

Tassiane Terezinha Pinto

**MORFOANATOMIA E FISILOGIA DE SEMENTES COM
DORMÊNCIA FÍSICA DE *Colubrina glandulosa* PERKINS
(RHAMNACEAE) E *Senna multijuga* (RICH.) H. S. IRWIN &
BARNEBY (CAESALPINIOIDEAE - FABACEAE)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, com área de concentração em Fisiologia e Ecologia.

Orientador: Prof. Dr. Maria Terezinha
Silveira Paulilo

Coorientador : Prof. Dr. Marisa Santos

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

PINTO, Tassiane Terezinha

Morfoanatomia e fisiologia de sementes com dormência física de *Colubrina glandulosa* Perkins (Rhamnaceae) e *Senna multijuga* (Rich.) H. S. Irwin & Barneby (Caesalpinioideae - Fabaceae) / Tassiane Terezinha PINTO ; orientadora, Maria Terezinha Silveira Paulilo ; co-orientadora, Marisa Santos. - Florianópolis, SC, 2013.

71 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

Inclui referências

1. Biologia Vegetal. 2. Germinação. 3. Dormência Física. 4. Floresta Tropical. I. Paulilo, Maria Terezinha Silveira . II. Santos, Marisa. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela estrutura e oportunidade ao aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas e a todo o colegiado integrado, pelas aulas, discussões científicas e apoio intelectual.

Às professoras Maria Terezinha Silveira Paulilo e Marisa Santos, pela ótima orientação e sinceridade em todos os momentos da pesquisa.

Às biólogas Elise Lara Galitzki, Eliana de Medeiros Oliveira e Chirle Ferreira, pelo suporte técnico durante a fase experimental.

Aos meus colegas de turma e de trabalho, pelo companheirismo, amizade e aos momentos felizes nos laboratórios.

Aos professores formadores da banca examinadora, pelas valiosas contribuições dadas ao presente trabalho.

À minha família, pelo apoio e incentivo.

Muito obrigada!

“Uma trajetória de superação de obstáculos ao germinar de uma vida...”

RESUMO

A dormência física em sementes tem sido pouco estudada em espécies de florestas tropicais, como a Floresta Tropical Atlântica ou em famílias que não Fabaceae. O presente trabalho teve como objetivo verificar a anatomia e histoquímica do tegumento de duas espécies arbóreas da Floresta Tropical Atlântica, uma da família Rhamnaceae, *Colubrina glandulosa*, e outra da família Fabaceae, *Senna multijuga*, bem como localizar a estrutura ou região responsável pela entrada de água após a quebra da dormência física nestas sementes. Para análise da anatomia e histoquímica dos tegumentos, secções de sementes frescas ou fixadas foram submetidas a diferentes reagentes e observadas sob microscopia óptica ou de epi-fluorescência. Para observação da morfologia das cicatrizes tegumentares, sementes intactas e com tratamento para quebra de dormência foram observadas em microscópio estereoscópio ou sob microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para quebra da dormência das sementes foram testados choques térmicos, alternâncias de temperatura, escarificação química e escarificação térmica. Os procedimentos para análise do material em MEV, secagem em ponto crítico e secagem em sílica, causaram danos ao tegumento das sementes, optando-se, portanto, pela análise de sementes frescas sem aplicação de qualquer procedimento. O armazenamento das sementes em sílica ocasionou danos ao tegumento semelhante aos causados pelos tratamentos de quebra de dormência. Sementes de *C. glandulosa* apresentaram o tegumento composto por uma resistente camada paliçádica e por um denso tecido esclerenquimático. Na superfície da semente ocorre apenas uma cicatriz, denominada de fenda hilar. Sementes de *S. multijuga* apresentaram testa formada por uma camada de macrosclereides, duas camadas de osteosclereides, uma externa e outra interna, um tecido esclerenquimático e um tecido esponjoso, o tégmen é composto por duas camadas de células brancas. As cicatrizes encontradas são a micrópila, o hilo e o estroffolo alinhados. Para ambas as espécies, o ácido sulfúrico proporcionou maiores porcentagens de germinação. Em *C. glandulosa* este tratamento ocasionou grandes rachaduras em torno da fenda hilar, enquanto que em *S. multijuga* surgiram imensas rachaduras na camada paliçádica que recobre todo o tegumento da semente. Os tratamentos de choque térmico, alternâncias de temperatura e armazenamento em sílica, proporcionaram rachaduras semelhantes às que foram encontradas em ambas espécies após a imersão em ácido, no entanto, estas se mostraram menos conspícuas. Os tratamentos aplicados levaram à embebição de água pelas sementes. A partir dos dados sugere-

se que tanto *C. glandulosa* como *S. multijuga* não possuem estruturas específicas para a entrada de água após a quebra da dormência. Em *C. glandulosa* foram as rachaduras perpendiculares a fenda hilar que proporcionaram a entrada de água nas sementes e em *S. multijuga* o desprendimento de toda a camada paliçádica resultou em áreas permeáveis em toda a extensão da semente.

Palavras-chave: Semente, dormência física, tegumento, entrada de água, germinação, floresta tropical.

ABSTRACT

The physical dormancy in seeds has been poorly studied in tropical forest species, such as Atlantic Rainforest or in species that don't belong to the family Fabaceae. This study aimed to examine the anatomy and histochemistry of the seed coat of two tree species from the Atlantic Rainforest, one belonging to the family Ramnaceae, *Colubrina glandulosa*, and other belonging to the family Fabaceae, *Senna multijuga*, and locate the structure or region responsible for the entry of water after breaking physical dormancy of these seeds. To analyze the anatomy and histochemistry of the seed coat, sections of fresh or fixed seeds were subjected to different reagents and observed under light or epi-fluorescence microscopy. To observe the morphology of the morphology of the seed coat features, seeds with and without treatment for dormancy break were observed in stereoscopic microscope or scanning electron microscope (SEM). To break seed dormancy were tested thermal shock, alternating temperature, thermal and chemical scarification. The drying of the material for analysis in SEM, critical point drying or drying in silica, caused damage to the seed coat, opting thus for examining fresh seeds without the application of any procedure. Storing seeds in silica caused damage to the seed coat similar to those caused by treatments for dormancy breaking. Seeds *C. glandulosa* showed that the seed coat consists of a palisade layer and a dense sclerenchyma tissue. On the surface of the seed occurs the hilar slit. Seeds of *S. multijuga* showed that the seed coat is formed by a layer of macrosclereids, two layers of osteosclereids, one external and one internal, sclerenchyma and spongy tissue and the tegmen, composed of two layers of white cells. The micropyle, hilum and the strophiole are a ligned. For both species, sulfuric acid resulted in higher germination percentages. In *C. glandulosa* this treatment resulted in large cracks around the hilar slit, while in *S. multijuga* huge cracks appeared in the palisade layer in the entire seed coat. Heat shock ant alternating temperature treatments and storage on silica caused similar cracks to those cracks found in both species after immersion in acid; however, these cracks

were less conspicuous than in sulphuric acid. The treatments led to water imbibitions by seeds. The data suggests that both *C. glandulosa* as *S. multijuga* don't possess specific structures for water absorption after the dormancy breaking. In *C. glandulosa* cracks were perpendicular to the hilar slit, providing water absorption and in *S. multijuga* the detachment of the entire palisade layer resulted in permeable areas in the entire seed.

Keywords: seed, physical dormancy, seed coat, water intake, germination, tropical rainforest.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ramos de *Colubrina glandulosa*. (A) Em floração (foto de Martins Molz disponível em: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=1504 Acesso em 15/01/2013) e (B) com frutos maduros (foto de Gerson L. Lopes disponível em: <http://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/6488-2/> Acesso em 15/01/2013)..... 25
- Figura 2.** Aspecto de *Senna multijuga* (A) árvore em campo e (B) detalhe de ramo com inflorescência e frutos jovens..... 27
- Figura 3.** Frutos maduros de *Colubrina glandulosa* observados em microscópio estereoscópico. (A) fruto fechado e (B) fruto aberto com a porção proximal destacada mostrando as cocas (seta). pp – porção proximal, pd – porção distal. Barras: 1 mm. 35
- Figura 4.** Morfologia de sementes de *Colubrina glandulosa* sob microscópio estereoscópico. (A) Secção longitudinal evidenciando região basal concava e a face anterior de um dos cotilédones, (B) secção transversal mostrando o posicionamento dos cotilédones, endosperma e a proeminência lateral (*), (C) região basal com a fenda hilar (seta), (D) secção do tegumento mostrando a coloração natural da camada paliçádica e do tecido esclerenquimático. cp – camada paliçádica, co – cotilédones, en – endosperma, re – região extra - hilar, fh – fenda hilar, te – tecido esclerenquimático, ts – tegumentos. Barras: A, B, C, D – 0,5 mm e E – 250 mm. 36
- Figura 5.** Secções de tegumento de *Colubrina glandulosa*. (A) Secção longitudinal sem coloração sob microscopia óptica, (B) detalhe dos tecidos componentes do tegumento: camada paliçádica de macroesclereides e tecido esclerenquimático, (C) porção externa da camada paliçádica sob microscopia óptica evidenciando área lignificada, (D) região lignificada das macroesclereides após reação com azul de toluidina e (E) secção após reação com azul de anilina sob epi-fluorescência ultravioleta evidenciando a presença de calose. cl – calose, al – área lignificada, cp – camada paliçádica, ct – cutícula, fh – fenda hilar, pp – parede periclinal externa, te – tecido esclerenquimático. Barras: 25 µm. 38
- Figura 6.** Células do tegumento de *Colubrina glandulosa*. (A) Macroesclereide dissociada, (B) microscopia eletrônica de varredura de macroesclereide dissociada, evidenciando a porção externa com paredes facetadas (C) tecido esclerenquimático sob microscopia eletrônica de varredura e (D) porção interna das macroesclereides e tecido esclerenquimático após reação com azul de toluidina evidenciando paredes lignificadas. lg – região lignificada, pc – parede celular. Barras: 10 µm. 39

Figura 7. Aspectos da semente de *Senna multijuga*. (A) Semente sob microscópio estereoscópico, seta indica posicionamento da região hilar, (B) aspecto geral da região hilar sob microscopia eletrônica de varredura, (C) detalhes da micrópila próxima ao hilo, o qual ainda mantém vestígios do funículo e (D) estrofiolo. es – estrofiolo, fu – remanescente do funículo, hi – hilo, mi – micrópila, pl – pleurograma. Barras: A – 0,5 mm B, C e D – 50 μ m. 40

Figura 8. Anatomia do tegumento da região extra-hilar das sementes de *Senna multijuga*. (A) Estratos celulares, (B) secção sob microscopia óptica, após reação com sudam III evidenciando cutícula e camada subcuticular, (C) refração da linha lúcida em macroesclereides dissociadas (seta), (D) microscopia eletrônica de varredura da camada paliçádica evidenciando o espessamento das macroesclereides (seta), (E) osteoesclereide dissociada, (F) microscopia eletrônica de varredura do estrato das osteoesclereides, mostrando as paredes espessadas. (G) tecido esclerenquimático dissociado, (H) células brancas do tégmen. cb – células brancas, cp – camada paliçádica, cs – camada subcuticular, ct – cutícula, os – osteoesclereides, te – tecido esclerenquimático, tg - tégmen. Barras: A – 50 μ m, outras – 10 μ m. 42

Figura 9. Anatomia do tegumento da região abaixo das cicatrizes tegumentares de sementes de *Senna multijuga*. (A) Semente sob microscópio estereoscópico mostrando um dos cotilédones e o eixo embrionário, (B) secção da região das cicatrizes tegumentares sob microscopia óptica, (C) maior aumento dos tecidos detalhando as camadas do tegumento sob a região hilar, (D) tecido esponjoso com elementos traqueais. co – cotilédones, cp – camada paliçádica, ee – eixo embrionário, et – elementos traqueais, os – osteoesclereides, re – região extra-hilar, rh – região hilar, te – tecido esclerenquimático, tg – tégmen, tv – tecido esponjoso. Barras: A – 1 mm, B e C – 50 μ m..... 43

Figura 10. Porcentagem de germinação de sementes de *Colubrina glandulosa* após diferentes tratamentos térmicos. Letras comparam valores entre as colunas (Teste Tukey $p \geq 0,05$). Germinação avaliada após 20 dias de embebição. (8d – oito dias no tratamento; 16d – dezesseis dias no tratamento; amb. ambiente). 47

Figura 11. Porcentagem de germinação de sementes de *Senna multijuga* após diferentes tratamentos térmicos. Letras comparam valores entre as colunas (Teste Tukey $p \geq 0,05$). Germinação avaliada após 20 dias de embebição. (8d – oito dias no tratamento; 16d – dezesseis dias no tratamento; amb. – ambiente). 49

Figura 12. Região hilar de sementes de *Colubrina glandulosa* em microscopia eletrônica de varredura. (A) Semente intacta, (B) após alternância de temperatura de 40/20°C por 5 meses, (C) após armazenamento em sílica por 5

semanas e (D) após imersão em ácido sulfúrico por 30 minutos. Setas indicam rachaduras perpendiculares a fenda hilar causadas pelos tratamentos. Barras: 100 μm 51

Figura 13. Alterações tegumentares em sementes de *Colubrina glandulosa*. (A) Tegumento repleto de pequenas erupções após armazenamento em sílica (setas) e (B) detalhe das rachaduras na camada paliçádica evidenciando que a erupção é consequência da ruptura entre o tecido esclerenquimático e a camada paliçádica. Barras: A – 500 μm e B – 10 μm 52

Figura 14. Região hilar de sementes de *Senna multijuga* em microscopia eletrônica de varredura. (A) Semente intacta, (B) após alternância de temperatura de 40/20°C por 5 meses, (C) após armazenamento em sílica por 5 semanas e (D) após imersão em ácido sulfúrico por 30 minutos. Região hilar dentro do círculo, o restante já é caracterizado como região extra-hilar. As setas apontam rachaduras da camada paliçádica desprendidas das parede periclinal externa das osteosclereides. po – parede periclinal externa das osteosclereides Barras: 100 μm 53

Figura 15. Rachaduras tegumentares em *Senna multijuga* sob microscopia eletrônica de varredura. (A) Destacamento da camada paliçádica na região do pleurograma e (B) exposição da parede periclinal externa das osteosclereides abaixo da camada paliçádica destacada. cp – camada paliçádica, os – osteosclereides, pl - pleurograma. Barras: A – 100 μm e B – 5 μm 54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Porcentagem de emergência de plântulas (PE) de *Colubrina glandulosa* e *Senna multijuga* em diferentes estratos florestais 44
- Tabela 2.** Porcentagem de germinação (PG) de *Colubrina glandulosa* e *Senna multijuga* após tratamentos para quebra de dormência física em laboratório 45
- Tabela 3.** Valores inicial e final de massa de sementes de *Colubrina glandulosa* após diferentes tratamentos térmicos 46
- Tabela 4.** Valores inicial e final de massa de sementes e porcentagem de germinação de *Senna multijuga* após diferentes tratamentos térmicos 48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 DORMÊNCIA DE SEMENTES	21
1.2 ESTRUTURAS ESPECIALIZADAS NA ENTRADA DE ÁGUA EM SEMENTES	23
1.3 ESPÉCIES ESTUDADAS.....	24
1.3.1 <i>Colubrina glandulosa</i> Perkins	24
1.3.2 <i>Senna multijuga</i> (Rich.) H. S. Irwin & Barneby (Caesalpinioideae) - Fabaceae	25
2. MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 MATERIAL VEGETAL	29
2.2 MÉTODOS.....	29
2.2.1 Análise da morfologia e anatomia das sementes	29
2.2.2 Quebra da dormência, germinação e alterações tegumentares	31
3. RESULTADOS	35
3.1 MORFOLOGIA E ANATOMIA DAS SEMENTES	35
3.2 QUEBRA DA DORMÊNCIA FÍSICA E GERMINAÇÃO DE SEMENTES	44
3.2.1 Germinação inicial e emergência de plântulas em condições de clareira, borda e interior de mata	44
3.2.2 Tratamentos para quebra de dormência	44
4. DISCUSSÃO	55
4.1 MORFOLOGIA E ANATOMIA DAS SEMENTES	55
4.2. GERMINAÇÃO DE SEMENTES RECÉM COLETADAS	58
4.3. QUEBRA DE DORMÊNCIA EM SEMENTES	58
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
7. ANEXOS	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 DORMÊNCIA DE SEMENTES

Uma questão ecológica muito importante é saber por que as plantas se desenvolvem e onde crescem, sendo o conhecimento dos requisitos necessários a germinação das sementes essencial para responder a esta questão (Baskin & Baskin, 2001). Além disso, características anatômicas e morfológicas de sementes, frutos e plântulas, fornecem valiosas informações que permitem a identificação de muitas espécies em fases juvenis. Tal conhecimento é imprescindível quando se pretende compreender o ciclo biológico e a regeneração natural das espécies (Oliveira, 1993).

A aplicação prática deste conhecimento é importante para recuperação de áreas degradadas e manutenção da biodiversidade, como no caso do bioma Mata Atlântica, amplamente fragmentado, que apresenta apenas 7,84% da sua cobertura original (Porto *et al.*, 2006). Desta forma, espécies nativas com características importantes para reflorestamento devem ser estudadas, aprimorando-se técnicas e mantendo processos de quebra de dormência de sementes mais semelhantes aos que ocorrem naturalmente.

As sementes ocupam uma posição crítica na história da vida de plantas superiores, sendo o sucesso do estabelecimento do novo indivíduo largamente dependente de suas características fisiológicas e bioquímicas (Bewley & Black, 1994). Conforme Bewley & Black (1994), o processo germinativo geralmente ocorre sob certas condições ambientais, tais como, boa disponibilidade hídrica, boa oxigenação e temperaturas adequadas a cada espécie. Acrescentam, ainda, que sementes que germinam nestas condições são chamadas de quiescentes, todavia, algumas sementes, as chamadas dormentes, necessitam de outros fatores ambientais além destes para poderem germinar, apresentando alguma restrição interna, que não é superada apenas por condições adequadas de hidratação, temperatura e oxigenação.

