

Jacqueline Ortiz

**GERMINAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOHISTOLÓGICA
DO DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES E EMBRIOËS DE
Trichocline catharinensis CABRERA**

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido ao Curso de Engenharia
Florestal da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção
do Grau de Bacharel em
Engenharia Florestal
Orientadora: Profa. Dra. Neusa
Steiner

Curitiba
2014

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

Ortiz, Jacqueline
GERMINAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOHISTOLÓGICA DO
DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES E EMBRIÕES DE *Trichocline
catharinensis* CABRERA / Jacqueline Ortiz ; orientadora,
Neusa Steiner - Curitiba, SC, 2014.
59 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitiba. Graduação em Engenharia Florestal.

Inclui referências

1. Engenharia Florestal. 2. Cravo-do-campo. 3.
Proteínas. 4. Germoplasma vegetal. 5. Fisiologia Vegetal.
I. Steiner, Neusa. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Engenharia Florestal. III. Título.

JACQUELINE ORTIZ

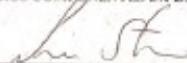
**GERMINAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
MORFOHISTOLÓGICA DO DESENVOLVIMENTO
DE SEMENTES E EMBRIÕES DE *TRICHOCLINE
CATHARINENSIS* CABRERA**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao
Colegiado do Curso de ENGENHARIA FLORESTAL, do
Campus Curitibanos da Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Florestal.

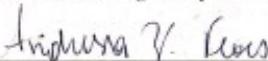
Orientador(a): Profa. Dra. Neusa Steiner

Data da defesa: 11 de dezembro de 2014.

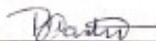
MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA:



Orientador: Profa. Dra. Neusa Steiner
Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas/Departamento de Botânica



Membro Titular: Profa. Dra. Andressa Vasconcelos Flores
Universidade Federal de Santa Catarina
Campus Universitário Curitibanos



Membro Titular: Profa. Dra. Patrícia Maria Oliveira Pierre Castro
Universidade Federal de Santa Catarina
Campus Universitário Curitibanos

Local: Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e saúde.

Aos meus pais Adélio e Angelita, pelo carinho, amor, dedicação, compreensão e apoio em todos os momentos.

Ao Leandro, pelo amor e dedicação, e a toda a sua família pela força.

A toda a família pelo estímulo, descontração e carinho. E ao Padrinho Anildo pelo apoio durante e depois do vestibular.

A professora Neusa Steiner, pela amizade, orientação e dedicação aos trabalhos feitos, sempre com esperança e otimismo.

Ao Laboratório de Ecologia e Morfofisiologia Vegetal do campus Universitário de Curitiba, pelo espaço para o desenvolvimento dos experimentos.

Ao Laboratório de Biologia Celular de Plantas, e a Professora Zenilda e ao Eder pela oportunidade de realização de parte dos experimentos em um bom laboratório.

Ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) pela oportunidade de aprendizado.

A Bruna, Getúlio, Kamila, Sibila, Jonas e Felipe pela ‘mãozinha’ durante implantação e avaliação do experimento.

Ao Leandro C. pela disponibilidade de coletas de sementes em seu sítio.

A Gladys, Francine e Maria Luiza pelos ensinamentos durante estadia no LFDGV e LAMAR.

Aos professores da Universidade Federal de Santa Catarina-Campus Curitiba pelo ensino acadêmico e profissional.

Aos amigos pela compreensão durante a ausência, pelos conselhos e alegria.

Ao CNPq pelo apoio financeiro com bolsas de iniciação científica.

E a todos que de alguma forma colaboraram com o desenvolvimento do trabalho e de minha formação profissional.

RESUMO

A *Trichocline catharinensis* Cabrera, popularmente conhecida como cravo-do-campo, da família Asteraceae é uma espécie nativa e endêmica distribuída nos Campos sulinos, que apresenta potencial ornamental e, atualmente se encontra vulnerável. Um dos componentes para o uso desta espécie como planta ornamental é o estudo da fisiologia do desenvolvimento das sementes e da germinação. O objetivo do presente trabalho foi estudar a fisiologia do desenvolvimento e a germinação de sementes de *T. catharinensis* visando estabelecer padrões de colheita e germinação das sementes gerando subsídios para a conservação e uso desta espécie como planta ornamental. Para isso, foram coletadas sementes em diferentes períodos, as quais foram submetidas aos testes de viabilidade, vigor e caracterização morfohistológica. Foi observado que a germinação iniciou aos 10 dias após o início do experimento. Sementes coletadas no mês de dezembro/2012 e janeiro/2013 apresentaram as maiores porcentagens de germinação comparativamente àquelas coletadas durante o mês de fevereiro/2013. Os resultados observados no teste de germinação foram confirmados pelo teste de tetrazólio e índice de velocidade de germinação. Na realização da caracterização morfológica e histoquímica do desenvolvimento da inflorescência, embrião e semente, foram identificadas quatro fases de desenvolvimento das estruturas: (I) desenvolvimento da inflorescência, (II) da região seminal, (III) do embrião globular e (IV) do embrião cotiledonar, com presença de cotilédones e meristemas apical e radicular. Durante estas fases de desenvolvimento foi observado modificações na composição dos tecidos celulares. Nas fases finais de desenvolvimento (embrião cotiledonar) as proteínas ocupavam grande parte das células. Estes resultados são essenciais para o conhecimento das alterações fisiológicas durante o desenvolvimento de sementes. Estudos relacionados às sementes desta espécie podem promover sua revalorização como planta ornamental, bem como no desenvolvimento de estratégias de uso e conservação de recursos genéticos vegetais.

Palavras-chave: Cravo-do-campo. Proteínas. Germoplasma vegetal. Fisiologia vegetal.

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 | OBJETIVOS | 13 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 13 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 13 |
| 3 | REFERENCIAL TEÓRICO | 15 |
| 3.1 | ÁREA DE OCORRÊNCIA E CARACTERÍSTICAS DE T. Catharinensis | 15 |
| 3.2 | SEMENTES E GERMINAÇÃO | 17 |
| 4 | METODOLOGIA | 21 |
| 4.1 | MATERIAL VEGETAL | 21 |
| 4.2 | TESTE DE GERMINAÇÃO | 21 |
| 4.3 | MEDIÇÃO DE PARTE AÉREA E RADICULAR | 23 |
| 4.4 | ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO | 23 |
| 4.5 | TESTE DE TETRAZÓLIO | 23 |
| 4.6 | ANÁLISE MORFOHISTOLÓGICA EM MICROSCOPIA DE LUZ..... | 24 |
| 4.7 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 25 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 27 |
| 5.1 | ESTRUTURA DA INFLORESCÊNCIA E SEMENTE..... | 27 |
| 5.2 | TESTE DE TETRAZÓLIO | 28 |
| 5.3 | GERMINAÇÃO | 31 |
| 5.4 | DESENVOLVIMENTO DAS INFLORESCÊNCIAS, SEMENTES E EMBRIÃO: CARACTERIZAÇÃO EXTERNA E INTERNA | 39 |
| 5.5 | MODIFICAÇÕES MORFOHISTOQUÍMICAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA INFLORESCÊNCIA, SEMENTE E EMBRIÃO..... | 41 |
| 5.6 | CARACTERÍSTICAS HISTOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DA SEMENTE..... | 46 |
| 6 | CONCLUSÃO | 49 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 51 |
| | REFERÊNCIAS | 53 |

1 INTRODUÇÃO

Existem inúmeras espécies de plantas nativas e de interesse econômico que pertencem a diferentes grupos vegetais e que são pouco estudadas, especialmente do ponto de vista da fisiologia de sementes. Estas espécies representam um desafio para estudos desta natureza, uma vez que, para a maioria delas pouco se conhece sobre os aspectos do desenvolvimento, maturação, germinação, longevidade das sementes, e biologia reprodutiva (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011). Estas informações são essenciais para o uso destes recursos genéticos em um programa de melhoramento e para o estabelecimento de estratégias de propagação e conservação de germoplasma.

Estudar a biodiversidade dos campos do sul do país é uma necessidade crescente, pois além de sua flora ser pouco conhecida, são considerados ecossistemas únicos e ímpares, uma vez que possuem peculiaridades, fragilidades e muitas potencialidades ecológicas para manter o equilíbrio ambiental (BARRETO, 2008). Além da importância ecológica há espécies, especialmente da família Asteraceae (ZANIN et al., 2009), como a *Trichocline catharinensis*, com potencial ornamental.

A espécie *T. catharinensis* popularmente conhecida como cravo-do-campo pertence ao gênero *Trichocline*, família Asteraceae, subfamília Cichoroideae e a tribo Mustisieae. Esta tribo contém aproximadamente 974 espécies, que estão distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da África, América, Ásia, Austrália e Havaí (CARDOSO; SCHEFFER-BASSO; GRANDO, 2007). A espécie *T. catharinensis* ocorre naturalmente no sul do Brasil e da América do Sul (CABRERA; KLEIN, 1973) e atualmente é considerada uma espécie endêmica e vulnerável (CONAMA, 2010; LIVRAMENTO, 2011). O cravo-do-campo é nativo, rústico e adaptado às condições ambientais da região onde ocorre. Apresenta alta rusticidade para cultivo e para as pragas e doenças que atacam o gênero *Gerbera*. A espécie em questão pode ser usada como fonte de resistência para programas de melhoramento de ornamentais (CARDOSO; SCHEFFER-BASSO; GRANDO, 2007).

De acordo com Schneider e Irgang (2005), o cravo-do-campo raramente é utilizado como planta ornamental, mas apresenta potencial visual para esta finalidade, assim como outras asteraceas presentes em formações campestres. No entanto, é considerada por muitos uma planta invasora (LIVRAMENTO, 2011). O potencial visual que possui pode levar a possíveis utilizações de *T. catharinensis* no paisagismo, para bordaduras e forrações, pois apresenta uma boa cobertura de solo,

devido a seu vigoroso crescimento foliar. Além disto, o seu cultivo em ambiente protegido demonstrou ainda mais seu potencial para ornamentação, pois os escalpos e capítulos obtidos em experimento de Cardoso, Scheffer-Basso e Grandó (2007) foram superiores, comparados aos encontrados no campo. Segundo estes autores, provavelmente esta resposta positiva foi devido às boas condições de fertilidade e umidade do solo.

Considerando isto, estudos com a espécie *T. catharinensis* podem gerar dados inéditos e úteis para conhecer a biologia do desenvolvimento da espécie e suas formas de reprodução, viabilizando futuros trabalhos de promoção das estratégias de propagação, utilização e conservação da espécie. Neste sentido, no presente trabalho foram estudados os aspectos morfohistológicos e fisiológicos do desenvolvimento e da germinação de sementes de *T. catharinensis*, visando gerar informações que possam ser utilizadas no desenvolvimento de estratégias de uso e conservação da espécie como planta ornamental.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi o de estudar as características morfohistológicas do desenvolvimento da inflorescência, semente e embrião de *T. catharinensis*, bem como os processos de germinação e colheita de sementes, gerando subsídios para a conservação e uso desta espécie como planta ornamental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar e monitorar as diferentes épocas de maturação e colheita de sementes de *T. catharinensis* na região de Curitiba/SC;
- b) Avaliar o vigor e a viabilidade das sementes de *T. catharinensis*;
- c) Caracterizar o potencial e a dinâmica de germinação das sementes de *T. catharinensis*;
- d) Descrever e avaliar os estádios de desenvolvimento das inflorescências e sementes de *T. catharinensis* através de análises morfológicas e histológicas;
- e) Caracterizar uma semente madura e viável de *T. catharinensis*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ÁREA DE OCORRÊNCIA E CARACTERÍSTICAS DE *T. catharinensis*

A palavra campos vem do latim *campus* e segundo Barreto (2008) significa superfície coberta por capim. Para Buckup (2010), as formações campestres no sul do Brasil são denominadas de campos de altitude ou campos de cima da serra. Já Sclick (2004) define os campos de cima da serra como porção de terra mais alta do Rio Grande do Sul (RS), com grupos vegetacionais característicos e algumas espécies endêmicas (SCLICK, 2004; MOCOCHINSKI; SCHEER, 2008). O planalto de Santa Catarina (SC) apresenta as mesmas características dos campos de cima da serra do RS (SCLICK, 2004).

