrazolium test may be effectively used through excision of the embryos and direct immersion in the tetrazolium solution, using the following combinations of methodology: 0.5%/2h/30°C, 0.075%/4h/40°C, and 0.5%/2h/40°C, allowing seed classification in two viability groups.

Key words: *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze, oven method, excised embryos, viability groups.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Importância da espécie.....	11
2.2. Comportamento recalcitrante da semente.....	12
2.3. Métodos para determinação do teor de água da semente.....	13
2.4. Avaliação do potencial fisiológico das sementes.....	14
2.4.1. Teste de tetrazólio.....	15
3. CAPITULO I - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA	16
3.1. Introdução	18
3.2. Material e Métodos	19
3.3. Resultados e Discussão	22
3.4. Conclusões.....	29
3.5. Agradecimentos	29
3.6 Referências.....	30
4. CAPITULO II - MÉTODO PRÁTICO PARA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA PELO TESTE DE TETRAZÓLIO	33
4.1. Introdução	35
4.2 Material e Métodos	37
4.3 Resultados e Discussão	39

4.4. Conclusões.....	45
4.5. Referências.....	46
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	49
6. REFERÊNCIAS.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Preparo das sementes para a determinação do teor de água. 1a – semente inteira; 1b – sementes cortadas em três partes; 1c – sementes cortadas em quatro partes; 1d – sementes cortadas em fragmentos menores do que 7 mm.21

Figura 2. Excisão dos embriões de *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze: (a) vista externa da semente; (b) sementes com partes laterais retiradas com guilhotina; (c) semente sem o pericarpo; (d) início da retirada manual do endosperma; (e) vista interna da semente; (f) início da excisão do embrião; (g) embrião parcialmente excisado; (h) embrião excisado; (i) estrutura do embrião excisado com corte longitudinal no lado oposto a abertura dos cotilédones: cotilédones -c; extremidade superior do eixo embrionário - es; extremidade lateral do eixo embrionário - el; extremidade inferior do eixo embrionário – ei.38

Figura 3. Grupos de viabilidade no teste de tetrazólio de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze: Grupo I (viáveis) - (a) embrião com coloração uniforme (vermelho carmim), de aspecto normal e firme; (b) embrião com menos da metade dos cotilédones com coloração vermelho intenso ou descolorido; (c) embrião com dano superficial próximo a extremidade inferior do eixo embrionário (radícula), porém sem atingi-lo. Grupo II (inviáveis) - (d) embrião com coloração vermelho intenso, típica de tecido deteriorado, atingindo a extremidade inferior do eixo embrionário (radícula); (e) embrião com dano na extremidade superior do eixo embrionário (plúmula); (f) embrião com mais da metade dos cotilédones descolorida;(g) embrião morto (quase totalmente descolorido); (h) embrião morto (com toda a extensão do eixo embrionário com coloração branco leitoso); (i) embrião morto (com tecido apodrecido).40

Figura 4. Aspecto das sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze, após o teste de tetrazólio realizado de acordo com metodologia de Brasil (2009): (a) semente com coloração vermelho carmim, uniforme; (b) semente apresentando coloração vermelho intenso na região da radícula; (c) semente com coloração vermelho intenso ao longo do eixo embrionário e cotilédones; (d) semente descolorida.41

Figura 5. Teste de tetrazólio conduzido com embriões excisados de *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze, empregando-se as metodologias que se relacionaram com o teste de germinação: (a) 0,075%/2h/30°C; (b) 0,5%/2h/30°C; (c) 0,5%/4h/30°C; (d) 0,075%/2h/40°C; (e) 0,075%/4h/40°C; (f) 0,2%/2h/40°C; (g) 0,2%/4h/40°C; (h) 0,5%/2h/40°C. 44

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Dados médios do teor de água de sementes de araucária determinado pelo método de estufa a 105°C, por diferentes períodos, com cinco e três sementes inteiras. 23
- Tabela 2.** Dados médios do teor de água de sementes de araucária determinado pelo método de estufa a baixa temperatura 101-105°C, por diferentes períodos, com cinco e três sementes inteiras. 25
- Tabela 3.** Dados médios do teor de água de sementes de araucária determinado pelo método de estufa a 105°C, por diferentes períodos, com cinco e três sementes cortadas de várias formas. 26
- Tabela 4.** Dados médios do teor de água e sementes de araucária determinado pelo método de estufa a baixa temperatura 101-105°C, por diferentes períodos, com cinco e três sementes cortadas de várias formas. 28
- Tabela 5.** Germinação de sementes de araucária, teste de tetrazólio (semente) e teste de tetrazólio (embrião excisado), testando-se neste último diferentes combinações de concentração da solução e períodos de coloração, a 30°C..... 42
- Tabela 6.** Germinação de sementes de araucária, viabilidade obtida pelo teste de tetrazólio em sementes inteiras e em embrião excisado, testando-se neste último diferentes combinações de concentração da solução e períodos de coloração, a 40°C..... 43

1. INTRODUÇÃO GERAL

A *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze é a única espécie do gênero com ocorrência natural no Brasil (Pires et al., 2013), sendo conhecida popularmente como araucária (Valério et al., 2007), pinheiro do paraná (Kozera et al., 2006) ou pinheiro brasileiro (Nascimento et al., 2001). Possui grande importância em áreas de reflorestamento ambiental (Anselmini, 2005), na nutrição humana e animal, proporcionando também, renda pela comercialização de sua semente, o pinhão (Silva e Marques, 2014). Porém, em razão principalmente das atividades madeireiras, está na lista das espécies ameaçadas de extinção (Brasil, 2008).

A semente exerce papel fundamental na perpetuação da araucária, uma vez que para produção de mudas utiliza-se da multiplicação sexuada (Pires et al., 2013). Assim, a obtenção e o emprego de sementes de alta qualidade, aliada a métodos práticos para a sua determinação, tomam importância durante o processo.

De acordo com a tolerância  dessecação das sementes, existem duas classificações principais: sementes de comportamento ortodoxo e sementes de comportamento recalcitrante, sendo que a araucária se enquadra no último grupo (Caçola et al., 2006). As sementes recalcitrantes possuem um teor de água crítico, abaixo do qual ocorre a perda total da viabilidade (Soares e Mota, 2004). Neste sentido, a quantidade de água contida nas sementes pode ser determinada por meio de procedimentos gerais indicados nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), sem possuir, no entanto, uma recomendação específica para *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze.

Por outro lado, a avaliação da viabilidade das sementes pode ser realizada pelo teste de germinação, sendo que para araucária é indicada a primeira contagem aos 20 dias e o encerramento aos 31 dias (Brasil, 2013). Torna-se imprescindível, assim, o emprego de técnicas que determinem mais rapidamente a qualidade fisiológica da semente, especialmente em razão do comportamento recalcitrante da espécie, que torna o seu potencial de armazenamento relativamente curto.

O teste de tetrazólio pode ser uma alternativa para estimar a viabilidade da semente em função da rapidez para obtenção de resultados. Nas Regras para Análise de Sementes (2009) existe a descrição geral deste teste para *Araucaria* spp., indicando uma forma de preparo da

semente que exige tempo considerável para execução, além de um período de pré-umedecimento acrescido de um longo tempo para coloração (18 a 25 h/30°C), o que ressalta a importância de se aprimorar a metodologia para condução do teste de tetrazólio em sementes de araucária.

O trabalho teve por objetivo ajustar uma metodologia específica para determinação do teor de água de sementes de araucária e estudar um método prático para a avaliação da qualidade das sementes por meio do teste de tetrazólio, propondo maior rapidez de execução e permitindo o estabelecimento de grupos de viabilidade

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância da espécie

A Mata de Araucária, também conhecida como Floresta Ombrófila Mista, faz parte do Bioma Mata Atlântica (Brasil, 2006), o qual possui elevada diversidade biológica, mesmo sendo intensamente explorado (Lima e Capobianco, 1997). A principal espécie componente da Floresta Ombrófila Mista é a *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze (Baillie et al., 2004), gimnosperma nativa de maior importância econômica e biológica (Anselmini, 2005), única do seu gênero com ocorrência natural no Brasil e que se encontra na lista de espécies ameaçadas (Brasil, 2008).

De acordo com a região do Brasil, a *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze pode ser denominada de pinheiro do paraná (Borges et al., 2003; Kozera et al., 2006), pinheiro brasileiro (Nascimento et al., 2001) ou araucária (Valério et al., 2007). As suas sementes são popularmente conhecidas por “pinhões”, os quais servem de alimento a fauna silvestre e compõem a base alimentar e econmica de muitas famílias rurais, apresentando um bom potencial para incremento da renda de comunidades locais (Zechini et al., 2012). O consumo humano ocorre, geralmente, por meio do cozimento dos pinhões; porém, são utilizados também como farinha em alguns pratos regionais. A fabricação da farinha é realizada somente de modo artesanal, com pouca expressão comercial, sendo produzidos tortas, pães e broas (Leite, 2007).

O pinhão  fonte de fibras e calorias, podendo apresentar benefícios  saúde humana, em razão de possuir substâncias de interesse medicinal, como componentes anti-inflamatórios, antibacterianos (Santi-Gadelha et al., 2006) e proteínas quinases (Machado et al., 2002).

A araucária  uma espécie pioneira heliófila (Carvalho, 1994), com ocorrência desde solos pouco férteis até os mais férteis, sendo observadas maiores produtividades em solos argilosos ou franco-argilosos, profundos e bem drenados (Silva et al., 2001). Possui boa

deposição de serrapilheira, que é de extrema importância para a devolução de nutrientes em ecossistemas florestais, por meio do ciclo biogeoquímico (Schumacher et al., 2004).

A conservação do remanescente da Floresta Ombrófila Mista proporciona benefícios ambientais e sociais, pois estas áreas desempenham funções de proteção do solo, manutenção dos cursos de água, seqüestro do carbono, mitigação dos efeitos negativos das mudanças climáticas e, ainda, podem permitir uma conexão entre fragmentos e reservas florestais, funcionando como corredores ecológicos (Higuchi et al., 2012).

2.2. Comportamento recalcitrante da semente

As sementes possuem duas classificações principais quanto à tolerância a dessecação, podendo apresentar comportamento ortodoxo ou recalcitrante. As sementes ortodoxas são aquelas que toleram o processo de secagem até abaixo de 10,0% do teor de água, sem perder a viabilidade, e também permitem o armazenamento durante um longo período de tempo (Capella et al., 2009). Já as sementes recalcitrantes, não resistem à secagem devido a sua alta resistência a perda de água, tendo a viabilidade comprometida quando o teor de água situa-se abaixo de um nível mínimo crítico (Soares e Mota, 2004). Como exemplos de sementes recalcitrantes, podem ser citadas a andiroba, o ingá, o abacateiro, a mangueira, a jaqueira e a araucária (Fonseca e Freire, 2003).

A determinação do teor de água da semente é de extrema importância, pois afeta a manutenção da qualidade das sementes durante o armazenamento (Pedrosa et al., 2014), sendo relevante a padronização da sua metodologia para a condução de testes de avaliação da qualidade fisiológica, visto que tem influência nos resultados (Vieira et al., 2012).

De acordo com Eira et al. (1994), a redução do teor de água das sementes de araucária é acompanhada de redução da sua viabilidade, verificando ainda que teores de água abaixo de 38,0%, considerado limite crítico, causam a perda total da viabilidade. Para a maioria das espécies, a metodologia para determinação do teor de água das sementes está descrita nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

2.3. Métodos para determinação do teor de água da semente

Na determinação do teor de água por meio da aplicação de calor, sob condições controladas, a água contida nas sementes é extraída na forma de vapor. Na remoção da água, a metodologia utilizada deve reduzir a oxidação, decomposição ou a perda de outras substâncias voláteis, assegurando a máxima retirada de água do material (Brasil, 2009).