O impedimento da germinação, em sementes dormentes, pode estar relacionado aos fatores físicos, fisiológicos e morfológicos da semente, ou ainda ser uma combinação destes. Baskin & Baskin (2001) propõem cinco tipos de dormência, sendo eles: 1) Fisiológica, quando a presença de substâncias inibidoras ou ausência de substâncias promotoras no embrião impedem a germinação; 2) Morfológica, quando o embrião não apresenta maturidade suficiente para germinar; 3) Morfofisiológica, quando, além de subdesenvolvido, o embrião é fisiologicamente dormente; 4) Física, caracterizada pela presença de tecidos extraembrionários que impedem a entrada de água ou trocas gasosas entre o embrião e o meio ambiente e, 5) Física-fisiológica, quando, além de fisiologicamente dormente, ocorre a presença de tecidos extraembrionários impermeabilizantes.

A necessidade de superação destes impedimentos faz com que a dormência de sementes ocorra como uma estratégia benéfica, distribuindo a germinação ao longo do tempo e do espaço, aumentando a probabilidade de

sobrevivência das plântulas (Carvalho & Nakagawa, 2000; Fenner & Tompson, 2005).

Evidências sugerem que a dormência física, objeto de estudo deste trabalho, foi o último tipo de dormência a aparecer na escala evolutiva (Baskin & Baskin, 2001), ocorrendo em pelo menos 17 famílias de angiospermas (Baskin & Baskin, 2001; Funes & Venier, 2006).

Dados levantados por Baskin & Baskin (2001) apontam que espécies sujeitas a variações ambientais apresentam um maior investimento em mecanismos de dormência física. Em florestas tropicais úmidas, dentre as espécies que apresentam sementes dormentes, cerca de 18% possuem dormência física, enquanto em florestas semi-decíduais esse valor chega a 40%, e em climas mais áridos, como em savanas ou cerrados (mais propensos a variações ambientais), esse percentual é de 70% (Baskin & Baskin, 2001). Deste modo, a dormência física tem grande importância ecológica, já que atua prevenindo a germinação em épocas e locais hostis, aumentando as chances de sobrevivência da plântula (Argel & Paton, 1999).

A dormência física é ocasionada pela presença de tecidos impermeáveis à água e aos gases, situados externamente ao embrião (Baskin & Baskin, 2004). Esta característica impermeabilizante pode ser conferida por uma camada de células alongadas e justapostas com diferentes graus de espessamento, denominadas macroesclereides ou células de Malpighi, que podem estar impregnadas ou não por lignina (Corner, 1976; Paoli, 2006; Evert, 2006) e/ou por outras substâncias hidrofóbicas (Rolston, 1978; Morrison *et al.*, 1998; Baskin, 2003).

Em alguns casos, as macroesclereides podem apresentar uma região de reforço em suas paredes celulares, formando uma linha contínua, perpendicular ao maior eixo das células da camada paliçádica, chamada de linha lúcida (Corner, 1976; Esau, 1997). Este reforço pode conferir ainda mais impermeabilidade ao tegumento e, em alguns casos, nesta linha pode estar presente a calose, um tipo de hemicelulose com alto grau de polimerização, que atuaria como barreira ao movimento da água para o interior da semente (Bhalla & Slaterry, 1984; Bevilacqua *et al.*, 1987).

Em condições ambientais, diversos fatores exercem influência sobre a quebra da dormência física, início da germinação e sua continuidade (Larcher, 2000). Fenner & Thompson (2005) apontam que eventos específicos do ambiente são responsáveis pela quebra da dormência física. Deste modo, a exposição à variação de temperatura entre dia e noite, secas prolongadas após períodos de chuva, altas ou baixas temperaturas e contato com fogo são situações naturais que atuam sobre o tegumento da semente, rompendo alguma estrutura específica, facilitando a entrada de água e, após este rompimento, a germinação ocorre em temperatura natural constante (Baskin & Baskin, 2001).

1.2 ESTRUTURAS ESPECIALIZADAS NA ENTRADA DE ÁGUA EM SEMENTES

Algumas sementes possuem cicatrizes ou estruturas, em sua superfície tegumentar, que variam em presença e em posição, de acordo com a estrutura do óvulo que as originou. Em óvulos ortótropos, de postura ereta, as cicatrizes estão em uma mesma linha axial (Gonçalves & Lorenzi, 2007), assim hilo e micrópila, os dois tipos mais comuns de cicatriz, encontram-se em extremidades opostas (Paoli, 2006).

A micrópila apresenta-se como um poro ou uma pequena depressão, oriunda da abertura dos integumentos do óvulo. O hilo é formado pelo rompimento do funículo que ligava o óvulo à placenta, onde passava o feixe vascular. A região de confluência dos tegumentos com o nucelo e o feixe vascular é conhecida como calaza (Paoli, 2006).

Em óvulos anátropos, ocorre uma curvatura de 180° devido ao crescimento intercalar do funículo (Paoli, 2006), sendo encontrado um terceiro tipo de cicatriz, a rafe, oriunda da fusão do funículo junto aos integumentos do óvulo (Gonçalves & Lorenzi, 2007). Devido a esta torção, a micrópila encontra-se voltada para a placenta, ficando lado a lado com o hilo e calaza (Paoli, 2006). Outro tipo de óvulo, que apresenta curvatura, é o do tipo campilótropo, que, diferentemente do anátropo, tem o nucelo curvo e o óvulo torna-se reniforme, mantendo a micrópila, o hilo, e a calaza alinhados paralelamente (Souza & Paoli, 2009). Nas sementes originadas a partir deste tipo de óvulo, o embrião curvo pode ser até duas vezes maior que o próprio comprimento da semente, e assim, radícula, hipocótilo e cotilédones mais desenvolvidos, garantiriam um melhor sucesso no estabelecimento das plântulas destas espécies (Paoli, 2006).

Nas sementes com dormência física, estruturas especializadas formam o principal meio de entrada de água em sementes com tegumento impermeável, e a abertura das mesmas ocorre após a passagem por condições ambientais específicas, tais como alteração na temperatura ambiental, ou flutuação diária de temperaturas (Morrison *et al.*, 1998; Baskin & Baskin, 2001; Castillo & Guenni, 2001; Perez, 2004).

Além do hilo e da micrópila, algumas sementes apresentam outra estrutura, o estrofolo, também conhecido como lente (Souza & Marcos-Filho, 2001), sendo uma área mais frágil do tegumento que pode se romper após a semente ter passado por um período de alternância de temperaturas, permitindo a entrada de água, como no caso de algumas leguminosas (Baskin & Baskin, 2001; Baskin, 2003).

Sementes de *Schizolobium parahyba* (Fabaceae – Caesalpinioideae) tem sua dormência física quebrada após a passagem por temperatura constante de 30°C ou por períodos de alternância entre 20/30°C; nesta espécie, a lente das sementes destaca-se do restante do tegumento, proporcionando o local para entrada da água, porém, esse rompimento não é verificado em sementes que não passam pelas condições descritas (Souza *et al.*, 2012). Para as espécies *Cassia leptophylla* e *Senna macranthera*, ambas Fabaceae – Caesalpinioideae, a

temperatura para quebra de dormência foi de 50°C, entretanto os locais para entrada de água na semente diferiram, em *C. leptophylla* ocorre pelo canal micropilar e em *S. macranthera* pela lente (Paula *et al.*, 2012).

Na família Geraniaceae, a estrutura de entrada de água, encontrada em sementes com dormência física, é uma válvula articulada adjacente à micrópila com características morfológicas distintas do tegumento da semente (Gama-Arachchige *et al.*, 2010). Em Sapindaceae a estrutura relacionada à entrada de água é um pequeno plugue tegumentar, adjacente ao hilo (Tuner *et al.*, 2009). Para a família Convolvulaceae foi demonstrado o desenvolvimento de fissuras em torno do hilo, formadas após a passagem por tratamentos envolvendo altas temperaturas (Jayasuriya *et al.*, 2007).

1.3 ESPÉCIES ESTUDADAS

1.3.1 *Colubrina glandulosa* Perkins

A família Rhamnaceae possui distribuição cosmopolita incluindo cerca 50 gêneros e 900 espécies, sendo que, no Brasil, ocorrem 13 gêneros com cerca de 50 espécies (Souza & Lorenzi, 2008).

Colubrina glandulosa (Fig. 1A e 1B), conhecida popularmente como sobrasil, sabraji, saguaraji, falso-pau-brasil, caçoca, entre outros, é uma espécie pertencente a um dos gêneros de Rhamnaceae com maior destaque entre as arbóreas florestais brasileiras (Lorenzi, 1998; Carvalho, 2003). É encontrada na Floresta Ombrófila Densa (em Santa Catarina), na Floresta Estacional Semidecidual (em Minas Gerais, Paraná e São Paulo), em ambiente ripário (em Minas Gerais), no cerradão (em São Paulo), na restinga e em encaves vegetacionais na Região Nordeste (Carvalho, 2005). De acordo com Durigan & Nogueira (1990), esta espécie é classificada como secundária inicial, geralmente habita matas mais abertas e secundárias, situadas em solos úmidos e pedregosos (Lorenzi, 1998). A temperatura média do mês mais quente, a qual esta arbórea está exposta, chega a 28°C e a média do mês mais frio é 14,3°C (Carvalho, 2003).

Sua madeira é pesada e resistente ao apodrecimento, sendo empregada em obras expostas da construção civil. Por se tratar de uma planta rústica e de fácil cultivo pode ser inserida em composições de florestas heterogêneas destinadas à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente (Lorenzi, 1998). Além da importância para a restauração da vegetação, folhas, brotos, flores e frutos desta espécie servem como alimento para o macaco-bugio (Hoeltgebaum *et al.*, 1999).

As sementes são pretas, brilhantes e lisas, apresentam formato elipsóide, sendo truncadas na extremidade que contém a região hilar (Carvalho, 2005). Possuem forte dormência tegumentar, com uma lenta e baixa porcentagem de germinação, cerca de 10% (Cavalheiro *et al.*, 2007). Com a utilização de tratamentos para quebra da dormência, tais como imersão em diferentes concentrações de ácido sulfúrico ou em água quente, são atingidos até 90% de germinação (Carvalho, 2003; Cavalheiro *et al.*, 2007).



Figura 1. Ramos de *Colubrina glandulosa*. (A) Em floração (foto de Martins Molz disponível em: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/lorars/open_sp.php?img=1504 Acesso em 15/01/2013) e (B) com frutos maduros (foto de Gerson L. Lopes disponível em: <http://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/6488-2/> Acesso em 15/01/2013).

1.3.2 *Senna multijuga* (Rich.) H. S. Irwin & Barneby (Caesalpinioideae) - Fabaceae

A família Fabaceae, dividida em três subfamílias, Faboideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae, possui distribuição cosmopolita, incluindo

cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18.000 espécies, sendo que no Brasil ocorrem cerca de 200 gêneros e 1.500 espécies (Souza & Lorenzi, 2008).

A espécie *Senna multijuga* (Fig. 2A e 2B), da subfamília Caesalpinioideae, é conhecida popularmente como pau-cigarra, caquera, aleluia-amarela, amarelinha, canafistula, cigarreira, entre outros (Lorenzi, 1998; Carvalho, 2003). Ocorre na Floresta Ombrófila Densa, Floresta Estacional Semidecidual e na Floresta Ombrófila mista (Floresta com Araucária) ficando exposta às temperaturas médias de 27°C no mês mais quente, e 13,9°C no mês mais frio (Carvalho, 2003).

Esta arbórea possui alta capacidade ornamental devido ao longo período de floração, sendo utilizada na arborização de ruas, parques e jardins do sudeste brasileiro. É uma planta decídua no inverno, heliófila, pioneira, indiferente às condições físicas do solo, o que proporciona grande capacidade de uso da mesma durante reflorestamento misto de áreas degradadas de preservação permanente (Lorenzi, 1998).

As sementes são planas, lustrosas e achatadas, apresentando uma coloração pardo-esverdeada (Carvalho, 2004). Seu ápice é arredondado, levemente truncado, com base afinada e reentrante na região hilar, no centro da semente há uma aréola de coloração marrom-escura circundada pelo pleurograma fechado (Amorin *et al.*, 2008). Apresentam dormência tegumentar, sendo descritos diversos procedimentos para sua quebra e, após os tratamentos, a germinação pode chegar a 80% (Lemos-Filho *et al.*, 1997), enquanto sementes não tratadas apresentam baixo poder germinativo, em torno de apenas 40% (Carvalho, 2003).

Lacerda *et al.* (2004) encontraram diferentes graus de dormência entre duas populações naturais de *S. multijuga*, e, de acordo com os autores, esta variação inter-populacional permite melhores adaptações às mudanças ambientais.



Figura 2. Aspecto de *Senna multijuga* (A) árvore em campo e (B) detalhe de ramo com inflorescência e frutos jovens.

Visando ampliar as informações sobre aspectos morfológicos de espécies arbóreas que apresentam sementes com dormência física, de modo a propiciar informações básicas para a identificação destas em laboratórios de sementes, viveiros florestais e em estudos sobre a biodiversidade e os aspectos de regeneração natural em vários ecossistemas, o objetivo deste trabalho foi encontrar: a) quais estruturas anatômicas e histoquímicas são responsáveis pela impermeabilização dos tegumentos, b) qual estrutura ou região do tegumento destas sementes é sensível a mudanças ambientais e c) quais os fatores ambientais são responsáveis pela quebra de dormência física em sementes das espécies estudadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Frutos maduros de cada espécie foram coletados de diferentes matrizes de áreas de Floresta Ombrófila Densa, na região de Florianópolis- SC durante os meses de abril a outubro (outono – inverno – início de primavera) de 2011. Para *C. glandulosa* foram cinco matrizes e para *S. multijuga* seis. O clima da região é do tipo Cfa, mesotérmico úmido, com verões quentes e chuvas distribuídas durante o ano, com temperatura média anual de 21,15°C, média mensal para os meses de verão de 23,46°C e para os meses de inverno de 16,75°C (Porto-Filho, 1993). A umidade é alta, em torno de 80% (CECCA/FNMA, 1996), com pluviosidade anual de 1.527 mm, bem distribuída durante todo o ano, não existindo estação seca ou chuvosa (Porto-Filho, 1993).

O material coletado permaneceu em bandejas, em condições ambiente de umidade e temperatura, por 14 dias, para secagem. As sementes foram separadas dos frutos manualmente.

Antes da instalação dos experimentos, todas as sementes de *C. glandulosa* passaram pelo teste de flotação, segundo metodologia sugerida por Carvalho (2005), cujas sementes cheias e viáveis, permanecem no fundo do recipiente enquanto as sementes vazias flutuam na superfície de água.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Análise da morfologia e anatomia das sementes

As medidas de espessura, largura e comprimento de 100 sementes foram obtidas com auxílio de paquímetro digital Stainless Hardened (Mainland, China). A massa média das mesmas foi verificada em 100 sementes através de balança eletrônica de precisão Gehaka BG 200 (São Paulo, Brasil).

Para proceder à análise da posição e do formato das estruturas tegumentares das sementes, utilizou-se o microscópio estereoscópio Leica EZ4D (Wetzlar, Alemanha) além das observações realizadas sob microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tal, as sementes foram preparadas da seguinte maneira: fixadas em glutaraldeído 2,5% e tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2 por 2 horas, lavadas três vezes consecutivas no mesmo tampão, desidratadas em série etílica crescente até etanol absoluto e secas em ponto crítico de CO₂ (Horridge & Tamm, 1969). Esta metodologia provocou alterações no tegumento das sementes, optando-se então por secagem em sílica em gel por quatro semanas. Entretanto este segundo método também alterou o tegumento. Finalmente, foram utilizadas sementes sem preparação alguma, metodologia que mostrou-se eficaz. Antes da análise no MEV, as sementes foram coladas em suportes de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla face e cobertas com 30 nm de ouro, em metalizador Leica EM SCD 500 (Wetzlar, Alemanha). A análise e documentação das amostras foram realizadas em microscópio

eletrônico de varredura Jeol XL30 (Tokio, Japão) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME – UFSC). Utilizaram-se no mínimo 10 sementes para observação em MEV.

A histologia do tegumento foi analisada em secções de sementes frescas e ou fixadas observadas em microscópio óptico Leica MPS 30 DMLS (Wetzlar, Alemanha). Para estudo do material fresco, as sementes foram coladas com cola instantânea (éster de cianoacrilato) Super Bonder® (Jundiá, Brasil) em blocos de madeira, e após a secagem seccionadas na espessura de 25 a 40 µm, em micrótomo de deslize Micron HM400 (Boise, Estados Unidos).

Outras sementes foram fixadas e emblocadas em historesina Leica Historesin® (Wetzlar, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante. Neste processo, as sementes foram seccionadas transversalmente, em seguida, fixadas em gluteraldeído 1% por 2 horas, lavadas três vezes em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2, desidratadas em série etílica crescente até etanol absoluto, imersas em solução de historesina e álcool 100% (1:1) por 48 horas, imersas em historesina pura por mais 48 horas e finalmente emblocadas com catalizador e historesina de hidroxietilmetacrilato pura. Após a secagem natural dos blocos, os mesmos foram seccionados em micrótomo rotativo Leica RM 2125RT (Wetzlar, Alemanha).

Para o estudo da constituição química das células do tegumento, as secções de sementes frescas foram submetidas a ação de diferentes reagentes, sendo que, para verificação de suberina, óleos, ceras e cutina as secções foram imersas em sudam III ou sudam IV (Costa, 1982), para identificação de lignina as secções foram imersas em azul de toluidina pH 6,8 (O'Brien *et al.*, 1965) e para verificação de substâncias pécicas em vermelho de rutênio (Gerlach, 1984). Para detecção de calose as secções, permaneceram 18 horas em solução de azul de anilina 0,05% e tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 8,3 (Ruzin, 1951). As amostras foram observadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX41 (Tokio, Japão), sob epifluorescência azul/ultravioleta, com excitação de 330/385 nm e emissão de 420 nm. As imagens foram documentadas por câmera digital Q imaging Q Color (Surrey, Canadá) acoplada ao microscópio.

