

ANIELI CIOATO DE SOUZA

DORMÊNCIA EM SEMENTES DE *Ilex paraguariensis*

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Produção Vegetal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal.

Orientadora: Dra. Luciana Magda de Oliveira

**LAGES
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Souza, Anieli Cioato de
Dormência em Sementes de *Ilex paraguariensis* /
Anieli Cioato de Souza. – Lages , 2018.
80 p.

Orientadora: Luciana Magda de Oliveira
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages,
2018.

1. Erva-mate. 2. Qualidade de sementes. 3.
Pirênios. I. Oliveira, Luciana Magda de. II.
Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa
de Pós-Graduação. III. Título.

ANIELI CIOATO DE SOUZA

DORMÊNCIA EM SEMENTES DE *Ilex paraguariensis*

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal.

Banca examinadora:

Orientadora:

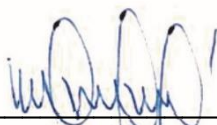


Profa. Dra. Luciana Magda de Oliveira
Universidade do Estado de Santa Catarina

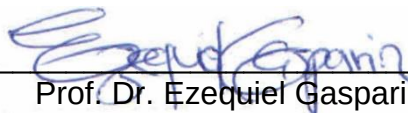
Membros:



Prof. Dr. Eduardo Euclides de Lima e Borges
Universidade Federal de Viçosa



Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho



Prof. Dr. Ezequiel Gasparin
Universidade Federal de Santa Maria



Profa. Dra. Katiane Paula Bagatine
Universidade do Oeste de Santa Catarina

Lages- SC, 30/07/2018

Aos meus pais, meu irmão e meu noivo,
por acreditarem e apoiarem na realização
do meu sonho. Obrigada pelo amor e
paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por abençoar cada passo dado ao longo da minha vida.

Aos meus pais, Iracilio e Ana Lúcia, e ao meu irmão Vagner pelo carinho e apoio em todos os momentos de minha vida. Agradeço a educação que recebi, por terem acreditado juntamente comigo nos meus sonhos, e estar conquistando um deles.

Ao meu noivo Mauricio, pelo amor, paciência, apoio, preocupação, companheirismo e ajuda durante a minha pós-graduação.

À minha cunhada, Greice, por ser amiga e companheira, pela compreensão e auxílio em todos os momentos.

Às minhas avós, tios e primos, por terem acreditado no meu potencial e me apoiado em minhas decisões.

Aos meus sogros, Cláudio e Eliane e cunhado Murilo, pelo apoio e momentos bons que compartilhamos.

À minha orientadora Prof. Dra. Luciana Magda de Oliveira, minha inspiração. Obrigada por ter acreditado no meu potencial, ter me apoiado, creditado confiança em todas as etapas e auxiliado na realização desse trabalho, por ter sido mais que orientadora e sim uma grande amiga. Ao meu coorientador PhD. Hugh W. Pritchard, pela confiança, incentivo e auxílio na realização deste trabalho no Millenium Seed Bank.

A todos os professores do CAV/UDESC, em especial ao professor Dr. Julio Cesar Pires Santos, pela disponibilidade e auxílio para a coleta de sementes. A todos os professores que tive ao longo da vida. É por cada ensinamento que me foi dado que hoje conquisto esse mérito.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pela oportunidade de realizar minha pós-graduação. A CAPES por financiarem meus estudos. Ao Millennium Seed Bank, do Royal Botanic Gardens, KEW, por me receber para o doutorado sanduíche.

Aos meus colegas do Laboratório de Sementes Florestais UDESC/CAV pelas nossas conversas e risadas no dia-a-dia no laboratório. Aos pesquisadores, amigos

e colegas do Millenium Seed Bank, pelas experiências compartilhadas. Em especial agradeço aos meus amigos do peito, por terem dividido as aflições e me proporcionado momentos de muita felicidade.

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste sonho, do fundo do meu coração, pois é impossível escrever tamanha minha gratidão.

RESUMO

SOUZA, Anieli Cioato de. **Dormência em sementes de *Ilex paraguariensis***. 2018, 80f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal – Área: Fisiologia e Manejo de Plantas) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal. Lages, 2018.

Objetivou-se determinar e quantificar as possíveis causas da baixa germinação de *Ilex paraguariensis*, através de parâmetros físicos, fisiológicos e sanitário das sementes (Capítulo I); identificar e descrever aspectos morfológicos do pirênio e histológicos dos embriões em diferentes estádios de desenvolvimento (Capítulo II); investigar a(s) causa(s) da dormência de sementes de *Ilex paraguariensis* (Capítulo III); determinar os efeitos da temperatura, da escarificação mecânica e do ácido giberélico (GA3) na superação de dormência e na germinação de sementes de *I. paraguariensis* (Capítulo IV). Para determinar as possíveis causas da baixa germinação, as sementes foram classificadas em vazias, deterioradas, predadas e cheias (embriões visualizados e embriões não visualizados). Para descrever os aspectos morfológicos e histológicos, os pirênios com os embriões visualizados, foram fixados para a análise anatômica, em solução de paraformaldeído, inclusos em historesina e seccionados em micrótomo. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina. Na investigação das causas da dormência foram realizados os seguintes testes: a) Dormência física: taxa de absorção em água e em azul de metileno; e detecção de lignina e suberina no endocarpo e tegumento, a partir de avaliações histoquímicas; b) Dormência fisiológica: bioensaios em sementes de alface e detecção de compostos fenólicos; c) Dormência morfológica: análise de embriões. No Capítulo IV, os pirênios foram pré-selecionados por meio de análise radiográfica, sendo submetidos aos experimentos apenas aqueles considerados cheios. Foram conduzidos dois experimentos: 1- Diferentes temperaturas (constantes e alternadas) e escarificação mecânica com lixa e; 2- Diferentes temperaturas e diferentes dosagens de ácido giberélico (Testemunha, 360 μ M, 720 μ M e 3600 μ M). De acordo com os resultados, foram verificadas quantidades elevadas de sementes vazias e deterioradas, assim como o ataque de insetos. No Capítulo II, os embriões foram classificados nos estádios globular, coração (ocupando aproximadamente 10% do comprimento da semente), pós coração (15% do comprimento), torpedo (20% do comprimento) e maduro (40% do comprimento); e foram localizados abaixo da micrópila, alinhado ao ponto externo. No Capítulo III, na taxa de absorção de água, foi verificado um aumento na massa das sementes; entretanto, na embebição em azul de metileno, ocorreu a absorção apenas no endocarpo. Os bioensaios com sementes de alface indicaram a presença de inibidores químicos. Na avaliação morfológica das sementes, apenas em 55,5%, das sementes cheias, os embriões foram visualizados e encontravam-se nos estádios globular ou coração, nas demais os embriões não foram visualizados. No Capítulo IV, não houve germinação nos pirênios escarificados. Nos pirênios intactos, foi verificada germinação apenas na temperatura 10/20 e 10/25 °C para apenas um dos lotes, e nas temperaturas de 15/25 e 20/30 °C para ambos. O tratamento que resultou em dados numéricos de germinação superiores foi em temperatura de 20/30 °C e 260 μ M de ácido giberélico (26%). Além da dormência, o número elevado de sementes vazias e danificadas é causa da baixa germinação. Para definir os estádios de desenvolvimento indica-se além da análise morfológica, o espaço em que o embrião ocupa no endosperma. A dormência de sementes de *Ilex paraguariensis* é devida a

causas física, morfológica e possivelmente fisiológica. Para a superação da dormência e germinação, recomenda-se a temperatura alternada de 20/30 °C e o uso do ácido giberélico na dosagem de 260 µM.

Palavras-chave: erva-mate, qualidade de sementes, pirênios.

ABSTRACT

SOUZA, Anieli Cioato de. **Dormancy in *Ilex paraguariensis* seeds**. 2018, 80f. Thesis (PhD in Plant Production – Area: Physiology and plant management)- Santa Catarina State University. Postgraduate Program in Plant Production. Lages, 2018.

The objective were to determine and quantify the possible causes of low germination of *Ilex paraguariensis*, through physical, physiological and sanitary parameters of the seeds (Chapter I); to identify and describe the morphological aspects of pyrenes and histological of embryos at different stages of development (Chapter II); to investigate the cause (s) of *Ilex paraguariensis* seed dormancy (Chapter III); to determine the effects of temperature, mechanical scarification and gibberellic acid (GA3) on dormancy overcoming and germination of *I. paraguariensis* seed (Chapter IV). To determine the possible causes of the low germination, the seeds were classified as empty, deteriorated, predated and full (visualized embryos and non-visualized embryos). To describe the morphological and histological aspects, the pyrenes with the embryos visualized were fixed for the anatomical analysis, in paraformaldehyde solution, included in historesin and sectioned in a microtome. The sections were stained with Toluidine Blue. In the investigation of the causes of dormancy, the following tests were performed: a) Physical numbness: rate of absorption in water and in methylene blue; and detection of lignin and suberin in the endocarp and integument, from histochemical evaluations; b) Physiological dormancy: bioassays in lettuce seeds and detection of phenolic compounds; c) Morphological dormancy: embryo analysis. In Chapter IV, the pyrenes were pre-selected by means of radiographic analysis, being submitted to the experiments only those considered full. Two experiments were conducted: 1- Different temperatures (constant and alternating) and mechanical scarification with sandpaper and; 2- Different temperatures and different dosages of gibberellic acid (Witness, 360 μ M, 720 μ M and 3600 μ M). According to the results, high amounts of empty and deteriorated seeds were verified, as well as insect attack. In Chapter II, the embryos were classified into the globular stages, heart (occupying approximately 10% of the length of the seed), post heart (15% of length), torpedo (20% of length) and mature (40% of length); and were located below the micropyle, aligned to the external point. In Chapter III, in the rate of water absorption, an increase in seed mass was observed; however, in methylene blue imbibition, absorption only occurred in the endocarp. Bioassays with lettuce seeds indicated the presence of chemical inhibitors. In the morphological evaluation of the seeds, only 55.5% of the seeds were filled, the embryos were visualized and were in the globular or heart stages, in the others the embryos were not visualized. In Chapter IV, there was no germination in scarified pyrenes. In the intact pyrenes, germination was only verified at 10/20 and 10/25 ° C for only one of the lots, and at temperatures of 15/25 and 20/30 ° C for both. The treatment that resulted in higher germination numerical data was at temperature of 20/30 ° C and 260 μ M of gibberellic acid (26%). In addition to dormancy, the high number of empty and damaged seeds causes low germination. In order to define the stages of development, it is indicated beyond the morphological analysis, the space in which the embryo occupies in the endosperm. The seed dormancy of *Ilex paraguariensis* is combined to physical, morphological and possibly physiological causes. To overcome dormancy and germination, the alternating temperature of 20/30 °C and the use of gibberellic acid in the dosage of 260 μ M are recommended.

Key-words: herb-mate, seed quality, pyrenes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sementes de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. classificadas como: Vazia (A); Deteriorada (B); Predada (C); Cheia, com embrião não visualizado (D); e Cheia, com embrião visualizado (E).	27
Figura 2 - Sementes de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. com sinais de predação.	28
Figura 3- Morfologia dos pirênios de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	34
Figura 4- Corte anatômico de pirênios de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil., com a presença de substâncias pécticas e lignina	35
Figura 5 - Localização do embrião nos pirênios de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. A: Vista lateral 1; B: Vista lateral 2 e; C: Pirênio cortado longitudinalmente.	36
Figura 6 - Pirênios de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. com embrião em estágio globular de desenvolvimento.....	37
Figura 7 - Pirênios de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. com embrião em estágio coração de desenvolvimento.....	37
Figura 8 - Pirênios de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. com embrião em estágio pós coração de desenvolvimento.....	38
Figura 9 - Pirênios de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. com embrião em estágio torpedo de desenvolvimento.....	39
Figura 10 - Pirênios de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. com embrião em estágio maduro de desenvolvimento.....	40
Figura 11- Pirênio de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil., com embrião envolto em cavidade contendo células com paredes lignificadas.	41
Figura 12 - Curva padrão de ácido gálico.	47
Figura 13 - Curva de hidratação de pirênios de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. baseada no ganho de massa (g) ao longo do tempo (h).....	49
Figura 14 - Pirênios de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. após imersão em solução de azul de metileno a 1% por 48 horas.....	50
Figura 15 - Pirênios lixados de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. após imersão em solução de azul de metileno a 1% por 48 horas.	51
Figura 16- Presença de lignina em pirênios de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	52

Figura 17- Presença de compostos lipofílicos em sementes de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	53
Figura 18 - Quantificação de compostos fenólicos no endocarpo e semente (tegumento, endosperma e embrião) de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	55
Figura 19 - Sementes de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. seccionadas longitudinalmente com embriões nos estádios globular (A) e coração (B).	56
Figura 20 -Dados climáticos (precipitação total, temperatura máxima e mínima) médios, dos anos 2015 a 2017, mensais dos municípios de Chapeco, SC e Ijuí, RS.	61
Figura 21 - Germinação (%) de pirênios intactos de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. dos lotes de Ijuí e Chapecó, no período de 300 dias incubados em diferentes temperaturas.	63
Figura 22 - Pirênios cheios (%) intactos ou escarificados de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil., condicionados à diferentes temperaturas, e avaliados por meio do teste de raios X..	64
Figura 23 - Classificação dos pirênios de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil., com o uso de raios X..	66
Figura 24 - Germinação (%), no período de 300 dias, de pirênios de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. submetidos a diferentes temperaturas e dosagens de ácido giberélico (GA ₃)	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagens de sementes vazias, deterioradas, predadas, cheias com embrião visualizado e cheias com embrião não visualizado, observadas em lotes de sementes de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.....	26
Tabela 2 - Correlação de Pearson entre as classes das sementes e variáveis climáticas.....	29
Tabela 3 - Viabilidade (%) de sementes cheias de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. com embrião visualizado e não visualizado, de diferentes procedências e/ou ano de coleta.....	30
Tabela 4 - Germinação (%) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de <i>Lactuca sativa</i> (alface), com extratos: aquoso 15% de sementes (tegumento, endosperma e embrião) e 20% de endocarpo hidroalcólico, 15% de sementes (tegumento, endosperma e embrião) e 20% de endocarpo de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	54
Tabela 5 – Germinação final (%) após 10 meses, de pirênios de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil., submetidos a diferentes temperaturas e concentrações de ácido giberélico (GA ₃).	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	20
2	CAPITULO I - CAUSAS DA BAIXA GERMINAÇÃO DE LOTES DE SEMENTES DE <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. (AQUIFOLIACEAE)	23
2.1	RESUMO.....	23
2.2	INTRODUÇÃO	23
2.3	MATERIAL E MÉTODOS	24
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
2.5	CONCLUSÃO.....	30
3	CAPITULO II - ASPECTOS MORFOLÓGICOS E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO APÓS A DISPERSÃO DE PIRÊNIOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.....	31
3.1	RESUMO.....	31
3.2	INTRODUÇÃO	31
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3.5	CONCLUSÕES	41
4	CAPITULO III - DORMÊNCIA COMBINADA EM PIRÊNIOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	43
4.1	RESUMO.....	43
4.2	INTRODUÇÃO	43
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.5	CONCLUSÃO.....	57
5	CAPITULO IV - TEMPERATURA, ESCARIFICAÇÃO MECÂNICA E ÁCIDO GIBERÉLICO NA SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA E GERMINAÇÃO DE PIRÊNIOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	59
5.1	RESUMO.....	59
5.2	INTRODUÇÃO	59
5.3	MATERIAL E MÉTODOS	61
5.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.5	CONCLUSÃO.....	69
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
	REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO GERAL

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. – Hil.) é uma espécie arbórea pertencente à família Aquifoliaceae, que ocorre no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (CARVALHO, 2003). Planta cuja ocorrência é endêmica, distribui-se na forma silvestre no bioma Mata Atlântica, principalmente nos estados de Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, apresentando ocorrências em áreas de maior altitude em São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. A espécie ocorre também na província de Misiones, na Argentina, e no leste do Paraguai, compreendendo uma área de 540 mil quilômetros quadrados, sendo 450 mil no Brasil (ANDRADE, 2003; GERHARDT, 2013).

A erva-mate é considerada como a espécie símbolo do estado do Rio Grande do Sul, e apresenta grande importância na economia e na cultura dos estados sulinos (BACKES; IRGANG, 2002). Apesar de ser uma espécie utilizada há várias décadas, alguns problemas silviculturais ainda persistem, dentre os quais, a baixa porcentagem de germinação de suas sementes. Tal fato constitui-se no principal problema para a produção de mudas da espécie (FOWLER; STURION, 2000).

A baixa germinação de sementes, de forma geral, pode estar relacionada à diversos fatores, como a presença de sementes vazias/chochas, predadas e dormentes. Não há relatos na literatura sobre a presença de sementes vazias em erva-mate, entretanto, Zanon (1988) orienta a imersão em água das sementes dessa espécie, sendo retiradas as sobrenadantes; procedimento esse que é, geralmente, utilizado para a remoção de sementes vazias e chochas.

Apesar da provável ocorrência de predação e de sementes vazias, a presença de dormência em sementes de erva-mate é o principal problema relatado para a produção de mudas. Segundo Brasil (2009a), as sementes dessa espécie levam em torno de 365 dias para germinar, sendo que são necessários em torno de seis meses para a superação da dormência.

Ainda não há um consenso sobre a(s) causa(s) da dormência dessas sementes. De acordo com Medeiros (1998), a dormência dessas sementes é devida à presença de endocarpo lenhoso (dormência física). Grigoletti Júnior et al. (1999) salientam que alguns fungos associados às sementes de erva-mate favorecem sua germinação ao decompor seu endocarpo, inferindo que as sementes dessa espécie apresentam dormência física que é superada pela ação de fungos saprófitos, sob condições

naturais. Já para Dolce; Mroginski; Rey (2010), o endocarpo e o tegumento das sementes de *I. paraguariensis* estabelecem resistência na expansão dos tecidos (dormência mecânica), dificultando a germinação.