Carvalho (2005) relatou que a remoção da água das sementes ocorre de forma decrescente, sendo que no momento inicial ocorre uma grande perda, a qual se torna mais lenta com o decorrer do tempo. O mesmo autor afirma ainda, que quanto maior a temperatura de secagem utilizada, menor será o peso final de matéria seca, devido à volatilização de alguns compostos, que pode levar a erros de análise, pois somente a água deveria ser extraída das sementes.

De acordo com Brasil (2009), para a determinação do teor de água das sementes é necessária a utilização de um método cujas instruções possam ser seguidas em diversos laboratórios e que sejam passíveis de reprodução. As metodologias oficialmente estabelecidas são: método de estufa a 105°C, método de estufa a baixa temperatura 101-105°C e método de estufa a alta temperatura 130-133°C.

O método de estufa a 105°C é recomendado para ser utilizado com sementes inteiras pertencentes a qualquer espécie, com a temperatura mantida a 105°C±3°C por um período de 24 horas; já o método de estufa a baixa temperatura 101-105°C é referência para introdução de novas espécies, sendo também indicado quando é necessário o preparo das sementes, por moagem ou corte. Por outro lado, o método de estufa a alta temperatura (130-133°C/1hora±3minutos; 2horas±6minutos ou 4horas±12minutos) pode ser usado como uma alternativa para espécies indicadas em Brasil (2009).

Na determinação do teor de água, em geral, sementes graúdas são moídas, e as pequenas são deixadas inteiras; a redução no tamanho das sementes facilita a evaporação da água (Carvalho, 2005). Para sementes com tegumento muito duro ou com peso de mil sementes acima de 200g, é recomendado o corte destas em pedaços menores do que 7,0 mm, não devendo a exposição ao ambiente exceder quatro minutos (Brasil, 2009).

No método de estufa a 105°C, é indicado o uso de sementes inteiras para qualquer espécie; porém, devido ao elevado peso de mil sementes da araucária, as Regras para Análise

de Sementes (2009) indicam a necessidade de cortes, sem, contudo, especificar a metodologia para a espécie. Ainda de acordo com as Regras para Análise de Sementes, para a introdução de novas espécies é recomendado o método de estufa a baixa temperatura 101-105°C, sendo este adotado nas Regras Internacionais de Análise de Sementes pela International Seed Testing Association–ISTA. No caso da *Araucaria angustifolia*, não existe uma metodologia definida para a extração do teor de água nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

2.4. Avaliação do potencial fisiológico das sementes

O potencial fisiológico de uma semente relaciona-se com a sua capacidade de desempenhar funções vitais, caracterizadas pela longevidade, germinação e vigor. Em geral, a redução da qualidade está diretamente relacionada com a diminuição da germinação, o aumento de plântulas anormais e a redução do vigor (Toledo et al., 2009).

O ponto de maturidade fisiológica é o momento em que as sementes apresentam o maior potencial fisiológico; a partir desse momento, as sementes sofrem mudanças graduais que culminam com a sua deterioração e perda gradativa do vigor (Carvalho e Nakagawa, 2012).

O teste de germinação é rotineiramente utilizado para determinar o potencial máximo de germinação de um lote de sementes, comparar a qualidade de diferentes lotes e estimar o valor para semeadura em campo. As Regras para Análise de Sementes descrevem a metodologia de condução do teste para várias espécies, sendo que pode levar de alguns dias a até meses para a obtenção de seus resultados (Brasil, 2009); no caso de *Araucaria* spp., não foram incluídas especificações para a execução do teste de germinação.

Mais recentemente, foram publicadas as Instruções para Análise de Sementes de Espécies Florestais (Brasil, 2013), com as recomendações para *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, nas quais para o teste de germinação pode ser utilizado o substrato vermiculita, com as sementes entre o substrato, temperaturas constantes de 25 ou 30°C, primeira contagem do teste aos 20 dias e contagem final aos 31 dias.

2.4.1. Teste de tetrazólio

Quando há necessidade de urgência na obtenção de resultados sobre a viabilidade da semente, ou para espécies que apresentam dormência ou que germinam lentamente, pode ser empregado o teste bioquímico de tetrazólio, o qual estima a qualidade fisiológica de forma mais rápida que o teste de germinação (Marcos Filho, 2005).

O teste de tetrazólio baseia-se na redução do sal 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio a trifetilformazan, devido a atividade das enzimas desidrogenases, indicando a vitalidade do tecido, por meio da coloração (Krzyzanowski et al., 1999; Abbade e Takaki, 2014).

Diversos fatores podem causar interferência no teste, principalmente aqueles relacionados à metodologia de execução, como o preparo das sementes antes da exposição ao sal, a concentração da solução de tetrazólio, o período e a temperatura de exposição à solução e os critérios de interpretação utilizados (Gaspar-Oliveira et al., 2009).

Nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009) há um procedimento geral, recomendado para o teste de tetrazólio em *Araucaria spp.*, o qual indica o pré-umedecimento das sementes por um período de 18 horas, a 20°C, com posterior preparo das sementes e coloração em solução de tetrazólio a 1%, na temperatura de 30°C, por um período que pode variar de 18 a 25 horas. Entretanto, há relatos na literatura que o procedimento recomendado para a espécie pode gerar erros de interpretação, devido a cortes e danos provocados no material durante o preparo (Cervi et al., 2009) e também pela excessiva coloração adquirida (Oliveira et al., 2014).

Em razão disso, metodologias alternativas para a condução do teste de tetrazólio em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze têm sido estudadas, como a avaliação do embrião em substituição ao uso da semente. Observou-se, em alguns trabalhos encontrados na literatura, que não foi realizada a correlação dos resultados obtidos neste teste com os do teste de germinação (Abreu et al., 2012), ou não foi testada a possibilidade de se obter maior rapidez na execução eliminando-se o período de pré-umedecimento das sementes (Oliveira et al., 2014), ou mesmo estabelecidas detalhadamente as classes de qualidade da semente, o que indica a necessidade de continuidade de pesquisas com a espécie, visando a definição de um protocolo eficiente.

3. CAPITULO I - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA

Resumo – Sementes de *Araucaria angustifolia* são consideradas de comportamento recalcitrante, não tolerando a desidratação e exposição a baixas temperaturas. Assim, a determinação do teor de água é importante para o monitoramento da perda de água durante o armazenamento e, conseqüentemente, para a manutenção da sua viabilidade. O objetivo do presente trabalho foi ajustar uma metodologia específica para determinação do teor de água de sementes de araucária. Para tanto foram testados quatro formas de preparo da semente (sementes íntegras, cortadas em três partes, cortadas em quatro partes e cortadas em fragmentos menores do que 7,0 mm), dois métodos de secagem (estufa a 105 °C e estufa a baixa temperatura a 103 °C), por diferentes períodos, além da determinação do peso de mil sementes. Por meio da avaliação da qualidade física, verificou-se que a araucária apresenta peso de mil sementes de 9.012,5 g, o que corresponde a aproximadamente 111 sementes por kg, com peso médio de 9 g por unidade. Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que o procedimento mais indicado para a determinação do teor de água de *Araucaria angustifolia* é a utilização do preparo das sementes cortando-as em três partes, pelo método de estufa a baixa temperatura 101-105 °C, durante 17 h.

Palavras-chave: *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, grau de umidade, método de estufa.

DETERMINATION THE MOISTURE CONTENT OF ARAUCARIA SEEDS

Abstract – *Araucaria angustifolia* seeds are considered to be recalcitrant, not tolerating drying and exposure to low temperatures. Thus, determination of moisture content is important for monitoring water loss during storage and, consequently, for maintaining seed viability. We aimed to adjust the specific methodology to determination the moisture content of araucaria seeds. Thus, we tested four seed preparations (whole seeds, seeds cut in three parts, seeds cut in four parts, and seeds cut in fragments of less than 7.0 mm) and two drying methods (laboratory oven at $105\pm 2^{\circ}\text{C}$ and laboratory oven at low temperature at $103\pm 2^{\circ}\text{C}$) for different periods, as well as determined thousand seed weight. The araucaria seeds have a thousand seed weight of 9,012.5 g, which corresponds to approximately 111 seeds per kg, with a mean weight of 9 g per unit. Based on the results obtained, it may be concluded that the procedure most recommended for determination of moisture content of *Araucaria angustifolia* is the use of seeds cut in three parts, at $103\pm 2^{\circ}\text{C}$, for 17 h.

Key words: *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, moisture content, oven method.

3.1. Introdução

O Brasil possui uma das maiores biodiversidade do mundo (Oliveira, 2005) distribuída ao longo de seis biomas, que em ordem de extensão são: Amazônia (Silvano e Segalla, 2005), Cerrado, Mata Atlântica (Araujo et al., 2009), Caatinga, Pampa e Pantanal (Bezerra et al., 2007). O bioma Mata Atlântica possui aproximadamente 131 mil ha (Fundação SOS Mata Atlântica, 2013) e compreende as formações florestais nativas e ecossistemas associados a Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Estacional Decidual.

A Floresta Ombrófila Mista, também conhecida como Mata de Araucária, ocorre principalmente no Brasil com predominância nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Mantovani et al., 2004), constituindo-se um dos ecossistemas mais ameaçados do bioma Mata Atlântica. A espécie *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, também conhecida como pinheiro-do-paraná ou simplesmente araucária, é a principal constituinte da Floresta Ombrófila Mista (Kozera et al., 2006), sendo a única do seu gênero com ocorrência natural no Brasil (Pires et al., 2013).

A espécie é considerada secundária longeva com características de pioneira (Sawczuk et al., 2012), possuindo importância ambiental para reflorestamentos a campo aberto e servindo de alimento nutritivo e energético para alimentação humana e da fauna silvestre durante o inverno (Anselmini, 2005). Garante, também, a renda de agricultores familiares por meio da comercialização de suas sementes, os chamados pinhões; adicionalmente, sua madeira é considerada de elevada qualidade.

A produção de mudas de araucária é realizada essencialmente via semente (Pires et al., 2013), podendo-se coletá-la diretamente das árvores ou do chão. Por esse método de propagação, a formação de mudas é facilmente conduzida, sendo necessário, no entanto, a aquisição de sementes de qualidade para garantir alta porcentagem de germinação e favorecer o desenvolvimento das plantas.

Como atributos para definir a qualidade das sementes podem ser destacados os componentes genético, físico, fisiológico e sanitário (Marcos Filho, 2013). O atributo de natureza física é representado pela pureza e condição física da semente, sendo esta

identificada pelo teor de água, tamanho, cor, forma e massa. Neste sentido, o peso de mil sementes é uma das determinações mais importantes, pois fornece informações para o cálculo do número de sementes por kg, o peso da amostra de trabalho para a análise de pureza quando não especificado nas Regras para Análise de Sementes, bem como pode dar indício do tamanho das sementes (Brasil, 2009).

Por outro lado, as sementes de araucária são classificadas como recalcitrantes (Caçola et al., 2006), ou seja, não toleram a desidratação. Assim, a determinação do teor de água é fundamental para o monitoramento da perda de umidade durante o armazenamento e, conseqüentemente, para manutenção da sua viabilidade.

As Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009) estabelecem, para a determinação do teor de água das sementes, o método de estufa a 105°C para todas as espécies e com sementes inteiras, e o método de estufa a baixa temperatura a 101-105 °C como referência para introdução de novas espécies. Indicam ainda, para sementes grandes de espécies florestais (peso de mil sementes > 200 g), o corte de cinco sementes em pedaços menores que 7,0 mm, sendo que a exposição da amostra durante o processo não deve exceder a quatro minutos. No caso da araucária, esse tipo de preparo talvez não seja o mais adequado, uma vez que o corte da semente em frações tão pequenas e em curto período de tempo é difícil, havendo carência de um protocolo específico.