A vegetação natural campestre que ocorre no planalto do RS e SC, e em menor extensão do Paraná (PR) forma mosaicos com a floresta ombrófila mista, inserida no Bioma Mata Atlântica (OVERBECK et al., 2007; RADAESKI et al., 2011). O solo e o clima possibilitam uma diversidade florística diferente de todo o mundo (RADAESKI et al., 2011). Os solos são ácidos, as temperaturas baixas no inverno com precipitações pluviométricas altas e regulares (BARRETO, 2008).

Buckup (2010) cita os processos de milhões de anos de história evolutiva, gerando o que é encontrado atualmente nas áreas de campos. A vegetação possui adaptações ao meio físico e as formas de manejo utilizadas (LOPES, 2009). A vegetação herbácea, que predomina as áreas de campo é representada principalmente pelas famílias botânicas Poaceae, Cyperaceae (OVERBECK et al., 2007), Apiaceae (WILLBERGER, et al., 2004), Melastomataceae, Verbenaceae, Solanaceae (BUCKUP, 2010) e a família Asteraceae, com alta dominância nestas formações (FERNANDES; RITTER, 2009).

A família Asteraceae é constituída de ervas perenes, subarbustos e arbustos, mas também ocorrem ervas anuais, lianas e árvores. Possuem alta adaptação ambiental, e são encontradas nos mais variados habitats e condições climáticas (CANCELLI; EVALDT; BAUERMAN, 2007; CANCELLI, 2008). Espécies desta família possuem variadas potencialidades para uso ornamental, medicinal, além da importância ecológica (ZANIN et al., 2009).

A inflorescência das Asteraceae apresenta forma de capítulos, sendo considerada biologicamente uma flor simples, com a função de um chamariz para polinizadores (CARDOSO, 2007). A polinização pode ser autógama ou alógama, quando há polinizadores

(FERNANDES; RITTER, 2009), que são basicamente insetos (GROMBONE- GUARATINI; SOLFERINI; SEMIR, 2004). Outro fator para o sucesso biológico da família se deve a sua grande capacidade de dispersão, devido à presença de sementes com papus plumosos, apêndices, ou estruturas de aderência e metabólitos secundários (CANCELI; EVALDT; BAUERMANN, 2007; CABRERA; KLEIN, 1973; SANCHO; KATINAS, 2002).

A espécie *T. catharinensis* popularmente conhecida como cravo-do-campo (WILLBERGER, et al., 2004; SCHEIDER; IRGANG, 2005; LOPES, 2009; BUCKUP, 2010; CONAMA, 2010; MONGE, 2012), também é chamada de cravo-do-campo-catarinense (CABRERA; KLEIN, 1973; CARDOSO; SCHEFFER-BASSO; GRANDO, 2007; BARRETO, 2008), e foi descoberta em Santa Catarina, por isso o nome *catharinensis* (CABRERA; KLEIN, 1973).

O cravo-do-campo é uma erva perene e rasteira (CABRERA; KLEIN, 1973; LIVRAMENTO; ZOLDAN, 2006; OVERBECK et al., 2007; BUCKUP, 2010; MONGE, 2012;). Possui capítulos vistosos e flores amarelas (BUCKUP, 2010). As flores centrais ou do disco formam o chamado miolo (BUCKUP, 2010), e possuem dimorfismo, e as flores externas ou do raio são femininas e apresentam lígulas amarelas (SANCHO; KATINAS, 2002). Seu florescimento estende-se de setembro a abril, com predominância no final de novembro e dezembro. (CABRERA; KLEIN, 1973; WILLBERGER, et al., 2004; LIVRAMENTO; ZOLDAN, 2006, LIVRAMENTO, 2011).

A espécie possui resistência ao pisoteio do gado e a competição com outras espécies herbáceas nativas (LIVRAMENTO, 2011; LIVRAMENTO; ZOLDAN, 2006). Também resiste ao estresse hídrico, uma vez que rebrota facilmente após a estiagem. O gado costuma comer suas folhas quando a pastagem diminui (LIVRAMENTO; ZOLDAN, 2006).

A espécie prefere campos ondulados, onde os solos são rasos ou rochosos, bem drenados (WILLBERGER, et al., 2004; LIVRAMENTO, 2011; CABRERA; KLEIN, 1973). Os topos de morros são considerados ambientes favoráveis para o desenvolvimento desta espécie (LIVRAMENTO, 2011; SCLICK, 2004).

A espécie *T. catharinensis* é indicadora dos campos de altitude em estágio médio de regeneração, da floresta ombrófila mista (BRASIL, 2009a). Possui dispersão na região de Lages, São Joaquim, Campos Novos, Curitiba, Caçador e Lebon Régis (CABRERA; KLEIN, 1973).

3.2 SEMENTES E GERMINAÇÃO

As sementes foram um dos refinamentos da adaptação das plantas, e estão ligadas à conquista dos ambientes terrestres. As plantas produtoras de esporos não podiam completar seu ciclo de vida em ambientes mais inóspitos e áridos, já que são dependentes de água, ficando limitadas às áreas próximas à linha da costa (IANNUZZI; VIEIRA, 2005). Um passo fundamental da evolução foi que todas as fases do ciclo reprodutivo ocorriam em ambiente externo, passaram a ocorrer sobre o esporófito, e a dispersão passou a ocorrer depois do desenvolvimento da semente. Há grande diversidade no aspecto externo e na estrutura da semente. Estas diferenças são relacionadas às estratégias de dispersão e de germinação, podendo ser relacionadas ao tamanho, cor, formato e à síndrome de dispersão (SANTOS, 2003).

Desta forma, o evento considerado mais importante na evolução das plantas vasculares foi o aparecimento da semente, um pouco antes do término do Devoniano (STEWART, 1987). Esta estrutura permitiu o surgimento de um novo grau evolutivo entre os vegetais, o das gimnospermas (*gimnos*= nua, *sperma*= semente), assim chamadas pela ausência do fruto, estrutura de recobrimento característica das angiospermas, ou plantas com flores. Sendo assim, o ciclo de vida das plantas que se multiplicam sexuadamente tem início e se encerra com a produção de sementes (MARCOS FILHO, 2005).

Sementes de angiospermas são formadas basicamente por tegumento e embrião (cotilédones e eixo embrionário), e pelo endosperma, muitas vezes ausente. O tegumento ou casca é a estrutura externa, que delimita a semente (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). E elas podem ser distribuídas para diferentes locais por meio de diferentes mecanismos de dispersão. Podem atingir distâncias consideráveis a partir do local de origem, contando com suas próprias estruturas e agentes bióticos e abióticos (MARCOS FILHO, 2005).

De acordo com Ferreira e Borghetti (2004) o desenvolvimento da semente pode ser dividido em três fases. A primeira é o crescimento inicial, devido à divisão celular e há um aumento rápido no peso fresco da semente inteira e no conteúdo de água. Nesta fase, a água representa a maior parte do peso da semente. Ocorre histodiferenciação e a morfogênese da semente acontece à medida que o zigoto se submete às divisões celulares, resultando na formação do corpo do embrião (eixo embrionário e os cotilédones). Simultaneamente, há a formação do endosperma. Na segunda fase há aumento de tamanho das sementes, pela expansão celular e deposição de reservas. Os vacúolos diminuem

de tamanho, as reservas se acumulam e o peso seco aumenta. E a terceira fase é a de dessecação, que ocorre com a perda de 90 a 95% de perda de água.

Geralmente, há alta variação na composição química das sementes maduras, mas em todas as sementes há carboidratos, lipídeos e proteínas armazenadas, os quais serão utilizados durante o período de germinação e estabelecimento da plântula (MELO, 2013).

A maturação fisiológica compreende as transformações morfológicas, fisiológicas e funcionais que se sucedem no óvulo fertilizado, culminando no ponto de máximo peso da matéria seca. Neste ponto a semente atinge poder máximo de germinação e máximo vigor, sendo denominado ponto de maturação fisiológica (GUIMARÃES et al., 1998). A determinação da maturidade das sementes pode auxiliar no entendimento da dinâmica do banco de sementes no solo. Em algumas espécies, a exposição das sementes as baixas temperaturas, sob condições úmidas, estimula o crescimento de embriões rudimentares ou fisiologicamente imaturos (DUARTE et al., 2012).

O vigor das sementes também indica a magnitude da deterioração fisiológica e/ou da integridade, e prevê a habilidade das sementes em se estabelecer em uma ampla faixa de condições ambientais. O teste de vigor pode ser utilizado para determinar o valor real do lote de sementes, para predizer o número de plântulas que irão emergir no campo, apresentando assim grande contribuição para o sistema de produção de sementes, e também na seleção de cultivares com qualidade fisiológica elevada, para utilização em programas de melhoramento genético (PESKE et al., 2003).

A primeira exigência para a germinação é a água, depois as faixas de temperatura mais apropriadas dependendo da espécie. Além disso, podem requerer luz e nutrientes. Desta forma, deve-se ter um conjunto específico de condições para que a germinação ocorra. Os sinais do ambiente são transmitidos para o interior da semente, causando ativação e inativação de reações metabólicas, para que o processo de germinação inicie (DE CASTRO; BRADFORD; HILORST, 2004).

O termo germinação apresenta diferentes conceitos em função dos diferentes usos. Agronomicamente considera-se germinação a emergência de parte da planta no solo ou a formação de uma plântula vigorosa sobre algum tipo de substrato (BORGHETTI; FERREIRA, 2004). Do ponto de vista fisiológico segundo De Castro, Bradford e Hilorst (2004) a germinação é a protrusão da radícula, sendo o primeiro processo visível que ocorre. A hidratação dos tecidos que acontece durante a embebição, promovendo o aumento na atividade respiratória,

síntese e consumo de ATP, síntese de proteínas e de RNAm e ativação de enzimas. Este processo gera a mobilização das reservas, promovendo o acúmulo de solutos e a entrada de água nas células, e a expansão gera o alongamento embrionário. Posteriormente, ocorre a preparação para o crescimento da plântula (BORGHETTI, 2004).

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAL VEGETAL

As coletas das sementes foram realizadas em três populações localizadas no município de Curitiba – SC (27°16'44" de latitude sul e 50°34'57" de longitude WGR), em campo aberto, a partir de plantas matrizes, em forma de touceiras com floração assincrônica. As coletas foram realizadas durante os meses de dezembro/2012 a fevereiro/2014, para compor todos os testes realizados.

A caracterização morfológica da planta, inflorescência e da estrutura da semente foi realizada por meio de avaliações visuais *in loco*. Foram consideradas características morfológicas, textura, coloração, tamanho e deiscência das inflorescências e das sementes. Foi também avaliada a sincronicidade do desenvolvimento das inflorescências.

Para os diferentes períodos de coleta das sementes foram selecionados dois estádios de desenvolvimento: (1) quando as sementes estavam aderidas ao pedúnculo, e a inflorescência apresentava coloração marrom, denominou-se sementes na inflorescência; e (2) quando as sementes estavam soltas, sendo dispersas no campo, denominou-se sementes dispersas.

A separação de sementes e os testes de viabilidade e vigor foram conduzidos no Laboratório de Ecologia e Morfofisiologia Vegetal do campus Universitários de Curitiba (CBS) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular de Plantas/ Centro de Ciências Biológicas/UFSC Florianópolis.