A dormência física é definida como aquela em que o tegumento e/ou o pericarpo são impermeáveis à entrada de água (BASKIN; BASKIN, 2004). Sementes com tegumento muito duro, porém, frequentemente necessitam da ação de microrganismos para a germinação (ZAIDAN; BARBEDO, 2004).

Outros autores descrevem a dormência de sementes de *I. paraguariensis* como morfológica (NIKLAS, 1987; HEUSER, 1990; SANSBERRO et al., 1998; FOWLER; BIANCHETTI, 2000; MENEGUETI et al., 2004) por apresentarem imaturidade do embrião, o qual requer período de estratificação para completar seu desenvolvimento e germinar. Nesse caso, as sementes desprendem-se da planta-mãe antes de estarem morfológicamente maduras, ocorrendo o término da maturação após a dispersão das mesmas (MALAVASI, 1988).

A dormência combinada também foi relatada para o gênero *Ilex* (BASKIN; BASKIN, 2014), e especificamente para *I. paraguariensis* como dormência morfológica e fisiológica (morfofisiológica) (CUQUEL; CARVALHO; CHAMMA, 1994; GALÍNDEZ et al., 2018); e morfológica e física (MEDEIROS, 1998), que ainda sugerem estudos para determinar as causas de dormência.

Assim, objetiva-se com o trabalho:

- a) Determinar e quantificar as possíveis causas da baixa germinação de *I. paraguariensis*, por meio de parâmetros físicos, fisiológicos e sanitário das sementes (Capítulo I);
- b) Identificar e descrever aspectos morfológicos do pirênio e histológicos do embrião das sementes de *I. paraguariensis* em diferentes estádios de desenvolvimento (Capítulo II);
- c) Investigar a(s) causa(s) da dormência de sementes de *I. paraguariensis* (Capítulo III);
- d) Determinar os efeitos da temperatura, da escarificação mecânica e do ácido giberélico (GA₃) na superação de dormência e germinação de sementes de *I. paraguariensis*. (Capítulo IV).

2 CAPITULO I - CAUSAS DA BAIXA GERMINAÇÃO DE LOTES DE SEMENTES DE *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (AQUIFOLIACEAE)¹

2.1 RESUMO

Objetivou-se determinar e quantificar as possíveis causas da baixa germinação de *I. paraguariensis*, por meio de parâmetros físicos, fisiológico e sanitário das sementes. Utilizaram-se seis lotes, de diferentes procedências e/ou anos de coleta. Em cada lote, sementes foram classificadas em vazias, deterioradas, predadas ou cheias. As sementes cheias foram submetidas ao teste de tetrazólio. Foi realizado, ainda, teste de germinação. Pelos resultados, foram verificadas quantidades elevadas, em quatro dos lotes avaliados, de sementes vazias e deterioradas, e em dois lotes houve ataque de insetos. No teste de tetrazólio, todos os lotes apresentaram maiores valores de sementes viáveis onde os embriões foram visualizados. Não houve germinação das sementes. A baixa temperatura pode ser a causa do número elevado de sementes vazias. As causas da baixa germinação dependem do lote; de forma geral, destaca-se a presença de sementes vazias e deterioradas, além da dormência.

Palavras-chave: Sementes vazias; Sementes deterioradas; Predação; Viabilidade; Erva-mate.

2.2 INTRODUÇÃO

A espécie *Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliaceae, dióica, popularmente conhecida como erva-mate, desempenha um importante papel socioeconômico na região Sul do Brasil. As folhas são secas para preparar um chá tradicional (chá-mate), que é consumido por milhões de pessoas na América do Sul (OLIVEIRA; WAQUIL, 2014; BERGOTTINI et al., 2015) e também o chimarrão. Nos últimos anos, o uso e a exportação por novos setores, como a indústria farmacêutica e de cosméticos, foram intensificados, o que faz com que muitos estudos venham sendo realizados nesta espécie devido à sua importância econômica (HORBACH et al., 2011; SANTIN et al., 2013).

A produção de mudas de *I. paraguariensis* é comumente realizada por sementes; entretanto, tem sido verificada baixa germinação. Apesar de a dormência ser descrita como a principal causa desse problema (FOWLER; STURION, 2000; MEDEIROS, 2001; DOLCE; MROGINSKI; REY, 2010), outros fatores podem contribuir, como a presença de sementes com má formação, vazias e deterioradas (CATAPAN, 1998).

¹ Artigo submetido para a revista FLORAM EM 19/09/2017.

A presença de insetos e de sementes vazias e deterioradas tem sido observada em sementes de outras espécies do gênero *Ilex*. Em *I. latifolia* foram encontradas vespas da família Torymidae (TAKAGI; TOGASHI, 2013). Já em *I. aquifolium*, Obeso (1998) observou que mais de 50% dos frutos tinham pelo menos uma semente vazia, o que foi verificado também por García; Obeso; Martínez (2005), ao avaliarem a chuva de sementes dessa espécie. Arrieta; Suárez (2004), durante o beneficiamento de sementes desse gênero, também verificaram a presença de sementes vazias.

Embora existam alguns relatos sobre as causas da baixa germinação das sementes de *I. paraguariensis* (ZANON, 1988; CATAPAN, 1998), ainda não há na literatura trabalhos que comprovem e quantifiquem esses problemas, sendo apenas citados. Assim, objetivou-se determinar e quantificar as possíveis causas da baixa germinação de *I. paraguariensis*, por meio de parâmetros físicos, fisiológicos e sanitário das sementes.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Apesar da unidade de dispersão da espécie ser um pirênio, nesse capítulo será utilizado o termo sementes. Seis lotes de sementes de *I. paraguariensis* foram utilizados, obtidos de no mínimo cinco matrizes nativas, com distância mínima de 5 (cinco) metros e máxima de 500 (quinhentos) metros, colhidos em diferentes locais e/ou ano:

OC-15: coletadas em 2015, no município de Otacílio Costa, SC, que possui clima quente e temperado. A classificação do clima é Cfb, segundo Köppen e Geiger. A temperatura média anual é 16.3 °C, com pluviosidade média anual de 1519 mm e altitude de 871 m (CLIMATE, 2016).

UR-15: obtidas em 2015 e **UR-16:** em 2016, ambos provenientes do município de Urupema, SC, onde o clima é quente e temperado, e segundo Köppen e Geiger, classificado como Cfb. A temperatura média anual é 14.1 °C, com média anual de pluviosidade de 1634 mm e a altitude de 1324 m (CLIMATE, 2016).

CE-16: lote colhido no ano de 2016, em Campo Erê, SC, que apresenta um clima quente e temperado, classificado como Cfb, segundo a Köppen e Geiger, com temperatura média de 16.7 °C, 2045 mm de pluviosidade média anual e altitude de 903 m (CLIMATE, 2016).

IJ-16: coletadas no ano de 2016, no município de Ijuí, RS, onde o clima é quente e temperado, classificado como Cfa, de acordo com a Köppen e Geiger. A temperatura média anual em Ijuí é de 19.9 °C, com média anual de pluviosidade de 1774 mm e altitude de 307 m (CLIMATE, 2016).

PU-16: obtido no ano de 2016, no município de Porto União, SC, onde o clima é quente e temperado, e segundo Köppen e Geiger, é classificado como Cfa. A temperatura média anual em Porto União é 17.7 °C, com pluviosidade média anual de 1667 mm e altitude de 780 m (CLIMATE, 2016).

Em todos os locais, as matrizes foram georreferenciadas e estão localizadas no interior de mata nativa. Os frutos foram coletados maduros com coloração roxa escura, cor 2,5/1 F: 5Y, de acordo com a Tabela de Munsell. As sementes foram extraídas em peneira e água corrente, beneficiadas manualmente para a retirada das impurezas, secas em papel toalha para a retirada da umidade superficial e utilizadas nos experimentos.

Inicialmente, foi determinado o teor de água em duas repetições, por lote, por meio do método de estufa, regulada a 105 °C (BRASIL, 2009a). Para cada lote, 200 sementes, divididas em quatro repetições, foram imersas em água durante 24 h, para facilitar o corte longitudinal, que foi realizado com auxílio de bisturi e pinça. As sementes foram avaliadas visualmente com auxílio de estereomicroscópio Stemi-305, com aumento de até seis vezes, e classificadas em: **Vazias** - sem a presença de endosperma e embrião; **Deterioradas** - com endosperma e embrião necrosados ou tecido gelatinoso; **Cheias com embrião não visualizado**; **Cheias com embrião visualizado** e **Predadas** – com a presença de inseto ou sinais de predação.

Após a avaliação, as sementes consideradas cheias, com embrião visualizado ou não, foram submetidas ao teste de tetrazólio, conforme Catapan (1998), para avaliação da qualidade fisiológica (viabilidade) das sementes. Inicialmente, as sementes foram imersas em água por 24 horas, em temperatura de 30 °C. Em seguida, foram cortadas longitudinalmente através do tegumento e do endosperma, e imersas em solução de 0,1% de tetrazólio por 24 horas, a 35 °C. As sementes, de todos os lotes, foram avaliadas individualmente, sendo consideradas viáveis aquelas sem nenhum dano, incluindo o endosperma. Além disso, foi realizado teste de germinação em quatro repetições de 50 sementes, por lote, em substrato sobre areia, a temperatura de 20/30 °C (BRASIL, 2009a).

Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram testados quanto à homogeneidade pelo teste de Shapiro-Wilk e normalidade, e foi realizada análise de variância. Os dados que se mostraram não homogêneos, foram transformados em arco seno $\sqrt{x}/100$. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A correlação de Pearson foi utilizada para correlacionar as condições ambientais e a caracterização dos lotes das sementes. Os dados de viabilidade foram comparados pelo teste de Mann-Whitney a 5% de probabilidade, as análises foram realizadas com o programa estatístico ASSISTAT.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de água das sementes foi de 12,2% para o lote UR15; 12,1% para o lote OC; 8,7% para CE; 6,9% para PU; 12% para UR16 e 10% para IJ. Os teores de água das sementes encontrados coincidem com os observados em outros trabalhos (MEDEIROS; SILVA, 2001; MENEGUETI et al., 2004).

As categorias das sementes de *I. paraguariensis* diferiram de acordo com o lote; mas, de forma geral, foram observadas altas porcentagens de sementes deterioradas e vazias (Tabela 1).

Tabela 1 - Porcentagens de sementes vazias, deterioradas, predadas, cheias com embrião visualizado e cheias com embrião não visualizado, observadas em lotes de sementes de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

LOTE	Vazias	Deterioradas	Predadas	Cheias	
				Embrião visualizado	Embrião não visualizado
OC-15	30,41 ab	24,37 c	0,99 a	6,22 b	34,82 b
UR-15	27,76 abc	42,23 ab	0,24 ab	28,62 a	0,70 c
UR-16	44,64 a	44,00 ab	0 b	3,94 b	7,42 c
CE-16	2,12 c	27,30 bc	0 b	33,16 a	37,42 b
IJ-16	4,44 bc	3,53 d	0 b	26,50 a	65,53 a
PU-16	36,18 a	57,71 a	0 b	2,00 b	4,11 c

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Médias seguidas pela mesma letra, comparando lotes, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Otacílio Costa-2015 (OC-15), Urupema-2015 (UR-15), Urupema-2016 (UR-16), Campo Ere- 2016 (CE-16), Ijuí-2016 (IJ-16) e Porto União- 2016 (PU-16).

As sementes vazias (Figura 1A) foram contabilizadas em maior número nos lotes de UR-16, UR-15, OC-16 e PU-16, com valores entre 27% e 44% (Tabela 1).

Esses resultados podem estar relacionados à polinização, distância entre as árvores matrizes, bem como à eficiência dos polinizadores naturais (AYUB; MARIATH, 1996 apud CARVALHO, 2003), devido a espécie ser dióica. Este fato foi confirmado nos lotes UR-15 e UR-16, onde as matrizes estavam mais distanciadas entre si, em comparação com os demais lotes.

Figura 1 - Sementes de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. classificadas como: Vazia (A); Deteriorada (B); Predada (C); Cheia, com embrião não visualizado (D); e Cheia, com embrião visualizado (E).



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Para reduzir o número de sementes vazias, em um lote para a produção de mudas, Zanon (1988) sugere que as sementes sejam imersas em água e as sobrenadantes descartadas. Sousa et al. (2003) observaram que a polinização controlada é eficiente e indicada por produzir maior número de frutos e de sementes cheias, sendo verificado somente 0,59% de sementes vazias após esse procedimento.

Na classe de sementes deterioradas (Figura 1B), o lote PU-16 apresentou o maior número, diferindo estatisticamente dos demais lotes, seguido pelos lotes de UR-15 e UR-16. O lote de IJ-16 apresentou o menor número de sementes deterioradas. Apesar de não ter sido avaliada a presença de patógenos, Oliveira (2013) relata que a deterioração das sementes pode estar relacionada à fungos, que colonizam frutos e sementes e que podem estar localizados na parte interna ou externa da semente.

Em relação à predação, foram observados insetos (Figura 1C) apenas nos lotes OC-15 e UR-15, com 4,18% e 0,7%, respectivamente. Os insetos foram identificados como micro himenópteros pertencentes à família Torymidae. Estas microvespas se alimentam do endosperma e embrião da semente, e após saem por um orifício, que pode ser identificado visualmente nas sementes (Figura 2).

Figura 2 - Sementes de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. com sinais de predação.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Em sementes de *I. paraguariensis* da safra 1982, procedências São Mateus do Sul-PR, Catanduvas-SC e Centenário-RS, Zanon (1988) verificou a presença de micro himenóptero, não identificado, que broqueia as sementes, provocando um alto índice de sementes danificadas, aproximadamente 50%.

A presença de sementes cheias, com embriões visualizados ou não (Figuras 1D e 1E), dependeu do lote, sendo maior (92,03%) no lote IJ-16 e menor (6,11%) no lote

PU-16 (Tabela 1). Em número de sementes com embrião visualizado, os lotes de CE-16, IJ-16 e UR-15 apresentaram os melhores resultados. Em sementes com os embriões não visualizados, o lote com maior resultado foi IJ-16.

Com a correlação de Pearson (Tabela 2) verificou-se a influência dos fatores climáticos em relação a cada classe de sementes.

Tabela 2 - Correlação de Pearson entre as classes das sementes e variáveis climáticas.

	Altitude	Temperatura	Pluviosidade
VAZIAS	0,81	-0,84	-0,74
MORTAS	0,63	-0,59	0,46
PREDADAS	0,33	-0,39	0,46
CHEIAS	-0,95	0,94	0,08

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

De acordo com a classificação de Dancey; Reidy (2006), valores acima de 0,7 são considerados como fortes, 0,4 até 0,6 moderado, e abaixo de 0,3 como fracos, pode-se inferir que as sementes vazias possuem uma correlação linear forte com a altitude, ou seja, quanto maior a altitude, maior o número de sementes vazias. Já a relação entre temperatura e pluviosidade é inversa, ou seja, quanto menor a temperatura e a pluviosidade, maior é o número de sementes vazias.

A relação entre temperatura e sementes vazias pode ser explicada pela polinização, visto que é entomófila, e baixas temperaturas podem diminuir a visita dos insetos nas flores. Pires et al. (2014), avaliando a polinização em *I. paraguariensis*, observaram que havia maior visitação de polinizadores em flores nos períodos com maior temperatura no dia, assim como Liebsch; Mikich (2009), quando avaliaram a fenologia reprodutiva da espécie, encontraram uma alta influência da temperatura na floração. A floração ocorre nos meses mais quentes com temperaturas médias acima de 13 °C (PIRES et al., 2014).

Sementes deterioradas possuem relação moderada com a altitude, pluviosidade e temperatura; sendo que a relação com a temperatura é inversa. Já as sementes predadas possuem baixa relação com a altitude e temperatura, e relação moderada com a pluviosidade.

Das sementes consideradas cheias com embrião visualizado, a maior parte, independente do lote, foi considerada viável pelo teste de tetrazólio. Já os resultados para sementes com embriões não visualizados dependeram do lote, sendo que os

lotes de UR-15 e UR-16 ultrapassaram os 50% de sementes inviáveis (Tabela 3). Não foi verificada a germinação das sementes em nenhum dos lotes utilizados. Isso indica a presença de dormência nas sementes, que mesmo cheias e consideradas viáveis (teste de tetrazólio), não germinaram.

Tabela 3 - Viabilidade (%) de sementes cheias de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. com embrião visualizado e não visualizado, de diferentes procedências e/ou ano de coleta.

LOCAL	EMBRIÃO VISUALIZADO		EMBRIÃO NÃO VISUALIZADO	
	Viável	Inviável	Viável	Inviável
OC-15	100 a	0 d	91 a	9 e
UR-15	100 a	0 d	5 e	95 a
UR-16	88 c	13 b	44 d	56 b
CE-16	83 d	17 a	89 a	11 e
IJ-16	96 b	4 c	86 b	14 d
PU-16	100 a	0 d	67 c	33 c

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Médias seguidas pela mesma letra, comparando lotes, não diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney a 5%. Otacílio Costa-2015 (OC-15), Urupema-2015 (UR-15), Urupema-2016 (UR-16), Campo Ere-2016 (CE-16), Ijuí-2016 (IJ-16) e Porto União- 2016 (PU-16).

As condições durante o desenvolvimento de sementes de *I. paraguariensis* parecem influenciar na germinação, tanto quanto a presença da dormência. Assim, mesmo com a superação eficiente da dormência, os fatores que influenciam no desenvolvimento das sementes devem ser levados em consideração.

2.5 CONCLUSÃO

As principais causas da baixa germinação das sementes de *I. paraguariensis* dependem do lote; entretanto, de forma geral, destaca-se a presença de sementes vazias e deterioradas, que podem chegar a aproximadamente 44% e 57%, respectivamente, além da presença de dormência. A baixa temperatura, observada nos locais de coleta, pode ser uma das causas do número elevado de sementes vazias.