Para observação individual das células componentes do tegumento realizou-se o método de dissociação celular, para o qual, 10 sementes de cada espécie foram seccionadas transversalmente e mantidas em contato com peróxido de hidrogênio e ácido acético glacial (1:1) (Franklin, 1945), dentro de frascos vedados, permanecendo em estufa a 60°C, por 48 horas. Após este período, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e o material sedimentado lavado em água destilada e, em seguida, corado com azul de toluidina pH 6,8 (O'Brien *et al.*, 1965) e coletado com pipeta Pasteur para montagem entre lâmina e lamínula e visualização em microscópio óptico Leica MPS 30 DMLS (Wetzlar, Alemanha).

2.2.2 Quebra da dormência, germinação e alterações tegumentares

2.2.2.1 Desinfecção dos materiais

A desinfecção de sementes foi realizada através de solução aquosa de hipoclorito de sódio 10%, durante três minutos. Placas de Petri, pinças e outros materiais utilizados durante os experimentos permaneceram 20 minutos em solução aquosa de hipoclorito de sódio 20%, ou em álcool 70% e depois lavados em água destilada (Brasil, 2009).

2.2.2.2 Comportamento dos frutos sob alternância de temperaturas

A fim de se verificar como a temperatura influencia a deiscência dos frutos, os mesmos foram colocados em recipientes de vidro e mantidos em câmara de germinação com alternância de 35°C/20°C por 15 dias, seguida de alternância de 40°C/20°C por mais 15 dias.

2.2.2.3 Verificação da viabilidade das sementes e do tipo de dormência

Para a detecção da dormência, 100 sementes de cada espécie foram separadas em quatro repetições de 25 e acomodadas sob folhas de papel filtro umedecidos com água destilada dentro de placas de Petri para germinação, permanecendo sobre bancada em condições naturais, sem controle de temperatura e fotoperíodo, por um período de 40 dias, iniciado em 30/09/2011 e finalizado em 07/11/2011.

O tempo de germinação foi calculado pela equação $\sum n_i \cdot t_i / \sum n_i$, onde n_i é o número de sementes germinadas dentro de determinado intervalo de tempo t_i (Labouriau, 1983).

Após este período, sementes não germinadas foram escarificadas com bisturi e mantidas em solução de tetrazólio 0,5% (2, 3, 5 – trifetil cloreto de tetrazólio), dentro de tubos de ensaio, no escuro, por 24 horas, sob temperatura constante de 25°C, para verificação da viabilidade (Brasil, 2009). Após este período, as sementes foram seccionadas longitudinalmente e analisadas em microscópio estereoscópico Leica EZ4D (Wetzlar, Alemanha).

Para confirmação de que a dormência relatada tratava-se de dormência física, sementes de ambas as espécies (100 de cada) foram submetidas à escarificação com ácido sulfúrico concentrado (sem diluições) por diferentes tempos (*S. multijuga* 5, 10 e 30 minutos de imersão e *C. glandulosa* 30, 60 e 90 minutos), em seguida foram lavadas três vezes em água corrente e colocadas para germinar sob duas folhas de papel filtro umedecidas com 5 mL de água destilada, dentro de placas de Petri que permaneceram durante 14 dias em câmaras de germinação, com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas ($\pm 40 \mu\text{mol}$ de luz $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Sementes de *S. multijuga* passaram pela escarificação mecânica e térmica. No primeiro teste, quatro repetições de 20 sementes foram escarificadas manualmente com auxílio de lixa d'água, na região oposta à região hilar. Para o segundo teste, quatro repetições de 20 sementes foram colocadas em água fervente até seu total resfriamento (cerca de 30 minutos de imersão). Após os tratamentos, as sementes foram colocadas em placas de petri, sobre papel filtro umedecido com água destilada, e armazenadas em câmara de germinação Dist 300-220 EF (Florianópolis, Brasil), com temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12 horas ($\pm 40 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$). A embebição foi verificada durante oito dias e a germinação após 40 dias.

2.2.2.4 Influência das condições de clareira, borda e interior de mata na emergência de plântulas

Para avaliar a influência dos ambientes de clareira, borda e interior de mata, na germinação e emergência de plântulas das espécies estudadas, separou-se quatro repetições de 20 sementes para cada ambiente, que foram acomodadas em vasos de barro com capacidade de 0,5 kg de substrato (serapilheira esterilizada), colocados nas dependências do Departamento de Botânica, no *campus* Trindade da Universidade Federal de Santa Catarina. Os vasos permaneceram nos diferentes ambientes, por 40 dias, e diariamente os vasos eram regados até a percolação e a intensidade de fluxo de fótons medida com quantômetro Li-Cor 250 (Lincoln, Estados Unidos) em um ponto central do local onde as repetições estavam posicionadas, às 11h30min. As temperaturas nos locais do experimento foram verificadas com termômetro de máxima e mínima Incoterm 5201.03.0.00 (Ribeirão Preto, Brasil). Os dados gerados para cada ambiente foram: clareira com intensidade de fluxo de fótons de $\pm 138,40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperatura máxima de 47°C e mínima de 14°C; borda de mata com intensidade de fluxo de fótons de $\pm 51,29 \mu\text{mol}$ de luz $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperatura máxima de 34°C e mínima de 13°C; e interior de mata com intensidade de fluxo de fótons de $\pm 21,30 \mu\text{mol}$ de luz $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperatura máxima de 31°C e mínima de 18°C.

Dados de temperatura máxima e mínima para o município de Florianópolis no período entre dezembro/2011 e abril/2012 foram cedidos pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI/CIRAM), sendo a temperatura máxima de 36,9°C e a mínima de 10,9°C (Anexo 01).

2.2.2.5 Tratamentos térmicos para quebra da dormência

Os tratamentos térmicos foram realizados para induzir a entrada de água nas sementes e sua posterior germinação, bem como para analisar as alterações morfológicas e ou anatômicas nas mesmas após alguns destes tratamentos.

Sementes de ambas as espécies passaram por choques térmicos – poucas horas em altas temperaturas durante um ou mais dias consecutivos em condições de umidade ou de seca. Estas temperaturas foram escolhidas de acordo com os dados coletados em ambiente externo (item 2.2.2.3), onde foi possível verificar que em determinadas horas do dia a temperatura chega a valores altos (Anexo 01), havendo, assim, a possibilidade das sementes dispersas encontrarem situações de temperaturas extremamente quentes durante o dia e mais amenas durante a noite.

Os tratamentos foram:

- 1) Choque de 4 horas a 50°C, em ambiente úmido, por sete dias;
- 2) Choque de 4 horas a 50°C, em ambiente úmido, por um único dia;
- 3) Choque de 4 horas a 50°C, em ambiente seco, por um único dia;
- 4) Choque de 1 hora a 40°C, em ambiente úmido, por um único dia;
- 5) Choque de 2 horas a 40°C, em ambiente úmido, por um único dia;
- 6) Choque de 4 horas a 40°C, em ambiente úmido, por um único dia;
- 7) Apenas para sementes de *C. glandulosa* choques de 1, 2 ou 4 horas a 35°C, em condições úmidas, por um único dia.

Os choques térmicos eram proporcionados pela estufa Samrello (Blumenau, Brasil). Cada tratamento continha quatro repetições com 20 sementes, acomodadas dentro de placas de Petri, sobre folhas de papel filtro. Em ambiente úmido, as folhas de papel eram umedecidas com 5 mL de água destilada, em condição de seca, o choque ocorria na ausência de água. Após cada choque, as sementes eram regadas e as placas transferidas para câmara de germinação Dist 300-220 EF (Florianópolis, Brasil), com temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12 horas ($\pm 40 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$). As sementes permaneceram nestas condições por 40 dias, sendo que nos oito primeiros dias foram coletados os dados a respeito da embebição. Para isto as sementes eram retiradas das placas, secas em papel toalha e suas massas eram medidas em balança eletr\u00f4nica de precis\u00e3o Gehaka BG 200 (S\u00e3o Paulo, Brasil). Ao final do experimento, foram coletados os dados referentes a germinação durante o per\u00edodo de incubação.

Os tratamentos de altern\u00e2ncia de temperatura – ciclo de altern\u00e2ncia entre 12 horas em altas temperaturas (correspondente ao fotoper\u00edodo com $\pm 45 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e 12 horas em temperaturas mais amenas, foram dados em condi\u00e7\u00f5es de umidade ou de seca, sendo eles:

- 1) Altern\u00e2ncia de 40°C/20°C em ambiente seco, por 16 dias;
- 2) Altern\u00e2ncia de 40°C/20°C em ambiente \u00famido;
- 3) Altern\u00e2ncia de 35°C/20°C em ambiente \u00famido;
- 4) Altern\u00e2ncia de 30°C/20°C em ambiente \u00famido;
- 5) Altern\u00e2ncia de 30°C/25°C em ambiente \u00famido.

Cada tratamento era formado por quatro repeti\u00e7\u00f5es com 20 sementes distribuídas sobre papel filtro dentro de placas de Petri, acomodadas em câmara de germinação Dist 300-220 EF (Florianópolis, Brasil), que realizava a altern\u00e2ncia das temperaturas de cada tratamento. O tempo de perman\u00eancia e as

demais condições de análise seguiram os mesmos procedimentos citados acima para os choques térmicos.

2.2.2.6 Comportamento das cicatrizes tegumentares após tratamentos para quebra da dormência física de sementes

Como o processo de secagem em sílica para observação em MEV provocou alterações tegumentares nas sementes de *C. glandulosa*, procurou-se entender se estas alterações influenciavam a entrada ou saída de água das sementes. Para isso, quatro repetições de 20 sementes intactas tiveram as cicatrizes tegumentares bloqueadas com cola instantânea (éster de cianoacrilato) Super Bonder® (Jundiaí, Brasil). Em seguida, suas massas foram medidas em balança eletrônica de precisão Gehaka BG 200 (São Paulo, Brasil). Cada repetição foi armazenada em placa de Petri contendo sílica em gel, vedadas com Parafilme e mantidas em sala com umidade controlada e temperatura constante de 25°C. Após cinco semanas as sementes foram retiradas das placas e suas massas novamente medidas. Assim, pode-se encontrar a diferença entre as massas inicial e final e verificar se as sementes perdem água por todo o tegumento ou apenas na região das cicatrizes tegumentares. As sementes controle não foram bloqueadas.

Para verificar se a entrada de água em sementes de *S. multijuga* ocorre por todo o tegumento ou apenas pela região das cicatrizes tegumentares, quatro repetições de 20 sementes tiveram sua dormência quebrada por escarificação térmica com água fervente por 30 minutos até seu resfriamento. Depois disso, as sementes tiveram as cicatrizes bloqueadas com cola instantânea e, após a secagem, colocadas para embeber, sob duas folhas de papel filtro umedecidos com 5 mL de água destilada, dentro de placas de Petri, por 120 horas.

Mudanças no tegumento e nas cicatrizes tegumentares das sementes de ambas as espécies foram observadas em MEV após tratamentos para a quebra da dormência. Os tratamentos utilizados foram alternância de temperaturas de 40/20°C durante cinco meses, choque térmico de quatro horas a 40°C, armazenamento em sílica em gel por 5 semanas ou imersão em ácido sulfúrico por 5 minutos para *S. multijuga* e 30 minutos para *C. glandulosa*. Cada tratamento era composto por 15 sementes, as quais, após serem tratadas, eram coladas em suportes de alumínio, com auxílio de fita carbono dupla face e cobertas com 30 nm de ouro, em metalizador Leica EM SCD 500 (Wetzlar, Alemanha). A análise e documentação das amostras foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol XL30 (Tokio, Japão) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME – UFSC).

3. RESULTADOS

3.1 MORFOLOGIA E ANATOMIA DAS SEMENTES

Colubrina glandulosa

Os frutos maduros de *Colubrina glandulosa* são globulares, secos e deiscentes. A liberação das sementes dos frutos ocorreu de maneira diferente de acordo com a temperatura em que os frutos estavam armazenados. Frutos colocados sobre bancada de laboratório, em temperatura ambiente ao redor de 30°C não liberaram as sementes sendo necessária a quebra manual do fruto, para liberá-las. Sob alternância de temperatura de 35°/20°C (por 15 dias), seguida da alternância de 20°/40°C (por dois dias), os frutos romperam-se espontaneamente, desprendendo a porção proximal (Fig. 3A) deixando amostra as cocas portadoras das sementes (Fig. 3B). Em sequência, decorrente deste tratamento, as cocas desagregaram de modo explosivo, liberando as sementes por dispersão balística.

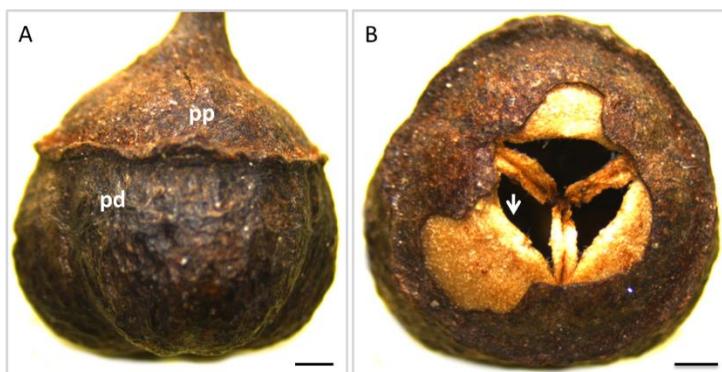


Figura 3. Frutos maduros de *Colubrina glandulosa* observados em microscópio estereoscópico. (A) fruto fechado e (B) fruto aberto com a porção proximal destacada mostrando as cocas (seta). pp – porção proximal, pd – porção distal. Barras: 1 mm.

As sementes de *C. glandulosa* apresentaram-se cordiformes (Fig. 4A), lustrosas e com coloração que vai do marrom escuro ao preto. A região basal é côncava (Fig. 4A), correspondendo à região hilar. Os dois lados da semente apresentam conformações distintas, um tenuemente convexo e o outro com uma saliência proeminente (Fig. 4B), decorrente do posicionamento da semente no lóculo do fruto, em que o lado proeminente da semente fica voltado para a porção interna do fruto. O hilo apresenta-se linear (Fig. 4C), geralmente contornado por remanescentes do funículo, constituindo a fenda hilar. Quando maduras e secas, as sementes apresentaram 21,1 mg de massa, tendo como dimensões $4,42 \pm 0,25$ mm de comprimento, $3,49 \pm 0,12$ mm de largura e $2,71 \pm 0,08$ mm de espessura.

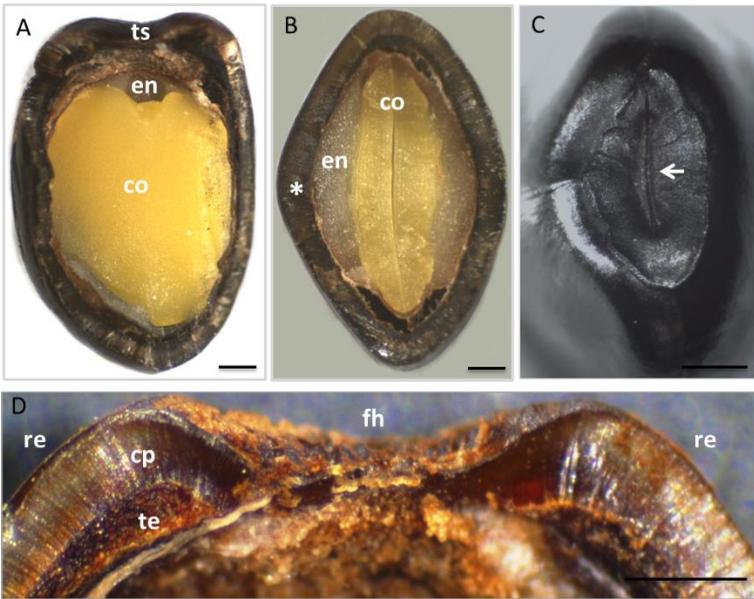


Figura 4. Morfologia de sementes de *Colubrina glandulosa* sob microscópio estereoscópico. (A) Secção longitudinal evidenciando região basal concava e a face anterior de um dos cotilédones, (B) secção transversal mostrando o posicionamento dos cotilédones, endosperma e a proeminência lateral (*), (C) região basal com a fenda hilar (seta), (D) secção do tegumento mostrando a coloração natural da camada paliçádica e do tecido esclerenquimático. cp – camada paliçádica, co – cotilédones, en – endosperma, re – região extra - hilar, fh – fenda hilar, te – tecido esclerenquimático, ts – tegumentos. Barras: A, B, C, D – 0,5 mm e E – 250 mm.

O embrião apresentou cotilédones, bem desenvolvidos e de coloração amarelada, e um pequeno eixo hipocótilo-radícula, voltado para região hilar (Fig. 4A). O endosperma esbranquiçado contorna todo o embrião, estando mais acumulado paralelamente aos cotilédones (Fig. 4B).

O estudo anatômico do tegumento mostrou que a epiderme é constituída por uma camada paliçádica, formada de macrosclereides, e internamente a esta, um tecido esclerenquimático compacto (Fig. 4D e 5A).

A camada paliçádica constitui a maior parte da espessura do tegumento, suas macrosclereides apresentam coloração âmbar (Fig. 4D) e apresentaram cerca de 290 μm de comprimento (máximo 446,67 e mínimo 205,38 μm), com os menores tamanhos verificados na sob a região hilar (Fig. 5A). A concavidade da região hilar é dada pela diminuição do tamanho das macrosclereides sob esta

região e pelo aumento de número de camadas do tecido esclerenquimático lateralmente a fenda hilar (Fig. 5A).