4.2 TESTE DE GERMINAÇÃO

Após a coleta, as sementes foram acondicionadas em bandejas plásticas, para secagem, onde permaneceram por aproximadamente quinze dias. Após a secagem ocorreu o beneficiamento das sementes, com a seleção manual, de acordo com o tamanho, volume e coloração externa das sementes, acrescido da retirada do papus. As sementes foram homogeneizadas de forma aleatória para cada mês de coleta e estádio de desenvolvimento, visando obter a amostra de trabalho. Após a obtenção da amostra de trabalho, foram diretamente submetidas aos testes de vigor e viabilidade.

As sementes beneficiadas foram submetidas ao processo de desinfestação, com metodologia de Ferreira et al. (2001) com

modificações. Inicialmente, as sementes foram colocadas em uma peneira com malha fina e imersas em 200mL de álcool 70% durante 10 segundos. Em seguida as sementes foram lavadas com 200mL de hipoclorito de sódio 1%. Após foram realizadas três lavagens com água destilada.

Após a desinfestação, as sementes provenientes de dois estádios de desenvolvimento (sementes dispersas e sementes na inflorescência) foram inoculadas em dois substratos (papel filtro e vermiculita expandida). A combinação destes fatores resultou em quatro tratamentos. (1) Sementes dispersas/papel filtro (SD/PF); (2) Sementes dispersas/vermiculita expandida (SD/V); (3) Sementes na inflorescência/papel filtro (SI/PF); e (4) Sementes na inflorescência/vermiculita expandida (SI/V) (Tabela 1). Estes tratamentos foram realizados para cada um dos meses de coleta (dezembro/2012, janeiro e fevereiro/2013). As sementes foram inoculadas em caixas tipo Gerbox, contendo os diferentes substratos e água. As caixas Gerbox foram mantidas em câmara para germinação (SOLAB® modelo SL 225), com fotoperíodo de 10 horas de luz a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ (FERREIRA et al., 2001, modificado). As avaliações do teste de germinação foram realizadas a cada cinco dias, até o trigésimo quinto (35) dia, quando o experimento foi encerrado. A semente foi considerada germinada após a protusão da radícula (DE CASTRO; BRADFORD; HILORST, 2004).

O teste de germinação foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de trinta sementes, totalizando 150 sementes por tratamento. Considerando todos os meses de coleta foram utilizadas um total de 1800 sementes.

Tabela 1: Tratamentos resultantes da combinação de dois substratos e estágio de desenvolvimento das sementes avaliadas no teste de germinação para as coletas realizadas nos meses de dezembro/2012, janeiro e fevereiro/2013.

| Tratamentos | Sementes dispersas | Sementes na inflorescência |
|---|--------------------|----------------------------|
| Papel filtro | (1)SD/PF | (3)SI/PF |
| Vermiculita expandida | (2)SD/V | (4)SI/V |
| (1)SD/PF- Sementes dispersas/papel filtro; (2)SD/V- Sementes dispersas/vermiculita expandida; (3)SI/PF- Sementes na inflorescência/papel filtro; e (4)SI/V- Sementes na inflorescência/vermiculita expandida, durante os meses de dezembro/2012, janeiro/2013 e fevereiro/2013. | | |

4.3 MEDIÇÕES DE PARTE AÉREA E RADICULAR

As avaliações das partes aérea e radicular foram realizadas no trigésimo quinto dia, quando houve o encerramento do experimento de germinação. As medidas das plântulas foram obtidas com auxílio de régua, sendo medidas parte aérea, radicular e total da plântula. Para a medição da parte aérea e total no mês de dezembro/2012, o experimento de germinação foi repetido com sementes que ficaram armazenadas a 8°C durante quarenta e cinco dias. Para as coletas realizadas em janeiro e fevereiro/2013 a avaliação da parte aérea, radicular e total foi concomitante ao encerramento do teste de germinação.

4.4 ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO

As contagens para o cálculo do índice de velocidade de germinação foram realizadas a cada cinco dias, a partir do décimo dia após o início do experimento. O IVG foi calculado de acordo com Borghetti e Ferreira (2004):

$$IVG = (G_1/N_1) + (G_2/N_2) + \dots + (G_n/N_n)$$

Onde G_1 , G_2 , G_n : número de diásporos germinados; N_1 , N_2 , N_n : número de dias após a semeadura.

4.5 TESTE DE TETRAZÓLIO

Para o teste do tetrazólio foi utilizada a metodologia descrita nas Regras de Análises de Sementes (BRASIL, 2009b). No entanto, não havia a padronização do teste de tetrazólio específico para esta espécie e modificações foram estabelecidas com abordagens e adequação de espécies filogeneticamente próximas e interpretações para espécies agrícolas já estabelecidas (NETO, 1998; BRASIL, 2009b). Foram utilizadas sementes provenientes de dois estádios de desenvolvimento (sementes dispersas e sementes na inflorescência) para cada um dos meses coletados (dezembro/2012, janeiro e fevereiro/2013). As sementes foram submetidas á embebição em água destilada durante 18 horas em temperatura de 30°C. Após este período foi realizado com auxílio de bisturi, um corte longitudinal na semente expondo o embrião, para posterior imersão em solução de tetrazólio 0,5% a 30°C por 3 horas. Para a análise do teste de tetrazólio, os embriões foram classificados em viáveis ou inviáveis de acordo com a coloração e

aspecto dos tecidos, e pela localização destas colorações em relação às áreas essenciais ao crescimento.

Os tratamentos avaliados foram (1) sementes dispersas/dezembro/2012; (2) sementes na inflorescência/ dezembro/2012; (3) sementes dispersas/janeiro/2013; (4) sementes na inflorescência/ janeiro/ 2013; (5) sementes dispersas/fevereiro/2013; (6) sementes na inflorescência/ fevereiro/ 2013. Foram avaliadas 40 sementes por tratamento, em quatro repetições de 10 sementes cada. Foi utilizado um total de 240 sementes em todo o período de coleta avaliado.

4.6 ANÁLISE MORFOHISTOLÓGICA EM MICROSCOPIA DE LUZ

As amostras de aquênios, sementes e embriões coletados em janeiro e fevereiro/2014, foram fixadas em solução de paraformaldeído (2,5%) em tampão fosfato (0,2M) pH 7,3, na proporção de 1:1, durante 24 h, à temperatura de 4°C. Após a fixação, o material foi lavado em tampão fosfato, três vezes, por trinta minutos (BOUZON, 1993), e desidratado em uma série de tríplice lavagem de trinta minutos com soluções aquosas de etanol em concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). A pré-infiltração das amostras foi realizada, inicialmente, com uma mistura 1:1 de etanol 100% e historesina Leica™, durante 12 h; posteriormente o material foi infiltrado em historesina pura por 24 horas. A inclusão foi realizada com historesina e adição de polimerizador (Leica Historesina, Heidelberg, Germany), à temperatura ambiente, por 2–3 h (ARNOLD et al., 1975).

As amostras foram seccionadas em micrótomo Leica (RM 2135), com navalhas de aço. Os cortes com espessura de 4 µm foram distendidos em temperatura ambiente e colocados diretamente nas lâminas sobre gotas de água destilada e desidratados em placa aquecedora a 37°C, até a secagem da lâmina de água. Os cortes foram tratados com diferentes técnicas de histoquímica, de acordo com Rogge-Renner et al. (2012), com o ácido periódico de Schiff (PAS), o azul de toluidina (AT-O) 0,5% e o azul brilhante de Comassie (CBB) 0,4% de solução de Clark.

Ácido Periódico de Schiff (PAS): as lâminas foram colocadas em recipiente fechado (cuba) e foi adicionado ácido periódico e deixado reagir por 20 min. Em seguida, a solução foi retirada, e as lâminas foram lavadas por 10 minutos em água corrente. Em seguida foi adicionado reagente de Schiff e fechado recipiente com papel alumínio (reação ocorre no escuro) e deixada por 20 minutos. Na continuidade, as lâminas

foram lavadas com água destilada, até todo o excesso da solução e resíduo sair. Em seguida foram colocadas para secar.

Azul de toluidina 0,5% (ATO): Foram adicionadas gotas de corante sobre a lâmina, onde estava o material a ser corado. Em seguida as lâminas foram lavadas em um fio de água, e colocadas para secar.

Azul Brillhante de Comassie (CBB): foi adicionado CBB sobre as lâminas, a reação ocorreu no escuro, com papel alumínio por 45 minutos. Após as amostras foram lavadas com solução de Clark (75% álcool p.a. e 25% ácido acético), até retirar o excesso do ácido, e em seguida as lâminas foram lavadas em água destilada, para reidratar, em seguida colocadas para secar naturalmente.

As observações e o registro das características qualitativas foram realizados em Microscópio Olympus BX41, adaptado com sistema de fotomicrografia Olympus America INC Q color 3.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram submetidos à análise da variância e quando significativos ao teste de Tukey a 5% de significância. As análises foram realizadas utilizando o programa ASSISTAT Versão 7.6 beta.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTRUTURA DA INFLORESCÊNCIA E SEMENTE

Foram observadas plantas na forma de touceiras (Figura 1A) e com floração assincrônica, ou seja, em diferentes estádios de desenvolvimento. As inflorescências possuíam flores distintas, as do raio e as do disco ou miolo, sendo que as flores do raio apresentaram lígula amarela, o que causou o contraste destas com a paisagem (Figura 1A). Com base em avaliações visuais “*in loco*” foi observado que após a polinização das inflorescências, estas passaram a apresentar modificações na coloração, passando de amarelo a marrom escuro, perderam as lígulas, ou estas secaram e continuaram aderidas ao pedúnculo (Figura 1B). Em seguida, foi observado que as estruturas chamadas de papus se abriram, as sementes se desprenderam do pedúnculo e foram dispersas no ambiente (Figura 1C).

Com base nestas observações “*in loco*” as sementes foram classificadas de acordo com características morfológicas de textura, coloração e tamanho. Foram identificados dois tipos de sementes: as sementes secas (Figura 1D1) e as intumescidas (Figura 1D2). Foi observado que as sementes intumescidas apresentaram tecido com coloração clara em seu interior (Figura 1E), e as sementes secas, apenas uma camada seca e escurecida em seu interior (Figura 1F).

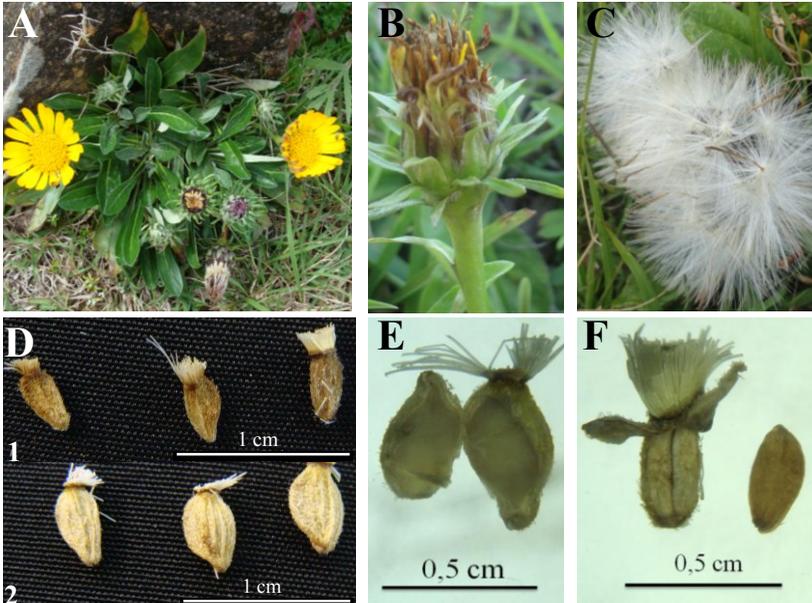


Figura 1: Características morfológicas das inflorescências e sementes de *Trichocline catharinensis*. A) Aspecto geral da planta com inflorescências em diferentes estádios de desenvolvimento; B) Inflorescência com coloração marrom, após a polinização com as sementes aderidas ao pedúnculo; C) Sementes dispersas ao ambiente; D) Sementes com o papus retirado, (1) secas e (2) intumescidas; E) Sementes intumescidas com preenchimento amarelado em todo o interior; F) Sementes secas com preenchimento seco e escurecido.