Em razão da importância da espécie, o trabalho objetivou ajustar uma metodologia específica para determinação do teor de água de sementes de araucária.

3.2. Material e Métodos

As pinhas de *Araucaria angustifolia* (variedade São José), das quais foram extraídas as sementes (pinhões), foram coletadas na área de testes de procedências e progênies de araucária, localizada na Embrapa Florestas, no município de Colombo-PR. A região apresenta altitude de 1.027 metros, 25° 17' 30" de latitude sul e 49° 13' 27" de longitude oeste; a temperatura média anual é de 16,5 °C, sendo o clima segundo a classificação de Köppen

subtropical Cfb, ou seja, temperado chuvoso, sem estação seca e com verão ameno.

A coleta das pinhas foi realizada diretamente das árvores, quando estas já apresentavam a mudança típica de coloração verde para marrom, caracterizando o seu amadurecimento. A operação foi realizada no mês de março de 2013, com o auxílio de um podão e de uma lona plástica empregada para recolher as sementes provenientes de árvores matrizes distribuídas na área de estudo. Os pinhões foram retirados manualmente da pinha, sendo eliminados os de tamanho pequeno localizados nas extremidades (Nogueira e Medeiros, 2007), os chochos (escamas não fecundadas ou com ausência do desenvolvimento do endosperma), bem como as falhas (escamas estéreis ou não fertilizadas).

Após o beneficiamento, as sementes foram encaminhadas ao Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, da Universidade Federal do Paraná, onde foram homogeneizadas e, posteriormente, acondicionadas em embalagens de polipropileno com 22 μ , mantidas em ambiente com temperatura média de 18 °C e umidade relativa do ar de 70%, por 14 dias, quando se realizou a avaliação da qualidade física das sementes, por meio das seguintes determinações:

Peso de mil sementes: utilizaram-se oito subamostras de 100 sementes puras, pesadas em balança de precisão, seguindo-se as recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Teor de água das sementes: foram utilizadas quatro repetições, sendo testados os seguintes tratamentos:

- a) cinco e três sementes inteiras (Figura 1a), pelo métodos de estufa a 105°C (Brasil, 2009) com início das pesagens a partir de 24 h de secagem, e pelo método de estufa a baixa temperatura 101-105°C (BRASIL, 2009) com início das pesagens a partir de 17 h de secagem, prosseguindo até que a massa de cada repetição se tornasse constante por duas medições consecutivas;
- b) cinco e três sementes cortadas em três partes transversais equidistantes (Figura 1b), pelos métodos de estufa a 105°C (Brasil, 2009) com início das pesagens a partir de 24 h de secagem, e pelo método de estufa a baixa temperatura 101-105°C (BRASIL, 2009) com início das pesagens a partir de 17 h de secagem, prosseguindo até que a massa de cada repetição se tornasse constante por duas medições consecutivas;
- c) cinco e três sementes cortadas em quatro partes (Figura 1c), sendo o primeiro corte

realizado no sentido longitudinal e os dois fragmentos formados seccionados transversalmente, pelos métodos de estufa a 105°C (Brasil, 2009) com início das pesagens a partir de 24 h de secagem, e pelo método de estufa a baixa temperatura 101-105°C (Brasil, 2009) com início das pesagens a partir de 17 h de secagem, prosseguindo até que a massa de cada repetição se tornasse constante por duas medições consecutivas;

- d) cinco e três sementes cortadas em fragmentos menores que 7,0 mm (Figura 1d), pelos métodos de estufa a 105°C (Brasil, 2009) com início das pesagens a partir de 24 h de secagem, e pelo método de estufa a baixa temperatura 101-105°C (Brasil, 2009) com início das pesagens a partir de 17 h de secagem, prosseguindo até que a massa de cada repetição se tornasse constante por duas medições consecutivas.

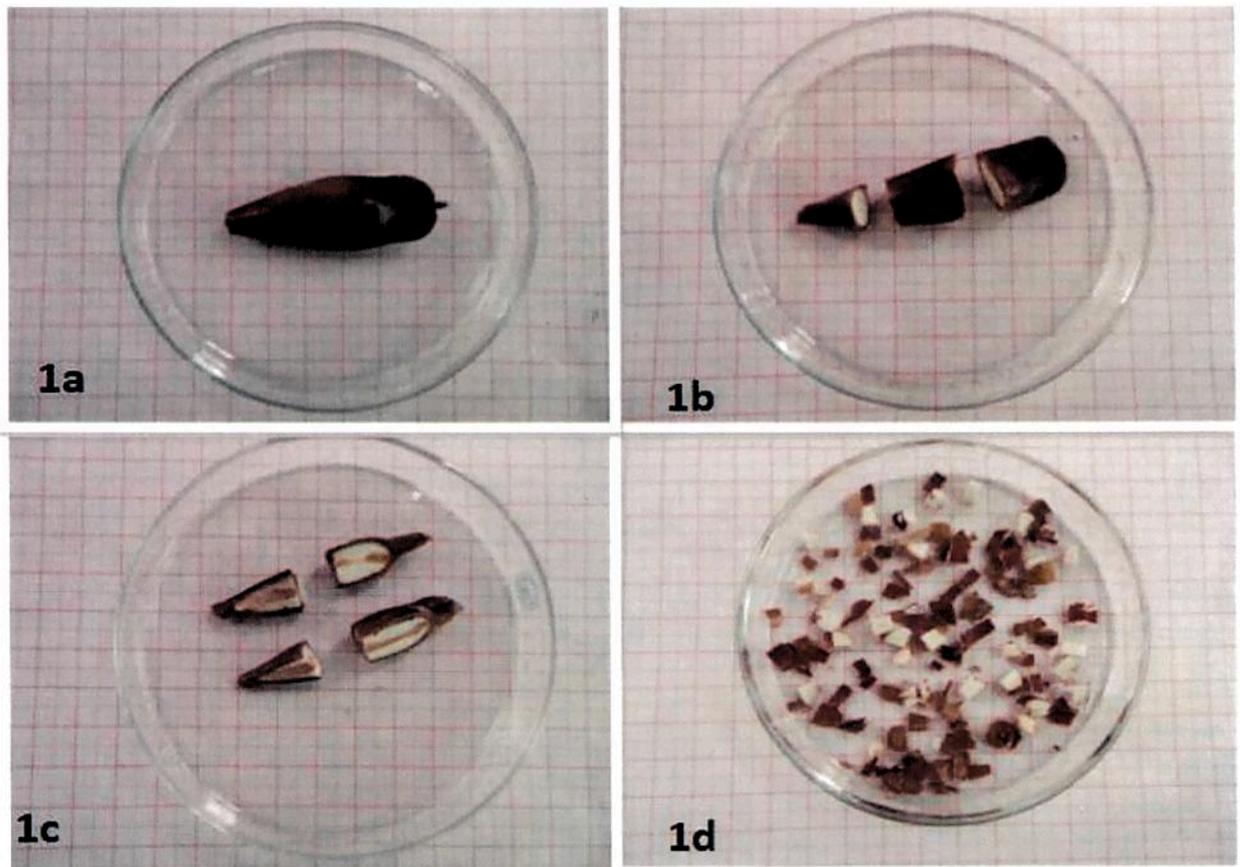


Figura 1. Preparo das sementes para a determinação do teor de água. 1a – semente inteira; 1b – sementes cortadas em três partes; 1c – sementes cortadas em quatro partes; 1d – sementes cortadas em fragmentos menores do que 7 mm.

A porcentagem de água foi calculada na base úmida, aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de água} = 100 (M-m) \cdot (M-t)^{-1} \quad \text{onde:}$$

M (massa inicial): massa do recipiente e sua tampa mais a massa da semente úmida;

m (massa final): massa do recipiente e sua tampa mais a massa da semente seca;

t (tara): massa do recipiente com sua tampa.

Os dados obtidos na determinação do teor de água foram submetidos ao teste de Bartlet para testar a homogeneidade das repetições e, posteriormente, foram analisados de acordo com o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo as médias comparadas pelo teste de Skott Knott ($p \leq 0,05$). A análise foi realizada empregando o sistema computacional ASSISTAT, versão 7.6 beta (Silva, 2013).

3.3. Resultados e Discussão

As sementes de araucária apresentaram peso de mil sementes de 9.012,5 g, o que corresponde a aproximadamente 111 sementes por kg, com peso médio de 9 g por unidade. De acordo com as instruções para análise de sementes de espécies florestais (Brasil, 2013), o peso de mil sementes da espécie *Araucaria angustifolia* pode oscilar entre 5.000 e 6.666 g, sendo justificada a divergência entre os dados verificados e os encontrados na literatura pelo fato das populações de espécies florestais apresentarem grande variabilidade morfológica das sementes, inclusive dentro da mesma população (Lúcio et al., 2011). Conhecer o peso de mil sementes, no caso das espécies florestais, é importante para estimar a quantidade de material a ser utilizada no viveiro para a obtenção de mudas.

Tabela 1. Dados médios do teor de água de sementes de araucária determinado pelo método de estufa a 105°C, por diferentes períodos, com cinco e três sementes inteiras.

Teor de água (105±3 °C)		
Períodos (horas)	5 sementes inteiras	3 sementes inteiras
%.....	
24	47,2 b	48,2 b
25	47,4 b	48,2 b
26	47,7 b	48,3 b
27	47,7 b	48,4 b
28	47,9 b	48,5 b
29	48,0 b	48,5 b
30	48,1 b	48,6 b
43	48,8 a	49,1 b
44	48,9 a	49,1 a
45	49,0 a	49,2 a
46	48,8 a	49,3 a
47	49,1 a	49,3 a
48	49,1 a	49,3 a
49	49,2 a	49,3 a
50	49,2 a	49,4 a
62	49,6 a	49,6 a
63	49,6 a	49,6 a
64	49,6 a	49,6 a
65	49,6 a	49,6 a
66	49,6 a	49,6 a
<i>C.V.(%)</i>	<i>1,3</i>	<i>1,8</i>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

Dentre as variáveis que podem interferir no resultado do peso de mil sementes está o teor de água, o qual na maturidade fisiológica normalmente varia de 50,0 a 70,0 % para as sementes do gênero *Araucaria* (Carvalho e Nakagawa, 2012). Ainda segundo os autores, essas sementes são liberadas com alto teor de água, em razão de sua natureza recalcitrante, e ressaltam a necessidade de métodos consistentes para determinação do teor de água visando à manutenção da sua viabilidade.

Nas Tabelas de 1 a 4 estão apresentados os resultados das metodologias testadas para determinação do teor de água de sementes de araucária.

Quando foram utilizadas sementes intactas (inteiras), no método de estufa a 105 °C (Tabela 1) observou-se que não houve secagem completa após 24 h sendo necessários 43 h e 44 h, respectivamente, para que houvesse estabilização completa do peso, para cinco e três sementes. Logo, a recomendação das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009) de se utilizar sementes intactas e 105±3 °C/24 h para todas as espécies, não se aplica para araucária.

No método de estufa a baixa temperatura 101-105 °C utilizando-se sementes inteiras (Tabela 2) também não foi possível efetuar a correta secagem das sementes até 17 h, necessitando de 36 h (cinco sementes) e 55 h (três sementes) para que o peso das repetições se tornasse constante. Desse modo, observa-se a necessidade de se realizar o preparo (corte) das sementes de araucária antes da determinação do teor de água, visto que o uso de sementes inteiras não é adequado. Na literatura, são escassas as pesquisas conduzidas com o intuito de avaliar métodos para a determinação do teor de água de sementes florestais. Alguns trabalhos podem ser citados, tais como o de ipê do serrado (Nery et al., 2004) e pau-preto (Garcia et al., 2008).