Em toda extensão da camada paliçádica foi observada uma linha escura (Fig. 5C e 5D), correspondente à uma região com forte impregnação de lignina verificada após reação com azul de toluidina (Fig. 5D). A impregnação de calose foi observada acima desta linha fortemente lignificada e abaixo da mesma, percorrendo toda a porção intermediária das macroesclereides (Fig. 5E). Acima da camada paliçádica ocorre uma fina cutícula (Fig. 5B). As macroesclereides possuem um formato acicular (Fig. 6A) sendo a porção interna afilada e a externa dilatada com paredes facetadas (Fig. 6B).

Adjacente à extremidade interna das macroesclereides, ocorre o tecido esclerenquimático (Fig. 6C), formado por células de formato irregular de paredes espessas e lignificadas (Fig. 6D), verificada após reação com azul de toluidina, o interior das células mostrou-se de coloração marrom. Na região extra-hilar este tecido apresenta cerca de 70 μm de espessura, sendo formado por três a quatro camadas celulares. Porém, próximo à região hilar, em ambos os lados da fenda, este tecido passa a ter até 17 camadas celulares, aumentando sua espessura para cerca de 260 μm , o que determina a formação das saliências laterais à fenda hilar (Fig. 4D e 5A).

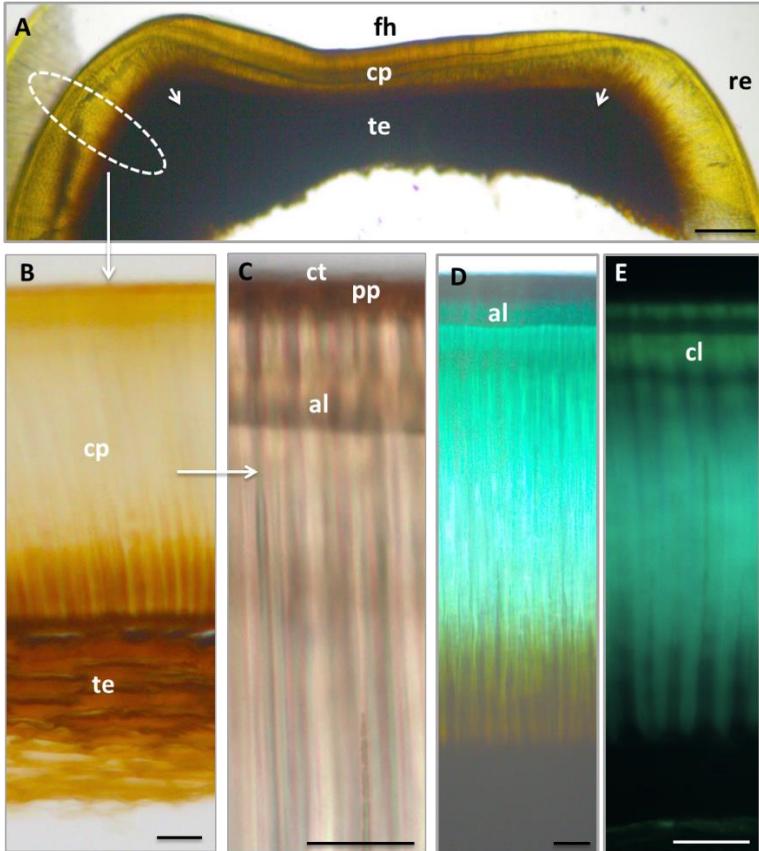


Figura 5. Secções de tegumento de *Colubrina glandulosa*. (A) Secção longitudinal sem coloração sob microscopia óptica, (B) detalhe dos tecidos componentes do tegumento: camada paliçádica de macroesclereides e tecido esclerenquimático, (C) porção externa da camada paliçádica sob microscopia óptica evidenciando área lignificada, (D) região lignificada das macroesclereides após reação com azul de toluidina e (E) secção após reação com azul de anilina sob epi-fluorescência ultravioleta evidenciando a presença de calose. cl – calose, al – área lignificada, cp – camada paliçádica, ct – cutícula, fh – fenda hilar, pp – parede periclinal externa, te – tecido esclerenquimático. Barras: 25 μ m.

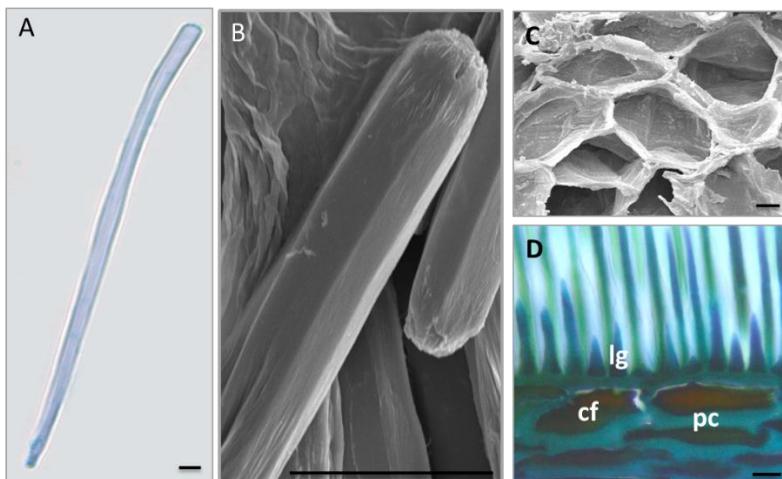


Figura 6. Células do tegumento de *Colubrina glandulosa*. (A) Macroesclereides dissociada, (B) microscopia eletrônica de varredura de macroesclereide dissociada, evidenciando a porção externa com paredes facetadas (C) tecido esclerenquimático sob microscopia eletrônica de varredura e (D) porção interna das macroesclereides e tecido esclerenquimático após reação com azul de toluidina evidenciando paredes lignificadas. lg – região lignificada, pc – parede celular. Barras: 10 μ m.

Senna multijuga

O estudo morfológico mostrou que as sementes de *S. multijuga* analisadas eram achatadas, alongadas e com a extremidade basal afilada. Em ambos os lados da semente, encontrou-se um pleurograma fechado e alongado (Fig. 7A). Na região das cicatrizes tegumentares, o hilo estava presente em posição central, entre a micrópila e o estrofiolo, dispostos em alinhamento (Fig. 7B). A micrópila apresentou-se como um pequeno orifício circundado por uma elevação do tegumento (Fig. 7C). O hilo tem formato arredondado e geralmente mantém vestígios do funículo (Fig. 7C). O estrofiolo possui formato ovalado (Fig. 7D). Quando maduras e secas estas sementes apresentaram 11,2 mg de massa, tendo como dimensões $6,84 \pm 0,56$ mm de comprimento, $2,29 \pm 0,29$ mm de largura e $0,76 \pm 0,13$ mm de espessura.

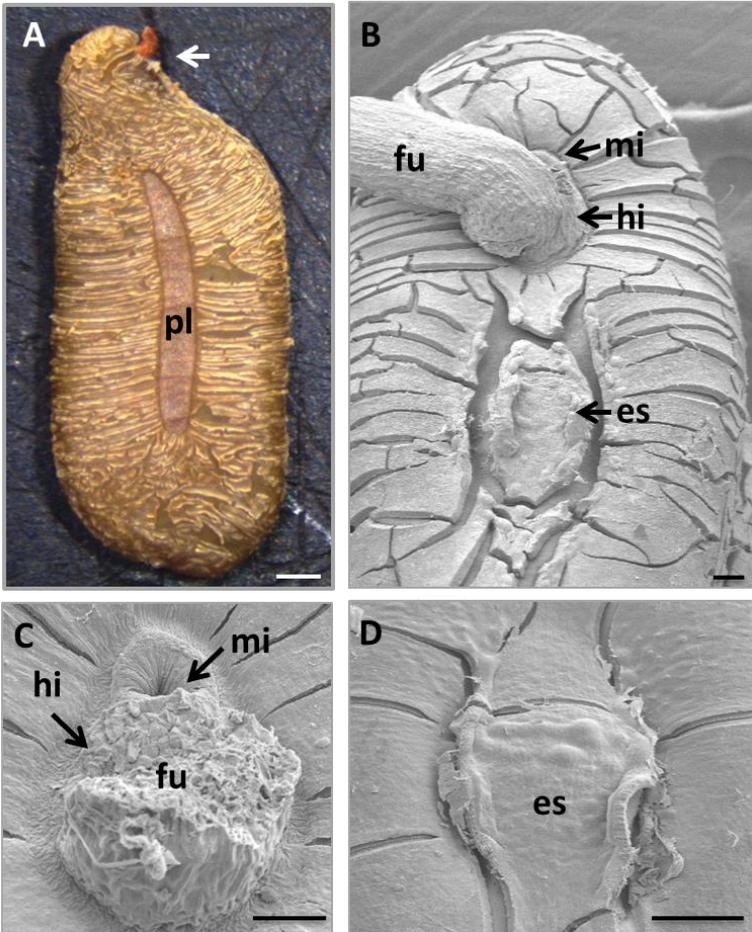


Figura 7. Aspectos da semente de *Senna multijuga*. (A) Semente sob microscópio estereoscópico, seta indica posicionamento da região hilar, (B) aspecto geral da região hilar sob microscopia eletrônica de varredura, (C) detalhes da micrópila próxima ao hilo, o qual ainda mantém vestígios do funículo e (D) estrofolo. es – estrofolo, fu – remanescente do funículo, hi – hilo, mi – micrópila, pl – pleurograma. Barras: A – 0,5 mm B, C e D – 50 μ m.

O embrião apresentou cotilédones do tipo folhoso e o eixo hipocótilo-radícula é curto e cilíndrico e está voltado para a região hilar da semente, sob um tecido especial. O endosperma preenche uniformemente todo o estreito espaço entre o embrião e os tegumentos.

As sementes de *S. multijuga* são bitegumentadas, ou seja, formadas por testa e tégmen. Os constituintes dos tegumentos na região extra-hilar são camada

paliçádica (macroesclereides), osteosclereides, tecido esclerenquimático, tecido esponjoso e células brancas (Fig. 8A).

Acima da camada paliçádica, a análise histoquímica revelou a presença de uma fina camada cuticular externa, com reação positiva ao sudam III (Fig. 8B) e uma camada subcuticular composta por substâncias pécticas, com reação positiva ao vermelho de rutênio (Fig. 8B).

As macroesclereides (Fig. 8C e 8D) apresentaram em média 45 µm de comprimento, havendo homogeneidade de tamanho por todo o tegumento. Estas células mostraram duas porções diferenciadas, separadas por uma linha refrativa, a linha lúcida (Fig. 8C e 8D), percorrendo transversalmente toda camada paliçádica e não apresentaram impregnação de calose. Acima da linha lúcida, as paredes mostraram-se celulósicas e, abaixo, lignificadas, conforme verificado após reação com azul de toluidina. Na porção inferior destas células, foi evidenciada a presença de protoplasto.

Internamente à camada paliçádica, ocorre um estrato de osteosclereides de paredes bem espessas e lignificadas com uma constrição mediana, deixando conspícuos espaços intercelulares por todo o estrato (Fig. 8E e 8F). Seguindo, no sentido interno está o tecido esclerenquimático multiestratificado, composto por células retangulares de paredes espessas e lignificadas, com vacúolos contendo substância de coloração marrom (Fig. 8G).

O tégmen, localizado internamente à testa, é composto por duas camadas de células brancas, alongadas horizontalmente, quase imperceptíveis, com paredes delgadas e lignificadas (Fig. 8H). Entre estas células e o tecido esclerenquimático superior há uma fina cutícula, identificada com o uso de sudam III.

A sequência dos tecidos abaixo da região hilar difere do padrão anatômico descrito acima. Nesta região, especificamente abaixo do estrofiolo foi observado um tecido esponjoso, com células de formatos irregulares, de coloração acinzentada, e com espaços intercelulares conspícuos (Fig. 9A, 9B e 9C) este tecido, situado de modo intercalado ao tecido esclerenquimático (Fig. 9B). Ainda nesta região, adjacente ao tégmen, ocorre uma segunda camada de osteosclereides, que não é verificada na região extra-hilar (Fig. 9C). Entre as camadas do tecido esponjoso distinguem-se elementos traqueais (Fig. 9D).

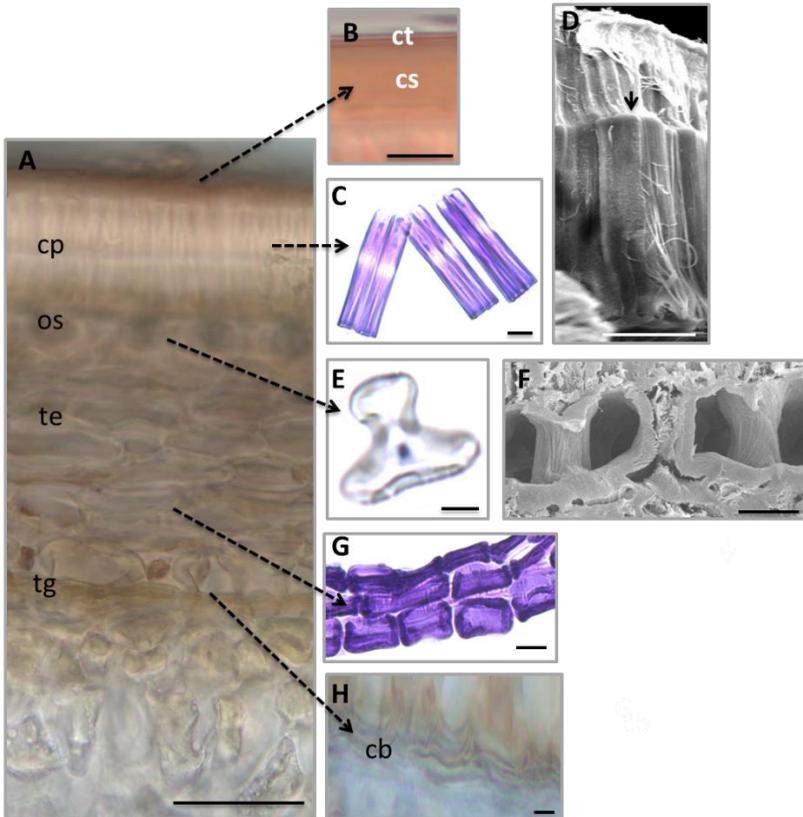


Figura 8. Anatomia do tegumento da região extra-hilar das sementes de *Senna multijuga*. (A) Estratos celulares, (B) secção sob microscopia óptica, após reação com sudam III evidenciando cutícula e camada subcuticular, (C) refração da linha lúcida em macroesclereides dissociadas (seta), (D) microscopia eletrônica de varredura da camada paliçádica evidenciando o espessamento das macroesclereides (seta), (E) osteoesclereide dissociada, (F) microscopia eletrônica de varredura do estrato das osteosclereides, mostrando as paredes espessadas. (G) tecido esclerenquimático dissociado, (H) células brancas do tégmen. cb – células brancas, cp – camada paliçádica, cs – camada subcuticular, ct – cutícula, os – osteosclereides, te – tecido esclerenquimático, tg - tégmen. Barras: A – 50 μ m, outras – 10 μ m.

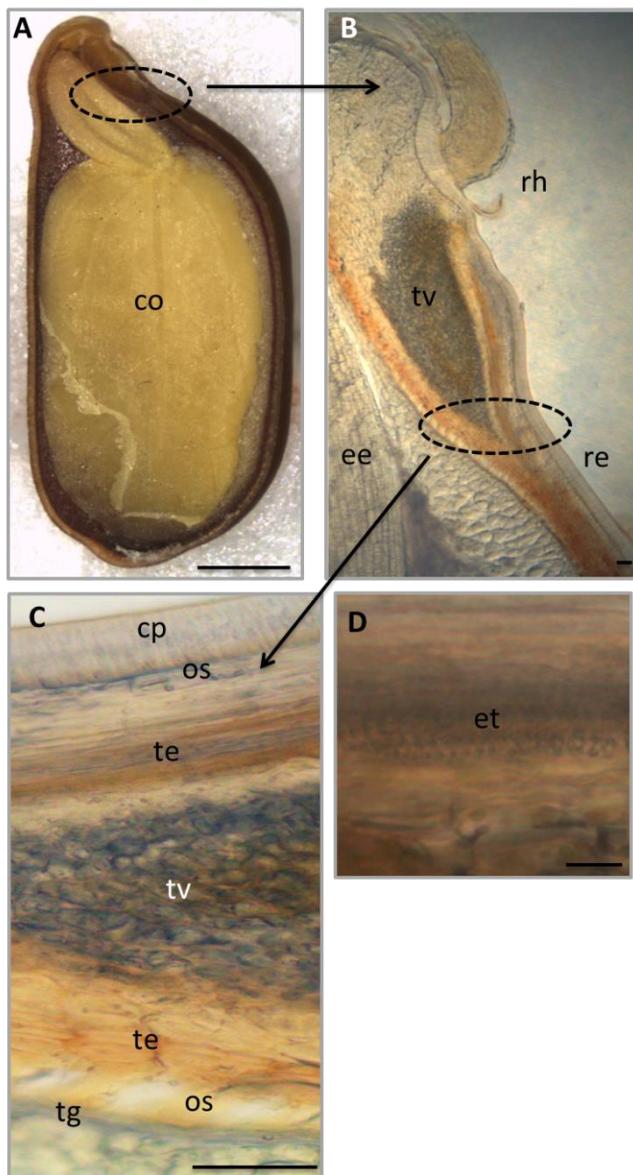


Figura 9. Anatomia do tegumento da região abaixo das cicatrizes tegumentares de sementes de *Senna multijuga*. (A) Semente sob microscópio estereoscópico mostrando um dos cotilédones e o eixo embrionário, (B) secção da região das cicatrizes tegumentares sob microscopia óptica, (C) maior aumento dos tecidos detalhando as camadas do tegumento sob a região hilar, (D) tecido esponjoso

com elementos traqueais. co – cotilédones, cp – camada paliçádica, ee – eixo embrionário, et – elementos traqueais, os – osteosclereides, re – região extrahilar, rh – região hilar, te – tecido esclerenquimático, tg – tégmen, tv – tecido esponjoso. Barras: A – 1 mm, B e C – 50 mm.