3 CAPITULO II - ASPECTOS MORFOLÓGICOS E DESENVOLVIMENTO

EMBRIONÁRIO APÓS A DISPERSÃO DE PIRÊNIOS DE *Ilex paraguariensis* A. St. Hil

3.1 RESUMO

Objetivou-se com esse trabalho identificar e descrever os aspectos morfológicos do pirênio e histológicos dos embriões de *Ilex paraguariensis* em diferentes estádios de desenvolvimento. Os pirênios foram coletados no ano de 2016 e 2017, de frutos maduros, nos municípios de Campo Erê e Urupema, SC. Os pirênios, com embriões visualizados, foram fixados em solução de paraformaldeído e inclusos em historesina Leica™. As amostras foram seccionadas em micrótomo Leica com espessura de 7 µm. Os cortes corados com Azul de Toluidina. Os embriões foram classificados nos estádios globular, coração (ocupando aproximadamente 10% do comprimento da semente), pós coração (15% do comprimento), torpedo (20% do comprimento) e maduro (40% do comprimento); e foram localizados abaixo da micrópila, alinhado ao ponto externo. A região de entorno do embrião, denominada cavidade, é constituída por uma camada lignificada.

Palavras-chave: Anatomia; Semente; Embrião; erva-mate.

3.2 INTRODUÇÃO

Ilex paraguariensis, também conhecida como erva-mate, é uma espécie arbórea nativa da Floresta Ombrófila Mista na América do Sul, cujas folhas são largamente utilizadas na medicina e consumidas na forma de chá (chá-mate). A espécie é de grande importância socioeconômica para a região sul do Brasil, Paraguai e Argentina (FOWLER; STURION, 2000; LORENZI; MATOS, 2002). Embora seja uma espécie utilizada há várias décadas, alguns problemas silviculturais persistem, dentre os quais, a germinação baixa e distribuída ao longo do tempo (MEDEIROS et al., 1997; FOWLER; STURION, 2000).

Dentre os fatores que exercem influência na germinação dos pirênios, de forma geral, está a dormência, relacionada a aspectos estruturais (DEBEAUJON et al., 2007), como a presença de barreiras mecânicas, químicas e físicas à germinação e, ainda, à diferenciação e maturação das estruturas do embrião (BASKIN; BASKIN; LI, 2000; HILHORST, 2007; CARDOSO, 2008).

Apesar da dormência morfológica já ser descrita em pirênios de *I. paraguariensis* (MELLO, 1980; FERREIRA et al., 1991; HEUSER, 1999; FOWLER;

STURION, 2000; MEDEIROS, 2001;), são escassos os detalhamentos dos estádios de desenvolvimento dos embriões que podem ser encontrados nas sementes maduras da espécie. Nesse sentido, se torna necessária a categorização do desenvolvimento dos embriões, visto que, apenas embriões no estágio maduro estarão aptos à germinação.

Em relação à categorização dos embriões, de acordo com seu estágio de desenvolvimento, alguns autores se basearam no tamanho como Niklas (1987); Heuser (1990) e Catapan (1998). Entretanto, a classificação dos estádios de desenvolvimento dos embriões de pirênios maduros de *I. paraguariensis*, com base em seu tamanho, pode ser subjetiva. Nesse sentido, Heuser (1990) apresenta a morfoanatomia de embriões de *I. paraguariensis* em diferentes estádios. Acredita-se que são necessários estudos para melhor descrever os pirênios e os diferentes estádios de desenvolvimento de embriões de pirênios maduros permitindo a identificação do estágio de desenvolvimento pela relação do espaço que o mesmo ocupa no endosperma. Uma melhor caracterização do pirênio se faz necessária, para identificar a localização do embrião.

Objetivou-se com esse trabalho identificar e descrever aspectos morfológicos do pirênio e histológicos dos embriões dos pirênios de *Ilex paraguariensis* em diferentes estádios de desenvolvimento.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Frutos maduros, com coloração roxa escura (cor 2,5/1 F: 5Y da Tabela de Munsell) de *I. paraguariensis* foram coletados no ano de 2016 e 2017, sob telas instaladas abaixo das árvores. Os frutos foram coletados no município de Campo Erê, SC, que apresenta clima quente e temperado, classificado como Cfb, segundo Köppen e Geiger. A temperatura média anual é de 16.7 °C, com 2045 mm de pluviosidade média anual e altitude de 903 m (CLIMATE, 2016); e no município de Urupema, SC, que apresenta clima quente e temperado, classificado como Cfb segundo Köppen e Geiger. A temperatura média anual é 14.1 °C, com média anual de pluviosidade de 1634 mm e a altitude de 1324 m (CLIMATE, 2016).

Após a colheita, os pirênios foram extraídos, com auxílio de peneira e água corrente, beneficiados com uso de soprador para retirada de impurezas e utilizados

nas análises. Determinou-se o teor de água por meio do método da estufa a 105 ± 3 °C, por 24 h, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009a).

Os pirênios permaneceram por 24 h imersos em água, para a secção e observação interna. Os pirênios, com embrião visualizado, foram utilizados para a descrição da morfologia e fixados para a avaliação anatômica. Foram descartados aqueles em que os embriões não foram localizados, os vazios e os predados.

A descrição morfológica foi realizada com auxílio de estéreo microscópio Marca/modelo Zeiss Stemi-305, com câmera acoplada, com zoom de até 60x. As ilustrações foram desenhadas em papel de desenho com gramatura de 224 g/m² com lápis de grafite 6b.

Para a avaliação anatômica, os pirênios foram fixados em solução de paraformaldeído (2,5%) em tampão fosfato (0,2M) com pH 7,3, na proporção de 1:1, durante 24 horas, 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 horas; 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; MITRENGA; MAYRESBACH, 1975).

As amostras foram seccionadas em micrótomo Leica (RM 2125), com lâminas descartáveis. Os cortes, com espessura de 7 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.

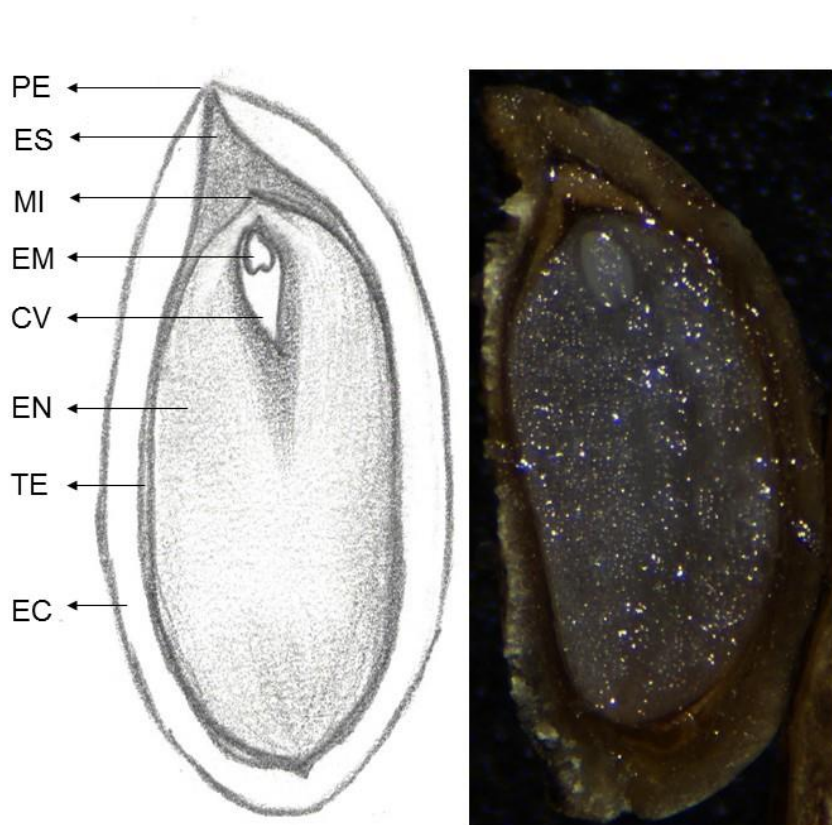
Os cortes foram corados com Azul de Toluidina (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1965), que é uma coloração policromática que detecta substâncias pécticas e lignina, permitindo identificar os diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões devido a sua coloração. Para registros das estruturas dos embriões foram realizados em microscópio de luz com câmera acoplada Marca/modelo Leica ICC50 HD.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de água dos pirênios foi de 12% para os lotes de Urupema 2016 e 2017; e 9% para Campo Ere 2016 e 2017. Os teores de água das sementes encontrados coincidem com os observados em outros trabalhos (MEDEIROS; SILVA, 2001; MENEGUETI et al., 2004).

O órgão de dispersão da espécie *I. paraguariensis* é o pirênio, que é constituído pelo endocarpo, tegumento, endosperma e embrião (Figura 3).

Figura 3 – Morfologia dos pirênios de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.



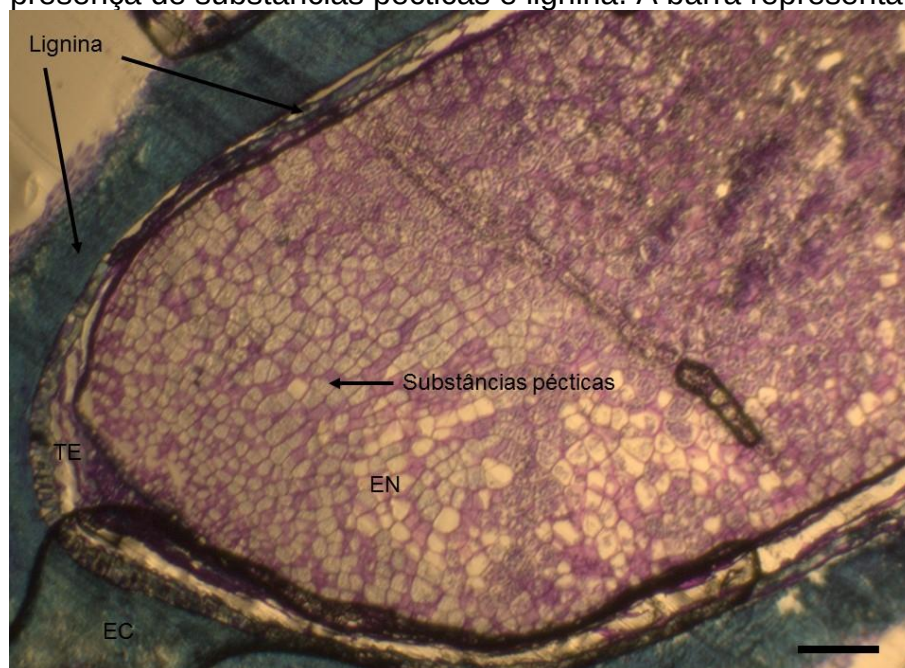
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Legenda: PE - Poro exterior; ES – Tecido esponjoso; MI - Micrópila; EM - Embrião; CV - Cavidade; EN - Endosperma; TE - Tegumento; EC - Endocarpo.

O endocarpo é ósseo-lenhoso e envolve a semente (KUNIYOSHI, 1983), sendo constituído por fibras que se dispõe desordenadamente, apresentando cristais entre as mesmas (JESKE; SILVA; HEUSER, 2000), composto por lignina.

Na porção inferior próximo ao endocarpo, há o tegumento, formado por lignina e substâncias pécticas, podendo oferecer resistência a entrada de água (Figura 4). Segundo Heuser (1990), o tegumento é uma camada de esclereídeos com espessamento de parede periclinais internas e periclinais anticlinais; na parte inferior há uma camada de parênquima formado por células achatadas de paredes delgadas.

Figura 4 – Corte anatômico de pirênios de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., com a presença de substâncias pécticas e lignina. A barra representa 0,2 mm.



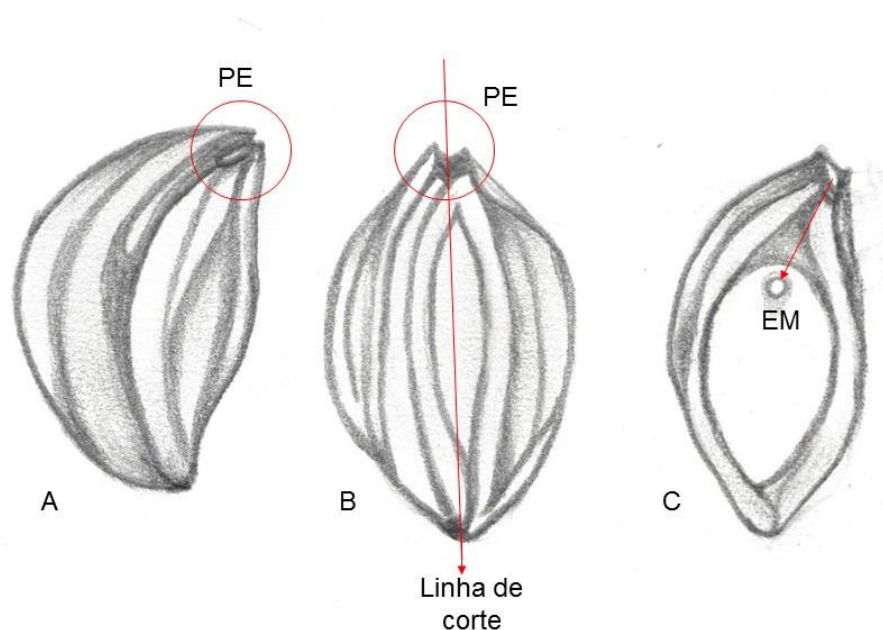
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Legenda: EN - Endosperma; TE - Tegumento; EC - Endocarpo.

O endosperma carnoso, de cor creme, rodeia o embrião (KUNIYOSHI, 1983; BRASIL, 2009b). A espécie possui embrião basal, relativamente pequeno, e quando maduro ocupa de 1/3 a 1/2 da porção inferior da semente; sendo rudimentar, não desenvolvido, porém diferenciado (MARTIN, 1946; BASKIN; BASKIN, 2004), conforme descrito para a família Aquifoliaceae (BRASIL, 2009b).

Entre o poro exterior e a micrópila há uma camada preenchida de tecido esponjoso (Figura 3) (KUNIYOSHI, 1983). O corte deve ser no sentido longitudinal, ou seja, no sentido do comprimento do pirênio, tendo início no poro exterior, que pode ser identificado com o pirênio ainda intacto. Na porção inferior, junto da micrópila, está o embrião, para sua identificação, (Figura 5).

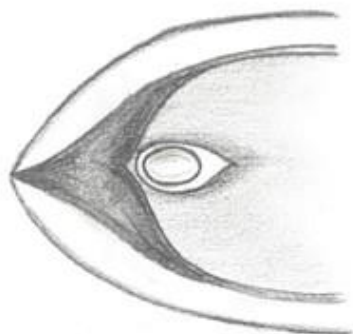
Figura 5 - Localização do embrião nos pirênios de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. A: Vista lateral 1; B: Vista lateral 2 e; C: Pirênio cortado longitudinalmente.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.
Onde: PE - poro exterior, EM – embrião.

Conforme citado anteriormente, os embriões dos pirênios de frutos maduros de *I. paraguariensis* podem se encontrar em diferentes estádios de maturação, caracterizando a dormência morfológica dos pirênios. O embrião globular (Figura 6) é caracterizado como uma massa de células desorganizadas, conforme descrito por Heuser (1990). Nas análises anatômicas dos lotes utilizados, não foram identificados pirênios com embriões neste estágio. O embrião globular, pelo tamanho, foi classificado como menor de 0,19 mm (NIKLAS, 1987; HEUSER, 1990; CATAPAN, 1998).

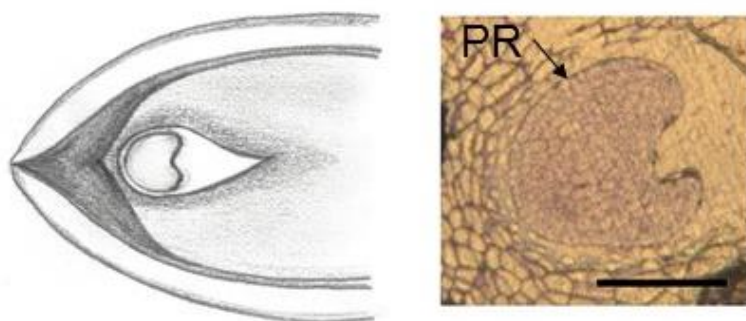
Figura 6 – Pirênios de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. com embrião em estágio globular de desenvolvimento.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

O embrião caracterizado como no estágio coração (Figura 7) possui organização celular, mas ainda não é possível diferenciar os elementos procambiais que são os precursores dos tecidos de condução. Pode ser identificada a protoderme e os primórdios cotiledonares, sendo confirmado pela descrição de Bryant (1985), que relata que determinadas zonas já estão destinadas a se desenvolverem em órgãos específicos. As formas rudimentares dos próprios órgãos, particularmente dos cotilédones e da radícula, tornam-se distinguíveis, sendo este estágio conhecido como coração por possuir dois lobos distintos, possuindo aproximadamente 50 células (BRYANT, 1985).

Figura 7 – Pirênios de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. com embrião em estágio coração de desenvolvimento. A barra representa 0,2 mm.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

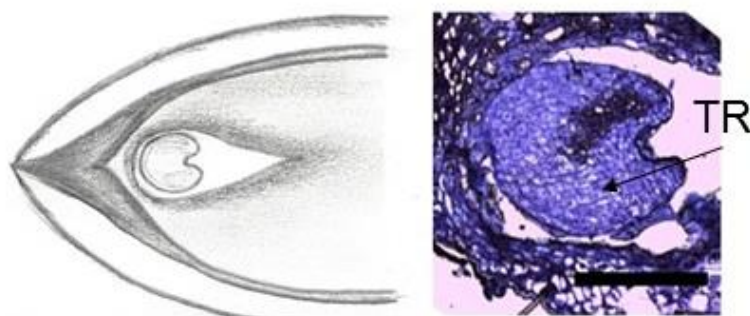
Onde: PR- Protoderme.