Pode-se observar na Tabela 3 um comportamento distinto quando é realizado o corte das sementes, tanto o uso de três sementes quanto de cinco foram eficientes para determinação do teor de água, não havendo diferenças estatísticas nos três tipos de preparo da semente testados. Tal fato indica a possibilidade de redução para três sementes por amostra, usando-se menos sementes na análise de rotina, o que é bastante positivo para araucária em razão da alternância anual de produção (Paludo et al., 2011) e consequente disponibilidade de sementes.

Tabela 2. Dados médios do teor de água de sementes de araucária determinado pelo método de estufa a baixa temperatura 101-105°C, por diferentes períodos, com cinco e três sementes inteiras.

Períodos (horas)	Teor de água (103±2 °C)	
	5 sementes inteiras	3 sementes inteiras
%	
17	46,3 b	46,2 e
18	46,5 b	46,6 d
19	46,8 b	46,9 d
20	47,1 b	47,2 c
21	47,2 b	47,3 c
22	47,4 b	47,5 c
23	47,6 b	47,7 c
36	48,9 a	49,1 b
37	48,9 a	49,1 b
38	48,9 a	49,0 b
39	49,0 a	49,2 b
40	49,0 a	49,3 b
41	49,2 a	49,4 b
42	49,3 a	49,4 b
55	49,7 a	50,0 a
56	49,7 a	49,9 a
<i>C.V.(%)</i>	<i>1,4</i>	<i>0,7</i>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

Com relação ao preparo das sementes, a forma de corte também não apresentou diferença (Tabela 3), podendo então ser destacado o corte em três partes, por ser mais prático e rápido, não diferenciando do tratamento recomendado pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009) para sementes de tamanho maior, que é o corte das sementes

intactas em fragmentos menores do que 7,0 mm, sendo que a exposição da amostra ao ambiente não deve exceder a quatro minutos.

Tabela 3. Dados médios do teor de água de sementes de araucária determinado pelo método de estufa a 105°C, por diferentes períodos, com cinco e três sementes cortadas de várias formas.

Teor de água (105±3 °C)			
	Formas de corte da semente		
	< 7,0 mm	3 partes	4 partes
3 sementes cortadas			
Períodos (horas)%.....		
24	49,6 a	50,0 a	50,0 a
25	49,6 a	50,1 a	50,1 a
26	49,7 a	50,2 a	50,1 a
27	49,8 a	50,3 a	50,2 a
28	49,8 a	50,3 a	50,2 a
<i>C.V.(%)</i>	<i>0,8</i>	<i>0,7</i>	<i>0,9</i>
5 sementes cortadas			
Períodos (horas)%.....		
24	49,2 a	49,6 a	50,0 a
25	49,2 a	49,6 a	50,1 a
26	49,2 a	49,7 a	50,1 a
27	49,3 a	49,8 a	50,1 a
28	49,2 a	49,8 a	50,1 a
<i>C.V.(%)</i>	<i>0,8</i>	<i>0,7</i>	<i>0,3</i>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

A exigência do tempo foi atendida em todas as metodologias analisadas, com exceção do corte em fragmentos menores que 7,0 mm, o qual levou, em média, 10 minutos por repetição para sementes de araucária, o que se constitui um problema, pois as sementes podem sofrer influência da umidade relativa do ar do ambiente apresentando um teor diferente do real.

O método de estufa a 105 °C é considerado oficial para uso nos laboratórios de análise do país. Pelos dados obtidos, observa-se que o tempo de 24 h foi suficiente para a secagem, visto que não apresentou diferença significativa do tratamento de secagem por 28 h, período este em que não se observaram acréscimos nos pesos médios das amostras e o teste foi encerrado.

Os coeficientes de variação foram baixos, revelando homogeneidade entre as repetições; os valores do teor de água de 24 h para 28 h foram bem próximos, variando de 0,1 % a 0,2 %.

Analisando-se a Tabela 4, verifica-se novamente que tanto três quanto cinco sementes foram eficientes para determinação do teor de água das sementes, não havendo diferenças estatísticas nos três tipos de preparo das sementes testados, confirmando a possibilidade de se trabalhar com cortes em pedaços maiores, pois foram semelhantes estatisticamente aos menores do que 7,0 mm. Entretanto, a exigência do tempo máximo de quatro minutos de exposição ao ambiente não foi novamente atendida para o corte em fragmentos menores do que 7,0 mm.

Observando-se ainda os dados da Tabela 4 é possível verificar que o período de 17 h foi eficiente para a retirada de água da semente, sendo observada a estabilização do peso tanto para a quantidade de três sementes quanto para cinco sementes. O método de estufa a baixa temperatura 101-105°C é o método básico de referência para introdução de novas espécies, sendo o adotado, de acordo com Brasil (2009), pelas Regras Internacionais de Análise de Sementes da *International Seed Testing Association* – ISTA.

Com base nos resultados obtidos, a utilização de três sementes de araucária cortadas em três partes a 103 ± 2 °C, por 17 h, é a mais indicada para a análise de rotina dos laboratórios, pois requer menor quantidade de sementes, sendo de fácil preparo e maior rapidez.

Tabela 4. Dados médios do teor de água e sementes de araucária determinado pelo método de estufa a baixa temperatura 101-105°C, por diferentes períodos, com cinco e três sementes cortadas de várias formas.

Teor de água (103±2 °C)			
	Formas de corte da semente		
	< 7,0 mm	3 partes	4 partes
3 sementes cortadas			
Períodos (horas)%		
17	50,2 a	49,4 a	49,8 a
18	50,2 a	49,4 a	49,8 a
19	50,3 a	49,6 a	49,8 a
20	50,4 a	49,9 a	49,9 a
21	50,4 a	49,9 a	50,1 a
22	50,5 a	50,0 a	50,1 a
23	50,5 a	50,0 a	50,2 a
36	50,6 a	50,3 a	50,4 a
37	50,6 a	50,2 a	50,3 a
38	50,6 a	50,2 a	50,3 a
39	50,5 a	50,2 a	50,3 a
<i>C.V.(%)</i>	<i>0,3</i>	<i>0,9</i>	<i>1,2</i>
5 sementes cortadas			
Períodos (horas)%		
17	48,7 a	49,5 a	49,3 a
18	48,9 a	49,6 a	49,3 a
19	48,8 a	49,7 a	49,4 a
20	48,9 a	49,7 a	49,4 a
<i>C.V.(%)</i>	<i>1,0</i>	<i>1,7</i>	<i>1,1</i>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

A recomendação do corte da semente em pedaços menores do que 7,0 mm, em menos de quatro minutos (Brasil, 2009), não se aplica para as sementes da espécie estudada, uma vez que tal preparo acarreta um período maior de exposição ao ambiente (10 minutos). Adicionalmente, o método de estufa a 105 °C, com sementes intactas, também não é viável para araucária, sendo necessário um tempo maior para a secagem se completar.

O conhecimento da forma correta para determinação do teor de água para sementes de araucária é muito importante, tanto para o armazenamento (pelo comportamento recalcitrante da semente) quanto pelo fato deste componente interferir na análise da qualidade física (peso de mil sementes) e fisiológica (germinação e vigor).

Mediante os resultados obtidos, a atualização do método recomendado para a determinação do teor de água de sementes de araucária nas Regras para Análise de Sementes é pertinente. Para tanto, o próximo passo é a realização de ensaios interlaboratoriais buscando a padronização do método proposto.

3.4. Conclusões

A utilização de três sementes cortadas em três partes com secagem a $103\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 17 h é o método mais indicado para determinação do teor de água de sementes de *Araucaria angustifolia*.

3.5. Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo e a EMBRAPA Florestas pelo fornecimento das sementes.

3.6 Referências

ANSELMINI, J.I. **Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. na região de Curitiba-PR.** 2005. 52p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná – Curitiba. Disponível em <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/1922/c%3fpa%20PDF%20Justina.pdf?sequence=1> (Acesso em 20/02/2014).

ARAÚJO, C.O; CONDEZ, T.H.; SAWAYA, R.J. Anfíbios Anuros do Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus, sudeste do Brasil, e suas relações com outras taxocenoses no Brasil. **Biota Neotropica**, v.9, n.2, p. 77-98, 2009.

BEZERRA, H.S.; SANO, E.E.; FERREIRA, L.G. Desempenho do satélite sino-brasileiro de recursos terrestres CBERS-2 no mapeamento da cobertura da terra no Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Geofísica**, v.25, n.2, p. 171-185, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instruções para análise de sementes de espécies florestais.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/SDA, 2013. 97 p. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Laborat%C3%B3rio/Sementes/FLORESTAL_documento_pdf.pdf> (Acesso em 20/02/2014).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes.** Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395 p.

CAÇOLA, A.V.; AMARANTE, C.V.T.; FLEIG, F. D.; MOTA, C.S. Qualidade fisiológica de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze submetidas a diferentes condições de armazenamento e a escarificação. **Ciência Florestal**, v.16, n.3/4, p. 391-398, 2006.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção.** 5.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590p.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2011-2012**. São Paulo, 2013. 61p (Relatório Técnico). Disponível em <http://www.sosma.org.br/link/atlas2011-12> (Acesso em 22/02/2014).

GARCIA, L.C.; MORAES, R.P.; LIMA, R.M.B. Determinação do grau crítico de umidade em sementes de *Cenostigma tocanthum* Ducke, **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.3, p.172-176, 2008.

KOZERA, C.; DITTRICH, V.A.O.; SILVA, S.M. Fitossociologia do componente arbóreo de um fragmento de Floresta Ombrófila Mista Montana, Curitiba, PR, BR. **Floresta**, v.36, n.2, p.225-237, 2006.

LÚCIO, A.D.C.; OLIVEIRA, F.; LOPES, S.J. Limites de confiança para variáveis em análises de sementes de espécies florestais exóticas. **Revista Árvore**, v.35, n.6, p.1165-1171, 2011.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, L.P. C.; REIS, M.S. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.4, p.787-796, 2004.

MARCOS FILHO, J. Importância do potencial fisiológico da semente de soja. **Informativo Abrates**, v.23, p.21-24, 2013

NERY, M.C.; CARVALHO, M.L.M.; OLIVEIRA, L.M. Determinação do grau de umidade de sementes de ipê-do-cerrado *Tabebuia ochracea* ((Cham.) Standl.) pelos métodos de estufa e forno de micro-ondas. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.6, p.1299-1305, 2004.

NOGUEIRA, A.C.; MEDEIROS, A.C.S. **Coleta de Sementes Florestais Nativas**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2007. 11p. (Embrapa Florestas. Circular técnica, 144). Disponível em: <http://www.cnpf.embrapa.br/publica/circotec/edicoes/Circular144.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2014.

OLIVEIRA, N.B. Inovação e produção na química fina. **Química Nova**, v.28, p.79-85, 2005.

PALUDO, G.F.; MANTOVANI, A.; REIS, M.S. Regeneração de uma população natural de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Revista Árvore**, v.35, n.5, p.1107-1119, 2011.

PIRES, P.P.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. Ácido indolbutírico e ortotropismo na miniestaquia de *Araucaria angustifolia*. **Revista Árvore**, v.37, n.3, p.393-399, 2013.

SAWCZUK, A.R; FIGUEIREDO FILHO, A.; DIAS, A.N.; WATZLAWICK, L.F.; STEPKA, T.F. Alterações na estrutura e na diversidade florística no período 2002-2008 de uma Floresta Ombrófila Mista Montana do centro-sul do Paraná, Brasil. **Revista Floresta**, v.42, n.1, p.1-10, 2012.