3.2 QUEBRA DA DORMÊNCIA FÍSICA E GERMINAÇÃO DE SEMENTES

3.2.1 Germinação inicial e emergência de plântulas em condições de clareira, borda e interior de mata

Sementes de *C. glandulosa* colocadas para germinar em placas de Petri sobre bancada laboratorial apresentaram 22% de germinação, com tempo médio em 23,24 dias. Para *Senna multijuga* a porcentagem de germinação foi 3%, com tempo médio de germinação em cinco dias. Sementes não germinadas de ambas as espécies apresentaram coloração rósea, após passarem pelo teste de tetrazólio, evidenciando que estavam vivas.

A porcentagem média de emergência de plântulas, após 120 dias de avaliação, de *C. glandulosa* em condições ambientais de clareira, borda e interior de mata foi respectivamente de 0%, 22,5% e 17,5%. Para *S. multijuga* os valores foram de 5%, 2,5% e 0% (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de emergência de plântulas (PE) de *Colubrina glandulosa* e *Senna multijuga* em diferentes estratos florestais.

Condição de germinação	<i>C. glandulosa</i> (PE %)	<i>S. multijuga</i> (PE %)
Clareira*	0 b	5 a
Borda de mata*	22,5 a	2,5 a
Interior de mata*	17,5 a	0 a

*Sementes acomodadas em vasos de barro sob condições naturais de mata: Clareira 138,40 μmol de luz por $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, borda de mata 51,29 μmol de luz por $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e interior de mata 21,30 μmol de luz por $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

3.2.2 Tratamentos para quebra de dormência

3.2.2.1 Quebra de dormência por escarificação química, mecânica e térmica

Após a imersão em ácido sulfúrico concentrado para quebra de dormência física das sementes de ambas as espécies, houve variação significativa na porcentagem de germinação, dependendo do tempo de imersão (Tabela 2). A maior porcentagem de germinação para *C. glandulosa* foi em 90 minutos de imersão, chegando a 72%, enquanto para *S. multijuga* a melhor porcentagem foi de 90%, após a imersão por 5 minutos.

As sementes de *S. multijuga* apresentaram 59,33% de germinação, após passagem por escarificação mecânica. Após passagem por escarificação térmica em água fervente, as sementes embeberam água consideravelmente nos primeiros dias de avaliação, mas não apresentaram germinação no período de 20 dias, indicando que este tratamento em água fervente pode causar morte do embrião.

Tabela 2. Porcentagem de germinação (PG) de *Colubrina glandulosa* e *Senna multijuga* após tratamentos para quebra de dormência física em laboratório.

<i>Colubrina glandulosa</i>		<i>Senna multijuga</i>	
Tempo de imersão	PG (%)	Tempo de imersão	PG (%)
Controle	0 d	Controle	0 d
30'	36 c	5'	92 a
60'	40 b	10'	72 b
90'	72 a	15'	60 c

Letras comparam valores na vertical (Teste Tukey $p \geq 0,05$). Sementes incubadas em câmara de germinação a 25°C e fotoperíodo de 12h.

3.2.2.2 Tratamentos térmicos: Choques e alternâncias de temperatura

Colubrina glandulosa

Dados mostrados na Tabela 3 apontam que a massa inicial das sementes de *C. glandulosa*, que não receberam choques ou alternância de temperatura e permaneceram sob 25°C constantes, não se alterou após oito dias de incubação. Sementes que passaram pelo choque seco de quatro horas a 50°C, choque úmido de uma, duas ou quatro horas a 35°C, alternância de temperatura de 40°/20°C em ambiente seco por 16 dias ou por alternância 30°/25°C em ambiente úmido não apresentaram diferença entre a massa inicial e a final, nos primeiros dias de avaliação.

Após 20 dias de embebição, sementes que passaram pelos choques úmidos de uma, duas ou quatro horas a 35°C apresentaram diferentes porcentagens de germinação, conforme verificado na Figura 10.

Os tratamentos que permitiram uma embebição parcial das sementes de *C. glandulosa*, nos primeiros oito dias de avaliação, foram os choques úmidos de duas e quatro horas a 40°C, os choques úmidos de quatro horas a 50°C uma única vez e por sete dias seguidos, bem como as alternâncias de temperatura entre 40°/20°C, 35°/20°C e 30°/20°C em presença de água. Contudo, não foi verificada a germinação após os tratamentos de alternância que promoveram a rápida embebição inicial (Fig. 10).

Tabela 3. Valores inicial e final de massa de sementes de *Colubrina glandulosa* após diferentes tratamentos térmicos.

Tratamentos	Massa Inicial (mg)*	Massa Final (mg)**
25°C constantes	26,5 a	28,1 a
Após imersão em ácido sulfúrico	26,0 a	49,0 b
Choque 4h a 50°C – 1 dia amb. Seco	26,6 a	29,1 a
Choque 4h a 50°C – 1 dia amb. Úmido	26,4 a	31,8 b
Choque 4h a 50°C – 7 dias amb. Úmido	25,7 a	29,1 b
Choque 1h a 40°C – 1 dia amb. Úmido	27,1 a	31,4 b
Choque 2h a 40°C – 1 dia amb. Úmido	26,4 a	29,2 b
Choque 4h a 40°C – 1 dia amb. Úmido	26,4 a	29,3 b
Choque 1h a 35°C – 1 dia amb. Úmido	26,6 a	28,3 a
Choque 2h a 35°C – 1 dia amb. Úmido	27,3 a	30,0 b
Choque 4h a 35°C – 1 dia amb. Úmido	26,5 a	29,8 b
Alternância 40°/20°C – 16 dias amb. Úmido	26,1 a	26,5 a
Alternância 40°/20°C – 8 dias amb. Úmido	26,7 a	29,8 b
Alternância 35°/20°C – 8 dias amb. Úmido	26,5 a	32,2 b
Alternância 30°/20°C – 8 dias amb. Úmido	26,8 a	29,8 b
Alternância 30°/25°C – 8 dias amb. Úmido	26,5 a	28,2 a

*) Sementes secas; **) Após oito dias de embebição; Letras comparam valores na horizontal (Teste T $p \geq 0,05$).

Senna multijuga

A massa inicial das sementes de *S. multijuga*, que não receberam choque ou alternância de temperatura e que permaneceram sob temperatura constante de 25°C, não se alterou após oito dias de embebição, não havendo alguma germinação. Sementes que passaram pelo choque úmido de quatro horas a 50°C, alternâncias de temperatura entre 35°/20°, 30°/20 ou 30°/25°C (Tabela 4) também não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre a massa inicial e a massa final nos primeiros dias de avaliação. No entanto, após 20 dias de embebição, as sementes que passaram por estes tratamentos apresentaram diferentes porcentagens de germinação, conforme pode ser verificado na Figura 11.

O choque seco de quatro horas a 50°C, choque úmido de uma, duas ou quatro horas a 40°C e a alternância de 40°/20°C tanto em ambiente seco quanto úmido propiciaram rápida entrada de água nas sementes (Tabela 4) e as mesmas apresentaram diferença entre a massa inicial e a massa final nos primeiros dias de avaliação, apresentando diferentes porcentagens de germinação após 20 dias de embebição, conforme verificado na Figura 11.

Mesmo tratando-se de altas temperaturas, os tratamentos não inviabilizam as sementes e, após o teste de tetrazólio, as sementes apresentaram coloração rósea. Apenas o choque úmido de quatro horas a 50°C por sete dias consecutivos teve efeito negativo, pois a maioria das sementes desintegraram-se e apresentaram coloração amarronzada após o teste de tetrazólio.

Tabela 4. Valores inicial e final de massa de sementes e porcentagem de germinação de *Senna multijuga* após diferentes tratamentos térmicos.

Tratamentos térmicos	Massa inicial	Massa final
	(mg)*	(mg)**
25°C constantes	11,4 a	12,5 a
Imersão em ácido sulfúrico	11,8 a	27,1 b
Choque 4h a 50°C – 8 dias amb. Seco	11,0 a	13,4 b
Choque 4h a 50°C – 7 dias amb. Úmido	12,2 a	31,1 b
Choque 4h a 50°C – 7 dias amb. Úmido	11,8 a	13,8 a
Choque 1h a 40°C – 1 dia amb. Úmido	11,1 a	16,0 b
Choque 2h a 40°C – 1 dia amb. Úmido	11,4 a	14,2 b
Choque 4h a 40°C – 1 dia amb. Úmido	11,2 a	16,9 b
Alternância 40°/20°C – 16 dias amb. Seco	11,5 a	13,3 b
Alternância 40°/20°C – 8 dias amb. Úmido	11,3 a	15,1 b
Alternância 35°/20°C – 8 dias amb. Úmido	11,2 a	12,4 a
Alternância 30°/20°C – 8 dias amb. Úmido	10,9 a	11,3 a
Alternância 30°/25°C – 8 dias amb. Úmido	11,3 a	11,8 a

*) Sementes secas; **) Após oito dias de embebição; Letras comparam valores na horizontal (Teste T $p \geq 0,05$).

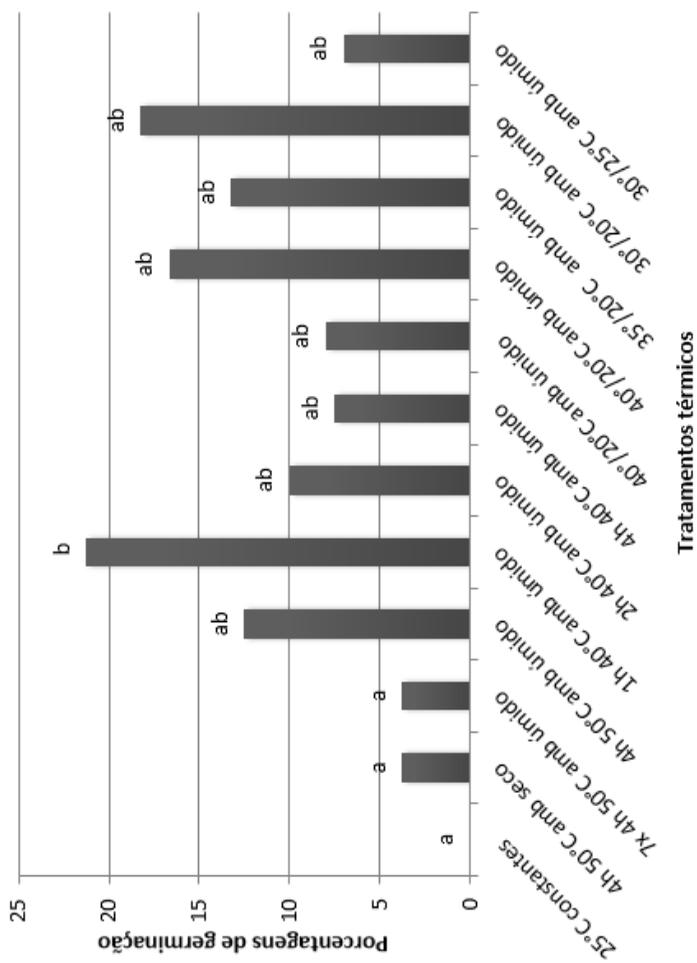


Figura 11. Porcentagem de germinação de sementes de *Senna multijuga* após diferentes tratamentos térmicos. Letras comparam valores entre as colunas (Teste Tukey $p \geq 0,05$). Germinação avaliada após 20 dias de embebição. (8d – oito dias no tratamento; 16d – dezesseis dias no tratamento; amb. – ambiente).

3.2.2.4 Mudanças na região hilar após tratamentos para quebra de dormência

A região hilar de sementes intactas de *C. glandulosa* (Fig. 12A) difere da região hilar de sementes que passaram pelos tratamentos de alternância de temperatura de 40/20°C por cinco meses (Fig. 12B), de armazenamento em sílica (Fig. 12C) e de imersão em ácido sulfúrico (Fig. 12D), mostrando estas últimas a região hilar bastante danificada, sendo observadas rachaduras na camada paliçada em torno da fenda hilar bem como um aspecto poroso em todo o tegumento. As que passaram pela alternância e pela sílica exibiram em todo o tegumento, além das rachaduras na região hilar, pequenas erupções que apresentaram rachaduras em sua extremidade, expondo o tecido esclerenquimático (Fig. 13A e 13B). Dados a respeito da embebição das sementes após os tratamentos de secagem em sílica e de alternância de temperaturas de 40/20°C mostraram que houve diminuição da massa das sementes, evidenciando perda de água ($p=0,01$). Quando as sementes foram colocadas em sílica com a região hilar bloqueada, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre massa inicial e final, sugerindo, ser pela região hilar onde ocorre a passagem de água tanto para fora como para o interior da semente.

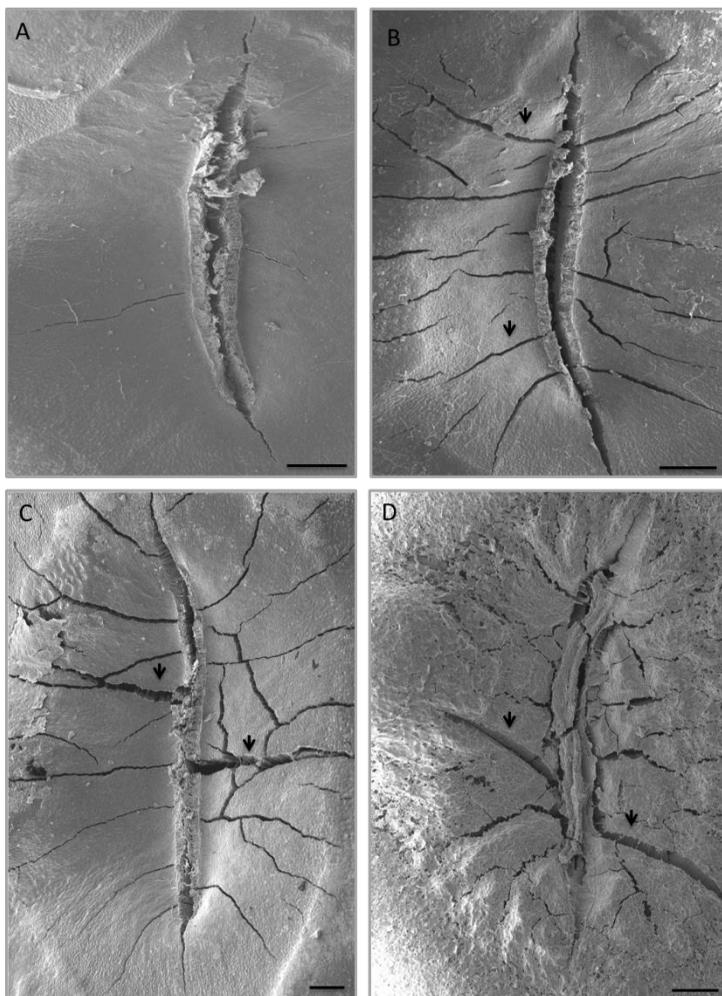


Figura 12. Região hilar de sementes de *Colubrina glandulosa* em microscopia eletrônica de varredura. (A) Semente intacta, (B) após alternância de temperatura de 40/20°C por 5 meses, (C) após armazenamento em sílica por 5 semanas e (D) após imersão em ácido sulfúrico por 30 minutos. Setas indicam rachaduras perpendiculares a fenda hilar causadas pelos tratamentos. Barras: 100 μm .

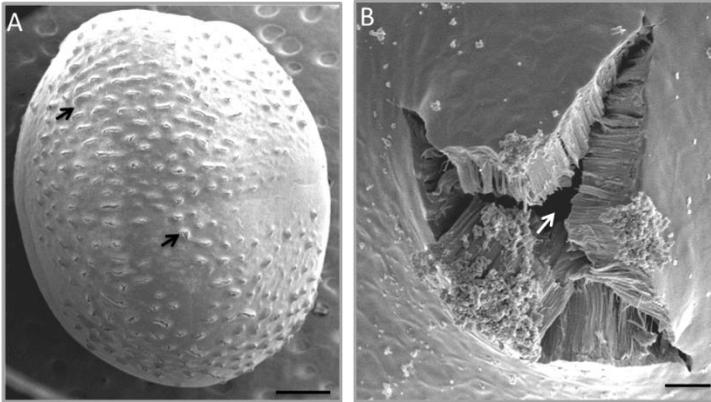


Figura 13. Alterações tegumentares em sementes de *Colubrina glandulosa*. (A) Tegumento repleto de pequenas erupções após armazenamento em sílica (setas) e (B) detalhe das rachaduras na camada paliçádica evidenciando que a erupção é consequência da ruptura entre o tecido esclerenquimático e a camada paliçádica. Barras: A – 500 μm e B – 10 μm

Sementes de *Senna multijuga*, quando intactas, já apresentaram rachaduras na camada paliçádica (Fig. 14A). No entanto, após passagem pela alternância de temperaturas de 40/20°C (Fig. 14B), pelo armazenamento em sílica (Fig. 14C) e pela imersão em ácido sulfúrico (Fig. 14D), a camada paliçádica destacou-se da semente (Fig. 15A), deixando grandes regiões da parede periclinal externa das osteosclereides expostas (Fig. 15B). A micrópila, o hilo e o estrofiolo não apresentaram mudanças em sua morfologia. Dados a respeito da embebição das sementes, após o bloqueio da região hilar, mostraram que as sementes que passaram pelo choque térmico em água fervente até o resfriamento tiveram aumento na sua massa mesmo com a região hilar bloqueada. Sementes que não passaram pelo choque não tiveram aumento na massa. Isto sugere, que o choque térmico altera todo o tegumento das sementes, como verificado pela microscopia eletrônica de varredura e, não somente uma região específica, como no caso de outras Fabaceae.

