

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

**ARMAZENAMENTO DE EMBRIÕES DE *Inga vera ssp. affinis* (DC.) T.D. PENNINGTON
(LEGUMINOSAE) SOB BAIXA TEMPERATURA**

MARCIO ROBERTO BONJOVANI

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas
(Botânica), AC: Fisiologia Vegetal**

BOTUCATU – SP

- 2007 -

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

ARMAZENAMENTO DE EMBRIÕES DE *Inga vera* ssp. *affinis* (DC.) T.D. PENNINGTON
(LEGUMINOSAE) SOB BAIXA TEMPERATURA

MARCIO ROBERTO BONJOVANI

PROF. DR. CLAUDIO JOSÉ BARBEDO
ORIENTADOR

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas
(Botânica), AC: Fisiologia Vegetal**

BOTUCATU – SP

- 2007 -

*Se os animais inspiram somente ternura,
o que houve então com os homens?*

Guimarães Rosa

DEDICO

Aos meus pais Elza Aparecida Gritti Bonjovani e Luiz Roberto Bonjovani

Aos meus irmãos Marcelo Bonjovani e Marco André Bonjovani

À minha esposa Aderlete Cristina Maçaira

AGRADECIMENTOS

À Deus por sua infinita bondade e misericórdia, sempre me proporcionando saúde, força e perseverança para a execução e conclusão deste trabalho;

À Universidade Estadual Paulista - UNESP, pela oportunidade de aprimorar minha formação acadêmica;

Ao Instituto de Botânica que possibilitou a execução deste trabalho em suas instalações e a Prefeitura do Município de São Roque pela permissão para as coletas;

Ao Dr Claudio José Barbedo, pela valiosa amizade, orientação segura, dedicação e participação na conclusão deste trabalho;

À Adeliana, Laís e Artur pelo incentivo e colaboração;

À Profa Dra Denise Maria Trombert de Oliveira pela atenção e colaboração nos experimentos de anatomia;

À Dra. Rita de C.L. Figueiredo Ribeiro pelo atenção e colaboração;

Aos professores do Departamento de Botânica, IB, Unesp – Botucatu, principalmente aos professores João Domingos Rodrigues e Elizabeth Orika Ono pela atenção e colaboração;

Ao Departamento de Produção Vegetal – Agricultura, principalmente aos Professores João Nakagawa e Cláudio Cavariani, pela atenção e colaboração;

À Luciene, Maria Helena e Sérgio da Seção de Pós-Graduação pela atenção e presteza;

Aos funcionários da UNESP, em especial a Adriana, Kleber e Valéria.

À Secretaria da Educação pela bolsa concedida;

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro ao projeto (Proc. 2005/04139-7);

Ao Centro de Exposições Imigrantes e à Prefeitura de Santo André, pela autorização para a colheita dos frutos;

Às seções de Sementes e Melhoramento Vegetal, Fisiologia e Bioquímica de Plantas e Dicotiledôneas, do Instituto de Botânica, pela permissão do uso da infra-estrutura disponível;

À Diretoria de Ensino de Osasco, em especial a Dirigente de Ensino e a Comissão Organizadora do Programa Bolsa Mestrado pela atenção;

Ao Odair pela atenção e contribuição na revisão dos abstracts.

Aos amigos do Instituto de Botânica Carmen, Cristina, Denise, Edmir, Igor, Juliana Iura, Juliana Prativiera, Liliana, Ludmila, Moacir, Paulo, Rodrigo, Simone, Tatiana pelo incentivo e colaboração durante a realização dos experimentos;

Às amigas Daniela, Maria Olívia, Talita Barbosa e Yara pela atenção, incentivo e colaboração;

Ao amigo Valdir Zucareli, pelo incentivo, atenção e colaboração;

Aos colegas da EE Professor Horácio Quaglio pelo incentivo;

A todas pessoas e instituições que direta ou indiretamente me auxiliaram, apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução	3
2. Revisão de Literatura	5
2.1. Caracterização da espécie <i>Inga vera</i> Willd. subsp. <i>affinis</i> (DC.) T.D. Pennington.....	5
2.2. Água em tecidos vegetais	6
2.3. Modificações hídricas nas sementes	9
2.4. Comportamento das sementes durante o armazenamento	11
2.5. Controle da mobilização de água em sementes	13
2.6. Armazenamento de sementes intolerantes à dessecação	14
3. Capítulo I: Germinação de embriões de <i>Inga vera</i> Willd. subsp. <i>affinis</i> (DC.) T.D. Pennington (Leguminosae) sob diferentes condições de estresse	16
4. Capítulo II: Tolerância de embriões de <i>Inga vera</i> Willd. subsp. <i>affinis</i> (DC.) T.D. Pennington (Leguminosae) à redução da temperatura de armazenamento	40
5. Capítulo III: Tolerância à dessecação de embriões de <i>Inga vera</i> subsp. <i>affinis</i> (DC.) T.D. Pennington (Leguminosae) após estresse hídrico	69
6. Considerações Finais	83
7. Conclusões	84
8. Referências Bibliográficas	85

BONJOVANI, M.R. **ARMAZENAMENTO DE EMBRIÕES DE *Inga vera* subsp. *affinis* (DC.) T.D. PENNINGTON (LEGUMINOSAE) SOB BAIXA TEMPERATURA.** 2007. 89p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

Resumo: A conservação da biodiversidade inclui métodos *in situ* e *ex situ*, o primeiro normalmente demandando grandes áreas. A conservação *ex situ* demanda menor quantia de recursos financeiros do que a conservação *in situ* e inclui a manutenção de bancos de sementes como meio de conservação da diversidade genética. Este método, porém, só é possível para as sementes denominadas ortodoxas, ou seja, as tolerantes à dessecação. Muitas espécies apresentam comportamento diferente, sendo intolerantes à dessecação e, conseqüentemente, apresentam curta longevidade natural. A conservação destas sementes em armazenamento tem sido o grande desafio para os fisiologistas de sementes, principalmente pela compreensão de sua sensibilidade e do desenvolvimento de tecnologias para sua preservação. Atualmente, novas tecnologias de re-indução de tolerância à dessecação em sementes ortodoxas e estudos de tolerância ao congelamento têm apresentado alguma perspectiva para a conservação de sementes recalcitrantes, mas muito pouco tem sido desenvolvido para as espécies arbóreas tropicais. No presente trabalho, sementes de *Inga vera* ssp. *affinis*, intolerantes à dessecação, foram analisadas em relação à sua sensibilidade a estresses ambientais, bem como aos benefícios desses estresses à ampliação da tolerância à dessecação e ao congelamento. Foi possível verificar que o estresse hídrico reduziu a sensibilidade dessas sementes à dessecação e que secagens brandas podem melhorar a tolerância ao congelamento. Os resultados obtidos reavivam a idéia de indução de tolerância à dessecação e ao congelamento das sementes recalcitrantes e traz novas perspectivas para o armazenamento a longo prazo dessas sementes.

Palavras-chave: conservação, espécie arbórea tropical, armazenamento de sementes, recalcitrante.

BONJOVANI, M.R. **STORAGE OF EMBRYOS OF *Inga vera* subsp. *affinis* (DC.) T.D. PENNINGTON (LEGUMINOSAE) AT LOW TEMPERATURE.** 2007. 89p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

Abstract: Conservation of biodiversity includes *in situ* and *ex situ* methods, the first one frequently demanding extensive areas. *Ex situ* conservation is less expensive method than *in situ* one and uses seed banks as the main source of maintenance of gene diversity. This method, however, is possible only for the seeds that are tolerant to desiccation, or the so-called orthodox seeds. Several tropical tree species produce seeds that are intolerant to desiccation and, consequently, show short lifespan, that so-called recalcitrant seeds. The conservation of the seeds with this kind of behaviour is one of the biggest challenges in seed physiology, mainly the understanding of this sensitivity and alternative methods for their conservation. Nowadays, re-induction of desiccation tolerance in orthodox seeds and freezing tolerance have shown new approaches on the conservation of recalcitrant seeds, but there is not enough information concerning the tropical tree species. In this work, seeds of *Inga vera* ssp. *affinis*, intolerant to desiccation, were analysed as for their sensibility to stress environment conditions and, then, to the benefits of stress conditions to the desiccation and freezing tolerance. It was observed that water stresses can reduce desiccation sensitivity of these seeds and soft drying can reduce freezing tolerance. The results obtained in this research bring to mind the idea of induction of both desiccation and freezing tolerance to recalcitrant seeds and the perspective of any kind of long term storage.

Keywords: conservation, tropical tree, seed storability, recalcitrant

1. Introdução

Conservar uma espécie não significa apenas garantir sua sobrevivência e não deixar que ela seja extinta. Esse papel seria reducionista e poderia ser desempenhado simplesmente mantendo poucos indivíduos de cada espécie em jardins botânicos, zoológicos e outros tipos de coleções de seres vivos, à semelhança da história da Arca de Noé. Essa conservação das espécies também deve implicar na manutenção de sua variabilidade genética intra-específica (Rocha 2004).

A Mata Atlântica, um dos biomas com maior diversidade biológica do planeta mas, também, um dos mais devastados por atividades antrópicas, é exemplo mundial da necessidade de criação de bancos de germoplasma visando, principalmente, à conservação do patrimônio genético (Mittermeier *et al.* 1999). Existem, basicamente, duas estratégias de conservação:

- *in situ* ou local é aquela realizada dentro dos próprios ecossistemas e habitats naturais conservados; objetiva "permitir e propiciar que a biodiversidade se mantenha dentro do contexto do ecossistema no qual é achada" (Botanic Gardens Conservation International 2001). Esse tipo de conservação mantém os seres vivos "nas mesmas condições sob as quais foram originadas as adaptações ao meio ambiente" (Lleras 1992).
- *ex situ* é a manutenção de amostras de organismos fora de seu habitat natural na forma de indivíduos inteiros, sementes, pólen, propágulos vegetativos e culturas de células ou tecidos (Botanic Gardens Conservation International 2001).

A conservação *in situ* e *ex situ* do germoplasma foi proposta como medida de prevenção contra perda da variabilidade genética. Seu principal objetivo é a conservação a longo prazo do germoplasma de espécies vegetais com a máxima integridade genética possível (Bajaj 1995). A conservação de sementes é a forma mais comum de conservação *ex situ*, já que a semente é a unidade de propagação natural da maioria das espécies de plantas superiores (Santos 2001)

A metodologia convencional de conservação de sementes utilizada em bancos de germoplasma compreende a secagem e armazenamento em câmaras a temperaturas abaixo de zero (Santos 2001). Entretanto, existem sementes sensíveis à desidratação e ao congelamento, que não sobrevivem ao armazenamento nessas condições, denominadas inicialmente, por Roberts (1973), recalcitrantes.