5.2 TESTE DE TETRAZÓLIO

Para as sementes de *T. catharinensis* este teste foi feito com amostras de sementes separadas, mas respectivamente dos mesmos lotes de sementes utilizados no teste de germinação. O teste de tetrazólio indicou que para o mês de dezembro/2012 as sementes dispersas apresentaram 95% de viabilidade, ou seja, ocorreu à redução do sal de tetrazólio, e os tecidos das sementes apresentaram coloração vermelha (Figuras 2 e 3B). Para as sementes coletadas na inflorescência/dezembro/2012, a viabilidade foi de 100%. Nas coletas de janeiro/2013, a viabilidade foi de 97,5% e 2,5% para as sementes dispersas e para as da inflorescência, respectivamente. Para as coletas durante o mês de fevereiro/2013, as sementes de ambos os estádios de desenvolvimento apresentaram baixa viabilidade, com 2,5 e 5,0% para

as sementes dispersas e para as da inflorescência, consequentemente (Figuras 2 e 3A).

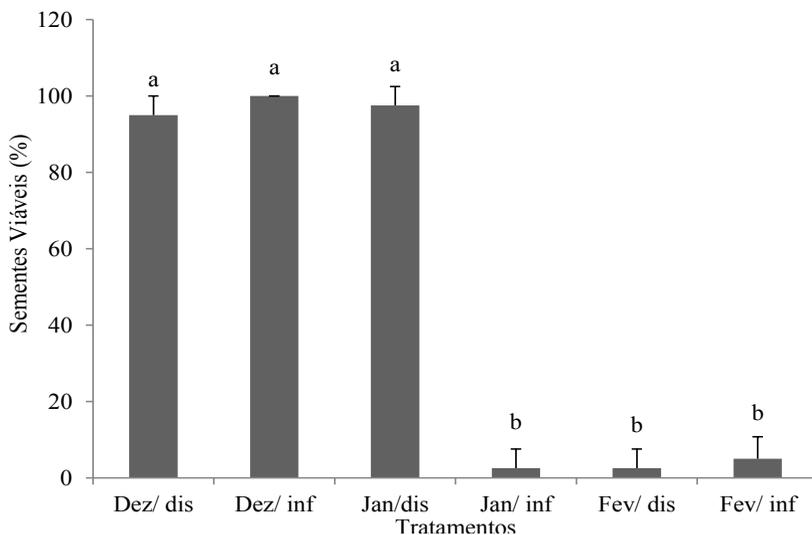


Figura 2: Teste de tetrazólio aplicado às sementes de *Trichocline catharinensis*, provenientes de coletas realizadas nos meses de dezembro/2012, janeiro e fevereiro/2013, com sementes dispersas (dis) e na inflorescência (inf). Teste de Tukey significativo a 1% de probabilidade.

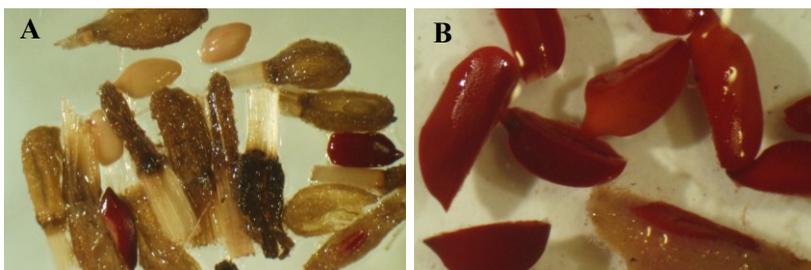


Figura 3: Aspecto das sementes de *Trichocline catharinensis* após teste de tetrazólio. A) Sementes inviáveis; B) Sementes viáveis.

Desta forma, considera-se que para o mês de fevereiro/2013 a baixa viabilidade no teste de tetrazólio, para ambos os estádios de desenvolvimento coletados, pode ter relação com o período de coleta, uma vez que o período com predominância de floração esta entre novembro e dezembro (CABRERA; KLEIN, 1973), assim como a dispersão das sementes. Desta forma, considera-se que para o mês de fevereiro/2013 as sementes podem ter sofrido alterações fisiológicas e bioquímicas, as quais diminuíram sua viabilidade. Já para o mês de janeiro/2013, as sementes na inflorescência ou aderidas ao pedúnculo, apresentaram baixa viabilidade de sementes, assim como em trabalho de Lattuada et al. (2012), com *Schlechtendalia luzulifolia* Less., conhecida como bolão-de-ouro (Asteraceae), onde as sementes ainda presas a inflorescência apresentaram menor viabilidade em relação as soltas ou dispersas. Em teste de tetrazólio as sementes ainda presas apresentaram 60% de viáveis, e as soltas ou dispersas 63%. Neste sentido Lattuada et al. (2012), chegaram a conclusão de que as sementes presas ao pedúnculo ainda estavam imaturas, com alto teor de massa verde, em relação as sementes soltas. Adicionalmente, deve-se considerar que durante o desenvolvimento das sementes há diversas alterações morfológicas nos frutos e sementes, na viabilidade, vigor, no teor de umidade, massa seca e reservas das sementes, que podem afetar sua viabilidade germinativa (SHIBATA, 2013).

O teste de tetrazólio é considerado rápido e eficiente para determinar viabilidade e vigor de sementes, e é influenciado pela umidade das sementes, danos mecânicos ou por insetos (PESKE, 2003). Este é um teste bioquímico, que tem por princípio a alteração da coloração dos tecidos vivos do embrião, pela redução de um indicador no interior dos mesmos. Esta alteração reflete a atividade do sistema enzimático, das enzimas desidrogenases presentes no processo de respiração das sementes, nas mitocôndrias, que catalisam a reação de redução do sal de tetrazólio nas células vivas. A reação de redução que ocorre resulta na formação de um composto vermelho, conhecido como formazan (PESKE, 2003), o qual perde um hidrogênio para as enzimas desidrogenases. Os tecidos corados em vermelho indicam que as células estão respirando, e os tecidos mortos não reagem com o sal de tetrazólio, ficando com a coloração inicial.

De acordo com o teste de tetrazólio, para maior viabilidade das sementes de *T. catharinensis* estas devem ser coletadas nos meses de dezembro/2012 e janeiro/2013. Ainda pode-se sugerir que para as sementes de *T. catharinensis* o protocolo utilizado se mostrou eficiente e foi compatível com os demais testes de viabilidade. Com base nisto

sugere que estes dados podem ser utilizados como base inicial para o estabelecimento do protocolo do teste de tretrazólio para esta espécie.

5.3 GERMINAÇÃO

Para sementes de *T. catharinensis*, foi observado que a germinação ocorreu aos 10 dias após a implantação do experimento, e estabilizou em torno dos 25 a 30 dias de avaliação, variando de acordo com o tratamento (Figura 4A,B,C). Ferreira et al. (2001) definiu em seu trabalho que sementes de diferentes espécies de Asteraceae com uma médias de germinação igual ou superior a 10 dias, são consideradas de germinação lenta. Isto indica que, as sementes de *T. catharinensis*, submetidas ao teste de germinação no presente trabalho podem ser consideradas também de germinação lenta.

Para a coleta do mês de dezembro/2012, o tratamento das sementes aderidas à inflorescência/papel filtro (SI/PF), apresentou maiores porcentagens de germinação, com 79,3%. Enquanto que as sementes dispersas/papel filtro (DS/PF), apresentaram as porcentagens médias de germinação mais baixas para o mês de dezembro/2012, com 58% de sementes germinadas (Figura 4A).

Em relação às sementes coletadas durante o mês de janeiro/2013, o tratamento das sementes dispersas/papel filtro (SD/PF) apresentou média de 76% de germinação, sendo considerada a maior porcentagem de germinação para este mês. O tratamento das sementes dispersas/vermiculita expandida (SD/V) obteve média de 74,7% de germinação, enquanto que os tratamentos de sementes na inflorescência/papel filtro (SI/PF) e vermiculita expandida (SI/V) apresentaram germinações médias de 56,7 e 65,3%, respectivamente (Figura 4B). Em teste de germinação de *Adenostemma brasilianum*, Asteraceae, sementes recém coletadas e submetidas ao teste de germinação também apresentaram médias de germinação elevadas, entre 85,5 e 88,5% (GODINHO; MANTOVANI-ALVARENGA; VIEIRA, 2011). E para sementes de girassol (*Helianthus annuus*, Asteraceae) 87 a 94% de germinação em diferentes lotes coletados, corroborando com o teste de germinação de *T. catharinensis*, para os meses de dezembro/2012 e janeiro/2013.

No presente trabalho, durante o mês de fevereiro/2013, a maior taxa de germinação foi de 46,7%, obtida no tratamento sementes dispersas/vermiculita expandida (SD/V), e apenas 14,7% para o tratamento das sementes na inflorescência/vermiculita expandida (SI/V) (Figura 4C), gerando as porcentagens médias mais baixas em relação

aos períodos avaliados. Em trabalho de Ferreira et al. (2001), para treze espécies da família Asteraceae, somente quatro apresentaram germinação superior a 60%, a menor média de germinação foi de 22,2% para *Trixis praestans*. As menores taxas de germinação são explicadas pela baixa produção de aquênios férteis (VELTEN; GARCIA, 2005), sementes sem embriões (MALUF; WIZENTIER, 1998), e condições climáticas (SHIBATA, 2013). O que sugere que as espécies da família em questão possuem diversos fatores intrínsecos e extrínsecos influentes na germinação.

Diferentes autores (MALUF; WIZENTIER, 1998; VELTEN; GARCIA, 2005; GODINHO; ALVARENGA; VIEIRA, 2011, FERREIRA et al., 2001) citam outro fator relevante, que é a dificuldades com a separação de sementes de Asteraceae, viáveis, inviáveis e sem embrião. Principalmente devido as suas características morfológicas muito parecidas, e a separação a olho nu se torna um parâmetro inseguro. Godinho, Alvarenga e Vieira (2011), em trabalho com sementes de *A. brasilianum* (Asteraceae), não havia forma para separar visualmente as sementes imperfeitas das perfeitas devido à semelhança morfológica. O beneficiamento e seleção de sementes para o mês de fevereiro/2013 podem estar relacionados às taxas de germinação encontradas, mas considera-se que o período de coleta foi o principal fator limitante.

Uma forma de separação de sementes é o uso da densidade, a qual relaciona massa e volume, estes métodos mostram-se eficientes para sementes pequenas e leves. Enquanto que métodos visuais, apenas de massa e separação com soprador podem não possuir a eficiência desejada. Este último método foi utilizado para sementes de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart, Asteraceae) e não apresentou eficiência, devido a massa da semente ser pequena, relacionada à massa total do fruto (DE MELO et al., 2009).

Barros e Rossetto (2009) relatam a existência de limitações do teste de germinação, para a detecção de diferenças não acentuadas na qualidade fisiológica entre lotes de sementes. Podendo se um fator para os menores valores de porcentagem de germinação e viabilidade das sementes coletadas em fevereiro/2013. Tanto o teste de tetrazólio como o de germinação para ambos os estádios de desenvolvimento coletados, apresentaram semelhantes resultados para os períodos de coleta. Ambos demonstraram que os meses de dezembro/2012 e janeiro/2013 apresentam alta viabilidade de sementes, porém para as sementes/inflorescência em janeiro/2013 ocorreu baixa viabilidade no teste de tetrazólio, o que pode ser justificada devido ao ponto de

maturação fisiológica deste lote de sementes, condições climáticas (SHIBATA, 2013), e relação com às populações coletadas.