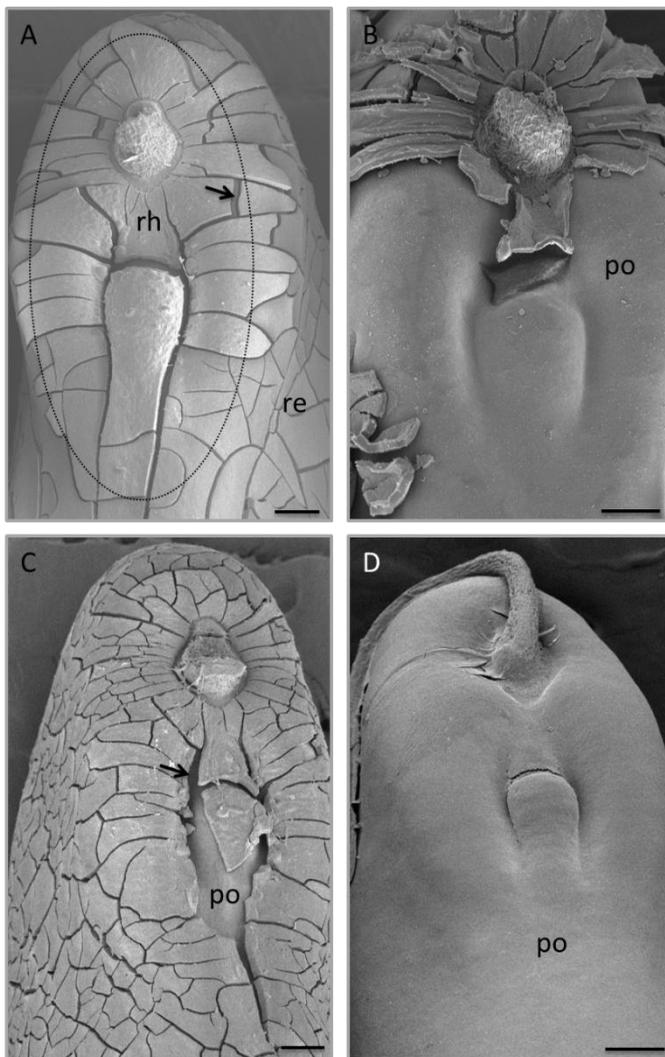


Figura 14. Região hilar de sementes de *Senna multijuga* em microscopia eletrônica de varredura. (A) Semente intacta, (B) após alternância de temperatura de 40/20°C por 5 meses, (C) após armazenamento em sílica por 5 semanas e (D) após imersão em ácido sulfúrico por 30 minutos. Região hilar dentro do círculo, o restante já é caracterizado como região extra-hilar. As setas apontam rachaduras da camada paliçádica desprendidas das parede periclinal externa das osteosclerídes. po – parede periclinal externa das osteosclerídes Barras: 100 µm.

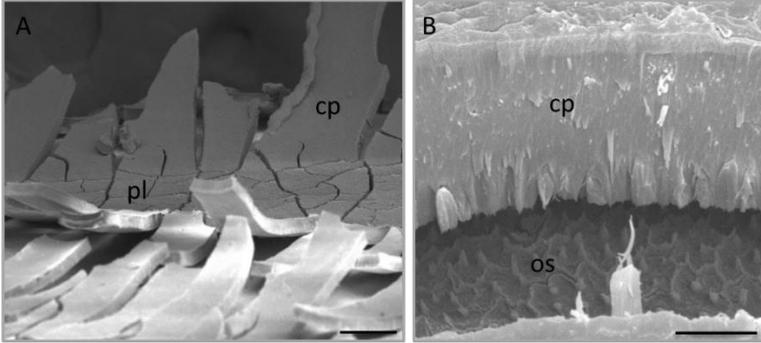


Figura 15. Rachaduras tegumentares em *Senna multijuga* sob microscopia eletrônica de varredura. (A) Destacamento da camada paliçádica na região do pleurograma e (B) exposição da parede periclinal externa das osteosclereides abaixo da camada paliçádica destacada. cp – camada paliçádica, os – osteosclereides, pl - pleurograma. Barras: A – 100 μm e B – 5 μm .

4. DISCUSSÃO

4.1 MORFOLOGIA E ANATOMIA DAS SEMENTES

Colubrina glandulosa

Em sementes de *Colubrina glandulosa* a micrópila e estrofiolo não são distintos, as sementes de Rhamnaceae são oriundas de óvulos anátropos (Escalante, 1946; Suessenguth, 1953), no qual funículo e micrópila permaneceriam lado a lado (Ferri, 1999). Supostamente em *C. glandulosa* a fenda hilar seja uma junção entre o hilo e a micrópila, não sendo possível separar estas duas estruturas visivelmente ou sob microscopia eletrônica de varredura. Nem todas as sementes apresentam cicatrizes tegumentares, a micrópila pode ser inconspícua (Barroso *et al.*, 1999) e o estrófiolo caracteriza geralmente as sementes de Fabaceae (Corner, 1976).

Na bibliografia especializada não foram encontrados trabalhos sobre a anatomia do tegumento das sementes de *C. glandulosa*. À semelhança de sementes de Fabaceae com dormência física (Baskin & Baskin, 2000; Ma *et al.*, 2004) a camada paliçádica da testa de *C. glandulosa* é composta por um estrato de macroesclereides por todo o tegumento, cujas células são espessas e fortemente unidas (Baskin & Baskin, 2000). Esta característica das células da camada paliçádica de *C. glandulosa* estão de acordo com Corner (1976) para as sementes de Rhamnaceae, que as descreve como exotestais, ou seja, quando o tecido mecânico resistente está presente na testa. Outras espécies de Rhamnaceae como *Hovenia dulcis* Thunb. (Castro *et al.*, 2005) e *Discaria toumatou* Raoul (Keogh & Bannister, 1994) igualmente apresentam este arranjo de macroesclereides em paliçada fortemente unidas.

O fato de encontrar-se lignina em todas as camadas celulares do tegumento de *C. glandulosa* infere na alta impermeabilidade destas sementes e na grande dificuldade de se obter altas porcentagens de germinação, após efetivados os tratamentos térmicos. A impregnação de lignina, nas macroesclereides e no tecido esclerenquimático, auxilia na impermeabilização do tegumento (Bewley & Black, 1994; Baskin, 2000; Baskin, 2003; Jayasuriya *et al.*, 2007). Segundo Esau (1976), a lignina é uma substância ou uma mistura de substâncias orgânicas de elevado conteúdo de carbono, mas que difere dos carboidratos, e que se encontra associada à celulose nas paredes de numerosas células. Sendo depois da celulose, a lignina é o polímero vegetal mais abundante, encontrado em maior quantidade na parede celular, cerca de 60 a 90% (Egg-Mendonça, 2001). Muito impermeável à água, resistente à pressão e pouco elástica, a deposição de lignina confere rigidez e resistência aos tecidos vegetais da planta, especialmente no tegumento de sementes, sendo correlacionada à resistência ao dano mecânico (Panobianco, 1997), conferindo ao tecido resistência mecânica e proteção à parede celular contra infestações por micro-organismos (Rijo & Vasconcelos, 1983, citados por Tavares *et al.* 1987). Esta impermeabilidade exerce efeito significativo sobre a capacidade e velocidade de

absorção de água pelo tegumento, interferindo desse modo, na quantidade de laxivados liberados para o meio externo durante a fase de embebição no processo de germinação de sementes (McDougall *et al.*, 1996).

A deposição de lignina e calose na camada paliçádica não se sobrepõe, ou seja, onde há depósito de uma não há depósito de outra, isto também foi observado por Delgado em espécies de Fabaceae (2010). A linha lúcida refrativa não foi encontrada no tegumento destas sementes, embora, segundo Corner (1976) esta linha estaria presente nas células de Rhamnaceae como uma faixa que separa a parte lignificada das células do restante não lignificado. No presente trabalho, sugere-se que, em sementes de *C. glandulosa*, uma linha altamente lignificada destaca-se na porção superior das macroesclereides e que abaixo dela surge a deposição de calose. A presença desta segunda substância – a calose, também pode ser responsável pelo impedimento da passagem de moléculas de água (Serrato-Valenti *et al.*, 1993). Em microscopia de epi-fluorescência de tubos polínicos, a calose fluoresce em verde-amarelo brilhante e contrasta com a fluorescência azulada ou acinzentada dos restante do tecido (Martin, 1959), este padrão também foi observado na testa de *C. glandulosa*, onde a fluorescência da calose difere de acordo com a região examinada das macroesclereides. A impregnação por calose é bem documentada para diversas espécies de Fabaceae, entretanto, para Rhamnaceae, os trabalhos científicos consultados sobre anatomia do tegumento não trataram deste assunto.

As células do tecido esclerenquimático de *C. glandulosa* são repletas de compostos fenólicos, que proporcionam a forte coloração amarronzada deste tecido. A formação de compostos de coloração escura, resultante da oxidação de substâncias fenólicas, pode também contribuir para a impermeabilização do tegumento (Bewley & Black, 1994). Segundo Corner (1976) o tégmen de Rhamnaceae é mais ou menos esmagado, composto por células cubóides de facetas retangulares ou hexagonais não lignificadas (Corner, 1976), no presente trabalho não identificou-se células formadoras do tégmen, uma vez que a descrição das células do tecido esclerenquimático diferem da descrição dada por Corner (1976) para esta família.

Senna multijuga

As sementes de *S. multijuga* apresentaram o padrão morfológico descrito para Fabaceae, com micrópila, hilo e estrofiolo, posicionados lado a lado em posição sub-basal, sendo micrópila e rafe pouco evidentes. Amorin *et al.* (2008) analisando sementes desta mesma espécie, também encontraram hilo sub-basal e micrópila e rafe inconspícuas. Os autores acima citados denominam como calaza linear a estrutura localizada abaixo do hilo, enquanto, no presente trabalho, seguiu-se a denominação utilizada por Serrato-Valenti *et al.* (1993) para tal estrutura, a de estrofiolo. A presença do tecido esponjoso, na região do estrofiolo, em *S. multijuga*, pode representar importante função no amortecimento da pressão exercida pela circulação de água, quando ocorre a absorção que precede a germinação, e pela movimentação e crescimento da

radícula ao direcionar-se para rompimento da testa. Bessa *et al.* (2001) sugerem que este tecido, presente em *Dipterix odorata* (Aubl.) Will., pode servir como mecanismo de resistência à contração da radícula sobre a testa.

O pleurograma, encontrado em ambos os lados da semente, apresenta a anatomia de acordo com o padrão descrito para o tegumento da região extrahilar. Gunn (1981) aponta que o pleurograma de alguns gêneros de Caesalpinioideae é resultante de uma diferença nas camadas de células da camada paliçádica, sendo esta estrutura responsável pela desidratação da semente durante sua maturação. As rachaduras ocasionadas, após o armazenamento em sílica, sobre o pleurograma eram diferentes daquelas encontradas no restante do tegumento; no pleurograma, a camada paliçádica não se destacava da camada de osteosclereides, o que pode indicar uma maior junção destas células nesta região.

As sementes de *S. multijuga* possuem as mesmas características anatômicas de tegumento descrito para outras sementes de Caesalpinioideae. Dentre estas características está a camada subcuticular bastante evidente, formada por uma matriz acelular de natureza péctica e hemicelulósica, que também foi verificada em outra espécie do mesmo gênero, *S. macranthera* (Paula *et al.*, 2012). Em outras espécies da família Fabaceae como *Cassia cathartica* Mart. (Souza, 1982) e *C. leptophylla* (Paula *et al.*, 2012) esta camada também ocorre.

A camada paliçádica composta por macroesclereides alongadas e fortemente unidas também é uma característica comum às Fabaceae (Baskin, 2003; Smith *et al.*, 2003). Em sementes de *S. multijuga* as macroesclereides não apresentaram impregnação de calose na linha lúcida, diferentemente do encontrado em outras espécies de Fabaceae (Serrato-Valenti *et al.*, 1993; Serrato-Valenti *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 2004; Paula *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2012). No presente trabalho, esta substância foi encontrada especialmente nas células brancas componentes do tégmen.

A presença de lignina foi evidenciada na porção interna das macroesclereides, logo abaixo da linha lúcida e nas outras camadas celulares, como nas osteosclereides e tecido esclerenquimático, assim o papel de impermeabilização do tegumento de sementes de *S. multijuga* está relacionado principalmente a presença desta substância, já que a calose só foi encontrada nas células brancas.

O tégmen das sementes de *S. multijuga* é procedente do tegumento interno do óvulo (Corner, 1951) e em suas células constituintes verificou-se a presença de cutícula após reação com sudam III. Segundo Shao *et al.* (2007) esta segunda cutícula pode proporcionar maior impermeabilidade às sementes (Shao *et al.*, 2007).

4.2. GERMINAÇÃO DE SEMENTES RECÉM COLETADAS

Para muitas espécies, a literatura relata que entre diferentes populações pode haver variação na quantidade de sementes dormentes e não dormentes, dependendo das condições ambientais de umidade e nutrição do solo, da densidade de folhas recobrimdo as plantas ou do grau de distúrbio do ambiente daquela população (Biere, 1991; Baskin & Baskin, 2001; Hoyle *et al.*, 2008). As sementes de *C. glandulosa* deste estudo, provenientes da população existente na Floresta Ombrófila Densa do município de Florianópolis, apresentaram certa porcentagem de sementes não dormentes (20%) dentre as recém coletadas, resultado similar ao de outros estudos com outras populações da mesma espécie, como 10% em Cavalheiro *et al.* (2007), 35% em Garcia *et al.* (2009) e 0 a 10%, dependendo da origem do lote, em Brancalion *et al.* (2011).

Para sementes de *S. multijuga*, provenientes da mesma região de Floresta Ombrófila Densa que *C. glandulosa*, cerca de 3% das sementes recém coletadas não eram dormentes. Em outros estudos com esta espécie, Lemos Filho *et al.* (1997) encontraram 11% de sementes não dormentes no lote utilizado, Piveta *et al.* (2010) apenas 1% e Maluf (1993), trabalhando com 11 populações da espécie, encontrou diferentes porcentagens de sementes não dormentes dependendo da população, as quais variaram de 0,5% a 24,25%. Embora apresentando certa porcentagem de sementes não dormentes, a germinação foi baixa o suficiente para estas espécies serem consideradas espécies com sementes dormentes (Baskin *et al.* 2007).

4.3. QUEBRA DE DORMÊNCIA EM SEMENTES

Colubrina glandulosa

A quebra da dormência física tem sido relacionada à ruptura ou deslocamento de estruturas presentes na região hilar do tegumento das sementes, o que permite a entrada de água (Baskin & Baskin, 2001). A anatomia, morfologia, origem e localização das estruturas de entrada de água têm sido descritas como o estrofiolo, micrópila, hilo ou alguma outra estrutura especial (Baskin & Baskin, 2001). Dentre as famílias que possuem dormência física, apenas Curcubitaceae, Rhamnaceae e Sapindaceae não tiveram as estruturas de entrada de água descritas (Baskin, 2003). Keogh & Bannister (1994) sugerem que os tratamentos de escarificação geram efeitos deletérios na camada cerosa e nos componentes como a suberina encontrados na camada paliçádica de *Discaria toumatou*, o que aumentaria as taxas de embebição das sementes, mas não apontam uma região específica no tegumento para que isto ocorra.

O tratamento de ácido sulfúrico que proporcionou 70% de germinação em sementes de *C. glandulosa* revelou em microscopia eletrônica de varredura ser responsável pelo aparecimento de rachaduras ao redor da fenda hilar e pela porosidade em todo o restante do tegumento. Também na região hilar, as macroesclereides possuem menores comprimentos do que na região extra-hilar.

Vários estudos realizados em Fabaceae encontraram que sob a estrutura de entrada de água na região hilar, as macroesclereides apresentam menores comprimentos (Serrato-Valenti *et al.*, 1995; Baskin *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2012), sendo sugerido que seria nesta região, mais fina e fraca do tegumento da semente, que haveria a abertura no tegumento (Serrato-Valenti *et al.*, 1995; Baskin & Baskin, 2001; Hu *et al.*, 2009). Dadas as rachaduras na região hilar após tratamento com ácido sulfúrico, o menor comprimento das macroesclereides neste local e a ausência de estruturas específicas para a entrada de água como micrópila e estrofiolo, pode ser suposto que a entrada de água na semente de *C. glandulosa* não se dê por nenhuma estrutura específica e sim por tais rachaduras. Estas rachaduras na região hilar também foram observadas, embora menos conspícuas, em sementes que receberam choque térmico de 40°C por quatro horas. Em tais sementes foi observada uma baixa porcentagem de germinação, enquanto naquelas que não receberam este tratamento não se verificou germinação alguma ($p=0,05$). Neste tratamento também foi observado o aumento de massa de sementes colocadas em água, evidenciando a entrada de água. Estes dados levam a indicação de que talvez a elevação de temperatura no ambiente possa quebrar a dormência das sementes desta espécie, abrindo rachaduras na região hilar.

A alternância de temperatura também pode ser necessária para a quebra da dormência física de sementes de espécies de florestas tropicais (Vázquez-Yanes & Orozco-Segovia, 1982; Souza *et al.*, 2012). Entretanto, no presente trabalho, as alternâncias de temperatura aplicadas não foram eficazes para levar à germinação das sementes, embora, algumas das alternâncias aplicadas tenham ocasionado a entrada de água nas sementes. Paula *et al.* (2012), trabalhando com duas espécies de Fabaceae da Mata Atlântica também não encontraram germinação de sementes após alternâncias de temperatura, embora, tenham encontrado absorção de água pelas sementes após choque térmico de 50°C.