SILVA, F.A.S. **Sistema de Assistência Estatística – ASSISTAT versão 7.6 beta**. Departamento de Engenharia Agrícola (DEAG) do CTRN da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Campina Grande – PB, 2013. Disponível em: <http://www.assistat.com/>. Acesso em 07 de Junho de 2013.

SILVANO, D.L.; SEGALLA, M.V. Conservação de anfíbios no Brasil. **Megadiversidade**, v.1, n.1, p. 79-86, 2005.

4. CAPITULO II - MÉTODO PRÁTICO PARA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE SEMENTES DE ARAUCÁRIA PELO TESTE DE TETRAZÓLIO

Resumo- O trabalho objetivou determinar um método prático para avaliação da qualidade de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, por meio do teste de tetrazólio, propondo maior rapidez de execução e permitindo o estabelecimento de grupos de viabilidade. Para tanto, foram conduzidos inicialmente os testes de germinação e de tetrazólio, com metodologia recomendada nas Regras para Análise de Sementes para *Araucaria* spp. Em seguida, testou-se um método prático para condução do teste de tetrazólio, sem o pré-umedecimento das sementes e utilizando-se quatro repetições de embriões excisados imersos diretamente na solução de tetrazólio, sendo estudadas três concentrações da solução (0,075%, 0,2% e 0,5%), três períodos de coloração (uma, duas e quatro horas) e duas temperaturas de coloração (30°C e 40°C). As médias obtidas por cada teste realizado foram comparadas pelo teste Scott-Knott ($p < 0,01$), que permitiu identificar os tratamentos dos testes de tetrazólio que melhor se relacionaram com o teste de germinação. É viável a utilização de embriões excisados de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze para condução do teste de tetrazólio, proporcionando maior rapidez de execução e melhor interpretação da viabilidade. O teste de tetrazólio pode ser empregado com eficiência por meio da excisão dos embriões e imersão direta na solução de tetrazólio, empregando-se as seguintes combinações de metodologia: 0,5%/2h/30°C, 0,075%/4h/40°C ou 0,5%/2h/40°C, permitindo a classificação das sementes em três grupos de viabilidade.

Palavras-chave: *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, embriões excisados, grupos de viabilidade.

PRACTICAL METHOD FOR VERIFY ARAUCÁRIA SEED VIABILITY BY TETRAZOLIUM TEST

Abstract- The aim of this study was to determine a practical method for evaluating the quality of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze seeds through the tetrazolium test for the purpose of greater speed in execution, allowing the establishment of viability groups. For that reason, initially, the germination and tetrazolium tests were conducted with the methodology recommended in the Seed Analysis Rules for *Araucaria* spp. After that, a practical method for carrying out the tetrazolium test was tested, without pre-wetting of the seeds and using four replications of excised embryos immersed directly in the tetrazolium solution, studying three concentrations of the solution (0.075%, 0.2%, and 0.5%), three staining periods (one, two, and four hours) and two staining temperatures (30°C and 40°C). The mean values obtained for each test undertaken were compared by the Scott-Knott test ($p < 0.01$), which allowed identification of the treatments of the tetrazolium tests that best related to the germination test. The use of embryos excised from *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze seeds for carrying out the tetrazolium test is viable, leading to greater rapidity of execution and better interpretation of viability. The tetrazolium test may be effectively used through excision of embryos and direct immersion in the tetrazolium solution using the following combinations of methodology: 0.5%/2h/30°C, 0.075%/4h/40°C, or 0.5%/2h/40°C, allowing the classification of the seeds in three viability groups.

Key words: *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, excised embryos, viability groups.

4.1. Introdução

A araucária (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze), pertencente ao Bioma Mata Atlântica (Watzlawick et al., 2011), é a única espécie do seu gênero com ocorrência natural no Brasil (Pires et al., 2013), nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Mantovani et al., 2004). Da araucária pode-se obter uma expressiva variedade de produtos e subprodutos (Soares e Mota, 2004), sendo que a comercialização de sua semente (o pinhão) apresenta-se como alternativa para a melhoria de renda de muitos produtores rurais (Silva e Marques, 2014).

Na literatura, verificam-se vários estudos abordando a multiplicação assexuada da espécie, como a propagação por enxertia (Wendling et al., 2009; Zanette et al., 2011) e microenxertia (Anselmini e Zanette, 2008). Entretanto, a produção de mudas de araucária é realizada principalmente via semente (Pires et al., 2013), o que ressalta a necessidade de métodos adequados para estimar a sua qualidade.

Neste sentido, o teste de germinação tem sido rotineiramente empregado em tecnologia de sementes para avaliação da viabilidade, sendo que no caso de sementes de araucária é recomendada a primeira contagem aos 20 dias e, a contagem final, aos 31 dias (Brasil, 2013). Torna-se imprescindível, assim, o emprego de técnicas que determinem mais rapidamente a qualidade fisiológica da semente, especialmente para espécies com comportamento recalcitrante (Oliveira et al., 2014) como a araucária (Caçola et al., 2006), as quais apresentam potencial de armazenamento relativamente curto.

O teste de tetrazólio pode ser utilizado como alternativa para estimar a viabilidade da semente em função da rapidez na obtenção de resultados. Nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009) existe a descrição geral deste teste para *Araucaria* spp., indicando o preparo da semente com remoção do pericarpo e corte ou punção da parte terminal e lateral da semente. Tal recomendação exige tempo considerável para execução, além de não especificar a profundidade do corte ou da punção, o que gera problemas na coloração, pois se a camada de endosperma for muito espessa, o sal de tetrazólio não consegue penetrar e o tecido apresenta-se com aspecto branco leitoso (morto); porém, se essa camada for muito fina, o embrião irá colorir intensamente, apresentando aparência de tecido em deterioração.

Adicionalmente, indica-se um tempo de 18h para o pré-umedecimento em água, agravado por um longo período de coloração (18 a 25h) e uma concentração de 1% da solução de tetrazólio. Quando utilizado este procedimento, as sementes adquirem uma coloração intensa, inclusive as viáveis, semelhantes à de tecido deteriorado. Para sementes grandes, em geral, há a recomendação de maiores concentrações da solução de tetrazólio objetivando facilitar a coloração dos tecidos; porém, a falta de especificidade da metodologia pode dificultar a interpretação.

Por outro lado, autores sugerem a realização do teste de tetrazólio por meio da excisão e análise do embrião, em substituição da semente inteira, visando agilizar a análise ou facilitar a execução, como em *Butia capitata* (Fernandes et al; 2007), *Acrocomia aculeata* (Ribeiro et al; 2010), *Poecilanthe parviflora* (Pinto et al; 2008) e *Schizolobium parahyba* (Ferreira et al; 2007). Em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, realizaram-se alguns estudos avaliando a possibilidade de utilização desse método. Abreu et al. (2012) avaliando o teste de tetrazólio em sementes de pinheiro brasileiro indicaram a imersão dos embriões em solução de tetrazólio de 0,2% por 4 horas, a 40°C, sem o pré-umedecimento da semente. Entretanto, na condução do seu trabalho, os referidos autores relacionaram os resultados do teste de tetrazólio com a germinação *in vitro*, não sendo realizada a correlação com o teste de germinação, prescrito nas Instruções para a Análise de Sementes Florestais (Brasil, 2013).

Oliveira et al. (2014), por sua vez, recomendaram inicialmente o pré-umedecimento das sementes de araucária em água por 18 horas, com posterior retirada do embrião e imersão na solução de tetrazólio com concentrações de 0,1% ou 0,5%, por 1 hora, a 25°C; porém, o procedimento de pré-umedecimento aumenta o tempo para conclusão do teste.

Assim, ressalta-se a importância de se aprimorar a metodologia para condução do teste de tetrazólio em sementes de araucária, testando-se procedimentos que requeiram maior rapidez e concentrações mais baixas da solução, visando menor custo e maior facilidade de interpretação da viabilidade durante a análise. Observa-se carência na literatura da descrição detalhada de grupos de qualidade da semente, imprescindível para a reprodução do teste.

O objetivo, neste estudo, foi determinar um método prático para avaliação da qualidade de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze por meio do teste de tetrazólio, propondo maior rapidez de execução e permitindo o estabelecimento de grupos de viabilidade.

4.2 Material e Métodos

As sementes (pinhões) utilizadas no experimento foram provenientes de pinhas de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (variedade São José), coletadas na área de testes de procedências e progênies de araucária localizada na Embrapa Florestas, no município de Colombo-PR.

As pinhas foram coletadas no mês de março de 2014, com a utilização de podão e de uma lona plástica para recolhimento dos frutos provenientes de árvores matrizes. A determinação do ponto de coleta foi baseada na mudança típica de coloração das pinhas, de verde para marrom. As sementes foram extraídas e beneficiadas manualmente, sendo eliminadas as de tamanho pequeno localizadas nas extremidades (Nogueira e Medeiros, 2007), as chochas e as falhas (escamas estéreis ou não fertilizadas).

Após o beneficiamento, as sementes foram encaminhadas ao laboratório de análise de sementes em embalagens de polipropileno de 22 μ , sendo homogeneizadas e acondicionadas em embalagens do mesmo material, mantidas em ambiente controlado (18°C e 70% de umidade relativa do ar) até a realização das seguintes análises:

- a) *Determinação do teor de água das sementes*: pelo método de estufa a baixa temperatura 101-105°C durante 17 horas, com duas repetições de três sementes cada, cortadas em três partes de dimensões semelhantes com o auxílio da guilhotina;
- b) *Teste de germinação*: conduzido com quatro repetições de 25 sementes cada, colocadas para germinar entre substrato de vermiculita saturada, no interior de caixas plásticas (17,5x13,2x11,5 cm) perfuradas. O condicionamento foi realizado em germinador do tipo Mangelsdorf a 25°C, durante 31 dias (Brasil, 2013). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais;
- c) *Teste de tetrazólio (semente)*: quatro repetições de 25 sementes foram pré-embebidas a 20°C, por 18 horas, com posterior remoção e corte da parte terminal e lateral de cada uma. A coloração das sementes foi realizada com a imersão em solução com 1% de 2,3,5-trifenil tetrazólio, por 24 horas, a 30°C, no escuro em equipamento tipo B.O.D. de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009);
- d) *Teste de tetrazólio (embrião excisado)*: utilizaram-se quatro repetições de 25 embriões cada, sendo a excisão dos embriões realizada com auxílio de guilhotina, por meio de cortes

nas laterais do tegumento e do endosperma até chegar próximo ao eixo embrionário; a partir deste ponto, a semente foi aberta manualmente para não danificar o embrião, procedendo-se a retirada deste (Figura 2).