A vida curta de sementes recalcitrantes causa sérios problemas para a conservação de germoplasma dessas espécies a longo prazo (Castro *et al.* 2004), necessitando, até os dias atuais, estudos de conservação (Barbedo & Marcos-Filho 1998).

Uma importante espécie que apresenta sementes com comportamento recalcitrante, presente na Mata Atlântica, é *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington. Suas sementes não sobrevivem a períodos superiores a 90 dias, mesmo sob as condições ideais de armazenamento.

Grande parte desse curto período de viabilidade em armazenamento deve-se à falta de estudos básicos sobre a sensibilidade e tolerância dessas sementes às condições ambientais, como a redução do seu teor de água e da temperatura, sobre metabolismo durante a maturação e germinação, entre outros (Barbedo & Marcos Filho 1998, Bilia *et al.* 2003).

Apenas de posse desses conhecimentos se possa, talvez, desenvolver tecnologia que permita armazenar essas sementes por período longo o suficiente para permitir sua inclusão em bancos de germoplasma.

De acordo com o exposto, o presente trabalho teve como objetivo geral fornecer informações para subsidiar estudos de armazenamento de sementes de *Inga vera* ssp. *affinis*. Para tanto, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a germinação de embriões de ingá sob diferentes condições de estresse;
- Analisar a transição fisiológica da maturação à germinação;
- Avaliar a temperatura para a germinação e o nível de secagem para o armazenamento de embriões de ingá;
- Avaliar a sensibilidade de embriões de ingá de diferentes estádios de maturação à redução de temperatura até níveis de congelamento;
- Avaliar a indução a tolerância à dessecação em embriões de ingá de diferentes estádios de maturação.

2. Revisão de Literatura

2.1. Caracterização da espécie *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington

Uma espécie que apresenta sementes com comportamento recalcitrante, presente na Mata Atlântica e em áreas de vegetação ripária, é *Inga uruguensis* Hook. & Arn., popularmente conhecida por ingá, angá, ingá-do-brejo, ingá-banana, ingá-de-quatro-quinas, ingazeiro (Joly 1993, Bilia *et al.* 1998, 2003). Recentemente foi sinonimizado por Pennington (2000) em *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D.

Esta espécie pertence à família das Fabaceae e sub-família Mimosoideae, com cerca de 40 gêneros e 350 a 400 espécies, distribuídas na América tropical e subtropical (Sanchotene 1989, Lorenzi 1992, Joly 1993).

No Brasil, *I. vera* ocorre desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais, principalmente na floresta pluvial atlântica (Lorenzi 1992, Figliolia & Kageyama 1994). É uma planta semidecídua, pioneira, característica de planícies aluviais e beira de rios, preferencialmente em solos úmidos e até brejosos ou terrenos periodicamente inundáveis (Lorenzi 1992, Durigan *et al.* 1997). Quando adulta, pode atingir de 5 a 28 metros de altura, com tronco de 70 centímetros de diâmetro. Apresenta folhas compostas, paripinadas, de ráquis alada com a superfície inferior de cor mais clara. As flores são vistosas, brancas, hermafroditas, com cerca de três centímetros de comprimento, agrupadas em inflorescências. A floração ocorre de agosto a novembro, com maturação dos frutos de dezembro a março (Custódio Filho & Mantovani 1986, Carvalho 1994, Figliolia & Kageyama 1994).

Seu fruto é um legume tomentoso, comprido, reto ou curvo, de cor rubro-bronzeada, com margens espessadas características, de 10 a 20 centímetros de comprimento e 2,5 a 3 centímetros de largura (Carvalho 1994). As sementes aparecem em número de 2 a 13 por fruto (Sanchotene 1989) e são revestidas pela sarcotesta (Oliveira & Beltrati 1993), muitas vezes bastante adocicada (Barbedo & Bilia 1997). É apreciada por macacos e pacus, que colaboram com a dispersão das sementes além da dispersão pela água. Em condições naturais, as sementes de ingá, após a dispersão, não ultrapassam 15 dias de armazenamento (Lorenzi 1992, Carvalho 1994, Bilia & Barbedo 1997). As sementes das espécies deste gênero apresentam elevada porcentagem de germinação verificando-se, inclusive, viviparidade (germinação das sementes dentro do próprio fruto) em algumas delas (Oliveira & Beltrati 1992, Pritchard *et al.* 1995, Bilia & Barbedo 1997).

O sistema radicular é pivotante, superficial, com numerosas raízes secundárias que têm excelente atuação no controle da erosão, protegendo o solo contra a degradação, o que assegura importante papel no reflorestamento ao longo de rios evitando o assoreamento (Sanchotene 1989, Bilia & Barbedo 1997).

Outra espécie deste gênero é *I. affinis*, que apresentou efeito positivo na recuperação da fertilidade de solos, através da fixação de nitrogênio, da adição de carbono (pela grande produção de serapilheira) e do aumento dos níveis de fósforo, em forma extraível pela planta, na superfície do solo (Montagnini *et al.* 1995).

As espécies do gênero *Inga* são utilizadas para sombreamento em cultivo de café e cacau. Sua madeira é moderadamente pesada, pouco resistente e de baixa durabilidade, podendo ser empregada em caixotaria, obras internas, confecção de brinquedos, lenha e outros. Nas formações florestais heterogêneas participa da fitomassa voltada à geração de energia. Pode ser, também, fonte alimentar e fitoterápica (Lorenzi 1992, Bilia & Barbedo 1997, Bilia *et al.* 2003).

A espécie é recomendada para plantio nas faixas mais próximas aos cursos d'água, em locais sujeitos a inundações periódicas de média a longa duração e com períodos de encharcamento longo. É, também, recomendada para recuperação de ecossistemas degradados (Carvalho 1994).

2.2. Água em tecidos vegetais

O conhecimento das relações hídricas pode contribuir para explicar o comportamento fisiológico das sementes (Villela 1998, Villela & Marcos Filho 1998). O potencial de água é considerado o indicador mais seguro do comportamento da semente, pois o teor de água se altera continuamente durante o acúmulo de matéria seca, além de não permitir a identificação de efeitos fisiológicos da água (Marcos Filho 2005).

Considerando-se o estado energético da água, durante a maturação da semente, verifica-se que a variação do potencial hídrico é menos acentuada que as verificadas para o grau de umidade de diferentes espécies (Egli & Tekrony 1997). Segundo esses autores, as sementes de milho, soja e trigo apresentaram, durante a maturidade fisiológica, teores de água de 37,7%, 59,0% e 43,7% enquanto os potenciais hídricos foram de -1,61 MPa, -1,52 MPa e -1,66 MPa, respectivamente, evidenciando a ação regulatória do estado da água na semente.

O potencial químico representa a quantidade de energia livre da água (Taiz & Zeiger 2004), expresso em unidades de pressão (MPa), como potencial hídrico (Ψ) (Castro & Hilhorst 2004). A água

pura tem um potencial químico elevado, podendo dissolver solutos e hidratar substâncias. Pela definição, a água pura tem um potencial hídrico igual a zero ($\Psi = 0$).

Quando solutos são adicionados à água, esta usa a energia para dissolvê-los, diminuindo assim seu potencial químico. Quanto mais negativo for o potencial hídrico de um sistema, menor será a disponibilidade de água nesse sistema (Larcher 2000, Castro & Hilhorst 2004).

Uma célula viva consiste de diversos compartimentos separados por membranas semipermeáveis seletivas. Canais nas membranas, formados por proteínas, permitem a passagem da água, mas impedem a de solutos. Por causa disso existem gradientes de potencial hídrico entre o meio externo e interno à membrana, que propiciam o movimento da água, sempre do potencial hídrico mais elevado para o mais baixo ou mais negativo (Castro & Hilhorst 2004).

Em geral, as sementes consistem de um embrião e de tecidos circunvizinhos. Todas as células dos tecidos embrionários e dos demais tecidos apresentam potencial hídrico, que pode ser específico a cada célula. Conseqüentemente, a semente como um todo pode comportar-se como uma célula, apresentando relações hídricas específicas (Castro & Hilhorst 2004).

O potencial hídrico caracteriza o estado energético da água na semente (Villela 1998). Nas sementes, os potenciais de temperatura e gravitacional podem ser considerados nulos pois ocorrem sob condições constantes de temperatura e posição. Assim, o potencial hídrico (Ψ) pode ser expresso pela soma de três componentes: de pressão (Ψ_p), osmótico (Ψ_s) e matricial (Ψ_m), isto é, $\Psi = \Psi_p + \Psi_s + \Psi_m$ (Villela *et al.* 1991, Villela & Marcos Filho 1998).

Segundo Castro & Hilhorst (2004), o potencial de pressão numa célula ocorre porque, à medida que a água entra na célula, o volume aumenta, mas é contido pela rígida parede celular, resultando na pressão hidrostática. O potencial osmótico, por sua vez, é condicionado pelas ligações entre a água e os solutos, pois a concentração de solutos dissolvidos na célula influencia a absorção de água. O potencial mátrico resulta das interações interfaciais, tais como forças capilares das sementes e é a capacidade das moléculas reterem água.

Sob pressão atmosférica normal, o potencial osmótico da água da semente é normalmente negativo, devido a presença de solutos. O mesmo ocorre com o potencial mátrico, em função dos colóides presentes na semente, pois as forças capilares e de adsorção não são desprezíveis, enquanto a pressão de turgescência é positiva e não se desenvolve em substância não confinada. Assim, o potencial hídrico tem valor negativo, a não ser em células túrgidas, em que se iguala a zero, de modo que os decréscimos dos potenciais mátrico e osmótico da célula reduzem o potencial de água, tornando-o mais negativo (Marcos Filho 2005).

As propriedades da superfície das moléculas, especialmente das proteínas, são modificadas pela quantidade de água associada. As proteínas são compostos orgânicos constituídos de seqüências de aminoácidos, apresentando múltiplos sítios de sorção de água. Com base no potencial hídrico e no modo de ligação da água com as macromoléculas, são identificados os tipos ou formas de água na semente (Vertucci 1993, Vertucci & Farrant 1995, Villela & Marcos Filho 1998).

As modificações na atividade metabólica da semente, em resposta a variações do teor de água, parecem estar associadas a alterações discretas nas propriedades físicas da água (Marcos Filho, 2005). Vertucci & Farrant (1995) descreveram cinco tipos de água considerando o modelo de sorção de água pelas macromoléculas.

Água tipo 1, é a água considerada estrutural, não apresenta propriedades de solvente, fortemente associada a macromoléculas, ocorre em teores de água inferiores a 7,5%, na base úmida, e -150 MPa. Está presente em sementes muito secas e, neste nível fisiológico, a atividade metabólica é restrita (Marcos Filho 2005).