No experimento realizado em condições de clareira, borda e interior de mata com *C. glandulosa*, os resultados mostraram que o ambiente de borda e do interior de mata foi eficaz para promoção da germinação, enquanto o de clareira não. Nesse caso, há que ser considerado que a falta de emergência não necessariamente significa falta de germinação, já que a alta temperatura no ambiente de clareira pode ter provocado grande seca no solo levando à morte das plântulas antes de sua emergência do solo, ou ainda, as plântulas podem não ter suportado a alta intensidade de luz do ambiente. A espécie *C. glandulosa* é tida como secundária inicial (Durigan & Nogueira 1990, Borghi *et al.* 2004, Rodrigues *et al.* 2010), embora Martins (2005) a tenha classificado como pioneira. Em trabalhos de Reis *et al.* (1994) e Caus & Paulilo (2000) foi observado que *C. glandulosa* apresentou menor biomassa quando cultivada em intensidade luminosa mais alta. Estes trabalhos dão suporte aos resultados encontrados, ou seja, a inexistência de plântulas de *C. glandulosa* em experimento simulando ambiente de clareira.

A intensidade luminosa, quando o sol estava a pino, foi cerca de três vezes maior em clareira do que em borda e, cerca de seis vezes maior do que no

interior de mata. Nestes ambientes a amplitude de variação da temperatura e as máximas e mínimas diferiram entre si, evidenciando a importância destes fatores na germinação de sementes, Quinlivan (1966); Vázquez-Yanes & Orozco-Segovia (1982); Baskin & Baskin (2001) e Kondo & Takahashi (2004) também relataram a importância da amplitude de variação da temperatura para germinação de sementes. Outro fator a influenciar o efeito da alternância de temperatura na quebra da dormência física de sementes é o tempo que estas ficam expostas a tal alternância, como afirmam Moreno-Casasola *et al.* (1994) e Van-Assche *et al.* (2003). Por esta razão, as alternâncias de temperatura aplicadas nas sementes deste trabalho podem não ter sido apropriadas para quebrar a dormência física das sementes desta espécie.

Um dos procedimentos para a visualização das sementes em MEV, foi a colocação das mesmas em sílica para perda da umidade. Sementes assim tratadas apresentaram perda de água e a observação destas em MEV mostrou rachaduras na região hilar semelhantes às encontradas após tratamento com ácido sulfúrico e alternância de temperatura de 40/20°C por cinco meses. A massa das sementes antes e depois da permanência em sílica mostrou que as sementes diminuem sua massa, evidenciando a perda de água. Por outro lado, quando a região hilar das sementes em sílica foi bloqueada com cola não houve alteração na massa da semente, de onde se concluiu que pelas rachaduras houve perda de vapor de água. Sugere-se que por estas mesmas rachaduras possa entrar água e que o ambiente seco na natureza poderia levar a rachaduras do tegumento da região hilar quebrando a dormência física das sementes.

Senna multijuga

O tratamento de ácido sulfúrico, que ocasionou a germinação de 92% de germinação de sementes, revelou sob MEV ser responsável pela remoção quase total da camada paliçádica. Quando aplicados tratamentos de choque térmico ou alternância de temperatura notou-se que há absorção de água pelas sementes e que sob MEV estas possuíam inúmeras rachaduras por todo o tegumento, inclusive o tratamento de choque térmico de 40°C por uma hora induziu alguma germinação. Outros choques térmicos e alternâncias de temperatura aplicados podem não ter sido suficientes para provocar profundas rachaduras na camada impermeável a água. Este também deve ser o caso das rachaduras presentes na camada paliçádica de sementes não tratadas. Estes dados sugerem que no caso de *S. multijuga* não há uma estrutura específica para entrada de água, mas sim rachaduras por todo o tegumento. Corroborando esta hipótese, sementes que passaram por escarificação térmica e que tiveram a região hilar bloqueada absorveram água por todo o restante do tegumento. Já para outra espécie do gênero *Senna* Paula *et al.* (2012) encontraram que a entrada de água após a quebra da dormência se deu através da micrópila. O choque de 50°C, embora tenha levado a absorção de água pela semente, parece ter sido excessivo, uma vez que a maior parte das sementes mostrou-se deteriorada. Segundo Coolbear (1994) exposições muito prolongadas a altas temperaturas podem causar

deterioração das sementes, devido à desnaturação proteica e processos associados.

Embora *S. multijuga* possua pleurograma, estrutura às vezes sugerida como responsável pela entrada de água (Melo-Pinna *et al.*, 1999), não foi evidenciado no presente trabalho esta função do pleurograma. Em outras espécies de Fabaceae, que possuem pleurograma, como *Mimosa bimucronata* (DC.) Kuntze também não foi evidenciado que a quebra da dormência na semente se dê por rupturas no pleurograma (Geisler, dados não publicados).

Experimentos em campo com *S. multijuga* não evidenciaram que ambientes de clareira, borda ou interior de mata tenham sido eficazes para quebra da dormência física das sementes desta espécie. Aqui vale salientar o que já foi dito para *C. glandulosa*, ou seja, que a amplitude de variação da temperatura, as máximas e mínimas do local bem como o tempo de exposição são importantes fatores para germinação de sementes e que podem não ter sido alcançados no período experimental do presente trabalho.

Trabalhos recentes sugerem que, dependendo da espécie, a quebra de dormência física de sementes pode necessitar de uma ou duas etapas. Nestes casos, na primeira etapa, as sementes tornam-se sensíveis aos tratamentos de quebra de dormência, ainda que permaneçam impermeáveis, e, então, na segunda etapa, as sementes tornam-se permeáveis após a exposição às condições ambientais adequadas (Jayasuriya *et al.*, 2008, 2009; Gama-Arachchige *et al.*, 2012, 2013)

A partir destes apontamentos, pode-se sugerir que as espécies aqui estudadas também apresentem um comportamento semelhante, e que a primeira sensibilização possa ter sido conferida com os choques e alternâncias ministrados. No entanto, as condições ambientais adequadas para a quebra da dormência, onde as sementes tornar-se-iam totalmente permeáveis, não foram alcançadas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em geral, os trabalhos que tratam da quebra de dormência física têm sugerido estruturas específicas no tegumento para a entrada de água após tratamentos térmicos, no presente trabalho constatou-se que estas estruturas podem não ser tão exclusivas e locais. No caso das espécies aqui estudadas, após a quebra da dormência, as semente de *C. glandulosa* apresentaram rachaduras perpendiculares a fenda hilar, enquanto as sementes de *S. multijuga* apresentaram rachaduras na camada paliçádica por toda a extensão do tegumento, sugerindo, assim, que é por estas rachaduras que ocorre a entrada de água na semente.

A combinação dos estudos morfológicos, anatômicos e fisiológicos, possibilitou a formulação de respostas a respeito da quebra de dormência, tal como ocorre na natureza. Em ambientes naturais, as sementes não germinam 100%; a capacidade de perpetuação incide na capacidade de germinar em condições adequadas e favoráveis. Em ambiente natural não ocorrem chuvas compostas de ácido sulfúrico capaz de quebrar a dormência de 100% das sementes presentes, no entanto, choques e alternância de temperaturas podem ocorrer e, ao contrário do que se imaginava, estas características não são verificadas apenas em savanas ou regiões desérticas, pois como foi constatado, em um único dia, a temperatura pode variar cerca de 20°C em uma clareira de floresta. A possibilidade de que um ambiente seco possa levar à ruptura do tegumento e à entrada de água, como foi aqui verificado nas sementes que permaneceram armazenadas em sílica, também é parte fundamental para se entender o funcionamento do mecanismo de quebra de dormência física de sementes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amorin, I. L., Davide, A. C., Ferreira, R. A. & Chaves, M. M. C.** (2008) Morfologia de frutos, sementes, plântulas e mudas de *Senna multijuga* var. *lindleyana* (Gardner) H. S. Irwin & Barneby – Leguminosae Caesalpinioideae. *Revista Brasileira de Botânica*, **31**, 507 – 516.
- Argel, P. J. & Paton, C. J.** (1999) Overcoming legume hardseededness. pp 247 – 265 in Loch, D. S and Ferguson, J. E. (Orgs.) *Forage seed production: Tropical and sub-tropical species*, Wallingford, CAB International.
- Barroso, G. M., Morin, M. P., Peixoto, A. L. & Ichaso, C. L. F.** (1999) *Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas*. Viçosa, UFV.
- Baskin, C. C.** (2003) Breaking physical dormancy in seeds – focussing on the lens. *New Phytologist*, **158**, 227 – 238.
- Baskin, C. C. and Baskin, J. M.** (2001) *Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*, San Diego, Academic Press.
- Baskin, C. C., Baskin, J. M. and Yoshinaga, A.** (2007) Imbibition and germination of seeds of *Colubrina oppositifolia* (Rhamnaceae), a Federal-Endangered Tree species endemic to Hawaii. *Natural Areas Journal*, **27**, 25 – 30.
- Baskin, J. M. and Baskin, C. C.** (2004) A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, **14**, 1 – 16.
- Baskin, J. M., Baskin, C. C. & Li, X.** (2000) Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology*, **15**, 139 – 152.
- Bessa, D. T. O., Mendonça, M. S. De & Araujo, M. G. P.** (2001) Morfo-anatomia de sementes de *Dipteryx odorata* (AUBL.) WILL. (Fabaceae) como contribuição ao estudo farmacognóstico de plantas da região amazônica. *Acta Amazonica*, **31**, 357 – 364.
- Bevilacqua, L. R. Fossati, F. & Dondero, G.** (1987) ‘Callose’ in the impermeable seed coat of *Sesbania punicea*. *Annals of Botany*, **59**, 335 – 341.
- Bewley, J. D. & Black, M.** (1994) *Seeds: physiology of development and germination*. New York, Plenum Publishing.
- Bhalla, P. L. & Slaterry, H. D.** (1984) Callose deposits make Clover seeds impermeable to water. *Annals of Botany*, **53**, 125 – 128.

Biere, A. (1991) Parental effects in *Lychnisfios cuculis*: Seed size, germination and seedling performance in controlled environment. *Journal of Evolutionary Biology*, **3**, 447 – 465.

Borghetti, F. & Ferreira, A. G. (2004) Interpretação de Resultados de germinação in Ferreira, A. G. and Borghetti, F. (Orgs.). *Germinação do básico ao aplicado*. Porto Alegre, Artmed.

Borghi, W. A., Martins, S. S., Quiqui, E. M. & Nanni, M. R. (2004) Caracterização e avaliação da mata ciliar à montante da hidrelétrica de Rosana, na Estação Ecológica do Caiuá, Diamante do Norte, PR. *Cadernos da biodiversidade*, **4**, 9 – 14.

Brancalion, P. H. S., Mondo, V. H. V. & Novembre, A. D. L. C. (2011) Escarificação química para a superação da dormência de sementes de saguaraji-vermelho (*Colubrina glandulosa* Perk. – Rhamnaceae). *Revista Árvore*, **35**, 119 – 124.

Brasil, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (2009). *Regras para análise de sementes*. Brasília, SNDA/DNDV/CLAV.

Carvalho, N. M. & Nakagawa, J. (2000). *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. Jaboticabal, FUNEP.

Carvalho, P. E. R. (2003) *Espécies Arbóreas Brasileiras*. Brasília, Embrapa.

Carvalho, P. E. R. (2004) Pau-cigarra – *Senna multijuga*. *Circular Técnica 92* Colombo, Embrapa, ISSN 1517-5278.

Carvalho, P. E. R. (2005) Sobrasil. *Circular Técnica 106*. Colombo, Embrapa, ISSN 1517-5278.

Castillo, R. & Guenni, O. (2001) Latencia en semillas de *Stylosanthes hamata* (Leguminoseae) y su relación com la morfología de la cubierta seminal. *Revista de Biología Tropical*, **49**, 287 - 299.

Castro, T. C., Barbosa, K. C., Albarello, N. & Figueiredo, S. F. L. (2005) Caracterização de pseudofrutos, sementes e plântulas obtidas a partir de germinação *in vivo* e *in vitro* da espécie medicinal *Hovenia dulcis* (Rhamnaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinai*s, Versão digital disponível em <http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol10_1_05/pla120105.htm>. Acesso em 15/10/2012.

Caus, C. & Paulilo, M. T. S. (2000) Influencia da quantidade de luz no

crescimento inicial de duas espécies arbóreas da mata atlântica. *Ínsula* **29**, 107 – 115.

Cavalheiro, A. L., Pimenta, J. A. & Torezan, J. M. D. (2007) Effect of some physical and chemical treatments on germination of *Colubrina glandulosa* seeds. *Seed Science & Technology*, **35**, 744 – 748.

CECCA, /FNMA - Centro de Estudos Cultura e Cidadania (1996) *Uma cidade numa Ilha: relatório sobre os problemas sócio-ambientais da Ilha de Santa Catarina*. Florianópolis, Insular.

Coolbear, P. (1994) Mechanisms of seed deterioration in Basra, A. S. (Org.) *Seed quality: basis mechanisms and agricultural implications*. New York, Food Products Press.

Corner, E. J. H. (1976) *The seeds of Dicotyledons*. London, Cambridge University Press.

Costa, A. F. (1982) *Farmacognosia*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.

Delgado, C. M. L. (2010) Estudo da quebra da dormência em sementes de *Sophora tomentosa* L. e *Erythrina speciosa* Andr. (Fabaceae – Papilionoideae). Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Durigan, G. & Nogueira, J. C. B. (1990) *Recomposição de matas ciliares*. São Paulo, Instituto Florestal.

Egg-Mendonça C.V. do C. (2001) *Caracterização química e enzimática de famílias de feijões obtidas do cruzamento das linhagens Amarelinho e CI – 107*. 48p. Dissertação (Mestrado em Agrobioquímica) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Esau, K. (1976) *Anatomia das plantas com sementes*. São Paulo: E. Blucher.

Esau, K. (1997) *Anatomia das plantas com sementes*. São Paulo, Edgard Blucher.

Escalante, M. G. (1946) Las Ramnáceas argentinas. *The Bulletin of the Botanical Society of Argentina*, **1**, 209 – 231.

Evert, R. F. (2006) *Esau's Plant Anatomy: meristems, cells and tissues of the plant body: their structures, function and development*. New Jersey, Wiley Interscience.

- Fenner, M. & Thompson, K.** (2005) *The Ecology of Seeds*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Ferri, M. G.** (1999). *Morfologia interna das plantas (Anatomia)*. São Paulo, Nobel.
- Franklin, G. L.** (1945) Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. *Nature* **155**, 51 – 51.
- Funes, G. & Venier, P.** (2006) Dormancy and germination in three Acacia (Fabaceae) species from central Argentina. *Seed Science Research*, **16**, 77 – 82.
- Gama-Arachchige, N. S., Baskin, J. M., Geneve, R. L. & Baskin C. C.** (2012) The autumn effect: timing of physical dormancy break in seeds of two winter annual species of Geraniaceae by a stepwise process. *Annals of Botany*, **110**: 637 – 651.
- Gama-Arachchige, N. S., Baskin, J. M., Geneve, R. L. & Baskin C. C.** (2013) Quantitative analysis of the thermal requirements for stepwise physical dormancy-break in seeds of the winter annual *Geranium carolinianum* (Geraniaceae). *Annals of Botany*, doi:10.1093/aob/mct046.
- Gama-Arachchige, N. S., Baskin, J. M., Geneve, R. L. & Baskin, C. C.** (2010) Identification and characterization of the water gap in physically dormant seeds of Geraniaceae, with special reference to *Geranium carolinianum*. *Annals of Botany*, **105**, 997 – 990.
- Garcia, L. C., Moraes, R. P. & Sousa, S. G. A.** (2009) Superação de dormência em sementes de Colubrina (*Colubrina glandulosa* Perk.). *Embrapa - Comunicado Técnico*, ISSN 1517 – 3887.
- Gerlach, D.** (1984) *Botanische mikrotechnik*. Stuttgart, George Thieme Verlag.
- Gonçalves, E. G. & Lorenzi, H.** (2007) *Morfologia vegetal: organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares*. São Paulo, Instituto Plantarum de Estudos da Flora.
- Gunn, C. R.** (1981) Seeds of the Leguminosae. pp. 913 – 926 in Polhill, R. M. and Raven, P. H. (Eds.) *Advances in Legume Systematics*. Kew, Crown Copyright.
- Hoeltgebaum, M. P., Sevegnani, L. & Hirano, Z. M. B.** (1999) Alimento para o *Alouatta fusca* (Primata, Cebidae) Morro Geisler, Indaial, SC. pp.196 in *Programa de Resumos 50º Congresso Nacional de Botânica*. Blumenau,

Sociedade Botânica do Brasil/Universidade Regional de Blumenau.

Horridge, G. A. & Tamm, S. L. (1969) Critical point drying for scanning electron microscopic stud of ciliary motion. *Science*, **163**, 817 – 818.

Hoyle, G. L., Steadman, K. J., Daws M. I. & Adkins, S. W. (2008) Pre and post harvest influences on seed dormancy status of an Australian Goodeniaceae species, *Goodenia fascicularis*. *Annals of Botany*, **102**, 93 – 101.

Hu, X. W., Wang, Y. R., Wu, Y. P., Baskin, C. C. (2009) Role of the lens in controlling water uptake in seeds of two Fabaceae (Papiloonoideae) species treated with sulphuric acid and hot water. *Seed Science Research*, **19** 73 – 80.

Jayasuriya, K. M. G. G., Baskin, C. C. & Baskin, J. M. (2007) Morphology and anatomy of physical dormancy in *Ipomoea lacunosa*: identification of the water gap in seeds of Convolvulaceae (Solanales). *Annals of Botany*, **100**, 13 – 21.

Jayasuriya, K. M. G. G., Baskin, J. M. & Baskin, C. C. (2008) Cycling of sensitivity to physical dormancy-break in seeds of *Ipomoea lacunose* (Convolvulaceae) and ecological significance. *Annals of Botany*, **101**, 341 – 352.