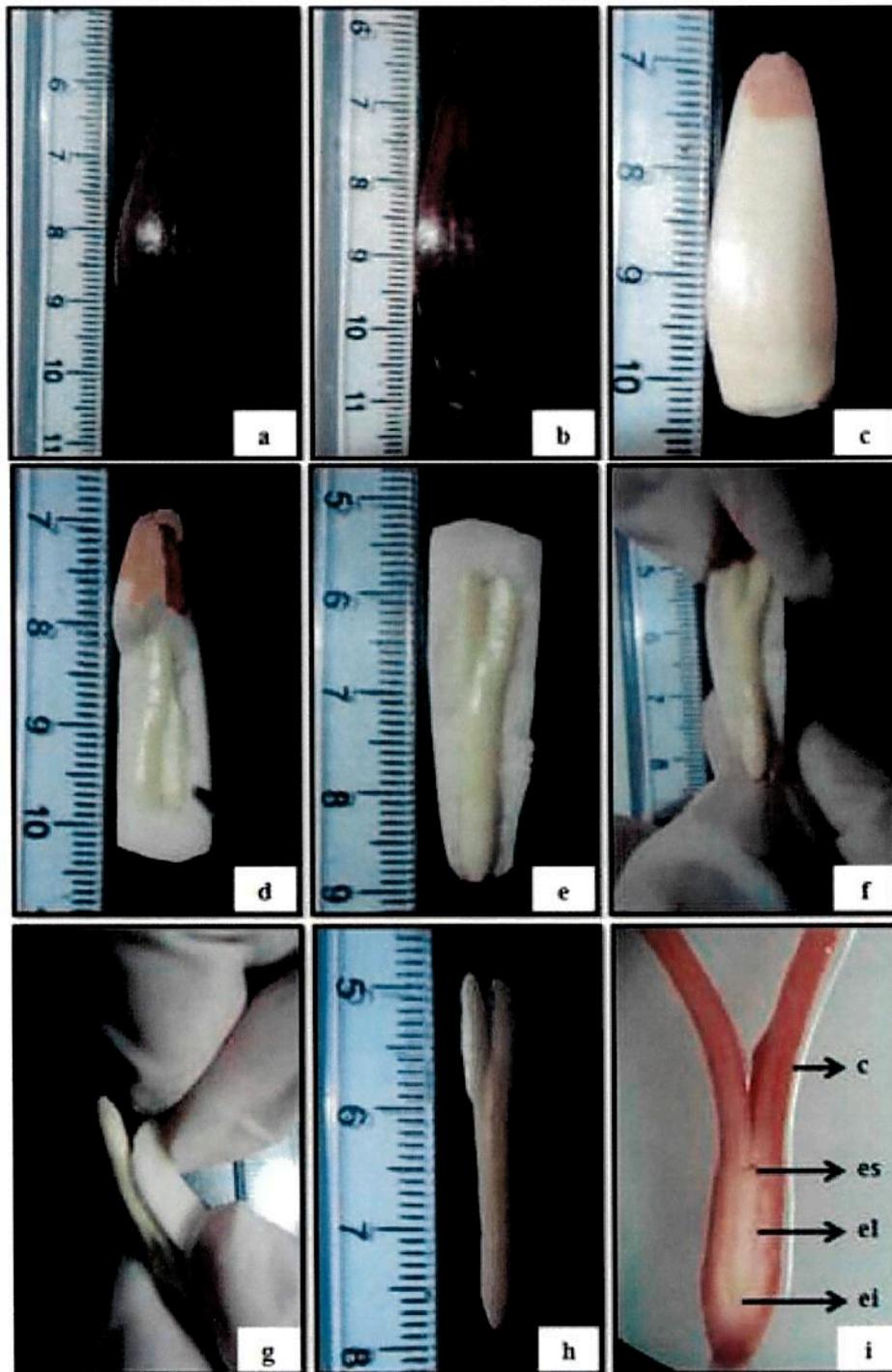


Figura 2. Excisão dos embriões de *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze: (a) vista externa da semente; (b) sementes com partes laterais retiradas com guilhotina; (c) semente sem o

pericarpo; (d) início da retirada manual do endosperma; (e) vista interna da semente; (f) início da excisão do embrião; (g) embrião parcialmente excisado; (h) embrião excisado; (i) estrutura do embrião excisado com corte longitudinal no lado oposto a abertura dos cotilédones: cotilédones -c; extremidade superior do eixo embrionário - es; extremidade lateral do eixo embrionário - el; extremidade inferior do eixo embrionário – ei.

Os embriões foram avaliados individualmente, realizando-se o corte longitudinal no lado oposto à abertura dos cotilédones, verificando a ocorrência de danos na face interna e externa; quando observada a presença de injúrias, analisou-se a profundidade e a distância em relação ao eixo embrionário. Cada embrião excisado foi imerso diretamente em três concentrações de sal de tetrazólio (0,075%; 0,2% e 0,5%), testando-se duas temperaturas (30 e 40°C) e três períodos de coloração (uma, duas e quatro horas), no escuro, sendo lavados posteriormente em água corrente, e analisados em microscópio estereoscópico. As concentrações e os períodos de coloração testados foram escolhidos após a realização de testes preliminares. Foram estabelecidos dois grupos de viabilidade dos embriões: Grupo I- viáveis e Grupo II- inviáveis, sendo consideradas como áreas vitais: no eixo embrionário - a extremidade superior (plúmula), a extremidade lateral e a extremidade inferior (radícula); nos cotilédones - a proporção dos danos e se estes afetavam mais da metade do tecido.

Para o procedimento estatístico foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, realizando a comparação de médias pelo teste de Scott-Knott, ($p < 0,01$); os resultados foram expressos em porcentagem. Utilizou-se o software Assistat 7.7 (Silva, 2013) para análise dos dados.

4.3 Resultados e Discussão

O teor de água das sementes de araucária, antes da realização dos testes, foi de 45,1%, valor este superior ao nível crítico de umidade considerado para a espécie (38,0%), abaixo do qual ocorre a perda total da viabilidade da semente (Eira et al., 1994).

Na Figura 3 encontram-se os grupos de viabilidade estabelecidos para sementes de araucária. No Grupo I (viáveis) estão inseridas as sementes que possuem embriões de coloração uniforme (vermelho carmim), com tecido de aspecto normal e firme, sem danos significativos para a germinação e o estabelecimento de plântulas normais (Figura 3a). Ainda nesta classe, foram inseridos os embriões que possuem menos da metade dos cotilédones com coloração vermelho intenso ou descolorido (Figura 3b) e também com dano superficial próximo a extremidade inferior do eixo embrionário (radícula), porém sem atingi-lo (Figura 3c), desde que as demais regiões apresentem coloração uniforme e tecidos firmes. No Grupo II (inviáveis), enquadraram-se os embriões com tecido descolorido ou com coloração vermelho intenso na região da radícula (Figura 3d); na região da plúmula (Figura 3e); com mais da metade dos cotilédones descolorida ou com coloração vermelho intenso (Figura 3f). Ainda neste grupo estão os embriões mortos, que se encontravam quase totalmente descoloridos (Figura 3g); com toda a extensão do eixo embrionário com coloração branco leitoso (Figura 3h); ou com tecido apodrecido (Figura 3i).

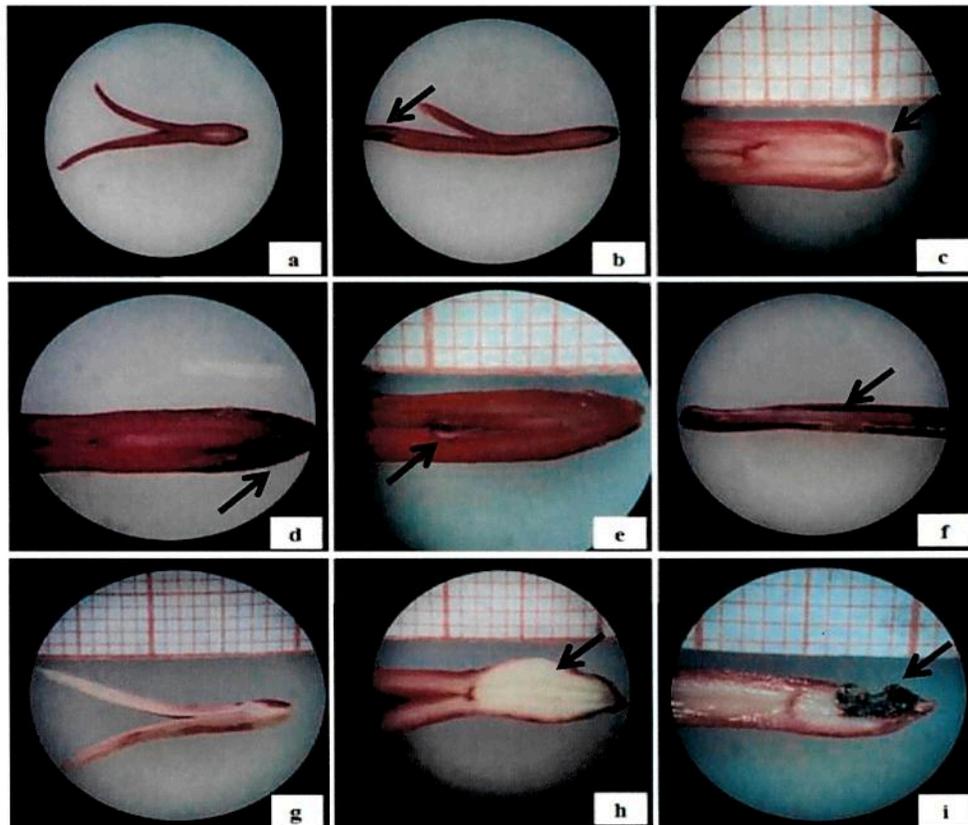


Figura 3. Grupos de viabilidade no teste de tetrazólio de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze: Grupo I (viáveis) - (a) embrião com coloração uniforme (vermelho carmim), de aspecto normal e firme; (b) embrião com menos da metade dos cotilédones com coloração

vermelho intenso ou descolorido; (c) embrião com dano superficial próximo a extremidade inferior do eixo embrionário (radícula), porém sem atingi-lo. Grupo II (inviáveis) - (d) embrião com coloração vermelho intenso, típica de tecido deteriorado, atingindo a extremidade inferior do eixo embrionário (radícula); (e) embrião com dano na extremidade superior do eixo embrionário (plúmula); (f) embrião com mais da metade dos cotilédones descolorida; (g) embrião morto (quase totalmente descolorido); (h) embrião morto (com toda a extensão do eixo embrionário com coloração branco leitosa); (i) embrião morto (com tecido apodrecido).

Nas Tabelas 5 e 6 estão apresentados os resultados dos testes de germinação e de tetrazólio. Pode-se observar que a viabilidade obtida no teste de tetrazólio, conduzido com semente inteira e nas condições recomendadas pelas RAS (Brasil, 2009) (1%/24h/30°C), foi consideravelmente inferior à observada no teste de germinação. Na realização da metodologia recomendada, verificou-se a presença de poucas sementes viáveis (Figura 4a), sendo que a maior parte apresentava tecidos com coloração vermelho intenso (Figura 4b e 4c) ou descolorido (Figura 4d). A coloração vermelho intenso, quando presente, indica a ocorrência de deterioração e, a coloração branco leitosa, caracteriza mortalidade (Brasil, 2009).

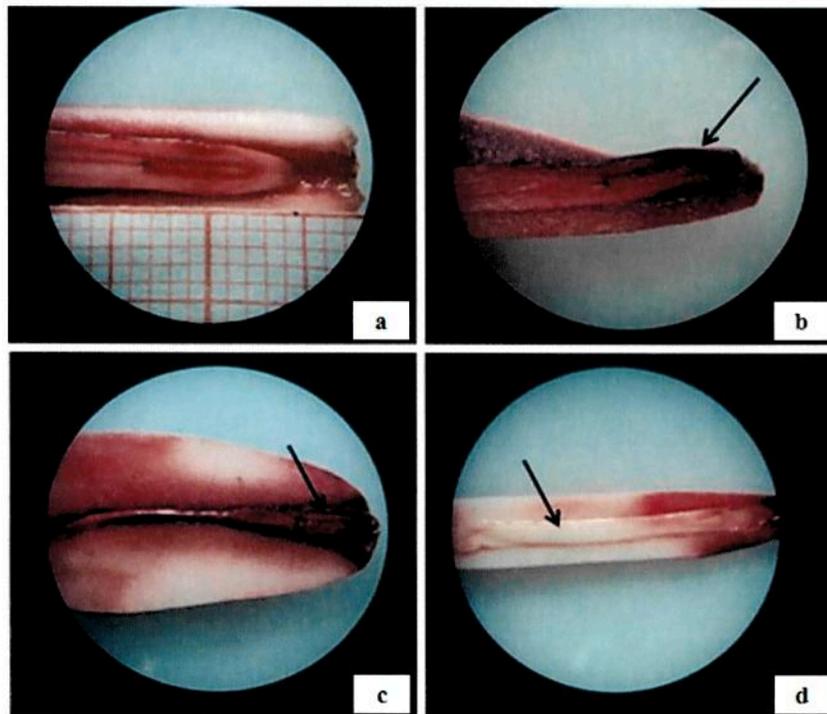


Figura 4. Aspecto das sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze, após o teste de tetrazólio realizado de acordo com metodologia de Brasil (2009): (a) semente com coloração vermelho carmim, uniforme; (b) semente apresentando coloração vermelho intenso na região

da radícula; (c) semente com coloração vermelho intenso ao longo do eixo embrionário e cotilédones; (d) semente descolorida.