Os embriões medem 0,29 mm em média, ocupando aproximadamente 10% do comprimento longitudinal do endosperma. O embrião coração foi classificado, de

acordo com o tamanho, com as dimensões entre 0,20 a 0,29 mm (NIKLAS, 1987); de 0,20 a 0,45 mm (HEUSER, 1990); e de 0,20 a 0,30 mm (CATAPAN, 1998).

O embrião pós coração (Figura 8) possui células de transferência evidentes, com maior organização, conforme descrito por Heuser (1990). As mudanças que ocorrem representam um aumento e amadurecimento do embrião (BRYANT, 1985).

Figura 8 - Pirênios de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. com embrião em estágio pós coração de desenvolvimento. A barra representa 0,2 mm.



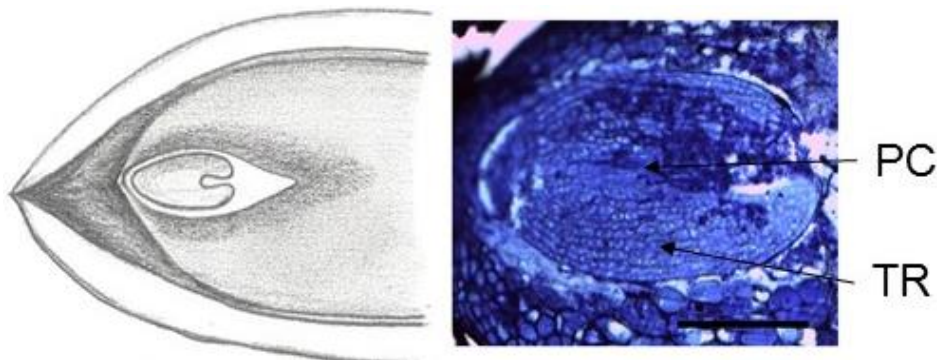
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Onde: TR- Células de transferência.

Os embriões medem 0,30 mm em média, ocupando 15% do comprimento do endosperma. Outros autores classificaram como pós coração embriões entre 0,30 a 0,40 mm (NIKLAS, 1987); 0,45 a 0,70 mm (HEUSER, 1990); e entre 0,30 a 0,50 mm (CATAPAN, 1998). O estágio de pós coração é um meio termo entre coração e torpedo, pois há algumas características marcantes de coração, como os primórdios cotiledonares, assim como características do torpedo, como células de transferência, apenas com tamanho reduzido, dificultando e confundindo sua identificação.

No embrião torpedo (Figura 9), o eixo embrionário e os cotilédones estão bem desenvolvidos, o procâmbio está organizado, com diferenciação mais pronunciada dos elementos procambiais, e com células do ápice radicular bem visíveis. As células que estão em divisão organizam-se em distintas regiões meristemáticas, evidenciando o tecido meristemático protoderme, meristema fundamental e procâmbio (BRYANT, 1985).

Figura 9 - Pirênios de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. com embrião em estágio torpedado de desenvolvimento. A barra representa 0,2 mm.



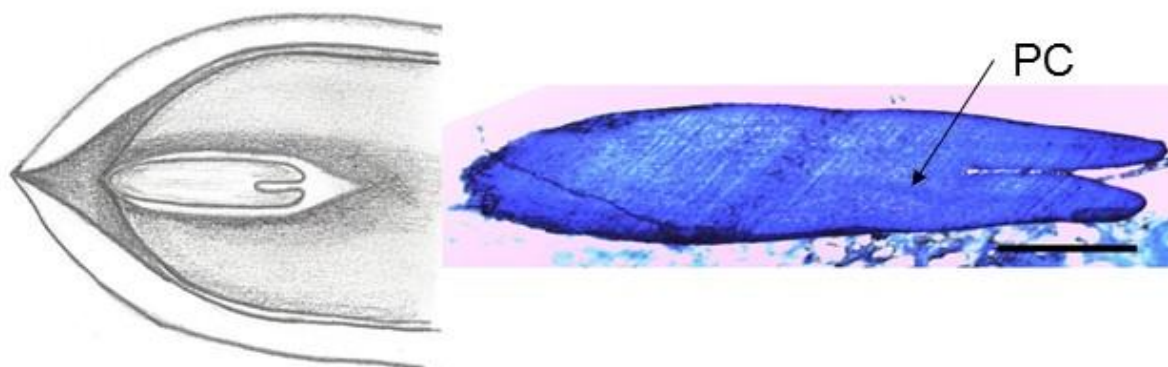
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Onde: TR- Células de transferência; PC- Procâmbio.

Os embriões medem 50 μ m em média, ocupando 20% do comprimento do endosperma. As classificações pelo tamanho, identificaram este estágio medindo entre 0,40 e 0,80 mm (NIKLAS, 1987); 0,70 e 1,00 mm (HEUSER, 1990); e entre 0,50 e 0,70 mm (CATAPAN, 1998).

Os embriões maduros (Figura 10) medem acima de 1,0 mm, ocupando em média 40% do comprimento do endosperma, os cotilédones estão desenvolvidos, distingue-se o procâmbio. As células iniciais do ápice radicular são bem evidentes, com parede celular mais espessa, cobertas por células de conteúdo mais denso, formando a coifa. Há diferenciação do sistema de condução, com células mais longas e estreitas na região do meristema provascular e diferenciação de elementos condutores do xilema. Pelo tamanho, este estágio foi classificado como maior que 1 mm (NIKLAS, 1987; HEUSER, 1990); e maior que 0,9 mm (CATAPAN, 1998).

Figura 10 - Pirênios de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. com embrião em estágio maduro de desenvolvimento. A barra representa 0,2 mm.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

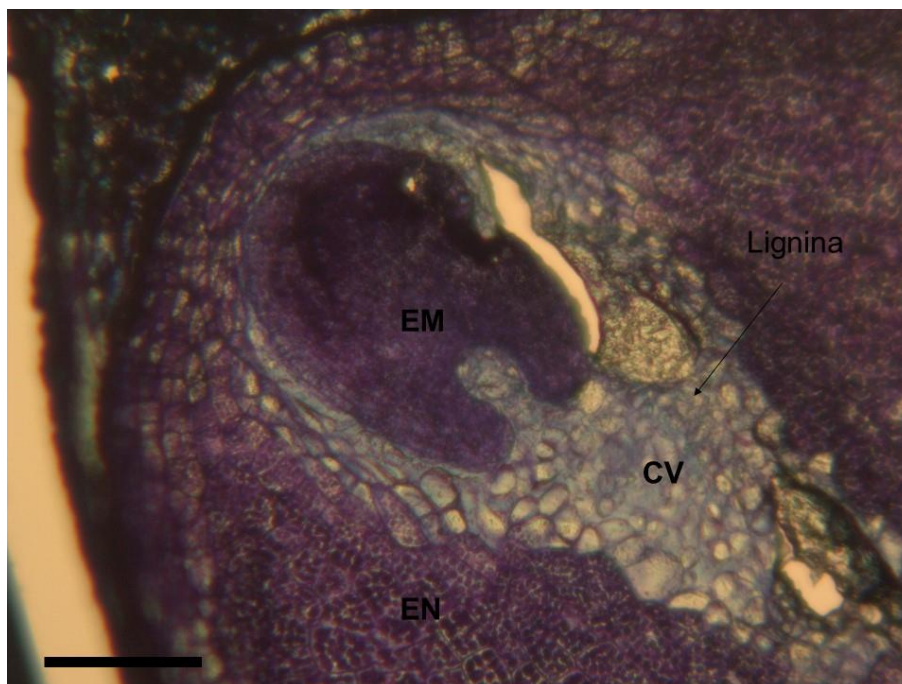
Onde: PC- Procâmbio.

Os tamanhos dos embriões coincidiram, em todos os estádios, com a classificação realizada por Niklas (1987) e Catapan (1998), porém não coincidiu com as classificações de Heuser (1990). A classificação pelo tamanho do embrião pode ser influenciada por outros fatores, como a própria dimensão das sementes; desta forma, acredita-se que o uso da porcentagem de ocupação do embrião no endosperma possa ser uma alternativa eficiente.

Em relação ao desenvolvimento dos embriões, os resultados obtidos nesse trabalho confirmam os descritos por Heuser (1990). No momento da coleta dos pirênios, os embriões estavam no estágio de coração, aumentando em aproximadamente 4 vezes o tamanho, como verificado também por Galíndez et al. (2018).

Durante as análises anatômicas, foi observada na região de entorno do embrião a presença de uma camada lignificada (Figura 11), também observado em *I. maximowicziana* e denominada cavidade por Chien et al. (2011).

Figura 11 – Pirênio de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., com embrião envolto em cavidade contendo células com paredes lignificadas. A barra representa 0,2 mm.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Legenda: EM - Embrião; CV - Cavidade; EN – Endosperma.

Esta região, no entorno do embrião, é originada pela lise de células do endosperma, resultante da ação de enzimas, que tem como função a abertura do espaço para o desenvolvimento do embrião. Segundo Heuser (1990), a dimensão desta cavidade não está relacionada com o estágio de desenvolvimento do embrião.

3.5 CONCLUSÕES

Para definir os estádios de desenvolvimento do embrião de *I. paraguariensis* indica-se além da análise morfológica, o espaço que o embrião ocupa no endosperma. Os embriões podem ser classificados nos estádios de globular, coração (ocupando aproximadamente 10% do comprimento da semente), pós coração (15% do comprimento), torpedo (20% do comprimento) e maduro (40% do comprimento); e estão localizados abaixo da micrópila, alinhado ao ponto externo do pirênio. A região de entorno do embrião, denominada cavidade, é formada por camadas lignificadas.

4 CAPITULO III - DORMÊNCIA COMBINADA EM PIRÊNIOS DE *Ilex paraguariensis*

A. St. Hil.

4.1 RESUMO

Objetivou-se investigar a(s) causa(s) da dormência de sementes de *Ilex paraguariensis*. Para investigar a(s) causa(s) da dormência de sementes de *Ilex paraguariensis* (erva-mate), foram realizados os seguintes testes: a) Dormência física: taxa de absorção em água e em azul de metileno; e detecção de lignina e compostos lipofílicos no endocarpo e tegumento; b) Dormência fisiológica: bioensaios em sementes de alface e detecção de compostos fenólicos; c) Dormência morfológica: análise de embriões. Para a taxa de absorção, foi verificado um aumento na massa das sementes, que caracteriza entrada de água; entretanto, quando a embebição foi realizada em azul de metileno, ocorreu a absorção apenas no endocarpo. Foi observada, ainda, lignina na forma de uma camada de esclerênquima junto ao tegumento da semente e compostos lipofílicos em uma camada externa ao endosperma. Os bioensaios com sementes de alface indicaram a presença de inibidores químicos. Foram quantificados compostos fenólicos. Na avaliação morfológica das sementes, apenas em 55,5%, das sementes cheias, os embriões foram visualizados e encontravam-se nos estádios globular ou coração, nas demais os embriões não foram visualizados. A dormência de sementes de *Ilex paraguariensis* é devida a causas física, fisiológica e morfológica.

Palavras-chave: Dormência física; dormência fisiológica; dormência morfológica; erva-mate.

4.2 INTRODUÇÃO

A dormência é uma adaptação que impede a germinação das sementes mesmo quando as condições ambientais são favoráveis (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006). Uma semente dormente não tem capacidade de germinar em um determinado período de tempo em combinação de fatores ambientais que são favoráveis à sua germinação (BASKIN; BASKIN, 2004). O fenômeno pelo qual sementes de uma determinada espécie, mesmo sendo viáveis e tendo todas as condições ambientais para tanto, deixam de germinar (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; POISOT et al., 2011); no entanto, para a produção vegetal é um problema por dificultar a obtenção de mudas.

Na literatura, os pirênios de *I. paraguariensis*, popularmente conhecida como erva-mate, são classificadas como dormentes; entretanto, ainda não há consenso sobre as causas da dormência.

De acordo com Medeiros (1998), a dormência dessas sementes é devida à presença de endocarpo lenhoso (dormência física). Grigoletti Júnior et al. (1999) afirmam que as sementes dessa espécie apresentam dormência física que é superada pela ação de fungos saprófitos, sob as condições naturais. Para Dolce; Mroginski; Rey (2010), o endocarpo e o tegumento das sementes de *I. paraguariensis* estabelecem resistência na expansão dos tecidos (dormência mecânica), dificultando a germinação.

A dormência física é definida como aquela em que o tegumento e/ou o endocarpo são impermeáveis à entrada de água (BASKIN; BASKIN, 2004). Sementes com tegumento muito duro, porém, frequentemente necessitam da ação de microrganismos para a germinação (ZAIDAN; BARBEDO, 2004).

Outros autores descrevem a dormência de sementes de *I. paraguariensis* como morfológica (NIKLAS, 1987; HEUSER, 1990; SANSBERRO et al., 1998; FOWLER; BIANCHETTI, 2000; MENEGUETI et al., 2004) por apresentarem imaturidade do embrião, o qual requer período adicional para completar seu desenvolvimento e germinar. As sementes desprendem-se da planta-mãe antes de estarem morfológicamente maduras, ocorrendo o término da maturação após a dispersão das mesmas (MALAVASI, 1988).

A dormência combinada também foi relatada para o gênero *Ilex* por Baskin e Baskin (2014), e especificamente para *I. paraguariensis* como dormência morfológica e fisiológica (morfofisiológica) (CUQUEL; CARVALHO; CHAMMA, 1994; GALÍNDEZ et al., 2018). A dormência fisiológica ocorre quando há substâncias inibidoras ou ausência de substâncias promotoras da germinação impedindo que a germinação ocorra (BASKIN; BASKIN, 2004), só sendo capazes de germinar após as substâncias inibidoras terem sido removidas, por exemplo, pelo trato digestivo de animais (ZAIDAN; BARBEDO, 2004). Foi relatada, ainda, dormência morfológica e física por Medeiros (1998).

A definição da(s) causa(s) da dormência de sementes é fundamental para a utilização de métodos eficientes para sua superação. Assim objetivou-se investigar a(s) causa(s) da dormência de sementes de *Ilex paraguariensis*.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

Frutos maduros, com coloração roxa escura (cor 2,5/1 F: 5Y da Tabela de Munsell) de *I. paraguariensis* foram colhidos no ano de 2016, sob telas instaladas abaixo das matrizes. A colheita foi realizada no município de Campo Erê, SC, que apresenta clima quente e temperado, com classificação Cfb, segundo a Köppen e Geiger, e 16.7 °C de temperatura média. A pluviosidade média anual é de 2045 mm e altitude de 903 m (CLIMATE, 2016).

Após a colheita, os pirênios foram extraídos, com auxílio de peneira e água corrente, beneficiados com uso de soprador para retirada de impurezas e utilizados nas análises. Inicialmente, foi determinado o teor de água dos pirênios por meio do método da estufa a 105 ± 3 °C por 24 h, conforme Brasil (2009a).

Para a identificação das causas da dormência, foram realizados os seguintes testes:

- a) Dormência física – taxa de absorção em água e em azul de metileno, e presença de lignina e suberina.

A hidratação em água foi realizada em quatro repetições de 100 pirênios, que tiveram sua massa mensurada e foram submetidos à embebição, em caixa gerbox com três folhas de papel Germitest® umedecidas com água 2,5 vezes a massa do papel em temperatura de 25 °C. A massa dos pirênios foi mensurada em intervalos de uma hora nas primeiras 24 horas, a cada doze horas no segundo dia, a cada vinte e quatro horas do terceiro ao quinto dia. A partir do sexto dia, a mensuração ocorreu a cada 48 horas. A taxa de absorção foi calculada por meio da diferença entre a massa inicial e a obtida a cada medição.

A hidratação também foi avaliada em solução de azul de metileno a 1% (OROZCO-SEGOVIA et al., 2007), em pirênios íntegros e em pirênios escarificados, com auxílio de lixa, até a visualização do endosperma. Os pirênios foram imersos na solução durante 48 horas, e, em seguida, seccionados longitudinalmente e analisados em estereomicroscópio com aumento de até 60 vezes.

Para a detecção de lignina e compostos lipofílicos, utilizou-se métodos de histoquímica. Os pirênios foram fixadas em FAA70 por um período de 72 horas, e armazenados em álcool 70%. Em seguida, foram realizadas desidratações em séries etanólicas de 2 horas cada (80%, 90% e 100%). Os pirênios foram incluídos em resina meta-acrilatoglicol Leica® e colocados em solução de pré infiltração durante 24 horas,

sendo 15 minutos em câmara de vácuo (-20 mbar). Após os pirênios foram acondicionados na solução de infiltração durante 72 horas sob temperatura de 10 °C e colocados na solução de inclusão. Após 48 horas, foram realizados cortes anatômicos longitudinais dos pirênios com lâminas descartáveis em micrótomo Leica RM 2025, com 7 µm de espessura. Para a coloração da lignina, utilizou-se Fluroglucinol 2%, e para a reação de compostos lipofílicos utilizou-se Sudam III. Lâminas semipermanentes foram confeccionadas com verniz vitral. As lâminas foram, então, avaliadas com relação à presença de coloração de reação para lignina e compostos lipofílicos, em microscópio óptico, acoplado com câmera.

b) Dormência fisiológica – Bioensaio em sementes de alface, detecção e quantificação de fenóis.

Sementes de alface foram submetidas ao teste de germinação em substrato umedecido com extratos dos endocarpos e das sementes de *I. paraguariensis*. Para a confecção do extrato hidroalcoólico e aquoso, os pirênios foram separados em duas partes: 1) endocarpo e 2) semente (tegumento, endosperma e embrião). Foram, então, desidratados em estufa de circulação de ar forçado, por 48 horas a 40 °C, até tornarem-se fragmentos secos, com massa constante. Os fragmentos foram triturados em um moinho triturador de facas até a geração de um pó. A partir do pó, foram confeccionados os extratos.