Jayasuriya, K. M. G. G., Baskin, J. M., Geneve, R. L. & Baskin, C. C. (2009) Sensitivity cycling and mechanism of physical dormancy break in seeds of *Ipomoea hederacea* (Convolvulaceae). *International Journal of Plant Sciences*, **170**, 429 – 443

Keogh, J. A. & Bannister, P. (1994) Seed structure and germination in *Discaria toumatou* (Rhamnaceae). *Weed Research*, **34**, 481 – 490.

Kondo, T. & Takahashi, K. (2004) Breaking of physical dormancy and germination ecology for seeds of *Thermopsis lupinoides* Link. *Journal of the Japanese Society of Revegetation Technology*, **30**, 163 –168.

Labouriau, L. F. G. (1983) *A Germinação de sementes*. Washington: Organização dos Estados Americanos.

Lacerda, D. R., Lemos-Filho, J. P., Goulart, M. F., Ribeiro, R. A. &

Lovato, M. B. (2004) Seed dormancy variation in natural populations of two tropical leguminous tree species: *Senna multijuga* (Caesalpinioideae) and *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae). *Seed Science Research*, **14**, 127 – 135.

Larcher, W. (2000) *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos, RiMa.

Lemos-Filho, J. P., Guerra, S. T. M., Lovato, M. B. & Scotti, M. R. M. M. L. (1997) Germinação de sementes de *Senna macranthera*, *Senna multijuga* e *Stryphnodendron polyphyllum*. *Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **32**, 1 – 6.

Lopes, G. L. (2013) Laboratório de Manejo Florestal – *Colubrina glandulosa*. Disponível em <http://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/6488-2/> Acesso em 15/01/2013.

Lorenzi, H. (1998) *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. Nova Odessa, Editora Plantarum.

Ma, F., Cholewa, W., Mohamed, T., Peterson, C. A. & Gijzen, M. (2004) Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coats correlate with their permeability to water. *Annals of Botany*, **94**, 213 – 228.

Maluf, A. M. (1993) Estudo da herdabilidade da capacidade germinativa e da dormência de sementes de *Senna multijuga*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **28**, 1417 – 1423.

Martin, F. W. (1959) Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Biotechnic & Histochemistry*, **34** (3), 125 – 128.

Martins, S. S. (2005) *Recomposição de matas ciliares no Estado do Paraná*. Maringá, Clichetec.

Mcdougall, G. J., Morrison, I. M., Stewart, D. & Hillman, J. R. (1996) Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. *Journal Science Food Agriculture*, **70** (2), 133 – 150.

Melo-Pinna, G. F. De A., Neiva, M. S. M. & Barbosa, D. C. De A. (1999) Estrutura do Tegumento seminal de quatro espécies de Leguminosae (Caesalpinioideae), ocorrentes numa área de caatinga (PE – Brasil). *Revista Brasileira de Botânica*, **22**, 375 – 379.

Molz, M. (2012) Flora do Rio Grande do Sul – *Colubrina glandulosa* Perkins. Disponível em http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=1504 Acesso em 15/01/2013.

Moreno-Casasola, P., Grime J. P. & Martínez, L. (1994) A comparative study of the effects of fluctuations in temperature and moisture supply on hard coat dormancy in seeds of coastal tropical legumes in Mexico. *Journal of Tropical Ecology*, **10**, 67 – 86.

- Morrison, D. A., McClay, K., Potew, C. & Rish, S.** (1998) The role of the lens in controlling heat induced breakdown of testa imposed dormancy in native Australian legumes. *Annals of Botany* **82**, 5 – 40.
- O'Brien, T. P., Feder, N. & Mc Cully, M. E.** (1965) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**, 368 – 373.
- Oliveira, E. C.** (1993) Morfologia de plântulas florestais. pp. 175 – 214 in Aguiar, I. B., Piña-Rodrigues, F. C. M. and Figliolia, M. B. (Eds). *Sementes florestais tropicais*. Abrates, Brasília.
- Panobianco, M.** (1997) *Variação na condutividade elétrica de sementes de diferentes genótipos de soja e relação com o conteúdo de lignina no tegumento*. 59p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Paoli, A. A. S.** (2006). Semente in Souza, L. A. (Org.) *Anatomia do fruto e da semente*. Ponta Grossa, UEPG.
- Paula, A. S. De, Delgado, C. M. L., Paulilo, M. T. S. & Santos, M.** (2012) Breaking physical dormancy of *Cassia leptophylla* and *Senna macranthera* (Fabaceae: Caesalpinioideae) seeds: water absorption and alternating temperatures. *Seed Science Research*, **1**, 1 – 9.
- Paulsen, T. R., Colville, L., Kranner, I., Daws, M. I., Hogstedt, G., Vandivik, V. & Thompson, K.** (2013) Physical dormancy in seeds: a game of hide and seek? *New Phytologist*, doi: 10.1111/nph.12191
- Perez, S. C. J. G. A.** (2004) Envoltórios in Ferreira, A. G. and Borghetti, F. (Eds.) *Germinação do básico ao aplicado*. Porto Alegre, Artmed.
- Piveta, G., Menezes, V. O., Pedroso, D. C., Muniz, M. F. B., Blume, E. & Wielewicki, A. P.** (2010) Superação de dormência na qualidade de sementes e mudas: influência na produção de *Senna multijuga* (L. C. Rich) Rirwin & Barneby. *Acta Amazonica*, **40**, 281 – 288.
- Porto, K. C., Almeida-Cortez, J. & Tabarelli, M.** (Orgs.) Ministério Do Meio Ambiente (2006) *Diversidade biológica e conservação da Floresta Atlântica ano norte do Rio São Francisco*. Brasília.
- Porto-Filho, E.** (1993) *Sedimentometria e algumas considerações sobre a bioquímica dos sedimentos de fundo da Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina*. Dissertação (Mestrado em Geografia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Quinlivan, B. J. (1966) The relationship between temperature fluctuations and the softening of hard seeds of some legumes species. *Australian Journal of Agricultural Research*, **17**, 625 – 631.

Reis, G. G., Reis, M. G. F., De Paula, R. C., Maesiri, M. & Borges, E. E. L. (1994) Crescimento e ponto de compensação lumínico em mudas de espécies florestais nativas submetidas a diferentes níveis de sombreamento. *Revista Árvore* **18**, 97 - 106.

Rodrigues, E. R., Monteiro, R. & Junior Cullen, L. (2010) Dinâmica inicial da composição florística de uma área restaurada na região do Pontal do Paranapanema, São Paulo, Brasil. *Revista Árvore*, Viçosa **34**, 853 – 861.

Rolston, M. P. (1978) Water impermeable seed dormancy. *The Botanical Review* **44**, 365 – 396.

Ruzin, S. E. (1951) *Plant microtechnique and microscopy*. New York, Oxford University Press.

Serrato-Valenti, G., Cornara L., Ferrando M. & Modenesi P. (1993) Structural and histochemical features of *Stylosanthes scabra* (Leguminosae: Papilionoideae) seed coat as related to water entry. *Canadian Journal of Botany* **71**, 834 –840.

Serrato-Valenti, G., Vries, M. De. & Cornara, L. (1995) The hilar region in *Leucaena leucocephala* Lam. (De Wit) seed: structure, histochemistry and the role of the lens in germination. *Annals of Botany* **75**, 569 – 574.

Shao, S., Meyer, C. J. M. F., Peterson, C. A. & Bernards, M. A. (2007) The outermost cuticle of soybean seeds: chemical composition and function during imbibition. *Journal of Experimental Botany* **58**, 1071 – 1082.

Smith, M., Wang, T., Ben, S. P. & Msanga, H. P. (2003) Dormancy and germination. pp. 149 – 176 in Vozzo, J.A. (Ed.) Tropical tree seed manual. Agriculture Handbook. Washington DC, USDA Forest Service.

Souza, F. H. D. & Marcos-Filho, J. (2001) The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. *Revista Brasileira de Botânica* **24**, 365 – 375.

Souza, L. A. & Paoli, A. A. S. (2009) Estrutura da semente in Souza, L. A. (Org.) *Sementes e plântulas: germinação, estrutura e adaptação*. Ponta Grossa, Toda Palavra.

Souza, L. A. (1982) Estrutura do tegumento das sementes de *Cassia cathartica* MART. (Leguminosae). *Ciência e Cultura* **34**, 71 – 74.

Souza, L. A., Rosa, S. M., Moscheta, I. S., Moura, K. S. M., Rodela, R. A., Rocha, D. C. & Lolis, M. I. G. A. (2005) *Morfologia e anatomia vegetal, técnicas e prática*. Ponta Grossa, UEPG.

Souza, T. V. De, Voltolini, C. H., Santos, M. & Paulilo M. T. S. (2012) Water absorption and dormancy-breaking requirements of physically dormant seeds of *Schizolobium parahyba* (Fabaceae – Caesalpinioideae). *Seed Science Research* **22**, 169 – 176.

Souza, V. C. & Lorenzi, H. (2008) *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APG II*. Nova Odessa, Instituto Plantarum.

Suessenguth, K. (1953) Rhamnaceae. pp 7 – 173 in Engler, A. & Prantl, K. (Orgs.). *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*, 2 ed.

Tavares, D. Q., Miranda, M. A. C., Umino, C. Y. & Dias, G. M. (1987) Características estruturais do tegumento de sementes permeáveis e impermeáveis de linhagens de soja, *Glycine max* (L.) Merrill. *Revista Brasileira de Botânica*, **10** (1), 147 – 153.

Turner, S. R., Cook, A., Baskin, J. M., Baskin, C. C., Tuckett, R. E., Steadman, K. J. & Dixon, K. W. (2009) Identificaton and characterization of the water gap in the physically dormant seeds of *Dodoneae petiolaris*: a first report for Sapindaceae. *Annals of Botany*, **104**, 833 – 844.

Van-Assche, J. A., Debucquoy, K. L. A. & Rommens, W. A. F. (2003) Seasonal cycles in the germination capacity of buried seeds of some Leguminosae (Fabaceae). *New Phytologist*, **158**, 315 – 323.

Vázquez-Yanes, C. & Orozco-Segovia, A. (1982) Seed germination of a tropical rain forest pioneer tree (*Heliocarpus donnell-smithii*) in response to diurnal fluctuation of temperature. *Physiologia plantarum*, **56**, 295 – 298.

7. ANEXOS

Anexo 1. Temperaturas verificadas no local experimental para ambiente de clareira, borda de mata e interior de mata, entre os meses de dezembro de 2011 e janeiro de 2012. Dados coletados com termômetro de máxima e mínima Incoterm 5201.03.0.00 (Ribeirão Preto, Brasil).

Clareira		Borda de Mata		Interior de Mata	
Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C
39	22	31	22	26	23
35	23	27	23	25	24
40	24	31	23	28	24
47	26	30	22	26	24
39	19	29	22	23	22
40	23	29	22	25	23
38	21	31	29	25	21
43	23	30	28	24	21
43	23	29	24	26	24
41	23	25	22	28	27
40	23	34	23	23	21
39	22	26	23	31	26
40	24	27	23	26	22
40	21	33	22	27	22
44	25	28	26	27	27
44	23	32	22	27	23
32	23	29	23	24	27
39	24	27	24	24	26
38	19	26	19	22	21
39	23	29	22	25	24
38	24	28	23	24	26
37	21	28	20	23	22
38	22	28	23	25	23
39	20	28	24	23	26
28	20	29	19	26	20
34	22	27	19	22	20
40	19	28	19	23	20
39	23	26	20	22	24

39	21	28	21	22	19
38	22	28	21	22	19
29	14	25	13	20	19
26	16	26	16	17	18
33	18	26	19	20	19

Anexo 2. Temperaturas verificadas em Florianópolis, entre os meses de dezembro de 2011 e abril de 2012. Dados cedidos pela Epagri/Ciram.

Data	Mínima °C	Máxima °C	Média °C
01/12/2011	17,9	23,2	20,4
02/12/2011	15,2	23,6	20,1
03/12/2011	17,3	25,9	21
04/12/2011	17,1	25,8	21,9
05/12/2011	19,9	26,3	22,9
06/12/2011	21,0	25,2	23
07/12/2011	21,6	27,2	23,5
08/12/2011	19,1	27,9	22,3
09/12/2011	18,4	22	20,3
10/12/2011	17,5	26,4	21,4
11/12/2011	22,1	25,7	23,6
12/12/2011		26,9	22,8
13/12/2011	18,4	21,4	19,9
14/12/2011	19,6	25,7	21,3
15/12/2011	21,8	25,4	22,7
16/12/2011	20,2	30,9	25,9
17/12/2011	19,5	32,2	25
18/12/2011	20,3	22,1	21,4
19/12/2011	23,5	31,7	28,1
20/12/2011	21,6	34,4	26,8
21/12/2011	19,7	28,3	24,9
22/12/2011	20,3	33,1	26,4
23/12/2011	24,3	36,9	28,4
24/12/2011	20,1	29,1	24,3
25/12/2011	18,5	20,3	19,3
26/12/2011	17,8	24,9	21
27/12/2011	17,1	27,5	22,4
28/12/2011	18,6	24,1	20,7
29/12/2011	15,4	24,9	20,6
30/12/2011	17,1	25,1	21,4
31/12/2011	19,7	22,3	20,7
01/01/2012	20,1	24,5	21,4
02/01/2012	19,0	26,8	22,1
03/01/2012	15,4	26,1	21,5

04/01/2012	17,5	28,1	22,1
05/01/2012	19,6	25,4	22,7
06/01/2012	21,2	28,2	24,4
07/01/2012	19,5	28,6	24,3
08/01/2012	23,5	26,4	24,6
09/01/2012	22,7	27,6	25
10/01/2012	21,4	27,9	24,3
11/01/2012	21,1	27,4	24,4
12/01/2012	23,4	29,9	26,5
13/01/2012	21,8	30	25,5
14/01/2012	20,9	24,3	22,2
15/01/2012	20,6	26,5	23,4
16/01/2012	20,3	26,9	23,4
17/01/2012	21,6	26,7	23,7
18/01/2012	19,3	27,2	22,9
19/01/2012	17,6	29	23,5
20/01/2012	22,3	30,9	26,1
21/01/2012	20,8	30,5	25,6
22/01/2012	22,4	29,8	26,2
23/01/2012	23,4	30,2	26,6
24/01/2012	22,7	31,8	27,1
25/01/2012	22,1	29,4	24,7
26/01/2012	18,2	26,5	22,7
27/01/2012	18,1	24,9	20,7
28/01/2012	16,5	26	21,5
29/01/2012	17,1	27,7	22,6
30/01/2012	18,3	29,8	23,8
31/01/2012	20,1	29,6	25,4
01/02/2012	22,4	29,6	25,8
02/02/2012	21,6	31,1	26,3
03/02/2012	24,6	30,4	26,8
04/02/2012	25,0	32,1	27,2
05/02/2012	24,2	33,1	27,5
06/02/2012	22,4	33,9	26,4
07/02/2012	21,9	29,8	25,4
08/02/2012	22,6	30	25,5
09/02/2012	23,1	32,7	26,3
10/02/2012	21,3	24,5	22,8

11/02/2012	17,7	27,8	23,1
12/02/2012	20,2	31	24,6
13/02/2012	19,7	28,5	24,6
14/02/2012	22,6	26	24,3
15/02/2012	24,5	30,2	26,5
16/02/2012	23,5	29,7	26,3
17/02/2012	23,6	29,6	26
18/02/2012	24,0	29,8	26,1
19/02/2012	24,3	29,6	25,9
20/02/2012	22,5	31	26,1
21/02/2012	22,5	27	24,9
22/02/2012	22,6	27,5	23,7
23/02/2012	21,9	28,4	24,5
24/02/2012	21,4	28,1	23,8
25/02/2012		23,6	23,1
26/02/2012	23,3	27,9	25,9
27/02/2012	24,7	29,6	26,6
28/02/2012	23,0	29,9	25,9
29/02/2012	22,7	33,8	27,8
01/03/2012	21,8	34,6	25,8
02/03/2012	20,6	28,6	24,7
03/03/2012	19,5	27,5	24,3
04/03/2012	20,5	29,5	25,3
05/03/2012	23,8	30,9	27
06/03/2012	23,4	30,9	26,7
07/03/2012	21,6	31,6	26,1
08/03/2012	22,7	32,1	26,3
09/03/2012	21,0	29	24,9
10/03/2012	19,1	30,1	24,8
11/03/2012	20,1	34	26,3
12/03/2012	21,2	31,3	26,1
13/03/2012	23,1	32,5	27
14/03/2012	22,4	33,5	26,3
15/03/2012	21,8	26,7	23,6
16/03/2012	17,3	27,3	22,8
17/03/2012	17,2	27,5	22,1
18/03/2012	17,8	27,9	22,8
19/03/2012	17,7	28,4	23,1

20/03/2012	19,7	29,6	24,2
21/03/2012	20,7	32,1	24,6
22/03/2012	19,3	29,4	22,6
23/03/2012	19,2	28,7	22,6
24/03/2012	18,8	26,4	22,3
25/03/2012	18,0	26,2	21,7
26/03/2012	19,7	29,3	24,4
27/03/2012	19,8	25,5	21,8
28/03/2012	12,4	22,8	18,1
29/03/2012	10,9	24,9	17,9
30/03/2012	14,4	27,3	21
31/03/2012	19,6	26,4	22,2
01/04/2012	17,9	26,8	22,1
02/04/2012	18,3	28,8	23,1
03/04/2012	19,2	28,4	23,8
04/04/2012	19,3	29,9	24
05/04/2012	20,0	29,8	23,9
06/04/2012	17,6	26,6	21,8
07/04/2012	18,2	27,6	22,7
08/04/2012	21,5	27,5	24,3
09/04/2012	20,1	26,7	23,1
10/04/2012	18,7	27	23,2
11/04/2012	22,3	27,1	24,4
12/04/2012	22,1	30,5	25,3
13/04/2012	19,7	27,1	22,8
14/04/2012	21,5	25,8	23,5
15/04/2012	21,1	26,1	23,2
16/04/2012	15,4	25,5	21,1
17/04/2012	17,2	26,3	21,4
18/04/2012	18,9	28,1	22,8