A água tipo 2 passa a ter papel de solvente e adquire propriedades mais próximas às de seu estado livre do que a do tipo 1. Essa água forma uma película fina na superfície da matriz, apresentando interação com os sítios polares de macromoléculas, ocorre entre teores de água de 7,5% a 20% (base úmida) exibindo potencial hídrico de -150 a -11 MPa. Neste nível, as reações químicas mediadas por sistemas enzimáticos simples começam a ser observadas, enquanto as atividades oxidativas se relacionam às taxas de deterioração (Marcos Filho 2005).

Tanto a água tipo 1 quanto a tipo 2 não são congeláveis, em razão da formação dos estados vítreos, em temperaturas abaixo do ponto de congelamento da água pura (Villela & Marcos Filho 1998).

A água tipo 3 se associa aos sítios hidrofóbicos das macromoléculas, formando pontes de união. É observada entre os teores de água de 20% a 33% na base úmida e potencial hídrico de -11 a -4 MPa. Neste nível de hidratação, a atividade fisiológica da semente se altera sensivelmente. O transporte de elétrons na mitocôndria é facilitado, a respiração é intensificada, há o início do metabolismo, mas os sistemas de reparo ainda não são ativados. Sementes recalcitrantes, quando desidratadas até este nível, exibem mecanismos de deterioração semelhantes aos das ortodoxas expostas a níveis elevados de umidade relativa do ar. A água se torna congelável quando atinge níveis mais próximos do limite superior estabelecido para o nível 3 de hidratação (Marcos Filho 2005).

Água tipo 4 não interage diretamente com a superfície das proteínas e ocupa poros e capilares. Verifica-se sua ocorrência entre os teores de água de 33% a 41% correspondendo aos potenciais

hídricos de -4 a -1,5 MPa. Nessa fase, o metabolismo das sementes é pouco conhecido. Esse tipo de água inclui os teores de água favoráveis ao armazenamento de várias espécies com sementes recalcitrantes e ao desenvolvimento das sementes durante grande parte do período de maturação (Marcos Filho 2005).

Água tipo 5 corresponde às características apresentadas por uma solução diluída, não se liga às macromoléculas, podendo ser considerada água livre. Sua ocorrência é observada sob teor de água superior a 41% e está retida com tensões superiores a -1,5 MPa (Villela & Marcos Filho 1998).

O estado da água afeta a natureza e a cinética das reações metabólicas, levando a crer que os mecanismos da deterioração de sementes diferem para cada nível de hidratação da semente durante o armazenamento (Villela & Marcos Filho 1998).

A relação entre os diferentes tipos de água e os teores de água críticos para a sobrevivência pode conduzir à compreensão da função essencial da água como fator limitante para a tolerância à dessecação (Marcos Filho 2005).

2.3. Modificações hídricas nas sementes

O teor de água para o óvulo recém-fecundado é de cerca de 80% (base úmida), decrescendo durante o processo de maturação. A desidratação é acelerada a partir da época em que as sementes ortodoxas atingem a máxima matéria seca (Carvalho & Nakagawa 1983). As sementes recalcitrantes permanecem com teores de água superiores a 60%, pois não sofrem dessecação ao final da maturação (Barbedo & Marcos Filho 1998, Marcos Filho 2005). A desidratação, em muitas ortodoxas, faz com que a semente mude seu programa de expressão de genes do modo de desenvolvimento para o modo germinativo (Kermode 1995).

Além do seu envolvimento no processo de desenvolvimento, a água geralmente é o fator limitante para a germinação de sementes não dormentes. Está associada à mobilização de reservas e à liberação de energia através da respiração, incentivando também a atividade de enzimas e reguladores de crescimento. Atua na diluição do protoplasma, favorecendo o metabolismo para a retomada do crescimento embrionário (Carvalho & Nakagawa 1983, Marcos Filho 2005).

Uma vez iniciado o crescimento, as sementes perdem rapidamente sua tolerância à desidratação (Leprince *et al.* 2000). O início da protrusão da raiz primária marca um “ponto sem retorno” para a semente, que se encontra comprometida com a germinação e com o desenvolvimento da plântula (Castro & Hilhorst 2004). Segundo Bewley & Black (1994), a absorção de água pelas sementes

freqüentemente obedece a um padrão trifásico e a tolerância das sementes à dessecação diminui gradativamente com o decorrer das Fases I e II de embebição, sendo perdida no início da Fase III.

O início da embebição (fase I) ou absorção de água é um processo dirigido pelo gradiente de potencial hídrico entre a semente e seu ambiente, sobretudo pelo potencial matricial da semente seca. É um processo puramente físico, que depende da ligação da água à matriz da semente, tal qual em qualquer outro material, vivo ou morto, que contenha sítios de ligação ou de afinidade pela água (Castro & Hilhorst 2004). A fase II é representada pela redução drástica da velocidade de embebição e da intensidade de respiração (Marcos Filho 2005). O potencial osmótico se torna a força que faz a água continuar se movendo para dentro da semente até que seja balanceada pelo potencial de turgor. Durante a fase II, são ativados os processos metabólicos requeridos para o crescimento do embrião e a conclusão do processo germinativo (protrusão raiz primária). O osmocondicionamento, dependendo do potencial hídrico da solução osmocondicionadora, pode prolongar a duração dessa fase. A fase III da embebição é marcada por um aumento no conteúdo de água da semente, que acontece devido à absorção associada ao início do crescimento do embrião (Castro & Hilhorst 2004).

A embebição ocorre gradativamente, com o umedecimento inicial dos tecidos mais próximos da superfície e o estabelecimento de uma “frente de hidratação”, à medida que a água caminha para o interior da semente (Marcos Filho 2005). As partes constituintes da semente absorvem água com velocidades distintas, podendo-se verificar uma direção da água nas sementes à medida que embebem (McDonald *et al.* 1994). Estudos recentes indicam que há, aparentemente, um fluxo direcionado de água, dependente da espécie (Terskikh *et al.* 2005, Kikuchi *et al.* 2006, Meyer *et al.* 2007, Garnczarska *et al.* 2007).

A captação de quantidade considerável de água é imprescindível para o reinício de atividades metabólicas da semente após a maturidade (Marcos Filho 2005). Dessa captação resulta a intensificação da respiração e de todas as outras atividades metabólicas, que culminam com o fornecimento de energia e nutrientes necessários para a retomada de crescimento, por parte do eixo embrionário (Carvalho & Nakagawa 1983).

O oxigênio é considerado o combustível necessário para oxidação dos materiais de reserva. Embora fundamental, a maioria das espécies não exige concentrações de oxigênio superiores a 10% para que ocorra a oxidação, mas níveis inferiores podem causar problemas dependendo da fase da germinação. Durante o início da embebição a energia é obtida através da respiração anaeróbica (Marcos Filho 2005). Essa situação não persiste por um período prolongado. Ao atingirem determinado grau de hidratação, as sementes passam a permitir a entrada do oxigênio que, dissolvido

em água, se difunde pelos tecidos e a respiração se torna aeróbica. No entanto, em solos encharcados ou excessivamente úmidos, as limitações à difusão do oxigênio podem promover a paralização da germinação (Marcos Filho 2005).

Supõe-se que o decréscimo ou fracasso da germinação em condições de anaerobiose se dá porque a ausência ou escassez de oxigênio favorece a produção de etanol nas células e este produto é tóxico ao metabolismo normal (Marcos Filho 2005). Porém a maioria das sementes é equipada com enzimas capazes de neutralizar o potencial tóxico do etanol (Castro & Hilhorst 2004).

Okamoto & Joly (2000) relataram que sementes de *Inga sessilis* (Vell.) Mart., submetidos a normoxia, hipoxia e anoxia, apresentaram 40% de germinação mesmo sob hipoxia. A anoxia, por outro lado, foi letal para as sementes.

2.4. Comportamento das sementes durante o armazenamento

A água assume importante papel no período de formação e maturação das sementes e, ao final da maturação, dois tipos de comportamento são observados: nas sementes ortodoxas há redução considerável do teor de água e, nas recalcitrantes, mantém-se o elevado teor de água (Barbedo & Marcos Filho 1998).

Na maioria das sementes, o desenvolvimento pode ser dividido convencionalmente em três fases confluentes. A primeira fase é caracterizada pelo crescimento inicial devido à divisão celular e a um aumento rápido no peso fresco da semente inteira e conteúdo de água. Depois disso há uma fase intermediária de maturação, na qual a semente aumenta de tamanho devido, principalmente, à expansão celular e à deposição de reservas. Finalmente, o desenvolvimento da maioria das sementes termina com uma fase pré-programada da secagem de maturação ou dessecação. Caracteristicamente, essas sementes são chamadas ortodoxas porque se submetem a algum grau de dessecação (Bewley & Black 1994, Castro *et al.* 2004). Isso resulta numa redução gradual no metabolismo da semente e o embrião passa para um estado quiescente. As sementes ortodoxas são exclusivas quanto à tolerância à dessecação, 90 a 95% da água é removida durante o desenvolvimento e a dessecação (Black & Pritchard 2002).

No entanto, para as espécies com sementes recalcitrantes, pode ocorrer passagem direta da fase de desenvolvimento para a germinativa, sem a dessecação, podendo germinar quando ainda está ligada a planta-mãe (Barbedo & Marcos Filho 1998). Portanto, não apresentam período de transição entre a

maturação e a germinação e raramente apresentam dormência (Marcos Filho 2005). Estas têm, em geral, períodos de vida muito limitados, morrendo devido à secagem (Castro *et al.* 2004).

As sementes podem ser classificadas, em relação ao seu comportamento no armazenamento, como recalcitrantes, intermediárias e ortodoxas, podendo ser conservadas, respectivamente, por curto, médio e longo prazo (Roberts 1973, Eira 1996).

A tolerância fisiológica das sementes à dessecação, no período pós-colheita, é variável entre as espécies. As sementes classificadas como ortodoxas toleram graus de dessecação próximos de 2% a 5%, ou ainda níveis menores. As sementes intermediárias toleram graus de dessecação em torno de 10% a 13%, sendo sua viabilidade reduzida em níveis inferiores de umidade, já as recalcitrantes não toleram dessecação a graus de umidade entre 15% a 20% (Roberts 1973, Hong & Ellis 1996). Contudo, parece existir uma larga escala de comportamentos de tolerância à dessecação e de armazenamento entre as espécies classificadas como recalcitrantes (Kermode & Finch-Savage 2002).