Nos extratos hidroalcoólicos, foi adicionado álcool etílico 70%, e deixados em local escuro por sete dias. Após, foi realizada a filtragem com papel filtro e a evaporação do álcool em rotaevaporador a 100 rpm e 55 °C, até volume constante. Foi acrescentado dimetil sulfoxido (DMSO) ao extrato e diluído com água destilada até a concentração de 15% para as sementes e 20% para o endocarpo.

Para o extrato aquoso, a partir do pó, foi adicionado água a 80 °C e deixado em repouso durante 24 horas em frasco com tampa fechada. O extrato foi diluído com água destilada até a concentração de 30% para as sementes e 20% para o endocarpo.

O teste de germinação de sementes de alface foi conduzido em BOD a 20 °C, com 4 repetições de 50 sementes, em substrato papel Filtro, que foi umedecido com 2,5 vezes o peso do papel com os extratos. Foram também instalados testes de germinação de sementes de alface em substratos umedecidos com água destilada (Testemunha-água) e com DMSO (Testemunha-DMSO). A primeira contagem da germinação foi realizada aos 4 dias, e a contagem final aos 7 dias após o início do teste, conforme Brasil (2009a). Para a determinação do índice de velocidade de

germinação, foi avaliada a germinação diariamente, até a contagem final, e o valor foi obtido utilizando a fórmula de Maguire (1962):

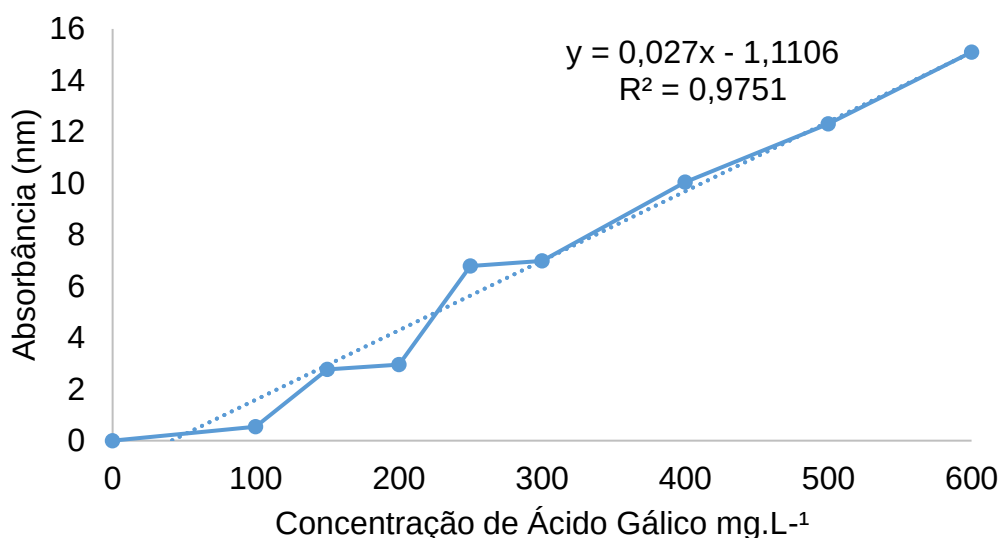
$$IVG = (G1/N1) + (G2/N2) + (G3/N3) + \dots + (Gn/Nn)$$

Onde: G1, G2, G3,...,Gn: Número de plântulas verificadas no dia da contagem; N1, N2, N3,...,Nn: Número de dias após a semeadura em que foi realizada a contagem.

A detecção de compostos fenólicos foi realizada a partir de análise histoquímica, por meio de inclusão dos pirênios em resina (conforme descrito no item anterior para lignina e suberina) e reação com cloreto férrico (JOHANSEN, 1940).

A quantificação de compostos fenólicos foi realizada a partir de sementes (tegumento, endosperma e embrião) e endocarpo. As amostras foram maceradas em almofariz de porcelana, utilizando como solução extratora metanol e água (1:1). A solução foi filtrada e foi determinado o conteúdo total de compostos fenólicos em espectrofotômetro, com absorvância de 760 nm. O reagente de Folin-Ciocalteu foi utilizado para a reação de coloração. Os dados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico por grama. Para determinar o conteúdo total de compostos fenólicos foi construída uma curva de calibração de ácido gálico (curva padrão) (Figura 12).

Figura 12 - Curva padrão de ácido gálico.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

c) Dormência morfológica - Análise morfológica dos embriões

Foram utilizadas quatro repetições de 100 pirênios, que foram imersos em água por 24 horas, e posteriormente seccionados longitudinalmente, para avaliação do desenvolvimento dos embriões. As avaliações foram realizadas em estereomicroscópio Stemi-305 com zoom de até 60x.

Os embriões foram classificados considerando os estádios: a) globular: quando o embrião é composto por uma massa de células, não sendo possível identificar os primórdios cotilédones; b) coração, é possível visualizar os primórdios cotilédones, onde o formato lembra um coração (ocupa aproximadamente 10% do comprimento da semente); c) pós coração, os cotilédones já estão maiores (ocupa aproximadamente 15% do comprimento da semente); d) torpedo, os cotilédones estão diferenciados (ocupa aproximadamente 20% do comprimento total) e; e) maduro, o embrião está desenvolvido e completamente diferenciado (ocupa aproximadamente 40% do comprimento da semente).

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Para comparação das médias entre tratamentos, utilizou-se o teste de Tukey 5% de probabilidade, utilizando o software Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2016).

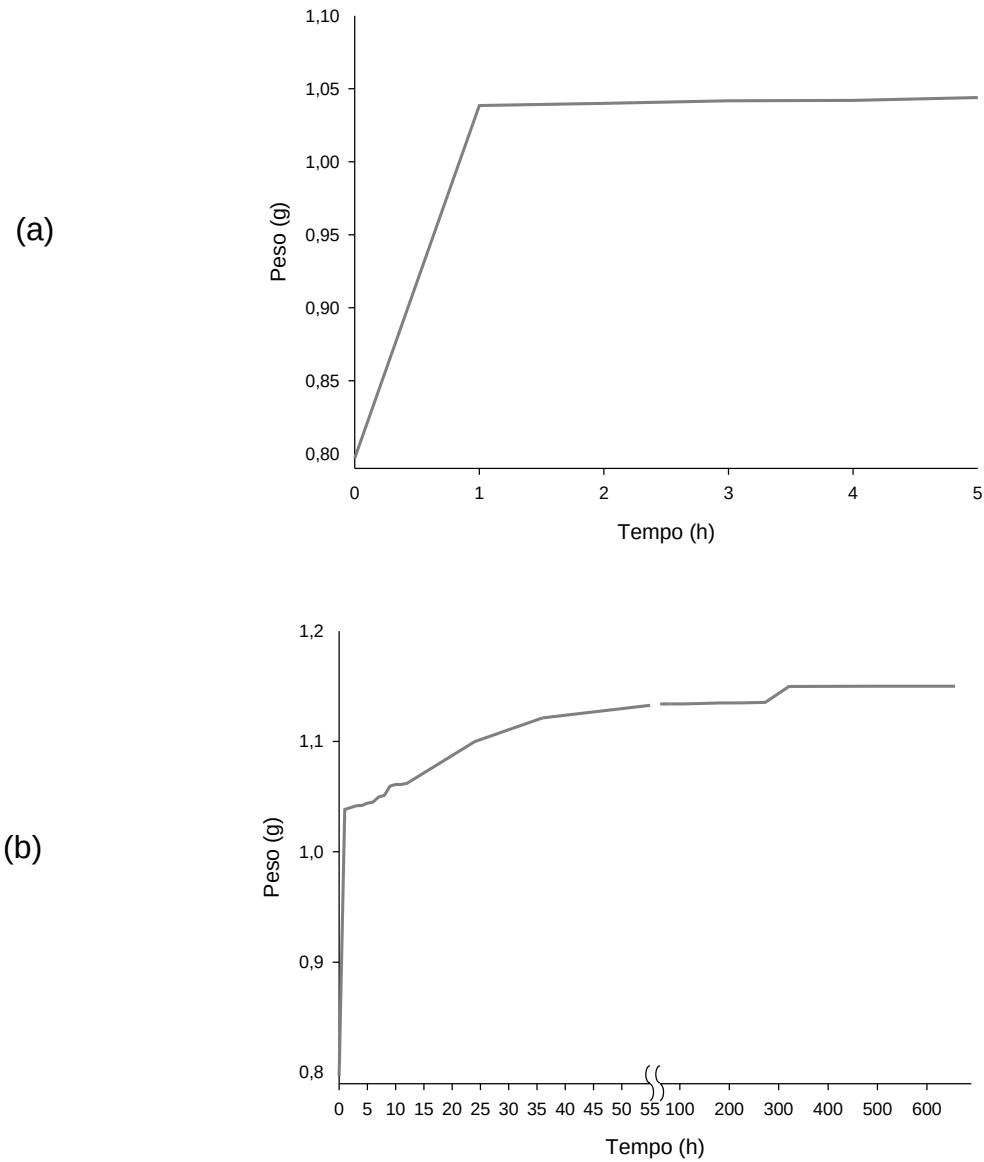
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de água dos pirênios estava em 8,7%, semelhante ao observado em outros trabalhos com a espécie (MEDEIROS; SILVA, 2001; MENEGUETI et al., 2004).

Durante o experimento relacionado à dormência física, foi verificado um aumento da massa dos pirênios expostos ao substrato umedecido, provavelmente devido à absorção de água. Durante toda a avaliação, os pirênios aumentaram a massa em 0,3 g em relação ao peso inicial; sendo que nas primeiras 24 horas, a massa foi aumentada em 78 % (Figura 13).

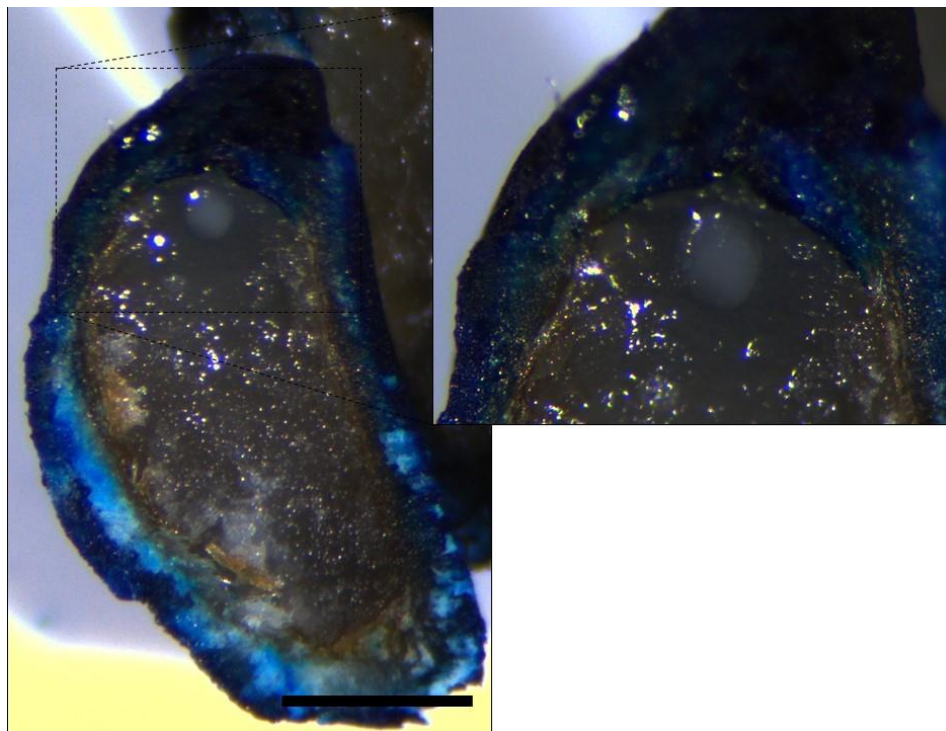
Apesar de ser verificada a absorção em água, foi observado, nos pirênios integros condicionados à hidratação em azul de metileno, que ela está relacionada apenas à entrada de água no endocarpo (Figura 14). A absorção de água em azul de metileno foi realizada no período de 48 horas devido aos resultados observados na curva de hidratação (aumento da massa anterior a esse período).

Figura 13 - Curva de hidratação de pirênios de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. baseada no ganho de massa (g) ao longo do tempo (h). (a) Curva de hidratação nas primeiras 5 horas; (b) Curva de hidratação em 600 horas.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura 14 - Pirênios de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. após imersão em solução de azul de metileno a 1% por 48 horas. A barra representa 1 mm.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Em estudos realizados com *I. latifolia* e *I. ronduta*, onde os pirênios foram imersos em água destilada e azul de metileno (1%) por 48 horas, foi verificada coloração apenas no endocarpo e no tegumento, não colorindo o endosperma e embrião (TEZUKA et al., 2013), resultados semelhantes ao observados nesse trabalho. Nos pirênios que foram escarificados com lixa (Figura 15), observou-se a entrada do corante no endosperma e embrião, após as 48 horas de embebição.

Figura 15 - Pirênios lixados de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. após imersão em solução de azul de metileno a 1% por 48 horas. A seta vermelha indica o local escarificado. A barra representa 1 mm.

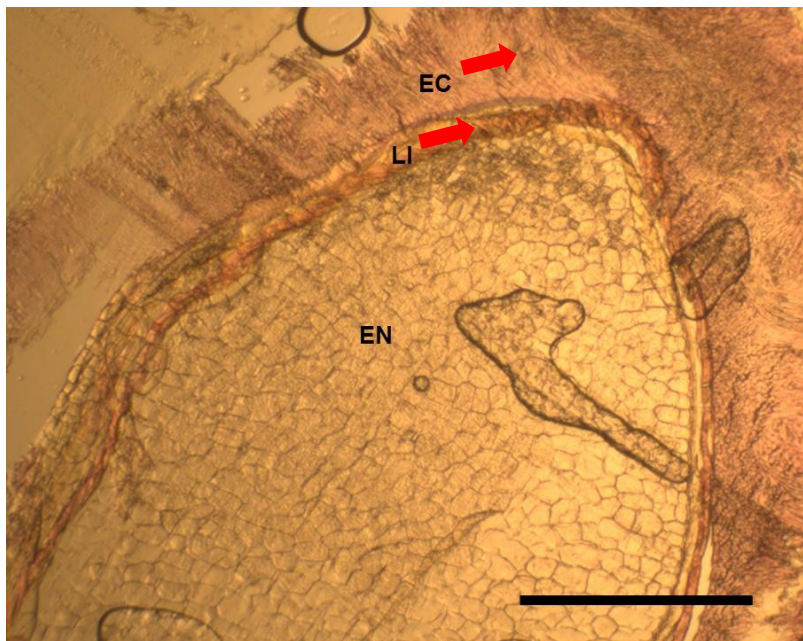


Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

A dormência física em pirênios de *I. paraguariensis* também foi observada por Grigoletti Júnior et al. (1999). O tecido de revestimento das sementes, formado por endocarpo e/ou tegumentos, pode ser um fator que ocasiona a dormência, denominada de dormência física (BASKIN; BASKIN, 2004). O tegumento protege o embrião, além de regular a absorção de água e oxigênio (ZENG et al., 2004), porém o revestimento pode inferir dormência por impedir a passagem de água (DEBEAUJON; LEÓN- KLOOSTERZIEL; KOORNEEF, 2000) e as trocas gasosas ou ainda restringir mecanicamente a saída da radícula (BEWLEY, 1997). Estudos realizados por Dolce; Mroginski; Rey (2010), em pirênios de *I. paraguariensis*, demonstraram que a germinação só foi possível após os pirênios serem seccionados.

A partir de cortes anatômicos pode-se observar a presença de lignina, na forma de uma camada de esclerênquima, junto ao envoltório da semente (endocarpo e tegumento) de *I. paraguariensis* (Figura 16).

Figura 16 – Presença de lignina em pirênios de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. A barra representa 0,5 mm.



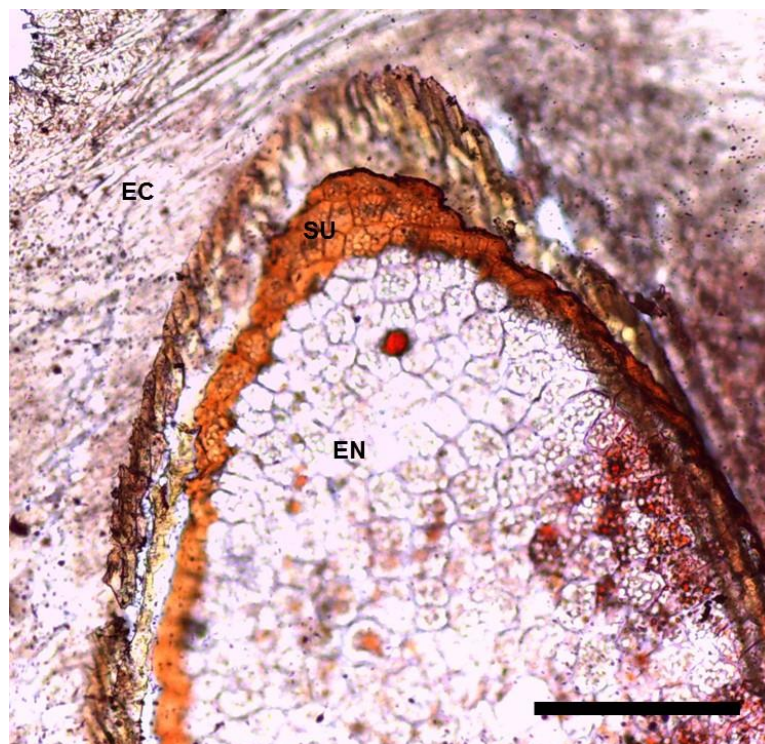
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Onde: EN: Endosperma; LI: Lignina; EC: Endocarpo.

A dormência física pode ser ocasionada pela presença de cutícula serosa, suberina, lignina, tecido paliçádico, cutina e mucilagens no tegumento e/ou pericarpo (PEREZ, 2004). Nos testes histoquímicos, utilizando o reagente Sudam III, foi possível identificar uma camada de ácidos graxos no endosperma, próxima ao tegumento (Figura 17).