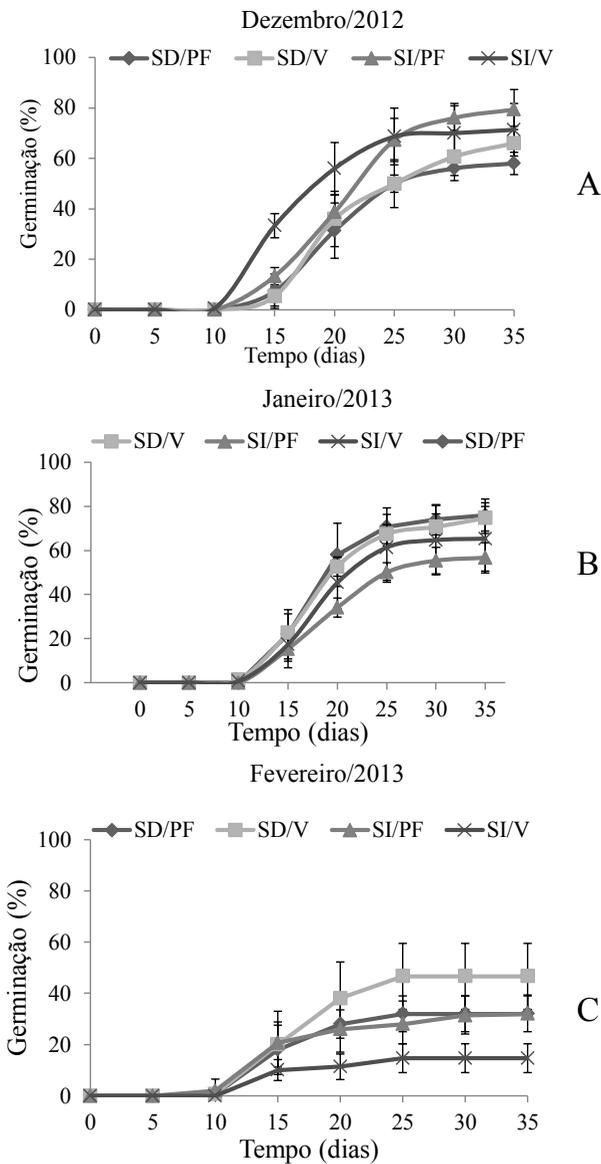


Figura 4: Porcentagem de germinação de *Trichocline catharinensis* em câmara de germinação, em A) dezembro/2012; B) janeiro/2013; C) fevereiro/2013 (SD: sementes dispersas; SI: sementes na inflorescência; V: vermiculita expandida; PF: papel filtro).

Na maturidade fisiológica ocorrem os maiores níveis de peso de matéria seca, viabilidade e vigor, entretanto em trabalho de Guimarães et al. (1998), com zínia (*Zinnia elegans* Jacq.) da família Asteraceae, ocorreram alterações fisiológicas e bioquímicas após a semente atingir o máximo peso de matéria seca, dificultando as coletas de sementes com máxima viabilidade e vigor. Trabalhos com baixos percentuais de aquênios férteis produzidos para Asteraceae são comumente encontrados, devendo ser um fator a considerar durante coletas de sementes. Uma vez que, a maior taxa de germinação para *Eremanthus elaeagnus* (Asteraceae) foi de 10%. Sugerindo que a baixa produção de aquênios férteis causa baixas taxas de germinação (VELTEN; GARCIA, 2005). Em mesmo trabalho, aproximadamente 70 e 56% dos aquênios de *E. elaeagnus* e *E. glomerulatus*, coletados em agosto e julho/2001, respectivamente, eram aparentemente viáveis e, deste porcentual, cerca de 91 e 73% não possuíam embriões. Desta forma o método de seleção de sementes viáveis é essencial, e pode ter sido considerado um fator positivo para o trabalho em questão.

A época de coleta pode influenciar na conservação e qualidade fisiológica, pois se as sementes forem colhidas após a maturação fisiológica apresentaram menor potencial de armazenamento e já iniciaram deterioração. Já a colheita precoce pode resultar em sementes imaturas e com baixo vigor, relacionado ao desenvolvimento incompleto do eixo embrionário, disponibilidade de compostos de reserva essenciais a germinação e ao desenvolvimento inicial das plântulas (SHIBATA, 2013).

Quanto aos substratos usados, o papel filtro foi superior para os meses de dezembro/2012 e janeiro/2013. Deve-se considerar a característica dos substratos, em relação à maior chegada de luminosidade as sementes (GUEDES et al., 2010). Sendo que o papel filtro deixava as sementes mais expostas à luminosidade em relação à vermiculita expandida.

As características que o substrato papel filtro deve ter, segundo Brasil (2009b), podem auxiliar o bom desempenho. Estas características estão relacionadas a fibra de madeira, algodão ou outra celulose, capacidade de retenção de água para suprir as necessidades da semente. Além disso, deve ser livre de impurezas e patógenos, assim como possuir resistência ao manuseio (BRASIL, 2009b), o qual demonstrou esta capacidade durante os ensaios. Apesar de a vermiculita expandida apresentar características adequadas à germinação como boa retenção de água, leveza e fácil manuseio, não apresentou os melhores resultados

para esta espécie (GUEDES et al., 2010), além das dificuldades para contagem de sementes, devido a coloração semelhante.

Em relação aos estádios de desenvolvimento coletados e os períodos, o teste de germinação apresentou diferenças significativas. Sendo que, segundo a análise estatística o mês de fevereiro/2013 diferiu dos meses de dezembro/2012 e janeiro/2013. Em dezembro/2012 as sementes na inflorescência apresentaram 75,3% de germinação, enquanto que as dispersas apresentaram 62%. Já para janeiro e fevereiro/2013 as sementes dispersas apresentaram maiores taxas de germinação, com 75,3 e 39,3%, enquanto que as coletas de sementes na inflorescência obtiveram 61 e 23,3% de germinação. Fevereiro/2013 obteve as menores taxas de germinação, em relação a ambas as coletas, com 39,3 e 23,3% para dispersas e inflorescência, respectivamente (Figura 5A). Desta forma, somente as coletas de fevereiro/2013 (sementes dispersas e na inflorescência) diferiram, comprovando as menores porcentagens de germinação para este mês, comparativamente aos demais.

As oscilações durante a germinação podem possuir diferentes fatores, que podem influenciar no processo de germinação das sementes, como as exigências por água, temperatura, luminosidade e nutrientes. Assim, fica claro que as sementes necessitam de um conjunto de condições para obter sucesso durante a germinação (DE CASTRO; BRADFORD; HILHORST, 2004). Podendo ser uma explicação para as oscilações de germinação durante os períodos de coleta.

O comprimento aéreo e radicular das plântulas, segundo teste de médias (Tukey 5% de probabilidade), não variou significativamente entre os tratamentos. O comprimento aéreo das plântulas ficou em torno de 6,05 mm, já o da parte radicular variou de 11,85 mm no tratamento das sementes dispersas de dezembro/2012 a 21,0 mm para as sementes dispersas de fevereiro/2013. Em relação á comparação de médias da parte aérea e radicular, ocorreu variação significativa, sendo a média da parte radicular maior que a aérea, com 16,3 e 6,1 mm, respectivamente. O tamanho total das plântulas também não diferiu estatisticamente entre os tratamentos avaliados. Apresentou tamanho total com amplitude de 17,9 mm (sementes dispersas do mês de dezembro/2012) a 27,0 mm de comprimento (sementes dispersas do mês de fevereiro/2013) (Figura 5B).

O índice de velocidade de germinação (IVG), em relação aos períodos e aos tipos de coleta, apresentou-se muito heterogêneo, e variou de 1,15 para as sementes na inflorescência/dezembro/2012 e 0,42 para as sementes inflorescência/fevereiro/2013. Entretanto, este índice

comprovou os resultados dos testes de germinação, com IVG 1,15 para sementes na inflorescência e 0,84 para as dispersas em dezembro/2012. Para os meses de janeiro e fevereiro/2013 as sementes na inflorescência apresentaram IVG 1,08 e 0,42, e para as sementes dispersas 1,01 e 0,67, respectivamente (Figura 5C).

Considerando os testes de tetrazólio, germinação e o IVG, as sementes nos dois estádios de desenvolvimento (dispersas e na inflorescência) de dezembro/2012 apresentaram altos valores de vigor e viabilidade. Assim como para janeiro/2013, com exceção das sementes na inflorescência, no teste de tetrazólio, o qual apresentou baixa viabilidade, possivelmente devido a diferentes fatores morfológicos e fisiológicos da planta e pela influência climática (LATTUADA et al., 2012; SHIBATA, 2013). Foi observado que para a espécie *S. luzulifolia* Less. (Asteraceae) o ponto de maturação fisiológica causou diferenças durante testes de viabilidade. As média de germinação para sementes aderidas a inflorescência foram de 29% e 77% para as sementes soltas, em temperatura de 20°C (LATTUADA et al., 2012), devido à coleta de sementes ainda imaturas, as quais necessitavam de reservas da planta mãe.

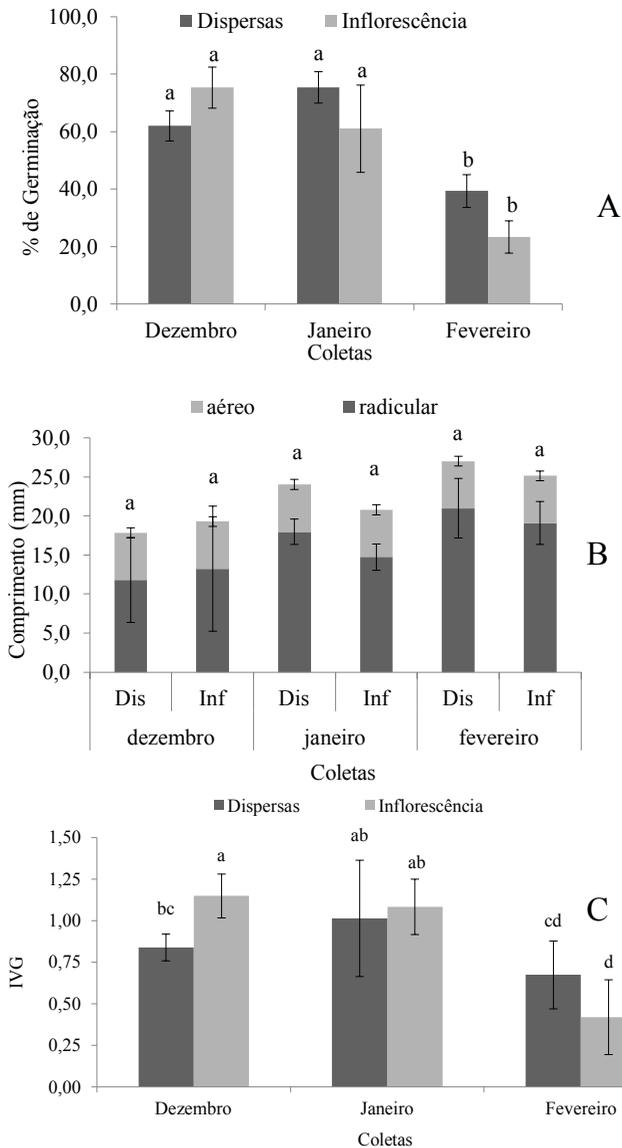


Figura 5: Testes aplicados as sementes de *Trichocline catharinensis*, germinadas em câmara de germinação, de coletas realizadas nos meses de dezembro/2012, janeiro/2013 e fevereiro/2013 para sementes dispersas e na inflorescência. A) Porcentagem de germinação; B) Comprimento aéreo e radicular; C) Índice de Velocidade de germinação.