Tal fato pode ter ocorrido em razão de estar prescrita a remoção do pericarpo e a retirada da parte lateral e terminal das sementes (Brasil, 2009). A remoção do tegumento possibilita maior uniformidade e rapidez durante a coloração (Gaspar-Oliveira et al., 2009); contudo, os resultados podem sofrer alterações devido aos cortes e danos nas sementes durante o preparo (Cervi e Mendonça, 2009), ocasionando equívocos na interpretação.

Tabela 5. Germinação de sementes de araucária, teste de tetrazólio (semente) e teste de tetrazólio (embrião excisado), testando-se neste último diferentes combinações de concentração da solução e períodos de coloração, a 30°C.

Testes	Viabilidade
%.....
Germinação	86 a
Tetrazólio/semente/1,0%/24h/30°C	14 d
Tetrazólio/embrião excisado/0,075%/1h/30°C	35 c
Tetrazólio/embrião excisado /0,075%/2h/30°C	86 a
Tetrazólio/embrião excisado /0,075%/4h/30°C	76 b
Tetrazólio/embrião excisado /0,2%/1h/30°C	40 c
Tetrazólio/embrião excisado /0,2%/2h/30°C	76 b
Tetrazólio/embrião excisado /0,2%/4h/30°C	76 b
Tetrazólio/embrião excisado /0,5%/1h/30°C	45 c
Tetrazólio/embrião excisado /0,5%/2h/30°C	83 a
Tetrazólio/embrião excisado /0,5%/4h/30°C	85 a
C.V.(%)	10,0

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,01$).

No caso da araucária, a falta de especificação quanto à quantidade a ser removida do tegumento pode causar excesso ou falta de coloração, dificultando assim a análise dos resultados. Oliveira et al. (2014), em trabalho realizado com *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, também relataram dificuldades na condução da metodologia do teste de tetrazólio descrita nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

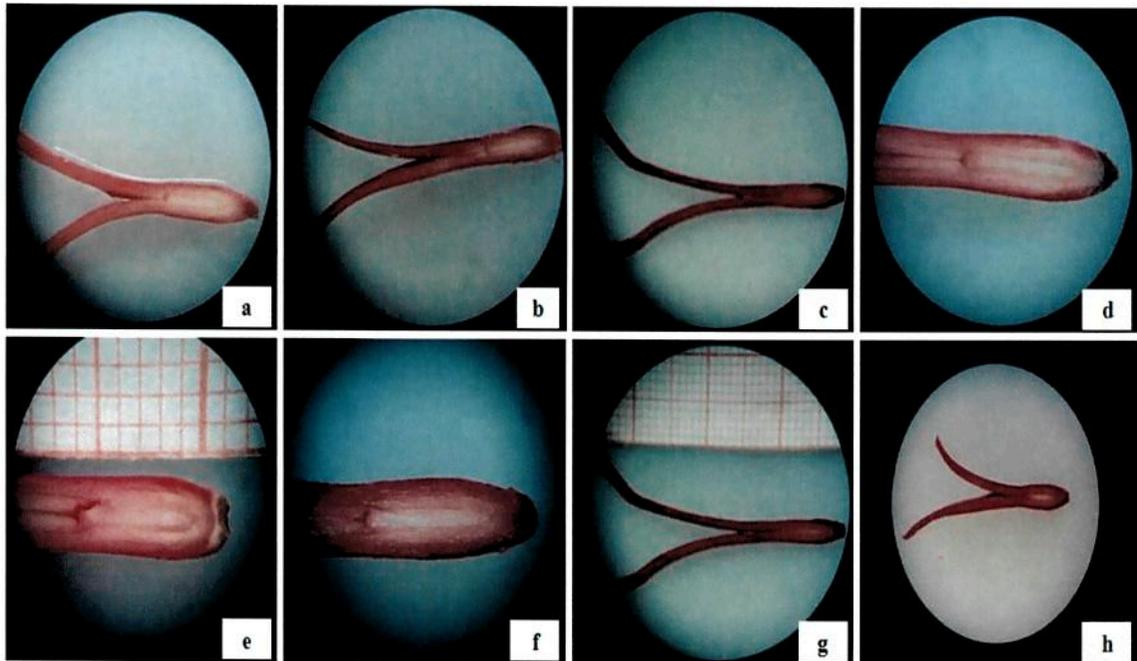
Tabela 6. Germinação de sementes de araucária, viabilidade obtida pelo teste de tetrazólio em sementes inteiras e em embrião excisado, testando-se neste último diferentes combinações de concentração da solução e períodos de coloração, a 40°C.

Testes	Viabilidade
%.....
Germinação	86 a
Tetrazólio/semente/1,0%/24h/30°C	14 d
Tetrazólio/embrião excisado /0,075%/1h/40°C	51 c
Tetrazólio/embrião excisado /0,075%/2h/40°C	83 a
Tetrazólio/embrião excisado /0,075%/4h/40°C	85 a
Tetrazólio/embrião excisado /0,2%/1h/40°C	65 b
Tetrazólio/embrião excisado /0,2%/2h/40°C	87 a
Tetrazólio/embrião excisado /0,2%/4h/40°C	80 a
Tetrazólio/embrião excisado /0,5%/1h/40°C	69 b
Tetrazólio/embrião excisado /0,5%/2h/40°C	80 a
Tetrazólio/embrião excisado /0,5%/4h/40°C	66 b
C.V.(%)	9,7

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,01$).

Quanto ao teste de tetrazólio conduzido com embriões excisados, a 30°C (Tabela 5) e a 40°C (Tabela 6), as combinações de metodologia que se relacionaram com o teste de germinação, ou seja, que apresentaram médias estatisticamente semelhantes foram: 0,075%/2h/30°C (Figura 5a); 0,5%/2h/30°C (Figura 5b); 0,5%/4h/30°C (Figura 5c);

0,075%/2h/40°C (Figura 5d); 0,075%/4h/40°C (Figura 5e); 0,2%/2h/40°C (Figura 5f);



0,2%/4h/40°C (Figura 5g) e 0,5%/2h/40°C (Figura 5h).

Figura 5. Teste de tetrazólio conduzido com embriões excisados de *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze, empregando-se as metodologias que se relacionaram com o teste de germinação: (a) 0,075%/2h/30°C; (b) 0,5%/2h/30°C; (c) 0,5%/4h/30°C; (d) 0,075%/2h/40°C; (e) 0,075%/4h/40°C; (f) 0,2%/2h/40°C; (g) 0,2%/4h/40°C; (h) 0,5%/2h/40°C.

Dos três tratamentos com a temperatura de 30 °C que foram estatisticamente semelhantes aos resultados obtidos no teste de germinação (Tabela 5), a combinação de 0,5%/2h/30°C foi a que possibilitou a melhor visualização das estruturas e dos danos (Figura 5b). Por outro lado, na temperatura de 40°C (Tabela 6), as combinações de 0,075%/4h/40°C e 0,5%/2h/40°C foram superiores em termos de identificação da estrutura dos embriões (Figuras 5e e 5h). Para redução de custo, menores concentrações de solução de tetrazólio são indicadas (Dias e Alves, 2008), as quais podem possibilitar também eficiente visualização e identificação dos tipos de injúrias (França Neto et al., 1998).

Para outras espécies florestais, estudos abordando a metodologia do teste de tetrazólio, em embriões, são encontrados para angico (*Anadenanthera peregrina*), sendo recomendando a concentração de 0,1%, por 24 horas a 30°C (Pinho et al., 2011), e para ipê-branco (*Tabebuia roseoalba*), indicando a concentração de 0,5%, a 36°C, durante 24h (Abbade e Takaki, 2014).

No caso de araucária, Oliveira et al. (2014) obtiveram melhores resultados com as concentrações de 0,1% ou 0,5% por 1h, a 25°C, porém incluindo um período de pré-umedecimento das sementes por 18 horas, antes da extração dos embriões, o que acarreta expressivo aumento do tempo de análise.

Assim, as combinações que possibilitaram a melhor visualização das estruturas e dos danos nos embriões de araucária foram 0,5%/2h/30°C, 0,075%/4h/40°C e 0,5%/2h/40°C. Para a avaliação da viabilidade, a utilização da concentração de 0,075 % traz benefícios para a análise de rotina, em razão do menor custo de execução, porém visando a redução de tempo, a utilização dos demais tratamentos é mais vantajosa. Além disso, o estudo proporcionou um ganho no período para obtenção de resultados, em todos os tratamentos, uma vez que não necessitou realizar o pré-umedecimento das sementes por 18h.

4.4. Conclusões

- A utilização de embriões excisados de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze é viável para condução do teste de tetrazólio, proporcionando maior rapidez de execução e melhor interpretação da viabilidade;
- O teste de tetrazólio pode ser empregado com eficiência por meio da imersão direta de embriões excisados em solução de tetrazólio, empregando-se as seguintes combinações de metodologia: 0,5%/2h/30°C, 0,075%/4h/40°C e 0,5%/2h/40°C, o que permite a classificação das sementes em dois grupos de qualidade.

4.5. Referências

ABBADE, L.C.; TAKAKI, M. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith-Bignoniaceae, submetidas ao armazenamento. **Revista Árvore**, v.38, n.2, p.233-240, 2014.

ABREU, D.C.A.; MEDEIROS, A.C.S.; AGUIAR, I.B.; BANZATTO, D.A. Teste Topográfico de tetrazólio em sementes de pinheiro-brasileiro (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze). In: **4º Congresso Florestal Paranaense**, 2012, Curitiba, PR.

ANSELMINI, J.I.; ZANETTE, F. Microenxertia e sua caracterização morfológica em *Araucaria angustifolia*. **Ciência Rural**, v.38, n.4, p.967-973, 2008.

BRASIL. 2013. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instruções para análise de sementes de espécies florestais**. Brasília, DF: MAPA/SDA, 97 p. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Laborat%C3%B3rio/Sementes/FLORESTAL_documento_pdf.pdf> (Acesso em 20/02/2014).

BRASIL. 2009. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 395 p.

CAÇOLA, A.V.; AMARANTE, C.V.T.; FLEIG, F. D.; MOTA, C.S. Qualidade fisiológica de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze submetidas a diferentes condições de armazenamento e a escarificação. **Ciência Florestal**, v.16, n.3/4, p. 391-398, 2006.

CERVI, F.; MENDONÇA, E.A.F. Adequação do teste de tetrazólio para sementes de algodociro. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.177-186, 2009.

DIAS, M.C.L.L.; ALVES, S.J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Panicum maximum* Jacq pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n.3, p. 152-158, 2008.

EIRA, M.T.S.; SALOMÃO, N.A.; CUNHA, R.; CARRARA, D.K.; MELLO, C.M.C. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. – Araucariaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v.16, n.1, p.71-75, 1994.