A comparação entre as propriedades da água em embriões maduros de sementes ortodoxas e recalcitrantes não mostra diferenças acentuadas, levando à conclusão de que a tolerância à dessecação não resulta apenas da quantidade de água estruturada, mas envolve a habilidade de perder uma quantidade considerável de água (Marcos Filho 2005).

As sementes ortodoxas podem tolerar desidratação quase completa, o que não ocorre com as sementes recalcitrantes. Após a histo-diferenciação, as células de sementes ortodoxas completam os vacúolos com proteínas, acumulam açúcares, alteram a composição da membrana, produzem proteínas LEA (“late-embryogenesis-abundant”) e entram no estado vítreo. Essas modificações hipoteticamente seriam responsáveis por conferir tolerância à desidratação. No entanto, estes mesmos processos podem ocorrer nos mesmos graus em sementes recalcitrantes, dificultando a demonstração de que atuam como protetores (Walters 2000).

A aquisição da tolerância à dessecação é um fenômeno complexo, envolvendo a interação de ajustes metabólicos e estruturais, permitindo que as células resistam a perdas consideráveis de água sem a ocorrência de prejuízos. A menor eficiência de um dos fatores envolvidos pode acarretar a formação de sementes com diferentes níveis de tolerância; é, porém, impossível a completa proteção contra esses danos. A essência da tolerância à dessecação se manifesta através da habilidade de promover a reversão de efeitos a partir da reidratação da semente (Marcos Filho 2005). A vida curta de sementes recalcitrantes causa sérios problemas para a conservação de germoplasma dessas espécies a longo prazo (Castro *et al.* 2004).

2. 5. Controle da mobilização de água em sementes

A água tem um papel-chave no desenvolvimento e na germinação, a medida em que a semente muda de um estado metabolicamente ativo para um estado inativo após a maturação, por efeito da dessecação, retornando depois ao estado metabolicamente ativo durante a germinação (Bewley & Black 1994, Kermode 1995).

A sobrevivência ou a conservação do potencial fisiológico durante o armazenamento dependem diretamente da manutenção das sementes com teor de água adequado e específico. Esse requisito está associado à intensidade das reações que caracterizam a atividade fisiológica verificada quando o teor de água das sementes ultrapassa os limites de segurança, tanto para as ortodoxas como para as recalcitrantes (Marcos Filho 2005).

As relações entre a atividade metabólica e a presença de água, embora forneçam subsídios suficientes para o estabelecimento de práticas de manejo das sementes, ainda não estão perfeitamente definidas (Marcos Filho 2005).

O condicionamento fisiológico envolve a absorção de água pela semente, sob condições controladas, permitindo as atividades metabólicas das sementes durante as fases I e II da embebição, mas impedindo que ocorra a protrusão da raiz primária. Dessa maneira, ativam-se a digestão das reservas e a sua translocação e assimilação, para que as sementes componentes do mesmo lote alcancem estado metabólico relativamente uniforme quando o acesso à água é interrompido (Castro & Hilhorst 2004, Marcos Filho 2005).

De acordo com McDonald (1999) três técnicas são empregadas para realizar o condicionamento fisiológico de sementes: a) hidrocondicionamento, que consiste na hidratação das sementes apenas com a utilização de água; b) osmocondicionamento, envolve a hidratação das sementes com soluções de baixo potencial osmótico, utilizam-se geralmente substâncias como polietilenoglicol (PEG), nitrato de potássio (KNO_3), ortofosfato de potássio (KH_2PO_4) e manitol, e c) matricondicionamento, no qual há controle da hidratação das sementes utilizando material sólido com baixo potencial mátrico como vermiculita, argila, areia ou turfa.

No condicionamento fisiológico, além do fornecimento de água às sementes, devem ser controlados, a temperatura, o suprimento de oxigênio, o pH do meio, a luminosidade e para que não haja colonização por fungos (Heydecker & Coolbear 1977).

O osmocondicionamento (*priming*) baseia-se em colocar as sementes para embeber em uma solução osmótica, na qual a hidratação acontece, mas de forma restrita, limitada, permitindo que

alguns eventos metabólicos do processo germinativo aconteçam sem que a germinação seja completada (Castro & Hilhorst 2004).

No osmocondicionamento o soluto mais utilizado tem sido o polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) por ser quimicamente inerte e não apresentar toxicidade sobre as sementes (Villela *et al.* 1991).

A principal desvantagem da utilização de solução de polietilenoglicol é a possível necessidade de aeração artificial, pois a baixa solubilidade do oxigênio é inversamente proporcional à concentração de PEG; o baixo nível de oxigênio, induzindo a anaerobiose, favorece a produção de etanol, tóxico à semente (Brocklehurst *et al.* 1984). Agentes como o manitol e outros de peso molecular mais baixo podem ser absorvidos e metabolizados durante a germinação e promover efeitos tóxicos (Parmar & Moore 1996).

2.6. Armazenamento de sementes intolerantes à dessecação

A principal técnica de conservação de sementes durante o armazenamento é a redução do seu metabolismo por meio da remoção da água. Porém, sementes de várias espécies nativas apresentam um limite letal de umidade, abaixo do qual há perda total de viabilidade do lote, apresentando grande dificuldade em sua conservação (Kohama *et al.* 2006). As sementes dessas espécies geralmente apresentam atividade metabólica intensa, tanto durante sua formação, quanto após sua colheita, por serem mantidas com teores de água relativamente elevados (Barbedo & Marcos Filho 1998, Castro *et al.* 2004). Portanto, métodos alternativos para o armazenamento dessas sementes devem obrigatoriamente considerar a redução do metabolismo (Andréo *et al.* 2006), ou a indução da tolerância à dessecação em sementes sensíveis, por exemplo com a adição de ABA. O armazenamento de sementes com teores de água relativamente altos, mas ainda insuficientes para permitir a germinação, tem permitido obtenção de resultados favoráveis, embora haja dificuldades para a manutenção desses graus de umidade durante período prolongado (Marcos Filho 2005).

Estudos realizados por Barbedo & Cicero (2000) mostraram que sementes de qualidade elevada de *Inga uruguensis*, quando armazenadas hidratadas e embebidas em solução de ácido abscísico 10^{-4} M em câmara fria, podem apresentar germinação superior a 80% após 40 dias. Uma outra opção que começa a se apresentar promissora para o controle do metabolismo é a regulação da mobilização da água na semente. Embriões de *Inga vera* mantidos em substratos com soluções de PEG a -2,4 MPa a 10°C apresentaram germinação superior a 80% aos 90 dias, enquanto os armazenados em

substrato umidecido com água pura (0 MPa), na mesma temperatura, apresentaram germinação inferior a 60% (Andréo *et al.* 2006).

Outra opção seria a desidratação parcial, ou seja, a secagem até atingir o menor teor de água suportável pela semente, sem acelerar a deterioração e manter a semente nessa condição (Marcos Filho 2005). A secagem pode ampliar a longevidade das sementes, reduzindo as reações metabólicas e dificultando a ação de microrganismos e insetos prejudiciais à sua conservação (Carvalho & Nakagawa 2000, Villela & Peres 2004).

A tolerância à dessecação vem sendo estudada, mas, até o presente momento, as pesquisas não apontam para o sucesso na utilização da secagem como forma de armazenar sementes recalcitrantes por períodos prolongados (Barbedo & Marcos Filho 1998). Bilia *et al.* (1998), estudando os limites de tolerância à dessecação das sementes de *Inga uruguensis*, conseguiram armazenar as sementes em sacos de polietileno a 10°C por até 60 dias após a colheita, mantendo a qualidade fisiológica, desde que seja reduzido o teor de água até níveis de 50%.

A capacidade de armazenamento é ampliada para muitas espécies, quando a redução do teor de água das sementes está associada à diminuição de temperatura do ambiente (Walters *et al.* 1998). Contudo, há espécies que não toleram grande redução da temperatura principalmente o congelamento (Chin *et al.* 1989). Sementes com elevados teores de água, ortodoxas ou recalcitrantes, são suscetíveis a danos causados por temperaturas negativas, devido à formação de cristais de gelo nos tecidos, provocando perda da viabilidade (Fonseca & Freire 2003). A principal consequência da formação de cristais de gelo é a ruptura mecânica, tanto da estrutura citoplasmática quanto da membrana celular, pela expansão da água congelada, resultando na desagregação celular (Fujikawa 1980). Pode ocorrer, ainda, enorme tensão e estresse físico em células vegetais submetidas ao congelamento. Isso porque, durante a transição de fase do líquido extracelular, com a consequente formação de gelo, há dessecação dos tecidos vegetais pela migração da água do interior da célula para o meio extracelular (Guy 2003).

3. Capítulo I

Germinação de embriões de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington

(Leguminosae) sob diferentes condições de estresse

(nas normas da Revista Brasileira de Botânica)

**Germination of embryos of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington (Leguminosae)
under different stress conditions**

ABSTRACT - The germination of seeds of embryos of *Inga vera* subsp. *affinis* under different stress conditions, as temperature, flooding and drying, was analysed. Results showed that maturity stage was important for the main stress tolerances. Embryos tolerate until 20 days of flooding, with low but present germination until 30 days. They showed germination in an large amplitude of temperature, where 25-30°C were the best ones. Drying was deleterious for the embryos but it depended on the maturity stage.

Key words - temperature, seed germination, tropical tree, flooding

Germinação de embriões de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington**(Leguminosae) sob diferentes condições de estresse**

RESUMO - A germinação de embriões de *Inga vera* subsp. *affinis* sob diferentes condições de estresse foi avaliada. Foram testadas diferentes temperaturas, níveis de secagem e imersão em água por diferentes períodos. Os resultados mostraram que o estágio de maturação dos embriões foi fundamental para o nível de estresse suportado. Embriões toleraram até 20 dias de imersão em água, mas com germinação presente até os 30 dias, embora diminuída. Os embriões demonstraram ampla faixa térmica para germinação, mas 25-30°C se mostraram as melhores temperaturas. A secagem foi prejudicial mas dependeu do estágio de maturação dos embriões.

Palavras-chave - temperatura, germinação de semente, espécie tropical, imersão

Introdução

A compreensão dos processos fisiológicos subjacentes aos danos provocados por estresse e dos mecanismos de adaptação e aclimatação dos vegetais a estresses ambientais é de grande importância para o meio ambiente. Em condições naturais, as plantas estão frequentemente expostas ao estresse ambiental, que desempenha um papel importante na determinação de como o solo e o clima limitam a distribuição de espécies vegetais (Taiz & Zeiger 2004).