O acúmulo de suberina forma um revestimento, uma barreira que evita a entrada de água (NAWRATH, 2002). A suberina é composta por dois tipos distintos de poliésteres insolúveis de ácido graxo e glicerol (SPURNÝ, 1964). Evidências genéticas mostram que a deposição de suberina controla a permeabilidade da semente (BEISSON et al., 2007). A camada de suberina foi também identificada em *I. opaca* junto ao endosperma seguido pela camada de lignina e substâncias pécticas presentes no tegumento e endocarpo (IVES, 1923), como verificado em *I. paraguariensis* neste trabalho.

Figura 17 – Presença de compostos lipofílicos em sementes de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. A barra representa 0,5 mm.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Onde: EN: Endosperma; SU: Suberina; EC: Endocarpo.

No entanto, a barreira física imposta pelo tegumento parece não ser o único obstáculo do processo germinativo de sementes de *I. paraguariensis*, uma vez que no teste de germinação de sementes de alface com o extrato hidroalcolólico, tanto de sementes quanto do endocarpo, não ocorreu a germinação, indicando a presença de inibidores químicos (Tabela 4). No extrato aquoso, houve germinação, porém, lenta comparada com a testemunha, diferindo estatisticamente tanto para IVG, como para Primeira Contagem de Germinação. Um fator a ser considerado é que ocorre maior solubilidade do(s) inibidor(es) em álcool, o que pode ser utilizado para futura identificação desse(s) inibidor(es). Salienta-se que houve 98% de germinação dos pirênios de alface em substrato umedecido com o extrator (DMSO), indicando que o mesmo não influencia nos resultados.

Tabela 4 - Germinação (%) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de *Lactuca sativa* (alface), com extratos: aquoso 15% de sementes (tegumento, endosperma e embrião) e 20% de endocarpo hidroalcólico, 15% de sementes (tegumento, endosperma e embrião) e 20% de endocarpo de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

TRATAMENTO	1ª Contagem	Contagem Final	IVG
	(4 dias) (%)	(7 dias) (%)	
Testemunha- DMSO	98 a	98 a	11,19 a
Ext. hidroalcoólico- Semente (15%)	0 b	0 b	-
Ext. hidroalcoólico- Endocarpo (20%)	0 b	0 b	-
Testemunha- Água	99 a	100 a	12,17 a
Ext. aquoso- Semente (30%)	68 b	83 b	6,25 c
Ext. aquoso- Endocarpo (20%)	90 b	95 a	8,87 b

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si em nível de significância de 5%.

As sementes de alface são utilizadas para examinar a alelopatia devido a sua sensibilidade aos metabólitos secundários que funcionam como aleloquímicos (FERREIRA; AQUILA, 2000). Os compostos alelopáticos podem afetar processos, tais como a germinação das sementes e o crescimento das plântulas, a assimilação de nutrientes, a fotossíntese, a respiração, a síntese de proteína, a atividade de enzimas e a perda de nutrientes pelos efeitos na permeabilidade da membrana celular (DURIGAN; ALMEIDA, 1993).

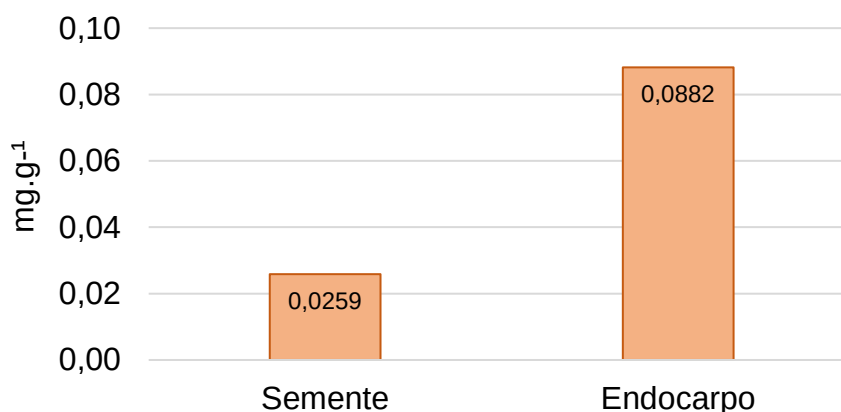
Em pirênios do mesmo gênero *Ilex*, Tezuka et al. (2013) verificaram a presença de inibidores no endosperma, tegumento e/ou endocarpo, pois embriões isolados germinaram 100% em 8 semanas de incubação, afirmando os resultados obtidos neste trabalho.

A presença de inibidores do processo de germinação condiciona a ocorrência de dormência do tipo fisiológica. A dormência fisiológica tem sido relacionada aos fitormônios, em especial ao ácido absísico (ABA), ou a produtos de metabolismo secundários, tais como terpenos e compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2013). Os compostos fenólicos podem influenciar no processo germinativo, uma vez que representam um obstáculo à difusão de gases, tendo como função proteger contra o vazamento de solutos, dano por embebição e estresse oxidativo (DEBEAUJON; LEÓN- KLOOSTERZIEL; KOORNEEF, 2000; MARCOS FILHO, 2015). Estes são um grupo de compostos secundários, muito heterogêneos quimicamente, provenientes

das rotas do ácido chiquímico e ácido malônico e com solubilidade variável de acordo com o composto (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Em sementes *I. paraguariensis*, na quantificação, foi verificada a presença de fenóis, tanto no endocarpo como na semente (tegumento, endosperma e embrião), sendo a maior quantidade presente no endocarpo comparada com a semente (Figura 18). No entanto, não houve reação ao cloreto férrico.

Figura 18 - Quantificação de compostos fenólicos no endocarpo e semente (tegumento, endosperma e embrião) de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

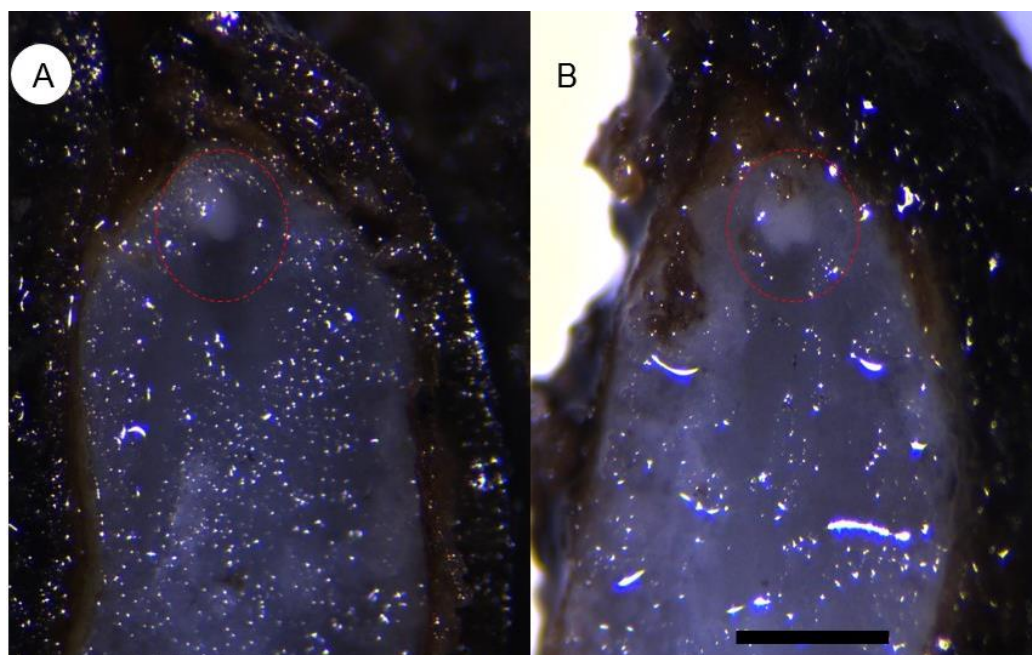


Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Em sementes florestais de *Piptadenia macrocarpa* Benth, *Joannesia princeps* Vell. e *Dalbergia nigra* Vell., houve variação de 0,329 a 1,342 mg.g⁻¹ de fenóis nos tegumentos, e de 0,016 a 0,495 mg.g⁻¹ nos embriões das sementes, indicando também menor concentração destes compostos nos tecidos internos das sementes (MACIEL; BORGES; BORGES, 1992). Com os bioensaios ficou evidente a presença de inibidores da germinação; mas, para a identificação dos mesmos são necessários mais estudos.

Além da barreira física imposta pelo tegumento e inibidores da germinação presentes no endocarpo e na semente, verificou-se na avaliação morfológica, que em 55,5% dos pirênios, os embriões encontravam-se no estágio globular ou coração (Figura 19), não sendo visualizados os embriões nos demais (44,5%). Os estádios de desenvolvimento, predominantes, de embriões de *I. paraguariensis*, descritos na literatura, vão de globular a pós-coração (NIKLAS, 1987; FOWLER; STURION; ZUFFELLATO-RIBAS, 2007).

Figura 19 - Sementes de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. seccionadas longitudinalmente com embriões nos estádios globular (A) e coração (B). A barra representa 0,5 mm.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

A imaturidade dos embriões foi igualmente relatada em outras espécies de *Ilex* (HU; ROGALSKI; WARD, 1979; TSANG; CORLETT, 2005; CHIEN et al., 2011) podendo ser um fenômeno comum para o gênero. Estudando a germinação de embriões imaturos de *I. paraguariensis in vitro*, de frutos de diferentes estágios de maturação, Ferreira et al. (1991) relataram que houve interrupção do crescimento de embriões no estágio conhecido como coração, quando os frutos estavam maduros, podendo ser consequência da presença de inibidores no endosperma e possivelmente nos próprios embriões. Por outro lado, Dolce; Mroginski; Rey (2010) relataram que não houve diferença significativa entre porcentagens de germinação de embriões excisados e de pirênios seccionados, sugerindo que o endosperma não inibe o desenvolvimento ou germinação de embriões.

Acredita-se que as diferentes causas da dormência no mesmo pirênio se complementam, pois a física dificulta trocas gasosas, impedindo a liberação e assimilação dos inibidores, que, por sua vez, dificultam o desenvolvimento do embrião.

4.5 CONCLUSÃO

Sementes de *Ilex paraguariensis* possuem dormência combinada: física (não absorção em água), morfológica (devido a embrião subdesenvolvido) e há indícios de fisiológica (presença de inibidores), sendo recomendado a investigar o agente inibidor.

5 CAPITULO IV - TEMPERATURA, ESCARIFICAÇÃO MECÂNICA E ÁCIDO GIBERÉLICO NA SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA E GERMINAÇÃO DE PIRÊNIOS DE *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

5.1 RESUMO

Objetivou-se determinar os efeitos da temperatura, da escarificação mecânica e do ácido giberélico (GA3) na superação de dormência e na germinação de sementes de *I. paraguariensis*. Pirênios de dois lotes foram pré-selecionados por meio de análise radiográfica, sendo submetidos aos experimentos apenas aqueles considerados cheios. Foram conduzidos dois experimentos: 1- Diferentes temperaturas (constantes: 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C, e alternadas: 5/15, 10/20, 10/25, 15/25, 20/30 e 10/35 °C) e escarificação mecânica com lixa e; 2- Diferentes temperaturas (5, 5/15, 10/20, 10/25, 15/25 e 20/30 °C) e diferentes dosagens de ácido giberélico (Testemunha, 360 µM, 720 µM e 3600 µM). No experimento 1, não houve germinação nos pirênios escarificados. Nos pirênios intactos, foi verificada germinação apenas na temperatura 10/20 °C para o lote de Ijuí, e 10/25 °C para o lote de Chapecó e nas temperaturas de 15/25 e 20/30 °C para ambos os lotes. Em temperaturas constantes, a partir de 25 °C, e alternada de 10/35 °C, foi registrado o maior número de pirênios danificados. No experimento 2, o tratamento que possibilitou dados numéricos superiores de germinação foi em temperatura de 20/30 °C e 260 µM de ácido giberélico (26%). Para a superação da dormência e germinação recomenda-se a temperatura alternada de 20/30 °C e o uso do ácido giberélico na dosagem de 260 µM.

Palavras-chave: Erva-mate; giberelina; lixa.

5.2 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) ocorre naturalmente em ecossistemas associados ao bioma Mata Atlântica, e é uma das espécies arbóreas nativas de maior importância econômica na região Sul do Brasil (GERHARDT, 2013), sendo as folhas comercializadas e consumidas principalmente na forma de chá (chá-mate). No Brasil, geralmente o cultivo de erva-mate é realizado em solos ácidos e de baixa fertilidade natural (SANTIN et al., 2013; OLIVA et al., 2014).

Ilex é um gênero da família Aquifoliaceae cujas sementes (pirênios) são conhecidas por possuir embrião basal, relativamente pequeno, quando maduro ocupa de 1/3 a 1/2 da porção inferior da semente; rudimentar, não desenvolvido, porém diferenciado (MARTIN, 1946; BASKIN; BASKIN, 2004; BRASIL, 2009b).

Os pirênios de *I. paraguariensis* possuem germinação lenta e desuniforme devido a presença de dormência, que é descrita como morfológica (NIKLAS, 1987;

HEUSER, 1990; SANSBERRO et al., 1998; FOWLER; BIANCHETTI, 2000; MENEGUETI et al., 2004), morfofisiológica (CUQUEL; CARVALHO; CHAMMA, 1994; GALÍNDEZ et al., 2018), e física (MEDEIROS, 1998), o que torna necessária a utilização de mais de um método para a sua superação.

Para a superação da dormência de pirênios de *I. paraguariensis*, é recomendada a estratificação entre areia, pelo período de 6 meses (ZANON, 1988), porém o tempo da superação da dormência e germinação é de aproximadamente 365 dias (BRASIL, 2009a), e com germinação lenta e desuniforme. Estudos para a superação da dormência e germinação das sementes, com maior eficiência e em tempo reduzido, são necessários.

Em geral, para a estratificação dos pirênios são utilizadas temperaturas mais altas ou mais baixas, ou ambas de forma alternada. Já para a germinação, as temperaturas são mais amenas, frequentemente em torno de 20 a 30 °C, para espécies da Mata Atlântica (BRANCALION et al., 2010). A temperatura é um dos fatores que influencia a germinação das sementes, determinando a capacidade e a velocidade de germinação (BEWLEY; BLACK, 1994).

Além da estratificação, outros métodos são utilizados para a superação da dormência, como a escarificação mecânica, frequentemente utilizada para espécies florestais (HERMANSEN; DURYEA; WHITE, 2000) e o uso de produtos químicos, como o ácido giberélico.

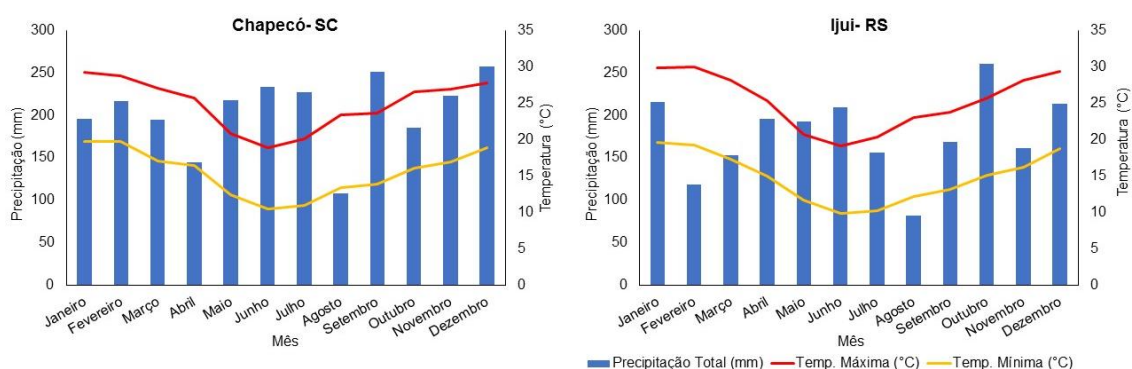
As giberelinas (GAs) controlam vários aspectos do desenvolvimento das plantas, incluindo-se a germinação, e desenvolvimento das plântulas, além de estarem envolvidas na superação da dormência (BEWLEY; BLACK, 1994; DAVIES, 1995). As GAs são importantes para estimular a ação de enzimas, acelerando a germinação por meio do enfraquecimento dos tecidos em torno do embrião, além de atuar na hidrólise dos tecidos de reserva para o fornecimento de energia ao embrião (METIVIER, 1986; GROOT; KARSSSEN, 1987).

Objetivou-se determinar os efeitos da temperatura, da escarificação mecânica e do ácido giberélico (GA₃) na superação de dormência e germinação de sementes de *I. paraguariensis*.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

Frutos maduros, com coloração roxa escura (cor 2,5/1 F: 5Y da Tabela de Munsell) de *I. paraguariensis* foram colhidos no mês de abril de 2017, sob telas instaladas abaixo das matrizes, nos municípios de Ijuí, RS e Chapecó, SC. A temperatura máxima média, no período de 2015 a 2017, para ambos os locais, foi de 25 °C e mínima de 15 °C (Figura 20).

Figura 20 - Dados climáticos (precipitação total, temperatura máxima e mínima) médios, dos anos 2015 a 2017, mensais dos municípios de Chapeco, SC e Ijuí, RS.



Fonte: Elaborada pela autora com dados do Climate, 2018.

Após a colheita, os pirênios foram extraídos, com auxílio de peneira e água corrente, beneficiados com uso de soprador para retirada de impurezas e utilizados nas análises.

Inicialmente, foi determinado o teor de água através método da estufa a 105 ± 3 °C, por 24 h, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009a). Os experimentos foram conduzidos no Departamento de Conservação de Sementes, Millenium Seed Bank, Royal Botanic Gardens, Kew.