FERNANDES, R.C.; MAGALHÃES, H.M.; LOPES, P.S.N.; SILVA JÚNIOR, D.B.; FERNANDES, R.C.; OLIVEIRA GOMES, J.A.; CARNEIRO, P.A.P. Elaboração da metodologia de aplicação do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade das sementes de coquinho-azedo. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.2, p.1004-1007, 2007.

FERREIRA, R.A.; OLIVEIRA, L.M.; TONETTI, O.A.O.; DAVIDE, A.C. Comparação da viabilidade de sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake – leguminosae caesalpinioideae, pelos testes de germinação e tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.3, p.83-89, 2007.

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. 1998. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 72 p.

GASPAR-OLIVEIRA, C. M.; MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Método de preparo das sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) para o teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.160-167, 2009.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, L.P. C.; REIS, M.S. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.4, p.787-796, 2004.

NOGUEIRA, A.C.; MEDEIROS, A.C.S. **Coleta de Sementes Florestais Nativas**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2007. 11p. (Embrapa Florestas. Circular técnica, 144). Disponível em: <http://www.cnpf.embrapa.br/publica/circtec/edicoes/Circular144.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2014.

OLIVEIRA, L.M.; GOMES, J.P.; SOUZA, G.K.; NICOLETTI, M.F.; LIZ, T.O.; PIKART, T.G. Metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Floresta e Ambiente**, v.21, n.4, p.468-474, 2014.

PINHO, D.S.; LIMA BORGES, E.E.; CARVALHO, A.P.V.; CORTE, V.B. Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade de sementes de angico. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.31, n.67, p.269-272, 2011.

PINTO, T.L.F.; BRANCALION, P.H.S.; NOVEMBRE, A.D.L.C.; CICERO, S.M. Avaliação da viabilidade de sementes de coração-de-negro (*Poecilanthe parviflora* Benth. - Fabaceae-Faboideae) pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n.1, p.208-214, 2008.

PIRES, P.P.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. Ácido indolbutírico e ortotropismo na miniestaquia de *Araucaria angustifolia*. **Revista Árvore**, v.37, n.3, p.393-399, 2013.

RIBEIRO, L.M.; GARCIA, Q.S.; OLIVEIRA, D.M.T.; NEVES, S.C. Critérios para o teste de tetrazólio na estimativa do potencial germinativo em macaúba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.4, p.361-368, 2010.

SILVA, F.A.S. **Sistema de Assistência Estatística – ASSISTAT versão 7.6 beta**. Departamento de Engenharia Agrícola (DEAG) do CTRN da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Campina Grande – PB, 2013. Disponível em: <http://www.assistat.com/>. Acesso em 07 de Junho de 2013.

SILVA, R.J.; MARQUES, R.T. **Estudo sobre a extração, utilização e comercialização do pinhão (semente de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze) no município de Barbacena-MG**. V Simpósio de Pesquisa e Inovação/IV Seminário de Iniciação Científica do IF Sudeste MG-Câmpus Barbacena, v.1, n.1, p.1-5, 2014.

SOARES, T.S.; MOTA, J.H. Araucária- o pinheiro brasileiro. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v.3, n.1, p.1-8, 2004.

WATZLAWICK, L.F.; EBLING, A.A.; RODRIGUES, A.L.; VERES, Q.J.I.; LIMA, A.M. Variação nos Teores de Carbono Orgânico em Espécies Arbóreas da Floresta Ombrófila Mista. **Floresta e Ambiente**, v.18, n.3, p.248-258, 2011.

WENDLING, I.; DUTRA, L.F.; HOFFMANN, H.A.; BETTIO, G.; HANSEL, F. Indução de brotações epicórmicas ortotrópicas para a propagação vegetativa de árvores adultas de *Araucaria angustifolia*. **Agronomía Costarricense**. v.33, n.2, p.309-319, 2009.

ZANETTE, F.; OLIVEIRA, L.D.S.; BIASI, L.A. Grafting of *Araucaria angustifolia* (BERTOL.) kuntze through the four seasons of the year. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.4, p.1364-1370, 2011.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Baseado no exposto, o procedimento mais indicado para a determinação do teor de água de *Araucaria angustifolia* é a utilização do preparo das sementes cortando-as três sementes em três partes, pelo método de estufa a 103 ± 2 °C, durante 17 h.

É viável a utilização de embriões excisados de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze para condução do teste de tetrazólio, proporcionando maior rapidez de execução e melhor interpretação da viabilidade. O teste pode ser empregado com eficiência por meio da excisão dos embriões e imersão direta na solução de tetrazólio, empregando-se as seguintes combinações de metodologia: 0,5%/2h/30°C, 0,075%/4h/40°C ou 0,5%/2h/40°C, permitindo a classificação das sementes em dois grupos de qualidade.

6. REFERÊNCIAS

ABBADE, L.C.; TAKAKI, M. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith-Bignoniaceae, submetidas ao armazenamento. **Revista Árvore**, v.38, n.2, p.233-240, 2014.

ABREU, D.C.A.; MEDEIROS, A.C.S.; AGUIAR, I.B.; BANZATTO, D.A. Teste Topográfico de tetrazólio em sementes de pinheiro-brasileiro (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze). In: **4º Congresso Florestal Paranaense**, 2012, Curitiba, PR.

ANSELMINI, J.I. **Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. na região de Curitiba-PR**. 2005. 52p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná – Curitiba.

BAILLIE, J.; ILTON-TAYLOR, C.; STUART, S.N. 2004. **IUCN red list of threatened species: a global species assessment**. Editora: IUCN, 194p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução normativa nº 06, de 23/09/2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, . Seção 1, 24/09/2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instruções para análise de sementes de espécies florestais. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária**. Brasília, DF: MAPA/SDA, 2013. 97 p. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Laborat%C3%B3rio/Sementes/FLORESTAL_documento_pdf.pdf>

BRASIL. 2009. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 395 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Lei nº 11.428, de 22/12/2006. Dispõe sobre a utilização e proteção da vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**; Brasília; 2006.

BORGES, L.R.; LÁZZARI, S.M.N.; LÁZZARI, F.A. Comparação dos sistemas de cultivo nativo e adensado de erva mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil., quanto à ocorrência e flutuação populacional de insetos. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.47, n.4, p. 563-568, 2003.

CAÇOLA, A.V.; AMARANTE, C.V.T.; FLEIG, F. D.; MOTA, C.S. Qualidade fisiológica de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze submetidas a diferentes condições de armazenamento e a escarificação. **Ciência Florestal**, v.16, n.3/4, p. 391-398, 2006.

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

CARVALHO, N.M. 2005. **A secagem de sementes**. Jaboticabal, FUNEP, 184p.
CARVALHO, P. E. R. 1994. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e usos da madeira**. Colombo: EMBRAPA/CNPQ, 640p.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. 2012. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 590p.

CERVI, F.; MENDONÇA, E.A.F. Adequação do teste de tetrazólio para sementes de algodoeiro. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.177-186, 2009.

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

GASPAR-OLIVEIRA, C. M.; MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Método de preparo das sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) para o teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.160-167, 2009.

HIGUCHI, P.; SILVA, A.C.; FERREIRA, T.S.; SOUZA, S.T.; GOMES, J.P.; SILVA, K.M.; SANTOS, K.F.; LINLE, C.; PAULINO, P.S. Influência de variáveis ambientais sobre o padrão estrutural e florístico do componente arbóreo, em um fragmento de floresta ombrófila mista montana em Lages, SC. **Ciência Florestal**, v.22, n.1, p.79-90, 2012.

KOZERA, C.; DITTRICH, V.A.O.; SILVA, S.M. Fitossociologia do componente arbóreo de um fragmento de Floresta Ombrófila Mista Montana, Curitiba, PR, BR. **Revista Floresta**, v.36, n.2, p.225-237, 2006.

KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. 1999. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. ABRATES, 218p.

LEITE, D.M.C. **Avaliação nutricional da semente do pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia*)**. 2007. 60p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Porto Alegre.

LIMA, A.R.; CAPOBIANCO, J.P.R. 1997. **Mata Atlântica: avanços legais e institucionais para sua conservação**. Documentos do ISA n. 004. Instituto Sócio Ambiental, Brasília.

MACHADO, E. L.; SILVA, A. C.; SILVA, M. J.; LEITE, A.; OTTOBONI, L. M. M. Endogenous protein phosphorylation and casein kinase activity during seed development in *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, v.61, n.7, p. 835-842, 2002.

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

NASCIMENTO, A.R.T.; LONGHI, S.J.; BRENA, D.A. Estrutura e padrões de distribuição espacial de espécies arbóreas em uma amostra de floresta ombrófila mista em nova prata, RS. **Ciência Florestal**, v.11, n.1, p.105-119, 2001.

OLIVEIRA, L.M.; GOMES, J.P.; SOUZA, G.K.; NICOLETTI, M.F.; LIZ, T.O.; PIKART, T.G. Metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Floresta e Ambiente**, v.21, n.4, p.468-474, 2014.

PEDROSA, C.R.G.; MELO, L.F.; FAGIOLI, M. Viabilidade do uso de aparelho de microondas na determinação do teor de água em sementes de milho e soja. **Revista Agropecuária Técnica**, v.35, n.1, p.48-53, 2014.

PIRES, P.P.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. Ácido indolbutírico e ortotropismo na miniestaquia de *Araucaria angustifolia*. **Revista Árvore**, v.37, n.3, p.393-399, 2013.

SANTI-GADELHA, T.S.; GADELHA, C.A.A.; SABOI, K. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.350, p.1050-1055, 2006.

SCHUMACHER, M.V.; BRUN, E.J.; HERNANDES, J.I.; KONIG, F.G. Produção de serapilheira em uma floresta de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze no município de Pinhal Grande-RS. **Revista. Árvore**, v.28, n.1, p.29-37, 2004.

SILVA, H.D.; BELLOTE, A.F.J.; FERREIRA, C.A.; BOGNOLA, I.A. Recomendação de solos para *Araucaria angustifolia* com base nas suas propriedades físicas e químicas. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n.43, p.61-74, 2001.

SILVA, R.J.; MARQUES, R.T. Estudo sobre a extração, utilização e comercialização do pinhão (semente de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze) no município de Barbacena-MG. **V Simpósio de Pesquisa e Inovação/IV Seminário de Iniciação Científica do IF Sudeste MG-Câmpus Barbacena**, v.1, n.1, p.1-5, 2014.

SOARES, T.S.; MOTA, J.H. Araucária- o pinheiro brasileiro. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v.3, n.1, p.1-8, 2004.

TOLEDO, M.Z.; FONSECA, N.R.; CÉSAR, M.L.; SORATTO, R.P.; CAVARIANI, C.; CRUSCIOL, C.A.C. Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de feijão em função da aplicação tardia de nitrogênio em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.39, n.2, p.124-133, 2009.

VALÉRIO, A.F.; WATZLAWICK, L.F.; SANTOS, R.T.; BRANDELERO, C.; KOEHLER, H.S. Quantificação de resíduos e rendimento no desdobro de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze. **FLORESTA**, v. 37, n. 3, 2007.

VIEIRA, R.D.; PENARIOL, A.L.; PERECIN, D.; PANOBIANCO, M. Condutividade elétrica e teor de água inicial das sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.9, p.1333-1338, 2012.

ZECHINI, A.A.; SCHUSSLER, G.; SILVA, J. Z.; MATTOS, A.G., PERONI, N.; MANTOVANI, A.; REIS, M.S. Produção, comercialização e identificação de variedades de pinhão no entorno da Floresta Nacional de Três Barras–SC. **Biodiversidade Brasileira**,v.2, n.2, p.74-82, 2012.