Estresses podem ocorrer ainda no início da vida vegetal, ou seja, na germinação das sementes. A germinação é uma seqüência de eventos fisiológicos influenciada por vários fatores intrínsecos e extrínsecos às sementes (Borges & Rena 1993). Para que o processo de germinação ocorra, é necessário que a disponibilidade de água, a temperatura e a concentração de oxigênio no meio não limitem o metabolismo germinativo (Carvalho & Nakagawa 2000, Cardoso 2004). Contudo, para espécies tropicais arbóreas, principalmente as nativas do Brasil, poucos estudos são desenvolvidos e as informações são, ainda, pouco conclusivas.

As diferenças entre os potenciais hídricos do solo e da semente determinam a direção do fluxo de movimentação da água (Borges & Rena 1993). O processo da embebição é puramente físico e depende somente da ligação da água à matriz da semente, ocorrendo em qualquer material, morto ou vivo, que contém sítios de ligação ou afinidade pela água (Castro & Hilhorst 2004). A água se move do meio de maior potencial para o de menor (Taiz & Zeiger 2004) e potenciais hídricos muito negativos, especialmente no início da embebição, podem influenciar a absorção de água pelas sementes, levando a estresse hídrico e, conseqüentemente, inviabilizando a seqüência de eventos do processo germinativo (Mikusinsk 1987, Ávila *et al.* 2007). A diminuição da germinação de sementes sob esse estresse é atribuída à redução da atividade enzimática, resultando em menor movimento meristemático (Popinigis 1985, Hadas 1976 *apud* Ávila *et al.* 2007).

O oxigênio é considerado necessário para a oxidação dos materiais de reserva e, conseqüente, para o suprimento de energia necessário ao desenvolvimento do eixo embrionário. Ainda que necessário, a maioria das espécies não exige concentrações elevadas de oxigênio para que ocorra a oxidação da matéria orgânica. Durante o início da imbibição a energia é obtida através da respiração anaeróbica. Esta situação não persiste por um período prolongado, pois, ao atingirem determinado grau de hidratação, as sementes passam a permitir a entrada do oxigênio que, dissolvido em água, se difunde pelos tecidos e a respiração se torna aeróbica. No entanto, em solos encharcados ou excessivamente úmidos, as limitações à difusão do oxigênio podem promover a paralização da germinação (Figliolia *et al.* 1993, Carvalho & Nakagawa 2000, Marcos Filho 2005).

As razões para o decréscimo ou fracasso da germinação em condições de anaerobiose ainda não são bem conhecidas; supõe-se que o decréscimo ou fracasso da germinação em condições de anaerobiose se dá porque a ausência ou escassez de oxigênio favorece a produção de etanol nas células e este produto é tóxico ao metabolismo normal (Marcos Filho 2005).

Estudos referentes à germinação e ao metabolismo respiratório de sementes de *Inga sessilis* (Vell.) Mart. submetidos a normoxia, hipoxia e anoxia, mostraram que, apesar de ser uma espécie típica de ambientes com solos drenados, 40% germinam sob hipoxia. A anoxia, por outro lado, é letal para as sementes (Okamoto & Joly 2000).

De todos os estresses possíveis às sementes, a temperatura certamente figura entre os principais. Na ausência de outros fatores limitantes, a germinação ocorre sob limites relativamente amplos de temperatura, cujos extremos dependem, principalmente, da espécie e suas características genéticas, das condições do ambiente durante a produção, do manejo durante e após a colheita e da sanidade (Marcos Filho 2005).

As temperaturas inferiores ou superiores à ótima tendem a reduzir a velocidade do processo germinativo, expondo as plântulas por maior período a fatores adversos, o que pode levar à redução na

porcentagem total de germinação (Carvalho & Nakagawa 2000). Em função disso, há a necessidade de serem determinadas temperaturas em que a eficiência do processo é total, bem como a máxima e mínima toleradas pelas sementes (Marcos Filho 2005).

Diante do exposto, considerando a ausência de informações sobre a tolerância de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* a estresses ambientais, o presente trabalho teve por objetivo estudar o efeito dos estresses hídrico, aeróbico e térmico na germinação, com vistas à ampliar o conhecimento sobre os fatores limitantes à germinação dos embriões dessa espécie.

Material e Métodos

Obtenção do material vegetal - Frutos de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington foram coletados no mês de janeiro de 2007, a partir de 10 matrizes plantadas no município de Santo André, SP (23°37'S, 46°31'W) e de 20 matrizes plantadas na área pertencente ao Centro de Exposições Imigrantes, São Paulo, SP (23°38'S e 46°32'W), áreas representadas na figura 1.

Os frutos foram levados ao Laboratório de Sementes do Instituto de Botânica, São Paulo, SP (23°37'S, 46°32'W), abertos manualmente e, em seguida, realizou-se a retirada das suas sementes. Estas foram classificadas segundo o estágio de maturação, baseando-se em informações de Figliolia (1993) e Barbedo (1997), sendo agrupadas em quatro estádios (figura 2). A seguir, a sarcotesta (tegumento) que as reveste foi removida, obtendo-se os embriões excisados utilizados nos experimentos. Os embriões foram, então, avaliados quanto à sua qualidade fisiológica, por meio da determinação do seu teor de água e o seu potencial hídrico e, ainda, por testes de germinação e vigor, conforme descrito abaixo.

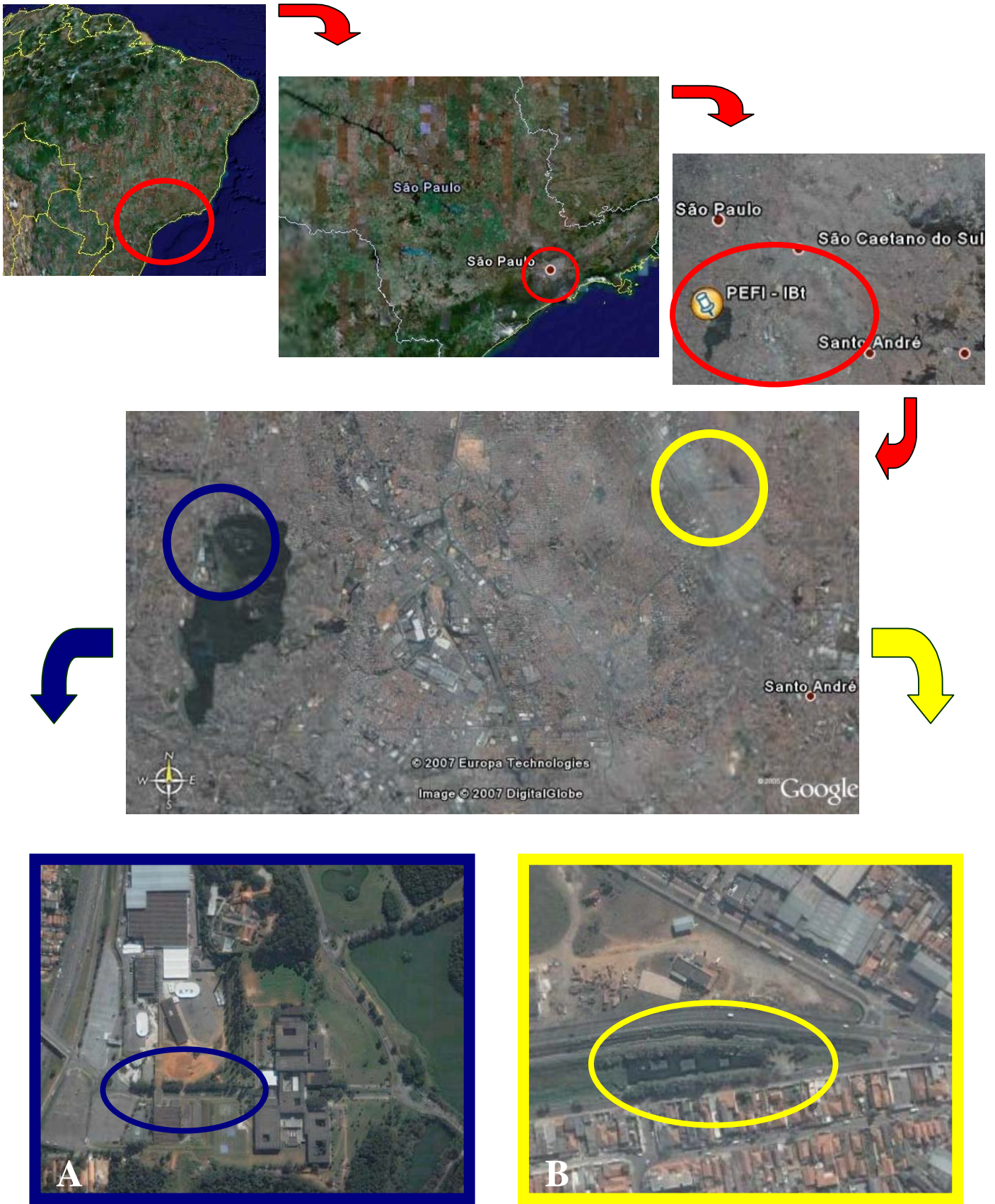


Figura 1 – Foto de satélite da localização geográfica dos locais de coleta: (A) Centro de Exposições Imigrantes, São Paulo e (B) Santo André, São Paulo. Fonte: Google Earth, 2005.