5.4 DESENVOLVIMENTO DAS INFLORESCÊNCIAS, SEMENTES E EMBRIÃO: CARACTERIZAÇÃO EXTERNA E INTERNA

Com base nas observações “*in loco*” e posteriormente com a separação e processamento do material por meio de técnicas histológicas, foram caracterizadas quatro fases de desenvolvimento incluindo a inflorescência e a semente de *T. catharinensis*. Foi observado nas fases I, II, III e IV (Figura 6) a ocorrência de mudanças na coloração e formação dos tecidos internos durante o desenvolvimento da inflorescência e sementes.

Na fase I a inflorescência apresentou coloração verde clara, as lígulas estavam em desenvolvimento, assim como as flores (Figura 6A,E). A flor possuía os papus e o ovário com coloração amarela clara (Figura 6I), e o ovário ainda estava em desenvolvimento, com a formação dos tecidos (Figura 6M).

A fase II possuía a inflorescência com papus bem desenvolvidos, e coloração amarela. As flores estavam abertas, com suas estruturas reprodutivas em antese, aptas a receber o pólen (Figura 6B,F). As flores apresentavam ovários e papus maiores que na fase I, e estigma e anteras abertos (Figura 6J). No desenvolvimento ovariano foi observada a formação da região seminal, e as células já apresentavam maior diferenciação de tecidos (Figura 6N).

Na fase III a inflorescência apresentou coloração marrom, as lígulas entraram em senescência, assim como a parte reprodutiva, e os papus apresentaram-se bem evidentes (Figura 6C, 6G). Os frutos passaram a ser chamadas de cipselas (GALASTRI; OLIVEIRA, 2010) ou aquênios, devido à fecundação. Martins e Oliveira (2007) definem que os frutos de Asteraceae são enquadrados como aquênio ou cipsela, sendo um tipo especial de fruto seco, indeiscente, característico da família, no qual o tegumento da semente e a parede do fruto são justapostos, porém independentes. Enquanto que os papus apresentaram grande volume (Figura 6K). A semente possuía embrião globular em desenvolvimento, com endosperma ocupando grande espaço (Figura 6O).

Durante a fase IV a inflorescência se abriu para a dispersão os aquênios. E esta apresentava um formato arredondado, com papus abertos e sementes com coloração desde marrom clara a escuras (Figura 6D,H,L). Nesta fase do desenvolvimento o embrião apresentou-se bem desenvolvido ou maturo, com os cotilédones e regiões meristemáticas definidas (Figura 6P).

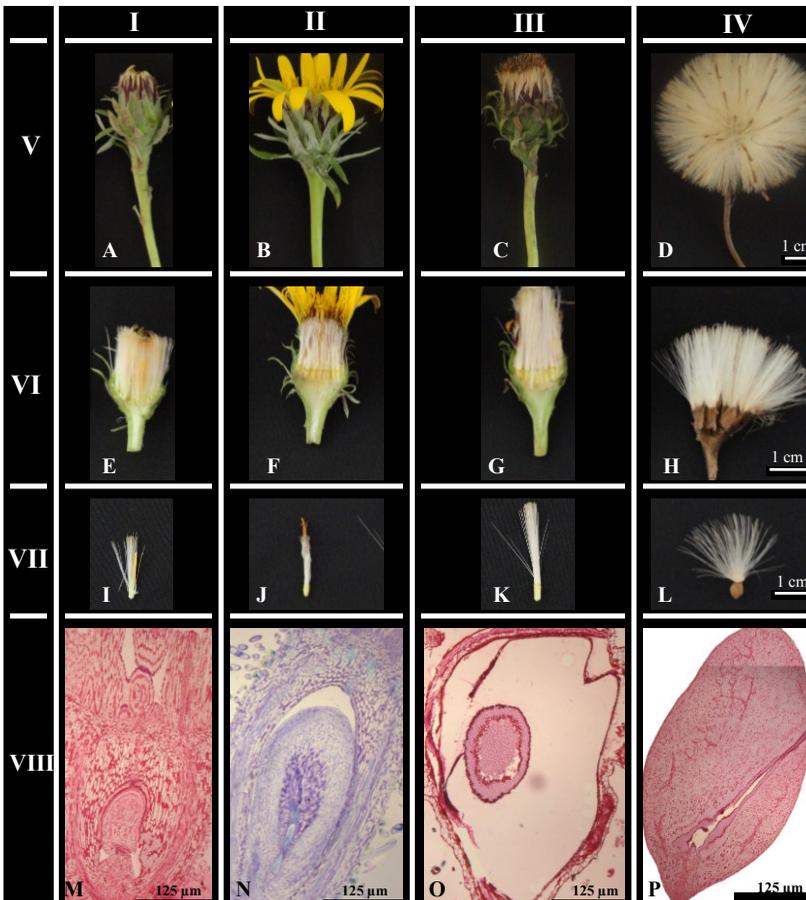


Figura 6: Desenvolvimento de inflorescências, sementes e embrião de *Tricholine catharinensis*, com alterações morfológicas e fisiológicas, apresentadas macro e microscopicamente: I) desenvolvimento da inflorescência, II) da região seminal; III) do embrião globular; IV) do embrião cotiledonar; V(A,B,C,D)- inflorescências em diferentes estádios de desenvolvimento; VI(E,F,G,H)- inflorescências seccionadas ao meio, com características internas visíveis; VII(I,J,K,L)- modificações de um aquênio individualizado ao longo do desenvolvimento VIII(M,N,O,P)- características histoquímicas do desenvolvimento de sementes. (M,O,P - Ácido Periódico de Schiff; N- Azul de Toluidina).

5.5 MODIFICAÇÕES MORFOHISTOQUÍMICAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA INFLORESCÊNCIA, SEMENTE E EMBRIÃO

A espécie *T.catharinensis*, como cita Galastri e Oliveira (2010) para as Asteraceae, apresentou órgãos reprodutivos morfológicamente homogêneos, com ovário ínfero, sincarpico e bicarpelar, com um único óvulo unitegumentado e basal. A epiderme externa apresentou-se unisseriada, composta por células cuboides justapostas, de citoplasma denso e núcleos evidentes e numerosos tricomas (Figura 7A). Estas mesmas características foram observadas por Martins e Oliveira (2007) em *Vernonia brevifolia* e *V. herbácea* (asteraceas). Ainda nestas espécies foi observado que o mesófilo ou tegumento ovariano foi formado por duas regiões distintas, sendo mesófilo interno e externo (MARTINS; OLIVEIRA 2007). Para *T. catharinensis* o mesófilo externo, apresentou uma a três camadas de células, com núcleos evidentes. Já no mesófilo interno foi observado de seis a nove camadas de células, com núcleos evidentes. No mesófilo foram observados os cordões procambiais (cp), iniciando diferenciação, disposto entre o mesófilo externo (me) e o interno (mi) (Figura 7A).

Durante observações, foi visualizado que no óvulo (ov) ocorreu a diferenciação de tegumento externo (te) e interno (ti). O tegumento externo (te) com uma a duas camadas de células, com formato cuboide e núcleos visíveis, e o tegumento interno (ti) apresentou aproximadamente cinco a sete camadas de células, mais arredondadas e desorganizadas que o tegumento externo, e núcleos visíveis. Ao centro foi observada a formação da região seminal (*) (Figura 7B), onde a célula ovo ou célula do megásporo diferencia-se. Na figura 7B, em sua extremidade, foi visualizada a presença dos papus, com camadas de células alongadas, e na outra extremidade a região do carpopódio, a qual une a flor à inflorescência, com células pequenas e arredondadas. Em trabalho de Julio e Oliveira (2009) os papus também estavam presentes, assim como na maior parte das Asteraceae, favorecendo a dispersão por longas distâncias. Os papus podem estar envolvidos com a absorção de água, uma vez que a maioria destas espécies cresce em ambientes secos (SANCHO; KATINAS 2002).

Na a figura 7A, com coloração de azul de toluidina, que identifica polissacarídeos ácidos, foram visualizados nos tecidos do fruto e do óvulo constituídos de polissacarídeos, principalmente nas paredes celulares. Assim como a coloração de ácido periódico de Schiff, que identifica polissacarídeos neutros, como celulose, hemicelulose e

glicoproteínas (ABUD et al., 2010), também estava presente nas paredes celulares, constituindo suas camadas. Os polissacarídeos são encontrados na forma solúvel e insolúvel, e são fonte de carbono, bem como protegem contra efeitos negativos da desidratação (SHIBATA, 2013). Os polissacarídeos ocorreram em grande quantidade na composição celular, tanto durante o desenvolvimento do fruto, do óvulo e do embrião até a maturação (Figura 7).

Durante a formação da célula do megásporo houve diferenciação da camada de células do endotélio (en) e formação da cavidade seminal (Figura 7C) com a formação da célula ovo (me) e a degeneração das demais. Souza (2009) explica que as células do óvulo podem se diferenciar das demais, formando conteúdo citoplasmático denso e núcleos conspícuos, sendo denominadas células esporogênicas ou arqueosporiais. A célula mãe do megásporo, originada por divisão da célula arqueosporial, sofreu divisões meióticas e formou uma tétrade de células, que são chamadas de megásporos. Destas células três degeneraram e uma desenvolveu (SOUZA, 2009). Quando as estruturas estavam formadas e aptas, ocorreu a fecundação, e desenvolvimento do embrião. Em *T.catharinensis* durante o desenvolvimento do embrião (em) foram observados os estádios de desenvolvimento globular (Figura 7D) e cotiledonar (figura 7E). Foi observado que quando o embrião estava no estágio globular apresentou grande volume de endosperma (eo) e fina camada de endotélio (en) (Figura 7D).

Durante o estágio globular de desenvolvimento do embrião, este apresentou grande acúmulo de polissacarídeos (Figura 7D), os quais formaram uma camada na região cotiledonar (Figura 7E). Foi reportado que estes polissacarídeos são indispensáveis para a germinação e desenvolvimento das plântulas, devido à disponibilização de energia (SHIBATA, 2013).

Já no estágio cotiledonar, foi identificado os cotilédones bem visíveis, assim como a região meristemática, com meristema apical (pl) e radicular (ra) (Figura 7E,F). A região meristemática apresentou células com núcleos grandes e evidentes (#), que ocuparam grande parte do citoplasma (Figura 7G). Foi observado que ao longo do desenvolvimento do embrião o tegumento diminuiu sua espessura e ficou desorganizado corroborando com as informações descritas por Carvalho e Nakagawa (2012), para sementes em geral.

De acordo com Rogge-Renner et al. (2012), os carboidratos (polissacarídeos) que estavam distribuídos na parede celular, podem ser além dos componentes já citados, o amido. Desta forma, os carboidratos

podem ser uma reserva energética e no presente trabalho foram observados principalmente no embrião cotiledonar (Figura 7E,F,G).