Os pirênios de *I. paraguariensis* foram pré-selecionados por meio de análise radiográfica (Raios X digital, Ultra Focus FAXTRON), sendo submetidos aos experimentos apenas aqueles considerados cheios.

Foram conduzidos dois experimentos, um com o intuito de avaliar temperaturas e escarificação mecânica na germinação dos pirênios e outro temperaturas e ácido giberélico.

EXPERIMENTO 1 – Temperaturas e escarificação mecânica

Pirênios, dos dois lotes, escarificados com o uso de lixa até o rompimento do tegumento e pirênios intactos foram submetidas à germinação em BODs com fotoperíodo de 12 h, em temperaturas constantes de: 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C, e alternadas (12h/12h) de: 5/15, 10/20, 10/25, 15/25, 20/30 e 10/35 °C.

Os pirênios foram dispostos em placas de Petri em quatro repetições de 25 pirênios, em substrato ágar 1%. A contagem da germinação foi realizada mensalmente no período de 10 meses, considerando-se pirênio germinado quando a radícula atingiu 2 mm de comprimento. Para a avaliação do aspecto dos tecidos (análise física), nos primeiros 5 meses, foram retirados 5 pirênios não germinados, por mês, de cada repetição, os quais foram secos por 30 minutos em temperatura ambiente e submetidos ao teste de raios X no equipamento Ultra Focus FAXTRON. Os pirênios foram classificados em cheios e danificados. Além disso, foi realizada a análise visual, por meio do corte dos pirênios.

EXPERIMENTO 2 – Temperaturas e ácido giberélico

Pirênios do lote de Chapecó, SC, foram dispostos em placas de Petri (25 pirênios/placa) em 4 repetições. O substrato utilizado foi ágar com diferentes concentrações de GA₃ (Testemunha, 360 µM, 720µM e 3600µM). Os pirênios foram incubados em BODs com fotoperíodo de 12 horas nas seguintes temperaturas: 5, 5/15, 10/20, 10/25, 15/25 e 20/30 °C. A contagem da germinação foi realizada mensalmente no período de 10 meses, considerou-se pirênio germinado quando a radícula atingiu 2 mm.

A análise estatística realizada, foi por métodos não paramétricos. Para comparação utilizou-se o teste de Truskal-Wallis com 5% de probabilidade, utilizando o software Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2016).

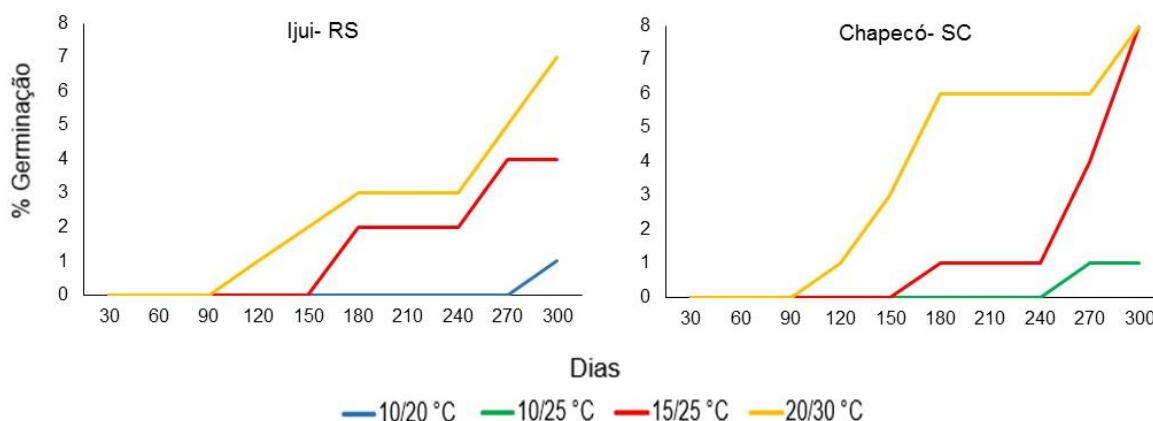
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de água dos pirênios foi de 6,5 % para o lote de Chapecó e 6,6 % para o lote de Ijuí. Esses resultados são semelhantes ao observado em outros trabalhos com a espécie (MEDEIROS; SILVA, 2001; MENEGUETI et al., 2004).

EXPERIMENTO 1 – Temperaturas e escarificação mecânica

Independente da temperatura de incubação, não houve germinação nos pirênios escarificados. O mesmo foi observado nas temperaturas constantes. Nas temperaturas alternadas houve germinação em 10/20 °C apenas para o lote de Ijuí, 10/25 °C para o lote de Chapecó e nas temperaturas de 15/25 e 20/30 °C para ambos os lotes (Figura 2).

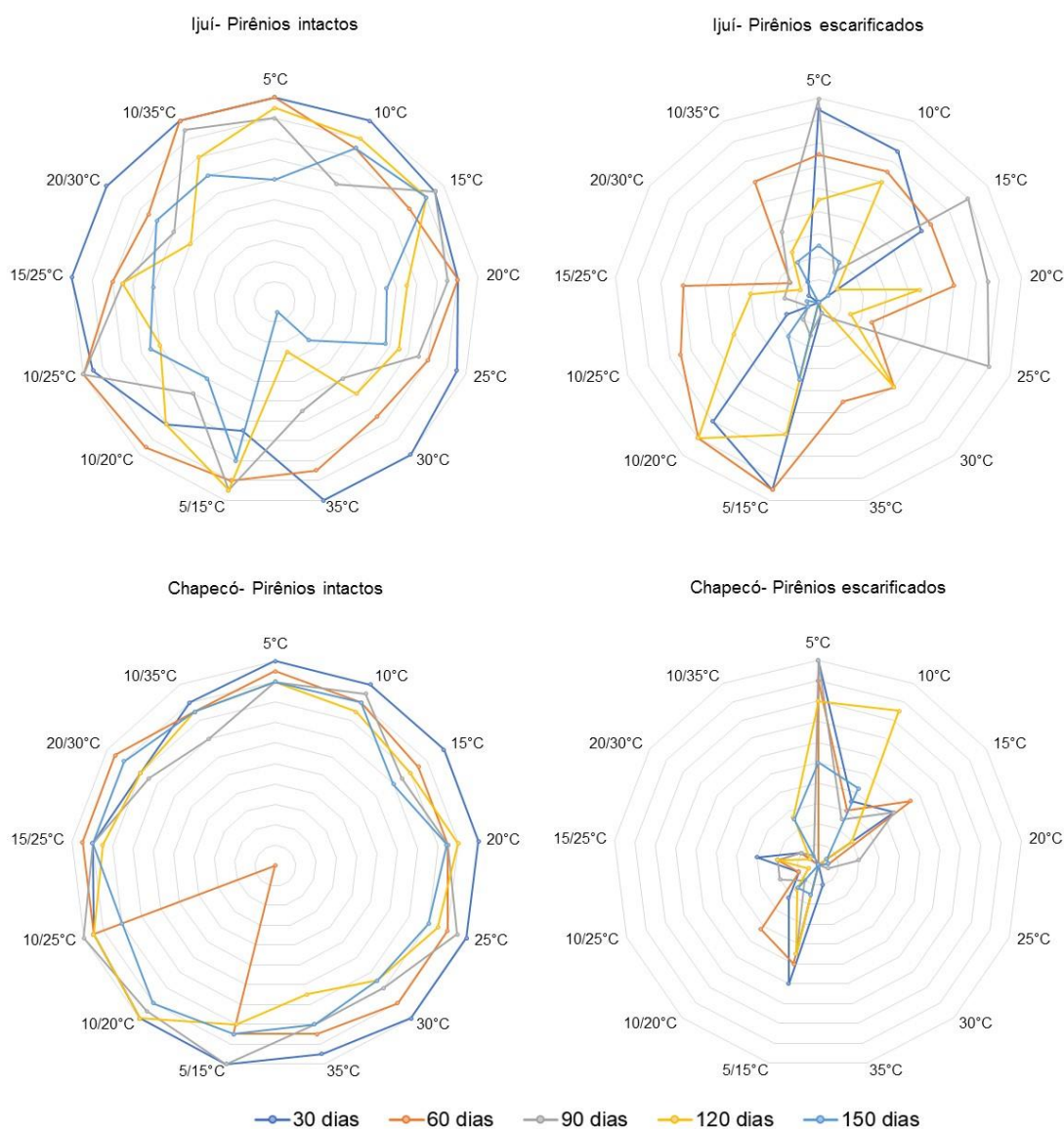
Figura 21 - Germinação (%) de pirênios intactos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. dos lotes de Ijuí e Chapecó, no período de 300 dias incubados em diferentes temperaturas.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

O máximo de germinação (protusão da radícula) foi de 7% para o lote de Ijuí, e 8% para o lote de Chapecó, na temperatura alternada de 20/30 °C. Porém, esta temperatura, comparada com as demais, demonstrou menor quantidade de pirênios aptos fisicamente para a germinação (Figura 22), acredita-se ser devido à alta temperatura, que aumenta o metabolismo das sementes promovendo a germinação ou a morte das mesmas. Temperaturas elevadas podem causar danos às sementes de determinadas espécies, levando, por exemplo, a alterações enzimáticas, reduzindo a quantidade de aminoácidos livres e modificando a velocidade de reações metabólicas (BRADFORD; NONOGAKI, 2007; MARCOS FILHO, 2015). Em relação ao índice de velocidade de germinação (IVG) não houve diferença estatística entre as temperaturas.

Figura 22 - Pirênios cheios (%) intactos ou escarificados de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., condicionados à diferentes temperaturas, e avaliados por meio do teste de raios X. Nos gráficos de radar, a linha externa representa 100%, e o ponto interno 0%.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Em temperaturas muito elevadas, em relação àquelas que a semente da espécie tolera, a energia contida nas células ou sistemas de membranas celulares da semente pode ficar cada vez menos favorável ao crescimento do embrião, até atingir a temperatura máxima em que toda a energia é dissipada, ocorrendo nesse ponto processos como a desnaturação de proteínas, limitando a germinação (CASSARO-SILVA, 2001). Conforme foi constatado neste trabalho, em temperaturas constantes a

partir de 25 °C e alternada de 10/35 °C foram registrados os maiores números de pirênios com endosperma escurecido ou liquidificado.

No entanto, temperaturas mais altas, que a temperatura ideal, auxiliam na redução da dormência física (BASKIN, 2003) e fisiológica (IGLESIAS-FERNÁNDEZ; RODRÍGUEZ-GACIO; MATILLA, 2011). No ambiente natural, as sementes sofrem fortemente com mudanças diárias de temperatura e umidade, principalmente quando estão na parte superior do solo (BENEVUTI; MACCHIA; MIELE, 2001; MERRITT et al., 2007; SAATKAMP et al., 2011).

Normalmente, a temperatura de germinação está relacionada àquela da região de origem geográfica da espécie, considerando a época favorável para a germinação (ANDRADE et al., 2000). Dessa forma, existem espécies cujo processo germinativo é favorecido por alternância de temperatura (SANTOS; AGUIAR, 2005; LOPES; SOARES, 2006). Para ambos os lotes, após o período de dispersão dos pirênios, há uma redução na temperatura, e em torno de 6 meses após, registra-se a temperatura, aproximada, de 20/30 °C pelo período de até 5 meses, favorecendo, possivelmente, a germinação dos pirênios. É importante destacar que as temperaturas alternadas abaixo de 10/25 °C e constantes abaixo de 20 °C não contribuíram para o escurecimento ou liquidificação do endosperma. As temperaturas mais baixas, possivelmente, reduziram o metabolismo dos pirênios, mantendo-os aptos para a germinação.

A temperatura é um dos fatores ambientais que exerce influência sobre a germinação, atuando na embebição de água pela semente, assim como nas reações bioquímicas que regulam o metabolismo envolvido nesse processo (CASTRO; BRADFORD; HILHORST, 2004). É possível afirmar que a germinação somente ocorrerá dentro de determinados limites de temperatura, nos quais o processo ocorre com máxima eficiência (OSIPI; NAKAGAWA, 2005).

Na análise radiográfica, foram observados pirênios cheios (com endosperma visivelmente claro) e danificados (com endosperma escuro ou quando o endosperma estava liquidificado) (Figura 23). É importante salientar que todos os pirênios estavam cheios no início dos experimentos, pois foram pré-selecionados no teste de raios X.

Figura 23 - Classificação dos pirênios de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., com o uso de raios X. Figura A: pirênio cheio; Figuras B e C: pirênios deteriorados com endospermas escurecidos; Figura D: pirênio deteriorado com endosperma liquidificado.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Por meio do corte dos pirênios, foi verificado que aqueles considerados cheios, possuíam aparência vítrea, ou seja, consistência rígida, ao contrário daqueles considerados deteriorados com endosperma liquidificado. Uma das possíveis causas para a ocorrência de endosperma liquidificado é a elevação da temperatura, ocasionando maior atividade celular, levando a deterioração da semente (MARCOS-FILHO, 2015). Os pirênios deteriorados, com interior escurecido, apresentaram endosperma com aspecto farináceo e foram considerados como mortos.

EXPERIMENTO 2 – Temperaturas e ácido giberélico

O tratamento que possibilitou dados numéricos superiores de germinação foi temperatura de 20/30 °C, e concentração de 260 µM de ácido giberélico (Tabela 5), confirmando os resultados de temperatura obtidos no Experimento 1.

Tabela 5 – Germinação final (%) após 10 meses, de pirênios de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., submetidos a diferentes temperaturas e concentrações de ácido giberélico (GA₃).

TEMPERATURAS	ÁCIDO GIBERÉLICO			
	Controle (0 µM)	260 µM	720 µM	2600 µM
5 °C	0 Aa	0 Ba	0 Aa	0 Ba
5/15 °C	0 Aa	0 Ba	0 Aa	0 Ba
10/20 °C	0 Aa	3 ABa	4 Aa	6 ABa
10/25 °C	1 Aa	8 ABa	6 Aa	4 ABa
15/25 °C	7 Aa	9 ABa	1 Aa	15 Aa
20/30 °C	6 Ab	26 Aa	15 Aab	15 Aab

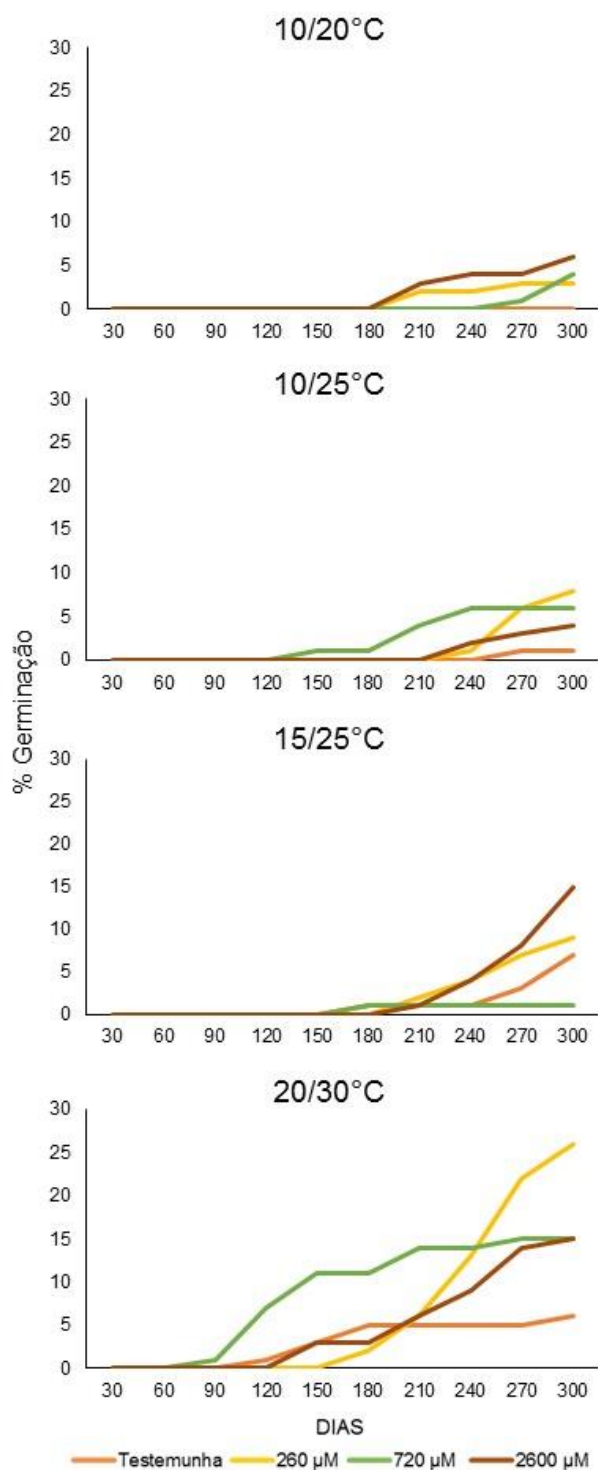
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Letras maiúsculas comparam as colunas, letras minúsculas comparam as linhas, no teste Truskal-Wallis a nível de 5%.

Na temperatura de 20/30 °C, a germinação teve início a partir de 60 dias na concentração de 720 µM de GA₃; aos 120 dias na concentração de 0 e; aos 150 dias na concentração de 2600 µM. Já na temperatura de 10/25 °C, a germinação iniciou aos 150 dias (Figura 24). Os regimes de temperaturas alternadas podem estar relacionados à alteração no balanço de substâncias promotoras e inibidoras da germinação (VAZQUEZ-YANES; OROZCO-SEGOVIA, 1993; BEWLEY; BLACK, 1994; OROZCO-SEGOVIA et al., 2007; MARCOS- FILHO, 2015), desta forma se tornando eficiente para a superação de dormência e germinação dos pirênios de *I. paraguariensis*.

Houve diferença estatística referente à concentração de GA₃ aplicada, demonstrando eficiência na aplicação comparando com a testemunha. A dosagem de 720 e 2600 µM promoveram o início da germinação em menor tempo, porém o tratamento com 260 µM promoveu a germinação em maior porcentagem ao longo do tempo.