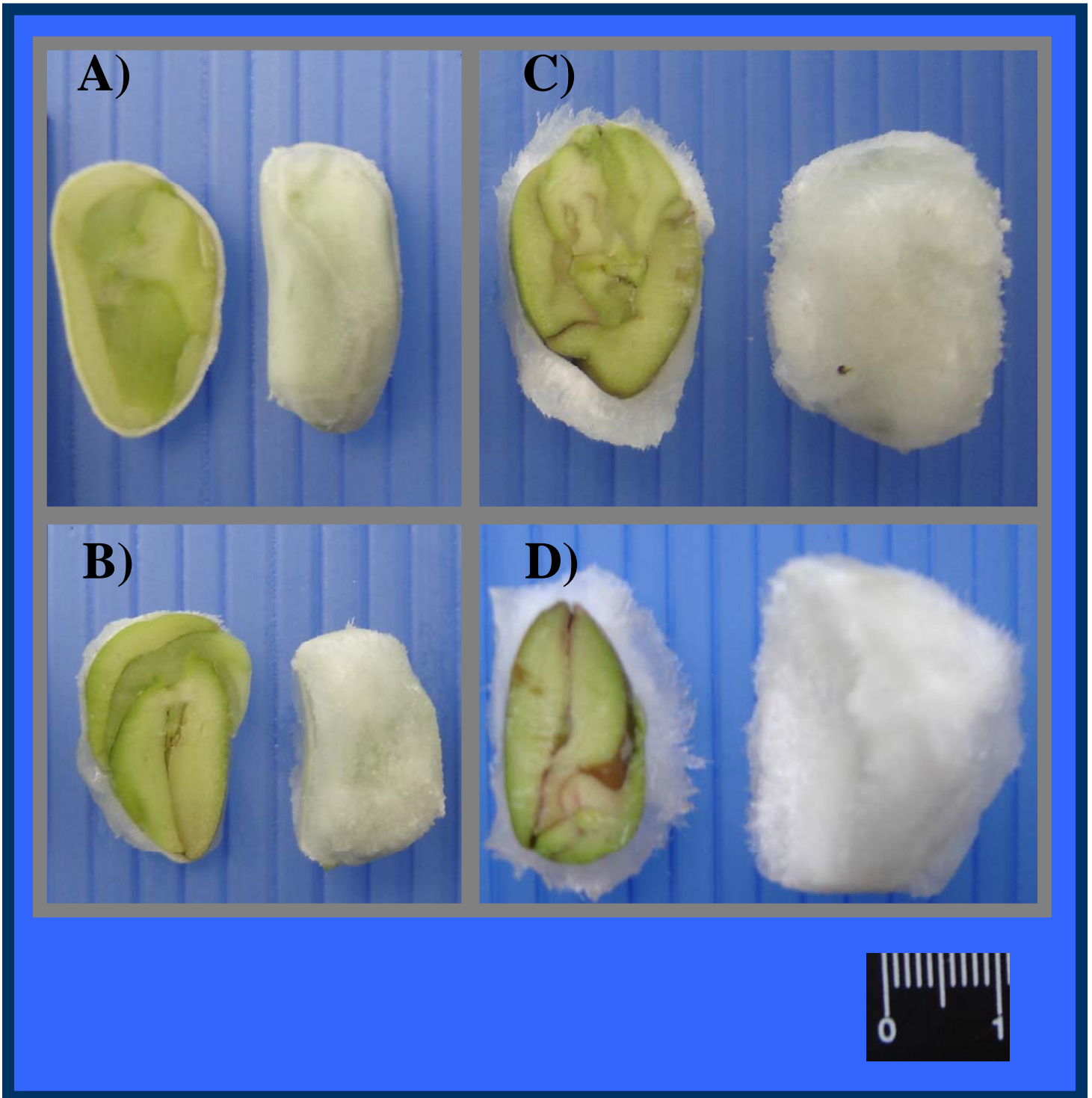


Figura 2. Embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de diferentes estádios de maturação. A separação visual em quatro estádios de maturação foi baseada nos aspectos gerais da sarcotesta das sementes. A) sementes do estágio I sarcotesta fortemente aderida ao embrião; B) sementes do estágio II sarcotesta pouco espessa e fortemente aderida ao embrião; C) sementes do estágio III sarcotesta espessa e D) sementes do estágio IV, sarcotesta com maior volume.

Tolerância a estresse hídrico e dessecação - após retirada amostra controle (sem estresse), os embriões foram submetidos a dois níveis de estresse hídrico, -2,0 (estresse leve) e -3,0 MPa (estresse severo). Para tanto, utilizaram-se soluções de polietileno glicol 6000 (PEG), calculando-se as quantidades de PEG segundo fórmula descrita por Michel & Kaufmann (1973), para a temperatura de 20 °C.

Os embriões foram incubados em bandeja plástica (26,5cm comprimento x 19,5cm largura x 5cm de altura), com a base transparente e a tampa esbranquiçada e opaca, com duas folhas de papel tipo Germitest para base e uma para cobertura. Essas folhas foram previamente umedecidas com 250 ml das soluções. Para a incubação, os embriões permaneceram submersos até sua metade.

As bandejas foram devidamente tampadas e mantidas no interior de câmaras incubadoras tipo BOD, com temperatura constante regulada para $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24 horas. Ao final da incubação, os embriões foram lavados em água corrente, para a retirada superficial da solução de PEG (Pertel *et al.* 2001), inclusive os embriões do controle e, em seguida, submetidos às secagens.

Após a retirada de amostra sem secagem, o restante dos embriões foi submetido a secagem em estufa, a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ com circulação forçada de ar (Bilia *et al.* 1998), até dois níveis, doravante denominados secagem leve e secagem severa, procurando-se levar os embriões aos teores de água de, respectivamente, 50% e 35% (base úmida), o que demandou período inferior a 48 horas. Para tanto, amostras de embriões foram retiradas periodicamente e avaliadas quanto a sua massa, até que atingissem valores próximos aos desejados, utilizando a equação descrita por Hong & Ellis (1996).

Ao final de cada nível de estresse e de secagem, os embriões foram novamente avaliados quanto à sua qualidade fisiológica, conforme descrito abaixo.

Tolerância a estresse aeróbico - após retirada de amostra controle (sem estresse aeróbico), o restante dos embriões foi submetido a quatro níveis (períodos) de estresse aeróbico. Para tanto, foram

colocados em copos plásticos (200ml) contendo 75ml de água deionizada e incubados, sob temperatura constante de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 5, 10, 20 e 30 dias.

Ao final de cada período, os embriões foram analisados quanto à sua qualidade fisiológica, conforme descrito abaixo.

Tolerância a estresse térmico - para esse estresse, os embriões foram submetidos a testes de germinação em diferentes temperaturas, desde 4°C até 38°C , com intervalos de 3°C .

Os testes de germinação tiveram duração de 45 dias, até que não houvesse germinação por dez dias seguidos. Foram consideradas como temperaturas cardiais as limítrofes, superior e inferior, para que ocorresse germinação (Labouriau 1983, Marcos Filho 2005).

Avaliações físicas e fisiológicas - o teor de água dos embriões foi avaliados pelo método da estufa a $103\pm 2^{\circ}\text{C}/17$ horas ISTA (1985). O potencial hídrico dos embriões foi avaliado em potenciômetro WP4 (Dewpoint PotentiaMeter, Decagon), baseando-se na temperatura de espelho no ponto de orvalho da atmosfera, após equilíbrio higroscópico com a amostra. Para aferição do potencial hídrico real dos embriões e do potencial registrado pelo potenciômetro, amostras foram incubadas em soluções de polietileno glicol 6000 com diferentes potenciais osmóticos, segundo Michel & Kaufmamm (1973), até peso constante, sendo então avaliadas no potenciômetro.

O teste de germinação foi realizado em rolo de papel Germitest, com duas folhas para a base e outra para cobertura, pré-umedecidas na proporção de duas vezes e meia o peso do papel (Brasil 1992), colocados em germinadores Marconi tipo MA400, com circulação interna de água, regulados para a temperatura constante de 25°C (exceto para o experimento de estresse térmico) e luz constante (Bilia & Barbedo 1997). As avaliações foram realizadas a cada dois dias, sendo computados os embriões germinados (protrusão de raiz primária com, no mínimo, 1 cm) e as plântulas normais (plântulas com sistema radicular e eofilos desenvolvidos e sem defeitos aparentes). Particularmente para o experimento de estresse térmico, foram também calculados o tempo médio de germinação e a

variância desse tempo médio (Labouriau 1983) e o índice de velocidade de germinação (IVG), segundo fórmula de Maguire (1962, *apud* Barbedo 1990). Como a espécie produz sementes poliembriônicas, os embriões contidos em cada semente foram mantidos juntos em todas as avaliações. Mesmo quando houve protrusão de mais de uma raiz primária ou surgimento de mais de uma plântula por embrião, apenas uma raiz e/ou plântula por embrião foram registradas (Bilia & Barbedo 1997).

Delineamento experimental e análise estatística dos dados - O delineamento experimental utilizado para as avaliações fisiológicas foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições de 20 embriões para todos os testes de todos os experimentos, exceto para estresse térmico no qual se utilizaram 50 embriões por repetição. Particularmente o experimento de estresse hídrico foi realizado em esquema fatorial 4x3x3 (estádio de maturação x níveis de estresse hídrico x níveis de secagem). Os resultados obtidos foram analisados pelo teste F e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (Santana & Ranal 2004). Particularmente para o experimento de estresse térmico foram ajustadas, quando pertinentes, equações polinomiais até o nível de terceiro grau. A correção da normalidade e da heterogeneidade dos dados em porcentagem, quando necessária, foi feita pela transformação para $\text{arc sen } (x/100)^{0,5}$.

Resultados e Discussão

Tolerância a estresse hídrico e dessecação - O teor de água dos embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* sem estresse e sem secagem foi bastante elevado, sendo maior para o estágio I (76,4%) e menor para os estágios III e IV (tabela 1). Segundo Figliolia & Kageyama (1994), as sementes de *Inga uruguensis* (sinonímia da espécie utilizada no presente trabalho) tendem a perder umidade à medida que

amadurecem, o que poderia indicar que, do estágio I ao estágio III, no presente trabalho, os embriões estavam amadurecendo.

Tabela 1. Teor de água (%) e potencial hídrico (-MPa) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis*, de quatro estádios de maturação, sem secagem ou após dois níveis de secagem (SemS: sem secagem; Slev: secagem até que os embriões atingissem teor de água próximo a 50% de água; Ssev: secagem até que os embriões atingissem teor de água próximo a 35% de água), sem estresse prévio à secagem ou submetidos a dois níveis de estresse osmótico (estresse leve: -2,0 MPa/24 horas, a 20°C; estresse severo: -3,0 MPa/24 horas, a 20°C). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, entre níveis de secagem; maiúsculas dentro de linhas, entre estádios de maturação; itálico entre níveis de estresse) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Nível de Estresse	Nível de Secagem	Estádio de maturação dos embriões			
		Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV
<i>Teor de água (%)</i>					
Sem estresse	Sem secagem	76,4 aAa	71,8 aBa	66,0 aCa	66,9 aCa
	Secagem leve	57,3 bAa	51,9 bBa	48,5 bBa	41,8 bCb
	Secagem severa	27,6 cCb	32,5 cBa	31,4 cBCa	41,3 cAa
Estresse leve	Sem secagem	73,5 aAab	68,9 aBa	62,8 aCab	61,1 aCb
	Secagem leve	51,0 bAb	42,8 bCb	45,3 bBCa	48,4 bABa
	Secagem severa	32,6 cAa	23,9 cBb	25,4 cBb	35,8 cAb
Estresse severo	Sem secagem	70,5 aAb	68,0 aAa	61,7 aBa	62,2 aBb
	Secagem leve	37,8 bBc	40,7 bBb	45,1 bAb	48,9 bAa
	Secagem severa	14,2 cDc	18,6 cCc	26,2 cBc	37,7 cAab
Coeficiente de variação (%)		4,58			
<i>Potencial hídrico (-MPa)</i>					
Sem estresse	Sem secagem	1,7 bAa	1,2 bAa	1,6 cAa	1,4 bAa
	Secagem leve	3,2 bBb	3,6 bBa	5,2 bBa	8,0 aAa
	Secagem severa	11,0 aAb	9,2 aAc	11,2 aAb	6,3 aBb
Estresse leve	Sem secagem	1,6 bAa	1,8 bAa	2,2 cAa	1,4 cAa
	Secagem leve	3,8 bAb	5,0 bAa	5,5 bAa	5,4 bAb
	Secagem severa	10,0 aBb	16,2 aAb	14,7 aAa	8,9 aBa
Estresse severo	Sem secagem	1,7 cAa	1,9 cAa	2,4 cAa	1,8 bAa
	Secagem leve	6,1 bAa	5,4 bAa	5,3 bAa	5,4 aAb
	Secagem severa	52,1 aAa	28,4 aBa	13,6 aCa	7,6 aDab
Coeficiente de variação (%)		18,14			

De maneira geral, estes teores de água dos embriões corresponderam a água retida com tensões próximas a $-1,5\text{MPa}$, porém sem tendências evidentes, sendo as diferenças não significativas (tabela 1). Nessa faixa de potencial hídrico, a água é classificada como tipo 5 (Vertucci 1993), ou seja, apresenta características de uma solução diluída e não se liga às macromoléculas (Marcos Filho 2005). É interessante ressaltar que, nesse nível de hidratação e de disponibilidade de água, os embriões podem até mesmo germinar.