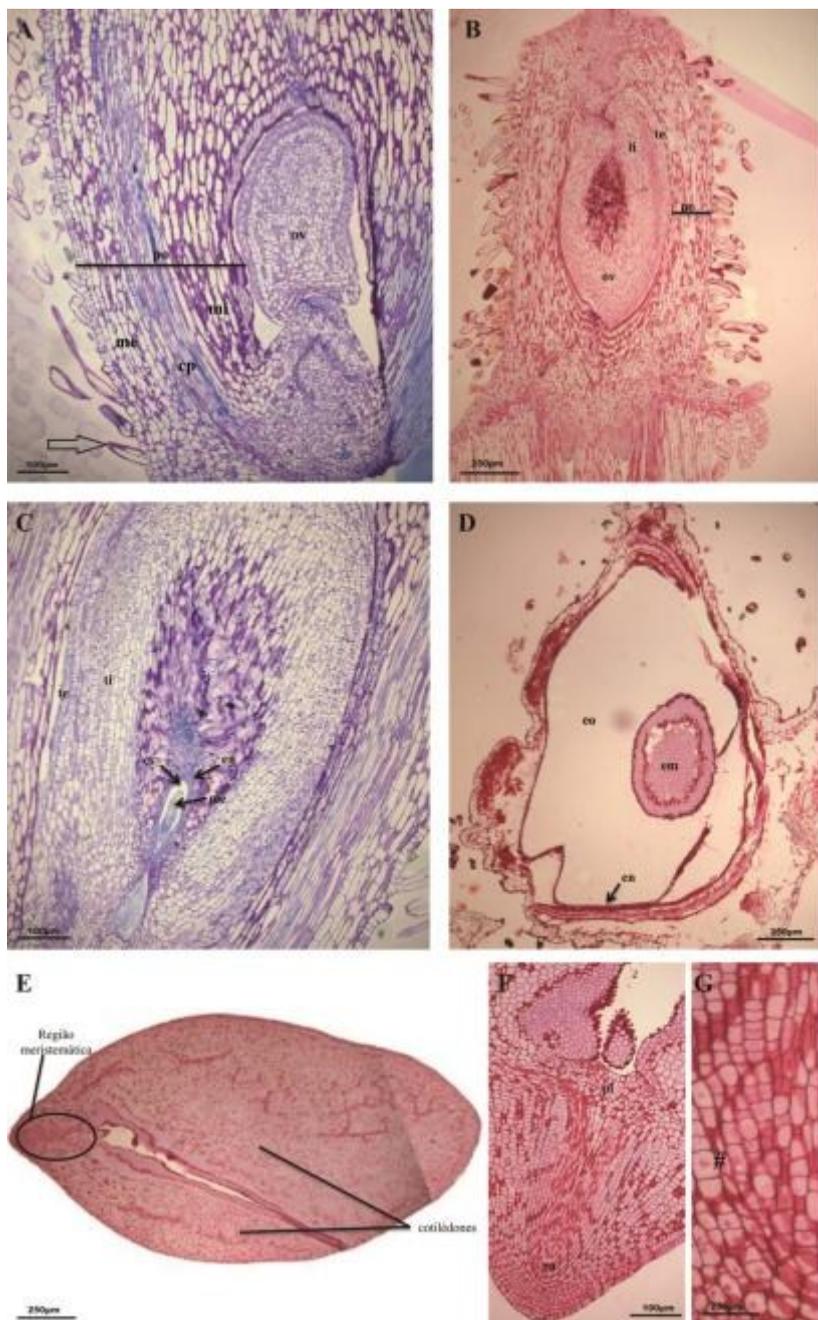


Figura 7: Caracterização morfohistológica com imagens em microscopia de luz do desenvolvimento de inflorescências, sementes e embriões de *Trichocline catharinensis*. A) desenvolvimento da parede ovariana (po) e do óvulo (ov); B) presença de região seminal; C) formação da célula ovo ou megasporo; D) desenvolvimento embrionário em estágio globular; E) embrião cotiledonar; F) região meristemática do embrião cotiledonar; G) células meristemáticas. (po: parede ovariana; ov: óvulo; *: nucelo; me: células que formarão célula ovo/megasporogênese; eo: endosperma; en: endotélio; em: embrião; #: células meristemáticas; te: tegumento externo; ti: tegumento interno; cs: cavidade seminal; pl: plumula; ra: radícula; me: mesófilo externo; mi: mesófilo interno; cp: cordão procambial; seta: tricomas). A,C- Azul de Toluidina; B,D,E,F,G- Ácido Periódico de Schiff.

5.6 CARACTERÍSTICAS HISTOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DA SEMENTE

Macroscopicamente notou-se a diferença entre sementes viáveis e inviáveis, devido ao maior tamanho e coloração mais clara das viáveis, em relação às inviáveis (Figura 8A), conforme já mencionado anteriormente. Sob estereomicroscópio foi possível visualizar que internamente as sementes viáveis apresentavam tecido de preenchimento com coloração amarelada (Figura 8B), já as sementes inviáveis apresentavam um tecido seco e mais escurecido (Figura 8C).

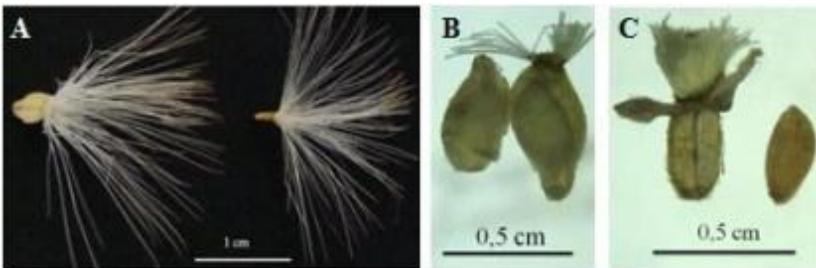


Figura 8: Estrutura macroscópica de sementes de *Trichoclina catharinensis*. a) semente viável e inviável; b) característica interna de sementes viáveis; c) característica interna de sementes inviáveis.

Em sementes viáveis de *T. catharinensis* (Figura 9) foi observado à formação de embriões em estágio cotiledonar (Figura 9A). Para a formação de uma plântula normal, a região meristemática (Figura 9B) deve ter a capacidade de diferenciar os tecidos (TAIZ; ZEIGER, 2009).

As camadas de células externas dos cotilédones apresentaram polissacarídeos e proteínas nas paredes celulares e citoplasma. Estes tecidos reagiram com o azul de toluidina e ácido periódico de Shiff, demonstrando que possuía polissacarídeos, e com o azul brilhante de Comassie, corando as proteínas (Figura 9C,D,E) (ROGGE-RENNER et al., 2012).

Sugere-se que esta deposição de carboidratos (polissacarídeos) nas paredes celulares dos cotilédones serve para a germinação e desenvolvimento inicial (SHIBATA, 2013). Para as camadas de células mais internas dos cotilédones, as proteínas estavam concentradas no citoplasma (Figura 9D). As proteínas possuem a função de fornecer aminoácidos essenciais para o processo de germinação e desenvolvimento inicial da plântula, a partir do crescimento embrionário (SHIBATA, 2013). Foi observado que as células da região cotiledonar

apresentaram núcleos pequenos (Figura E), visíveis ou não, e as células da região meristemática possuíam células em formato arredondado ou muitas vezes cuboide, com núcleos grandes e evidentes (Figura 9F).

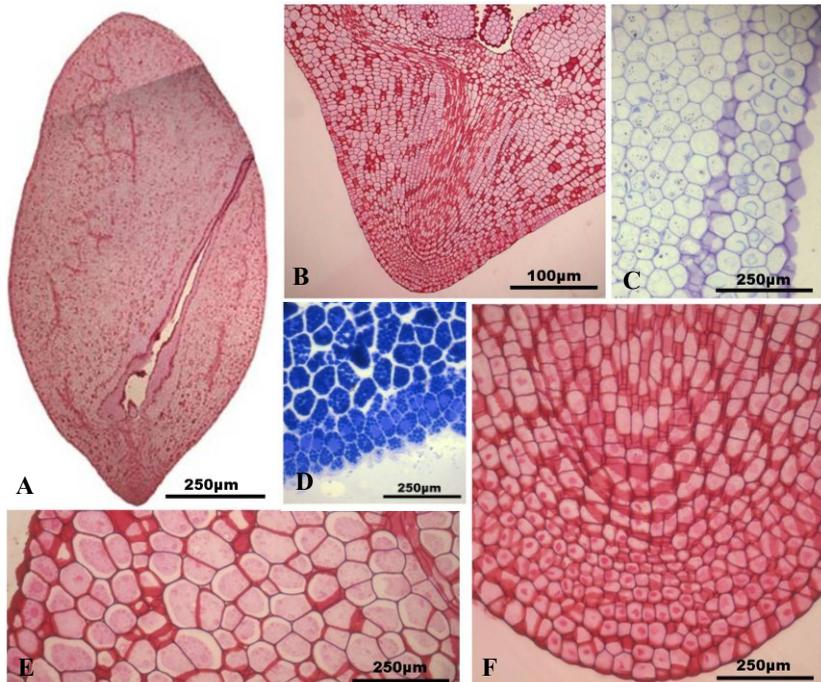


Figura 9: Características histoquímicas de semente de *Trichocline catharinensis*. A) embrião maturo; B) região meristemática do embrião; C,D,E) células da região cotiledonar; F) células da região meristemática; A,B,E,F- ácido periódico de Schiff; C- azul de toluidina; D- azul brilhante de Comassie.

6 CONCLUSÃO

A germinação das sementes de *T. catharinensis* iniciou aos 10 dias, após implantação do teste, com a protusão da radícula.

Os meses de dezembro/2012 e janeiro/2013 foram os mais apropriados para a coleta e germinação de *T. catharinensis*, sendo observado maior vigor e viabilidade. As coletas de sementes de fevereiro/2013 apresentaram menor vigor e viabilidade, comparativamente aos demais meses coletados. O substrato que obteve os melhores resultados para a germinação foi o papel filtro.

A caracterização da inflorescência, semente e embrião de *T. catharinensis* permitiu a identificação de diferentes tecidos e composições químicas, e quatro fases principais de desenvolvimento. A (I) formação e desenvolvimento da inflorescência; (II) da região seminal; (III) do embrião globular; (IV) dos cotilédones e região meristemática.

Com os resultados apresentados neste trabalho, conclui-se que a espécie *T. catharinensis* possui bom potencial de germinação, com viabilidade e vigor das sementes. E estes dados podem ser utilizados como informações iniciais para o desenvolvimento de estratégias de uso desta espécie como planta ornamental, bem como para o desenvolvimento de estratégias e conservação da mesma.

Recomenda-se a coleta e germinação de sementes de *T. catharinensis* nos períodos de dezembro e janeiro, as quais podem ser utilizadas para ornamentação em canteiros e áreas abertas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos resultados encontrados, este foi um trabalho inicial e que estudos adicionais devem ser realizados incluindo modificações metodológicas as quais não foram possíveis de serem executadas no presente trabalho. No entanto, as informações aqui levantadas são essenciais, especialmente pelo fato de estudar as sementes de uma espécie nativa, com potencial ornamental e atualmente em estado de vulnerabilidade. Adicionalmente, este trabalho permitiu o contato e aprendizado de diferentes procedimentos laboratoriais em testes aplicados no estudo das sementes. Estas metodologias podem ser utilizadas e ampliadas para o estudo de sementes de espécies florestais nativas pouco conhecidas.

Para a continuidade deste trabalho deve-se acompanhar o desenvolvimento *in situ* das plantas matrizes, com coletas periódicas de inflorescências marcadas após a antese das flores. Isto permitirá melhor precisão da descrição quanto às fases de desenvolvimento da semente e embrião. Ainda devem ser feitos futuros trabalhos de caracterização bioquímica da semente, como a análise de proteínas para auxiliar na caracterização fisiológica da semente a partir de dias após a antese, bem como aqueles relacionados ao comportamento recalcitrante ou ortodoxo das sementes.