Figura 24 - Germinação (%), no período de 300 dias, de pirênios de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. submetidos a diferentes temperaturas e dosagens de ácido giberélico (GA₃)



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Em estudos com *I. maximowicziana*, foram testadas três dosagens de giberelina (26, 260, e 2600 μM), onde a aplicação de 2600 μM promoveu a germinação de aproximadamente 90% aos 60 dias, 260 μM aproximadamente 75%, enquanto a germinação com água alcançou aproximadamente 50% e no final do experimento não houve diferença estatística entre os tratamentos (CHIEN et al., 2011), similar ao comportamento de *I. paraguariensis*, onde as concentrações maiores foram mais eficientes, pois na concentração de 720 μM , a germinação ocorreu 90 dias antes do tratamento com dosagem de 260 μM , porém na dosagem mais baixa, ao final dos 300 dias, houve maior porcentagem de germinação.

A aplicação de giberelinas exógenas podem superar a dormência fisiológica e promover a germinação de sementes de angiospermas e gimnospermas (BEWLEY; BLACK, 1994; BASKIN; BASKIN, 2014). As giberelinas GA_1 , GA_3 , GA_4 , e GA_7 , que são ativadores biológicos, podem encurtar o tempo desde a semeadura até a germinação de sementes dormentes e, assim, o tempo necessário para a produção de mudas (BASKIN; BASKIN, 2014).

A partir dos dados obtidos, observou-se que a aplicação de ácido giberélico foi eficiente, porém recomendam-se estudos com a aplicação desse produto com concentrações entre 260 e 720 μM e aumento gradativo da temperatura até 20/30 °C, o que possivelmente permitirá a redução da mortalidade dos pirênios.

5.5 CONCLUSÃO

Para a superação da dormência e germinação recomenda-se a temperatura alternada de 20/30 °C e uso do ácido giberélico na dosagem de 260 μM .

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com esse trabalho, foi verificado que além da dormência, a presença de sementes vazias e deterioradas é causa da baixa germinação de *Ilex paraguariensis*, o que justifica estudos referentes à polinização.

Foi possível a descrição das classes de desenvolvimento dos embriões, a relação do tamanho do embrião com o da semente, além da comprovação da dormência combinada.

Sugerem-se estudos relacionados à identificação dos inibidores da germinação, métodos para a superação da dormência e germinação, por meio do aumento gradativo da temperatura e uso de diferentes concentrações de ácido giberélico.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A. C. S. DE et al. Germinação de sementes de jenipapo: Temperatura, substrato e morfologia do desenvolvimento pós-seminal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 609–615, 2000.
- ANDRADE, F. M. Exploração, manejo e potencial socioeconômico da erva-mate. In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. (Eds.). **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. 2 Ed. ed. São Paulo: SENAC, 2003.
- ARNOLD, W.; MITRENGA, D.; MAYRESBACH, H. Gefriertrocknung und Einbettung in Glycolmethacrylat (GMA) – Ergebnisse Histochemischer Reaktionen. **Acta Histochem**, v. 14, p. 271–277, 1975.
- ARRIETA, S.; SUÁREZ, F. Germination and seed bank depletion of holly (*Ilex aquifolium* L.) in four microhabitat types. **Seed Science Research**, v. 14, n. 3, p. 305–313, 2004.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul: guia de identificação e interesse ecológico**. 1 Ed. Instituto Souza Cruz, 2002.
- BASKIN, C. C. Breaking physical dormancy in seeds- focussing on the lens. **New Phytologist**, v. 158, p. 229–232, 2003.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination**. 2. ed. San Diego: Elsevier, 2014.
- BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, v. 14, p. 1–16, 2004.
- BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C.; LI, X. Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. **Plant Species Biology**, v. 15, n. 2, p. 139–152, 2000.
- BEISSON, F. et al. The Acyltransferase GPAT5 Is Required for the Synthesis of Suberin in Seed Coat and Root of *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 19, n. January, p. 351–368, 2007.
- BENEVUTI, S.; MACCHIA, M.; MIELE, S. Quantitative analysis of emergence of seedlings from buried seed weeds with increasing soil depth. **Weed Science**, v. 49, n. 4, p. 528–535, 2001.
- BERGOTTINI, V. M. et al. Bio-inoculation of yerba mate seedlings (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) with native plant growth-promoting rhizobacteria: a sustainable alternative to improve crop yield. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n.

6, p. 749–755, 2015.

BEWLEY, J. D. Seed Germination and Dormancy. **The Plant Cell**, v. 9, n. July, p. 1055–1066, 1997.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2 Ed. New York: Plenum Press, 1994.

BOUZON, Z. L. **No Title Aspectos histoquímicos e ultra-estruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypnea musciformis* (Gigartinales – Rhodophyta)**. Universidade Federal do Paraná, 1993.

BRADFORD, K. J.; NONOGAKI, H. **Seed Development and Dormancy**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2007.

BRANCALION, P. H. S. et al. Instrumentos legais podem contribuir para a restauração de florestas tropicais biodiversas. **Revista Árvore**, v. 34, n. 3, p. 455–470, 2010.

BRASIL. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009a.

BRASIL. **Glossário Ilustrado de morfologia**. Brasília: MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, v. 1, 2009b.

BRYANT, J. A. **Seed physiology**. London: Edward Arnold, 1985.

CARDOSO, V. J. M. Germinação e dormência. In: KERBAUY, G. B. (Ed.). **Fisiologia Vegetal**. 2 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 384–407.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção**. 4 Ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003.

CASSARO-SILVA, M. Efeito da temperatura na germinação de sementes de manduirana (*Senna macranthera* (Collad.) Irwin et Barn. – Caesalpiniaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p. 92–99, 2001.

CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação: Do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 149–162.

CATAPAN, M. I. S. **Influência da temperatura, substrato e luz na germinação de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil.** Universidade Federal do Paraná, 1998.

CHIEN, C. et al. Nondeep simple morphophysiological dormancy in seeds of *Ilex maximowicziana* from northern (subtropical) and southern (tropical) Taiwan. **Ecological Research**, n. 26, p. 163–171, 2011.

CLIMATE. **Dados Climáticos para cidades mundiais.** Disponível em: <<http://pt.climate-data.org/>>. Acesso em: 9 set. 2016.

CLIMATE. **Dados Climáticos para cidades mundiais.** Disponível em: <<http://pt.climate-data.org/>>. Acesso em: 10 maio. 2018.

CUQUEL, F. L.; CARVALHO, M. L. M. DE; CHAMMA, H. M. C. P. Avaliação de métodos de estratificação para a quebra de dormência de sementes de erva-mate. **Scientia Agricola**, v. 51, n. 3, p. 415–421, 1994.

DANCEY, C. P.; REIDY, J. **Estatística sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows.** 3a Ed. Artmed Editora, 2006.

DAVIES, P. J. **Plant Hormones.** Springer Netherlands, 1995.

DEBEAUJON, I. et al. Seed Coat Development and Dormancy. In: BRADFORD, K. J.; NONOGAKI, H. (Eds.). **Seed Development, Dormancy and Germination.** Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2007. p. 6125–43.

DEBEAUJON, I.; LEÓN- KLOOSTERZIEL, K. M.; KOORNEEF, M. Influence of the Testa on Seed Dormancy , Germination , and Longevity in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 122, n. February, p. 403–413, 2000.

DOLCE, N. R.; MROGINSKI, L. A.; REY, H. Y. Endosperm and endocarp effects on the *Ilex paraguariensis* A. St. -Hil. (Aquifoliaceae) seed germination. **Seed Science and Technology**, v. 38, n. July, p. 441–448, 2010.

DURIGAN, J. C.; ALMEIDA, F. S. **Noções sobre a alelopatia.** Jaboticabal, 1993.

FERREIRA, A. G. et al. In vitro germination of immature embryos of *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Phyton**, v. 54, n. 1, p. 27–32, 1991.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 12, n. Edição Especial, p. 175–204, 2000.

FINCH-SAVAGE, W. E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. p. 501–523, 2006.

FOWLER, J. A. P.; BIANCHETTI, A. Dormência em sementes florestais. **Embrapa Florestas**, Documentos 40, p. 1–27, 2000.

FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A. Aspectos da Formação do fruto e da semente na germinação da erva-mate. **Embrapa**, n. Comunicado Técnico nº 45, p. 1–5, 2000.

FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Variação do desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. n. 54, n. 1, p. 105–108, 2007.

GALÍNDEZ, G. et al. Three levels of simple morphophysiological dormancy in seeds of *Ilex* (Aquifoliaceae) species from Argentina. **Seed Science Research**, n. May, p. 1–9, 2018.

GARCÍA, D.; OBESO, J. R.; MARTÍNEZ, I. Rodent seed predation promotes differential recruitment among bird-dispersed trees in temperate secondary forests. **Oecologia**, v. 144, n. 3, p. 435–446, 2005.

GERHARDT, M. **História Ambiental da erva-mate**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A. et al. Efeito de fungicidas aplicados nas sementes, na emergência de plântulas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 39, p. 31–39, 1999.

GROOT, S. P. C.; KARSSSEN, C. M. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. **Planta**, v. 171, n. 4, p. 525–531, 1987.

HERMANSEN, L. A.; DURYEA, M. L.; WHITE, T. L. Variability in seed coat dormancy in *Dimorphandra mollis*. **Seed Science and Technology**, v. 28, n. 3, p. 567–580, 2000.

HEUSER, E. D. *Ilex paraguariensis* St. Hill.: **Endosperma e Embrião durante a embriogênese tardia**. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1990.

HEUSER, E. D. **Embriogênese em *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aspectos do Suspensor e Endosperma**. Tese. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

HILHORST, H. W. M. Definitions and Hypotheses of Seed Dormancy. In: BRADFORD, K. J.; NONOGAKI, H. (Eds.). **Seed development, dormancy, and germination**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2007. p. 50–71.

HORBACH, M. A. et al. Micropropagação de plântulas de erva-mate obtidas de embriões zigóticos. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 113–119, 2011.

HU, C.-Y.; ROGALSKI, F.; WARD, C. Factors Maintaining *Ilex* Rudimentary Embryos in the Quiescent State and the Ultrastructural Changes during In vitro Activation. **Chicago Journals**, v. 140, n. 3, p. 272–279, 1979.

IGLESIAS-FERNÁNDEZ, R.; RODRÍGUEZ-GACIO, M. D. C.; MATILLA, A. J. Progress in research on dry afterripening. **Seed Science Research**, v. 21, n. 2, p. 69–80, 2011.

IVES, S. A. Maturation and Germination of Seeds of *Ilex opaca*. **Botanical Gazette**, v. 76, n. 1, p. 60–77, 1923.

JESKE, V. L.; SILVA, P. F. DA; HEUSER, E. D. Caracterização morfo-histológica do endocarpo em pirenos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **VXII Salão de Iniciação Científica**, 2000.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940.

KUNIYOSHI, Y. S. **Morfologia da Semente e da Germinação de 25 Espécies Arbóreas de uma Floresta com Araucaria**. Dissertação. Universidade Federal do Paraná, 1983.

LIEBSCH, D.; MIKICH, B. O. S. Fenologia reprodutiva de espécies vegetais da Floresta Ombrófila Mista do Paraná, Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, v. 32, n. 2, p. 375–391, 2009.

LOPES, J. C.; SOARES, A. DA S. Estudo da maturação de sementes de carvalho vermelho (*Miconia cinnamomifolia* (Dc.) Naud.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 623–628, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

MACIEL, A. DA S.; BORGES, E. E. DE L. E; BORGES, R. DE C. G. Determinação da presença de fenóis em sementes de espécies florestais e sua relação com inibidores de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 14, n. 1, p. 1–4, 1992.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176–177, 1962.

MALAVASI, M. M. Germinação de Sementes. In: RODRIGUES, F. M. C. (Ed.). .

Manual de Análise de Sementes Florestais. Campinas: Fundação Cargil, 1988. p. 25–40.

MARCOS- FILHO, J. Germinação. In: **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas.** 2. ed. Londrina- PR: ABRATES, 2015. p. 289–372.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de Plantas Cultivadas.** Piracicaba: Fealq, 2015.
MARTIN, A. C. The Comparative Internal Morphology of Seeds. **Source American Midland Naturalist**, v. 36, n. 3, p. 513–660, 1946.

MEDEIROS, A. C. DE S. et al. Superação da dormência e germinação de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Embrapa**, n. 41, p. 1–3, 1997.

MEDEIROS, A. C. DE S. **Dormência em Sementes de Erva- mate** (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Embrapa- CNPFColombo, 1998.

MEDEIROS, A. C. DE S. Aspectos De Dormência em Sementes de Espécies Arbóreas. **Circular Técnica 55**, p. 12, 2001.

MEDEIROS, A. C. DE S.; SILVA, L. C. DA. Efeitos Da Secagem Na Viabilidade Das Sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hill. **Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo**, v. 42, p. 35–46, 2001.

MELLO, V. D. C. **Morfologia e germinação da semente de erva-mate** (*Ilex paraguariensis* St. Hill). [s.l.] UFPEL, 1980.

MENEGUETI, J. C. B. et al. Superação da Dormência de Sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) por estratificação. **Revista Varia Scientia**, p. 157–182, 2004.

MERRITT, D. J. et al. Seed dormancy and germination stimulation syndromes for Australian temperate species. **Australian Journal of Botany**, v. 55, n. 3, p. 336–344, 2007.

METIVIER, J. R. Citocininas e giberelinas. In: FERRI, M. G. (Ed.). **Fisiologia Vegetal.** São Paulo: EDUSP, 1986. p. 92–162.

NAWRATH, C. **The Biopolymers Cutin and Suberin.** The American Society of Plant Biologists, 2002.

NIKLAS, C. O. Estudios Embriologicos y citologicos en la yerba mate *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Instituto de Botánica del Nordeste**, v. 6, n. 1, p. 45–56, 1987.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368–373, 1965.

OBESO, J. R. Patterns of variation in *Ilex aquifolium* fruit traits related to fruit consumption by birds and seed predation by rodents. **Ecoscience**, v. 5, n. 4, p. 463–469, 1998.

OLIVA, E. V. et al. Composição nutricional de procedência e progênes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) cultivadas em latossolo vermelho distrófico. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 4, p. 793–805, 2014.

OLIVEIRA, S. V. DE; WAQUIL, P. D. Dinâmica de produção e comercialização da erva-mate no Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, p. 1–7, 2014.

OLIVEIRA, M. E. Patologia de sementes. **Universidade Federal do Tocantins**, 2013.

OROZCO-SEGOVIA, A. et al. Seed anatomy and water uptake in relation to seed dormancy in *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae). **Annals of Botany**, v. 99, n. 4, p. 581–592, 2007.

OSIPI, E. A. F.; NAKAGAWA, J. Efeito da temperatura na avaliação da qualidade fisiológica de sementes do maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryander). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p. 179–181, 2005.

PEREZ, S. C. J. G. A. Envoltórios. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação: Do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 125–133.

PIRES, E. Z. et al. Biologia reprodutiva de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill.) em remanescente de Floresta Ombrófi la Mista Altomontana. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 13, n. 2, p. 171–180, 2014.

POISOT, T. et al. A conceptual framework for the evolution of ecological specialisation. **Ecol Lett**, v. 14, n. 9, p. 841–851, 2011.

SAATKAMP, A. et al. Soil depth detection by seeds and diurnally fluctuating temperatures: Different dynamics in 10 annual plants. **Plant and Soil**, v. 349, n. 1–2, p. 331–340, 2011.

SANSBERRO, P. A. et al. In vitro culture of rudimentary embryos of *Ilex paraguariensis*: Responses to exogenous cytokinins. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 17, n. 2, p. 101–105, 1998.

SANTIN, D. et al. Nutrição e crescimento da erva-mate submetida à calagem.

Ciência Florestal, v. 23, n. 1, p. 55–66, 2013.

SANTOS, S. R. G. DOS; AGUIAR, I. B. DE. Efeito da temperatura na germinação de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs separadas pela coloração do tegumento. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, n. 69, p. 77–83, 2005.

SILVA, F. DE A. S. E; AZEVEDO, C. A. V. DE. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733–3740, 2016.

SOUSA, V. A. DE; DAROS, T. L.; STURION, J. A. Fenologia reprodutiva de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). **Embrapa Florestas- CNPF**, 2003.

SPURNÝ, M. Changes in the Permeability of the Seed Coat in Connection with the Development of Suberin Adcrustations of the Macrosclereids from the Seed Coat of the Pea (*Pisum sativum* L.). **Flora**, v. 567, p. 547–567, 1964.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TAKAGI, E.; TOGASHI, K. Oviposition of the Seed Parasitoid Wasp *Macrodasyceras hirsutum* (Hymenoptera: Torymidae) into Seeds of Nonhost Tree *Ilex latifolia*. **Journal of the Entomological Research Society**, v. 15, n. 2, p. 17–20, 2013.

TEZUKA, T. et al. Factors affecting seed germination of *Ilex latifolia* and *I. rotunda*. **HortScience**, v. 48, n. 3, p. 352–356, 2013.

TSANG, A. C. W.; CORLETT, R. T. Reproductive biology of the *Ilex* species (Aquifoliaceae) in Hong Kong , China. **Can. J. Bot.**, v. 83, p. 1645–1654, 2005.

VAZQUEZ-YANES, C.; OROZCO-SEGOVIA, A. Patterns of seed longevity and germination in the tropical rainforest. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, n. 1, p. 69–87, 1993.

ZAIDAN, L. B. P.; BARBEDO, C. J. Quebra de dormencia em sementes. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação: Do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 134–146.

ZANON, A. **Produção De Sementes De Erva Mate**. Curitiba: EMBRAPA- Circular técnica nº16, 1988.

ZENG, C.-L. et al. Seed Coat Microsculpturing Changes during Seed Development in Diploid and Amphidiploid *Brassica* Species. **Annals of Botany**, n. 93, p. 555–566, 2004.