Considerando-se os estresses hídricos, nota-se que o estresse leve ($-2,0\text{MPa}$) reduziu o teor de água dos embriões de todos os estádios de maturação (tabela 1). Já quando se considera o estresse severo ($-3,0\text{MPa}$), apenas os embriões do estádio I continuaram a perder significativa quantidade de água, chegando a atingir um teor de $70,5\%$ (base úmida). Esses resultados são, de certa forma, interessantes pois, segundo Taiz & Zeiger (2004), a água se move do meio com maior potencial para o de menor. Como os embriões apresentavam, inicialmente, valores próximos a $-1,5\text{MPa}$, seria esperado que a maior movimentação de água ocorresse justamente do estresse leve para o severo. Tal fato poderia ser explicado, talvez, por um período insuficiente de exposição às soluções de PEG. De fato, nota-se, pelos resultados de potencial hídrico (tabela 1) que, mesmo após exposição ao estresse severo (-3MPa), os embriões mantiveram potencial hídrico entre $-1,5$ e $-2,5\text{MPa}$.

Em relação à secagem, após o primeiro nível (secagem leve) os embriões apresentaram teores de água entre $41,8\%$ a $57,3\%$, o estádio I permanecendo com valor superior aos demais. Os estádios II e III por sua vez não apresentaram diferenças significativa nos seus teores de água, mas foram superiores ao valor obtido para o estádio IV (tabela 1). Semelhante comportamento foi observado após o segundo nível de secagem (severa), desta vez o teor de água situando-se em torno de $30-40\%$, com potencial hídrico variando de $-6,3\text{MPa}$ a $-11,2\text{MPa}$ entre os estádios, mas todos situados dentro do tipo 3 de água (Vertucci 1993).

Os embriões de todos os estádios de maturação apresentaram 100% de germinação inicial e 97-100% de desenvolvimento de plântulas normais, valores característicos para a espécie (Bilia & Barbedo 1997, Bilia *et al.* 1999, Barbedo & Cicero 2000). Com as secagens, contudo, notou-se diferença entre estes estádios. Assim, ainda que não tenha apresentado diferença significativa nos teores de água, os estádios II e IV apresentaram redução na capacidade de germinação e no desenvolvimento de plântulas normais após a secagem leve (tabela 2).

Os embriões do estádio IV poderiam ter apresentado essa queda, não observada nos do estádio III, em função de sua maior remoção de água (tabela 1). Contudo, os do estádio II atingiram, após a secagem leve, teor de água significativamente igual aos do estádio III. Portanto, essa diferença observada na germinação sugere que o estádio II seja mais imaturo, pois sementes imaturas são mais sensíveis a dessecação (Marcos Filho 2005). O mesmo raciocínio poderia ser aplicado aos embriões do estádio I, que perderam a capacidade de produzir plântulas normais (tabela 2).

De modo geral, observa-se, na tabela 2, que há o comprometimento na germinação e na capacidade de produzir plântulas normais quando os embriões tiveram seus teores de água reduzidos a valores próximos a 27% e 30%, respectivamente para germinação e para plântulas normais (tabelas 1 e 2), o que confirma descrição de Bilia *et al.* (1998).

Igualmente, os embriões começaram a perder sua viabilidade quando apresentaram água retida com tensões, em média, entre -5,0 e -6,0 MPa. Nessa faixa, a água, classificada como tipo 3 (-4 a -11 MPa), está presente nos embriões associando-se aos sítos hidrofóbicos das macromoléculas (Vertucci 1993). Além disso, sementes intolerantes à dessecação apresentam mecanismos de deterioração quando desidratadas até esse nível (Marcos Filho 2005).

Tabela 2. Germinação e desenvolvimento de plântulas normais (%) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis*, de quatro estádios de maturação, sem secagem ou após dois níveis de secagem (SemS: sem secagem; Slev: secagem até que os embriões atingissem teor de água próximo a 50% de água; Ssev: secagem até que os embriões atingissem teor de água próximo a 35% de água), sem estresse prévio à secagem ou submetidos a dois níveis de estresse osmótico (estresse leve: -2,0 MPa/24 horas, a 20°C; estresse severo: -3,0 MPa/24 horas, a 20°C). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, entre níveis de secagem; maiúsculas dentro de linhas, entre estádios de maturação; itálico entre níveis de estresse) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Nível de Estresse	Nível de Secagem	Estádio de maturação dos embriões			
		Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV
<i>Germinação (%)</i>					
Sem estresse	Sem secagem	100 aAa	100 aAa	100 aAa	100 aAa
	Secagem leve	93 aAa	88 bBCa	100 aAa	78 bCa
	Secagem severa	0 bCa	18 cBa	20 bBCa	85 bAa
Estresse leve	Sem secagem	100 aAa	100 aAa	100 aAa	100 aAa
	Secagem leve	85 bABa	93 aAa	93 aAab	78 bBa
	Secagem severa	0 cBa	0 bBb	0 bBb	40 cAb
Estresse severo	Sem secagem	70 aBb	100 aAa	100 aAa	96 aAa
	Secagem leve	18 bCb	68 bBb	88 bAb	72 bABa
	Secagem severa	0 cBa	0 cBb	0 cBb	40 cAb
Coeficiente de variação (%)		13,12			
<i>Potencial hídrico (-MPa)</i>					
Sem estresse	Sem secagem	97 aAa	100 aAa	98 aAa	100 aAa
	Secagem leve	80 bBa	76 bBa	100 aAa	48 cCa
	Secagem severa	0 cBa	0 cBa	0 bBCa	80 bAa
Estresse leve	Sem secagem	87 aBa	100 aAa	100 aAa	92 aAb
	Secagem leve	62 bBa	70 bABa	86 bAb	58 bBa
	Secagem severa	0 cBa	0 cBa	0 cBa	15 cAb
Estresse severo	Sem secagem	7 aCb	98 aAa	100 aAa	85 aBb
	Secagem leve	2 aCb	44 bBb	68 bAc	37 bBa
	Secagem severa	0 aAa	0 cAa	0 cAa	5 cAb
Coeficiente de variação (%)		19,73			

A remoção de água retida com tensões abaixo de -11MPa, ou seja, água do tipo 2 (entre -12 e -150 MPa), segundo Verticci (1993), se mostrou letal para os embriões. Essa água, interage com os sítios polares das macromoléculas, ligando-se através de pontes de hidrogênio. Assim, aparentemente a remoção de água com algum tipo de ligação à matriz das sementes é a que provoca danos a embriões de *Inga vera ssp. affinis*.

Após o estresse leve, os embriões sem secagem dos estádios III e IV, que não haviam apresentado diferença significativa no teor de água, também o fizeram com relação à germinação. Nota-se, porém, que o estádio III apresentou desenvolvimento de plântulas normais superior ao do estádio IV após secagem leve (tabela 2). Quando se analisa a germinação e o desenvolvimento de plântulas normais dos embriões dos estádios III e IV após estresse leve e secagem severa verifica-se que os deste último estádio apresentaram melhor comportamento. Contudo, tal fato pode ser atribuído ao seu teor de água que, diferentemente do outro estádio, não atingiu os valores considerados letais por Bilia *et al.* (1999). Assim sendo, sugere-se que o estádio III está mais próximo do ponto de maturidade fisiológica do que o estádio IV, pois a tolerância à dessecação acentua-se próximo ao ponto de maturidade fisiológica (Castro *et al.* 2004).

Tolerância ao estresse aeróbico - os embriões de *I. vera ssp. affinis* mostraram-se muito tolerantes à submersão, ou seja, à redução da disponibilidade de ar. Pelos resultados observados na tabela 3 nota-se que a submersão em água por até 20 dias não modificou os principais valores de germinação. Após 30 dias de submersão, contudo, a porcentagem de germinação foi prejudicada, mas o maior prejuízo foi observado na velocidade de germinação, visto pelo IVG (tabela 3).

Tabela 3. Tolerância de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* à submersão em água por diferentes períodos, avaliada pela germinação, desenvolvimento de plântulas normais, velocidade e sincronismo de germinação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tempo de submersão	Germinação (%)	Desenvolvimento de plântulas normais (%)	Índice de velocidade de germinação	Primeira Contagem da Germinação (%)	Variância do tempo médio de germinação (dias⁻²)
Inicial (0 dia)	100 a	98 a	3,39 a	100 a	4,60 a
5 dias	98 a	92 a	2,47 c	98 a	4,03 b
10 dias	98 a	90 a	2,96 b	98 a	3,48 c
20 dias	100 a	95 a	2,58 bc	100 a	3,92 bc
30 dias	88 b	82 a	2,01 d	88 b	4,46 ab
Coefficiente de variação (%)	4,01	8,40	7,10	4,01	6,13

Andréo *et al.* (2006) obtiveram significativa ampliação da capacidade de armazenamento desses embriões quando mantidos em solução de PEG a -2,4MPa, controlando a mobilização de água e reduzindo, provavelmente, o seu metabolismo. Contudo, foi mantido controle de aeração desses embriões. No presente trabalho fica evidenciado que, de fato, apesar da grande tolerância à submersão dos embriões e plântulas dessa espécie (Lieberg & Joly 1993, Okamoto & Joly 2000), eles provavelmente não suportariam armazenamento prolongado submersos nas soluções de PEG. Contudo, fica também evidenciado que tratamentos de imersão por até 20 dias não comprometem a capacidade germinativa ou o vigor desses embriões.