REFERÊNCIAS

- ABUD, H.F.; GONÇALVES, N.R.; REIS, R.D.G.E; GALLÃO, M.I.; INNECCO, R. Morfologia de sementes e plântulas de cártamos. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza-PE, v. 41, n. 2, p. 259-265, abr./jun. 2010.
- ARNOLD, W.; MITRENGA, D.; MAYRESBACH, H. Gefriertro und einbsttung in glycolmethacrylat (GMA) – Ergebnisse Histochemischer Reaktionen. **Acta Histochem**, v.14, p. 271-277. 1975.
- BARRETO, W. S. **Variación de la biodiversidade del pasto en áreas sometidas al pastoreo racional**. 2008. 183 f. Tese (Doutorado em Biología Ambiental) - Universidad de León, León, 2008.
- BARROS, C.S.; ROSSETTO, C.A.V. Teste de germinação sob condições de restrição hídrica para avaliar o vigor de sementes de girassol. **Ciência Rural**, Santa Maria-RS, v.39, n.9, p.2621-2624, dez. 2009.
- BOUZON, Z. L. **Aspectos histoquímicos e ultra-estruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypnea musciformis* (Gigartinales – Rhodophyta)**. 1993. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biología Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Paraná, 1993.
- BORGHETTI, F. Dormência embrionária. In: FERREIRA, A. G. e BORGHETTI, F (org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, 2004. p. 109-123.
- BORGHETTI, F.; FERREIRA, A. G. Interpretação de resultados de germinação. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F (org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, 2004. p. 209-222.
- BRASIL. Lei nº 14.675, de 13 de abril de 2009. **Institui o Código Estadual do Meio Ambiente e estabelece outras providências**, Florianópolis, Santa Catarina, p. 92, abr. 2009a.
- BRASIL. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009b. 399p.

BUCKUP, G. B. (Org.). **Biodiversidade dos campos de cima da serra**. 2. ed. Libretos: Porto Alegre, 2010. 196p.

CABRERA, A. L.; KLEIN, R. M. **Compostas Tribo: Mustisieae**. 1. ed. Itajaí: P. Raulino Reitz, 1973. 124p.

CANCELLI, R. R. **Palinologia de Asteraceae: Morfologia polínica e suas implicações nos registros do quartenário do Rio Grande do Sul**. 2008. 173 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

CANCELLI, R. R.; EVALDT, A. C. P.; BAUERMANN, S. G. Contribuição à morfologia polínica da família Asteraceae Martinov. no Rio Grande do Sul- Parte I. **Pesquisas Botânica**, São Leopoldo, n. 58, p. 347-374. 2007.

CARDOSO, R. D. L. **Caracterização morfológica e citológica de Gérbera: subsídio para melhoramento genético**. 2007. 175 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2007.

CARDOSO, R. D. L.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; GRANDO, M. F. Divergência genética em um conjunto de acessos de Gerbera e cravo-do-campo-catarinense. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre-RS, v. 5, n.1, p.465-467, jul. 2007.

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

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução n. 423**, de 12 de abril. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, p. 55-57, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=628>>. Acesso em: 18 maio 2012.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. (Org.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro- Região Sul**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011.934p.

DE CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.;

BORGHETTI (org.). **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre, 2004. p. 149-162.

DE MELO, P.R.B; OLIVEIRA, J.A.; DE CARVALHO, M.L.M.; GUIMARÃES, R.M.; CARVALHO, B.O. Aplicação do teste de raios X no estudo da morfologia interna e da qualidade fisiológica de aquênios de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, [Londrina-PR], v. 31, n. 2, p.146-154, [out.]. 2009.

DUARTE, E. F.; DOS SANTOS, J. A.; PEIXOTO, J. S.; SANTOS, C. H. B. Maturação e dormência em diásporos de carrapicho-de-carneiro (*Acanthospermum hispidum* DC.- Asteraceae). **Revista Brasileira de Sementes**, [Londrina-PR], v. 34, n. 3 p. 441-449, [fev.]. 2012.

FERNANDES, A. C.; RITTER, M. R. A família Asteraceae no Morro Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre-RS, v.7, n.4, p.395-439, out./dez. 2009.

FERREIRA, A. G.; CASSOL, B.; DA ROSA, S. G. T.; DA SILVEIRA, T. S.; STIVAL, A. L.; SILVA, A. A. Germinação de sementes de Asteraceae nativas no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta bot. Bras**, São Paulo-SP, v. 15, n. 2, p. 231-242, mai./ago. 2001.

FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed. 2004. 324p.

GALASTRI, N. A.; DE OLIVEIRA, D. M. T. Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de *Vernonia platensis* (Spreng.) Less. (Asteraceae). **Acta bot. Bras**, [Belo Horizonte-MG], v. 24, n. 1, p. 73-83, mar. 2010.

GUIMARÃES, T. G.; OLIVEIRA, D. A.; MATOVANI-ALVARENGA, E.; GROSSI, J. A. S. Maturação fisiológica de sementes de Zínia (*Zinnia elegans* Jacq.). **Revista Brasileira de sementes**, [Londrina-PR], v. 20, n. 1, p.07-11, Santa Maria- RS.1998.

GODINHO, M. A. S.; MANTOVANI-ALVARENGA, E.; VIEIRA, M. F. Germinação e qualidade de sementes de *Adenostemma brasilianum* (PERS.) Cass., Asteraceae nativa de sub-bosque de Floresta Atlântica. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.35, n.6, p.1197-1205. 2011.

GUEDES, R.S.; ALVES, E. U.; GONÇALVES, E. P; BRAGA JÚNIOR, J.M. VIANA, J.S.; COLARES, P.N.Q. Substratos e temperaturas para testes de germinação e vigor de sementes de *Amburana cearenses* (Allemão) A.C. Smith. **Rev. Árvore**, Viçosa-MG, v.34, n.1, p.57-64. 2010.

GROMBONE- GUARATINI, M. T.; SOLFERINI, V. N.; SEMIR, J. Reproductive biology in species of *Bidens* L. (Asteraceae).**Sci. Agric**, Piracicaba-SP, v.61, n.2, p.185-189, mar./abr. 2004.

IANNUZI, R; VIEIRA, C. **Paleobotânica**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005. 167p.

JULIO, P.G.D.S; OLIVEIRA, D.M.T. Morfoanatomia comparada e ontogênese do pericarpo de *Bidens gardneri* Baker e *B. pilosa* L. (Asteraceae). **Revista Brasil. Bot.**, São Paulo, v.32, n.1, p.109-116, jan./mar. 2009.

LATTUADA, D.S; PEZZI, A.; CALIL, A. C.; LEONHARDT, C.; FIOR, C.S. Conservação de diásporos de *Schlechtendalia luzulifolia* Less. (Asteraceae). **Pesq. Agrop. Gaúcha**, Porto Alegre-RS, v.18, n.2. ago.2012.

LIVRAMENTO, G. *Trichocline catharinensis*: cravo-comum. In: CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro- Região Sul**. Brasília, 2011. p. 824- 828.

LIVRAMENTO, G.; ZOLDAN, S. R. **Plantas nativas do planalto catarinense com potencial ornamental**: resultados preliminares. Florianópolis: Epagri, 2006. 23p. (Documento n. 227).

LOPES, V. G. **Quantificação das raízes finas em um povoamento de *Pinus taeda* L., na região dos Campos de Cima da Serra, RS**. 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2009.

MALUF, A. M.; WIZENTIER, B. Aspectos fenológicos e germinação de sementes de quatro populações de *Eupatorium vauthierianum* DC. (Asteraceae). **Revista. brasil. Bot.**, São Paulo-SP, v.21, n. 3, dez. 1998.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. P. 495.

MARTINS, M. A. G.; OLIVEIRA, D. M. T. Morfoanatomia comparada dos frutos em desenvolvimento de *Vernonia brevifolia* Less. e *V. herbácea* (Vell.) Rusby (Asteraceae). **Revista Brasil. Bot.**, São Paulo, v.30, n.1, p.101-112, jan./mar. 2007.

MELO, R. B. **Caracterização das reservas das sementes e avaliação da germinação e formação de plântulas de nove espécies arbóreas de florestas alagáveis da Amazônia**. 2013. 72 f. Dissertação (Mestre em Botânica) - Universidade de Brasília. Brasília, 2013.

MOCCHINSKI, A. Y.; SCHEER, M. B. Campos de altitude na Serra do Mar Paranaense: Aspectos florísticos. **Floresta**, Curitiba-PR, v.38, n.4, p.625-640, out./dez. 2008.

MONGE, M. *Trichocline*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB005516>>. Acesso em: 21 julho 2013.

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

OVERBECK, G. E.; MÜLLER, S. C.; FIDELIS, A.; PFADENHAUER, J.; PILLAR, V. D.; BLANCO, C. C.; BOLDRINI, I. I.; BOTH, R.; FORNECK, E. D. Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. **Perspectives in plantecology, evolution and systematic**. [S.I.], v. 9. n. 2. p. 101-116. Dez. 2007.

PESKE, S. T.; ROSENTHAL, M. D'AVILA; ROTA, G. R. M. **Sementes: Fundamentos Científicos e Tecnológicos**. 1. ed. Pelotas: Rua, 2003. 415p.

RADAESKI, J. N.; EVALDT, A. C. P.; De LIMA, G. L.; BAUERMAN, S. G. Grãos de pólen das formações campestres sul-brasileiras. **Revista de iniciação científica da ULBRA**, Canoas- RS, p. 59-67, Anual. 2011. Disponível em:

<<http://www.ulbra.br/palinologia/graos-de-polen-das-formacoes-campestres-sul-brasileiras.pdf>>. Acesso em: 26 setembro 2013.

ROGGE-RENNER, G. D.; STEINER, N.; SCHMIDT, E. C.; BOUZON, Z. L.; FARIAS, F. L.; GUERRA, M. P. Structural and component characterization of meristem cells in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze zygotic embryo. **Protoplasma**, [S.I.], v. 250. n. 3. p. 731-739. set. 2012.

SANCHO, G.; KATINAS, L. Are the trichomes in corollas of mustisieae (Asteraceae) really twin hairs?. **Botanical Journal of the Linnean Society**. The Linnean Society of London. [London], v. 140, [s.n.], p. 427-433, 2002.

SANTOS, S. F. **Estrutura e histoquímica de sementes do gênero *Theobroma* L. (Sterculiaceae)**. 2003.105 f. Dissertação (Magister Scientiae) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

SCHNEIDER, A. A.; IRGANG, B. E. Florística e fitossociologia viária no município de Não-Me-Toque, Rio Grande do Sul, Brasil. **IHERINGIA**, Porto Alegre-RS, v.60, n.1, p.49-62, jan./jun. 2005.

SCLICK, F. E. **Alternativas de manejo para os campos de cima da serra**. 2004. 101 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SHIBATA, M. **Maturidade de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze: alterações fisiológicas, bioquímicas e conservação na pós-colheita**. 2013. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

SOUZA, L. A. (org.). **Sementes e Plântulas: germinação, estrutura e adaptação**. Ponta Grossa, PR: Todapalavra, 2009. 280p.

STEWART W. N. **Paleobotany and the evolution of plants**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987. 405p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 722p.

VELTEN, S. B.; GARCIA, Q. S. Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Eremanthus* (Asteraceae), ocorrentes na Serra do Cipó, MG, Brasil. **Acta bot. bras.**, Minas Gerais, v. 19, n. 4, p. 753-761. abr. 2005.

WILLBERGER, T. P.; STRANZ, A; PAZ, C.; BOENI, B.; CANCELLI, R.; BAUERMANN, S. G.; DUTRA, T.I.; MONDIN, C. A. (Orgs.). **Flora do Setor Oriental do Planalto Sul-rio-grandense**. Guia de espécies vegetais. 1.ed.São Leopoldo: ALPP, 2004. 59p.

ZANIN, A.; LONGHI-WAGNER, H. M.; SOUZA, M. L. D'ei R.; RIEPER, M. Fitofisionomia das formações campestres dos Campos dos Padres, Santa Catarina, Brasil. **INSULA**, Florianópolis-SC, n.38, p.42-57. 2009.