Essa tolerância à submersão talvez esteja relacionada à própria evolução e seleção natural da espécie, uma vez que sua ocorrência é freqüente às margens de rios, ou seja, áreas sujeitas a alagamentos periódicos (Bilia *et al.* 2003). Também pode estar relacionada à própria dispersão natural da espécie que, entre outros mecanismos, utiliza a dispersão pelo rio (Bilia *et al.* 2003).

Tolerância a estresse térmico - as figuras 3 e 4 apresentam os resultados de germinação e de desenvolvimento de plântulas normais dos embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* nas temperaturas de 7 a 38°C. Por esses resultados, ficou evidente a ampla tolerância térmica desses embriões para a germinação (acima de 60% entre 13 e 35°C, acima de 80% entre 16 e 28°C).

Sementes de plantas nativas do Brasil podem germinar em ampla faixa térmica, dependendo do bioma e da região e parecem apresentar uma relação positiva entre a temperatura ótima e o regime térmico da região de sua ocorrência natural, mas geralmente não germinam acima de 45°C e abaixo de 15°C (Borghetti 2005).

Apesar dessa ampla tolerância, há algum prejuízo na velocidade e no sincronismo de germinação, conforme demonstrado nas figuras 5, 6 e 7, identificando-se as temperaturas próximas a 25-30°C como as de germinação mais rápida e mais uniforme. Marcos Filho (2005) considera a velocidade e o sincronismo de germinação como indicativos do vigor de lotes de sementes.

Pelos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se considerar que as temperaturas de 25 a 30°C sejam as mais indicadas para apontar diferenças entre lotes de sementes de diferentes qualidades fisiológicas e, portanto, são as que devem ser utilizadas nos testes de germinação.

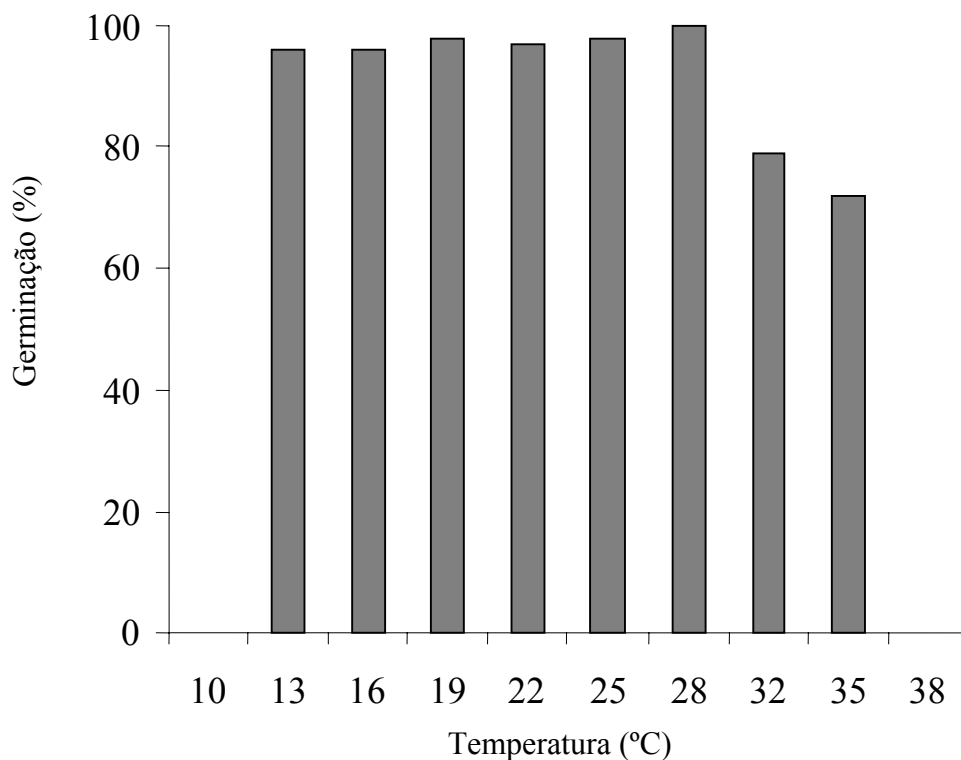


Figura 3. Germinação de embriões de *Inga vera* ssp. *Affinis*, em função da temperatura

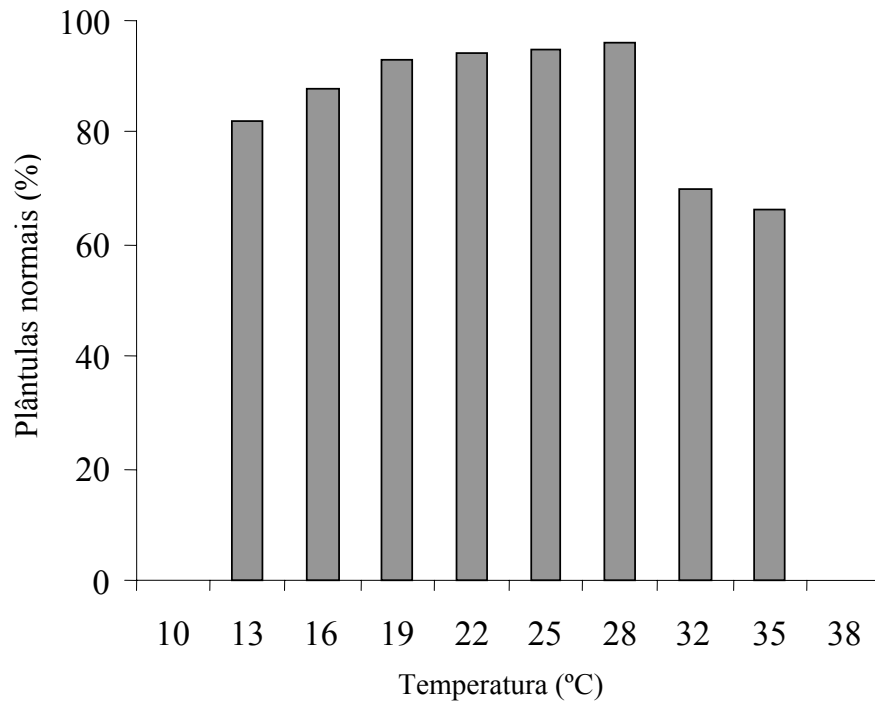


Figura 4. Desenvolvimento de plântulas normais de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis*, em função da temperatura

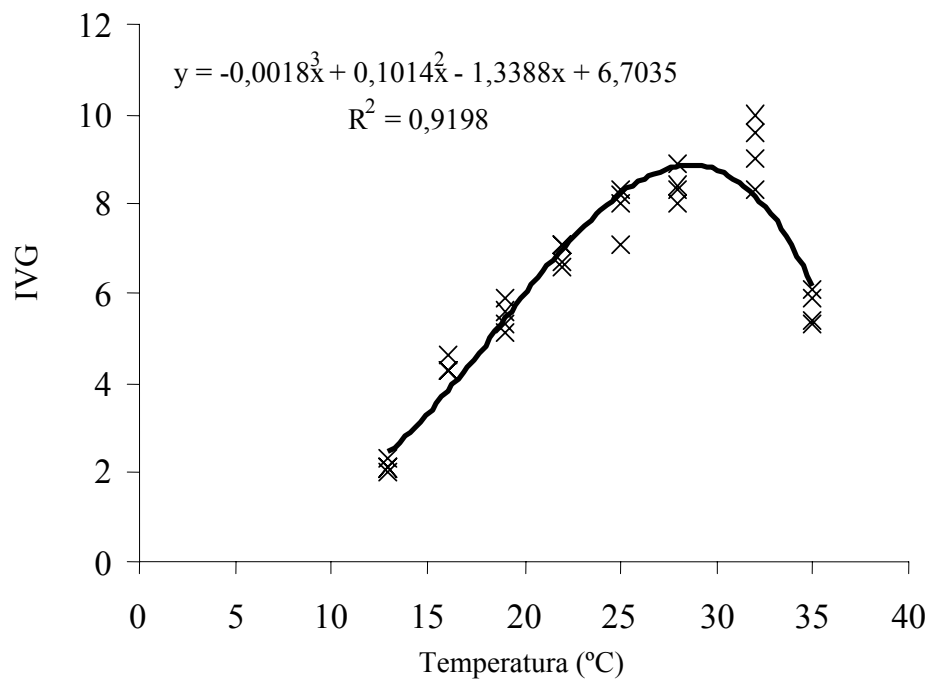


Figura 5. Índice de velocidade de germinação (IVG) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis*, em função da temperatura.

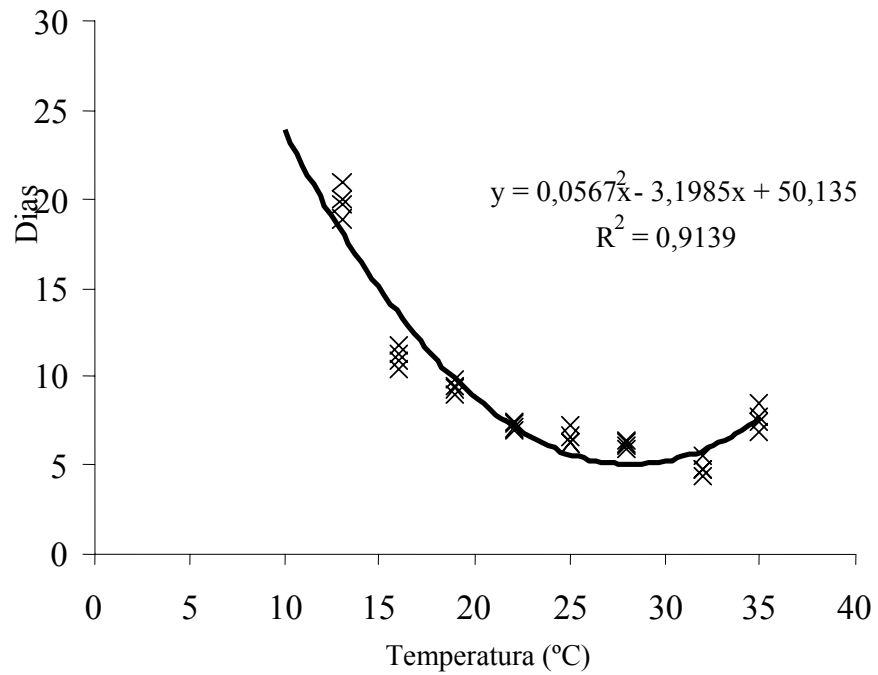


Figura 6. Tempo médio para germinação de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis*, em função da temperatura

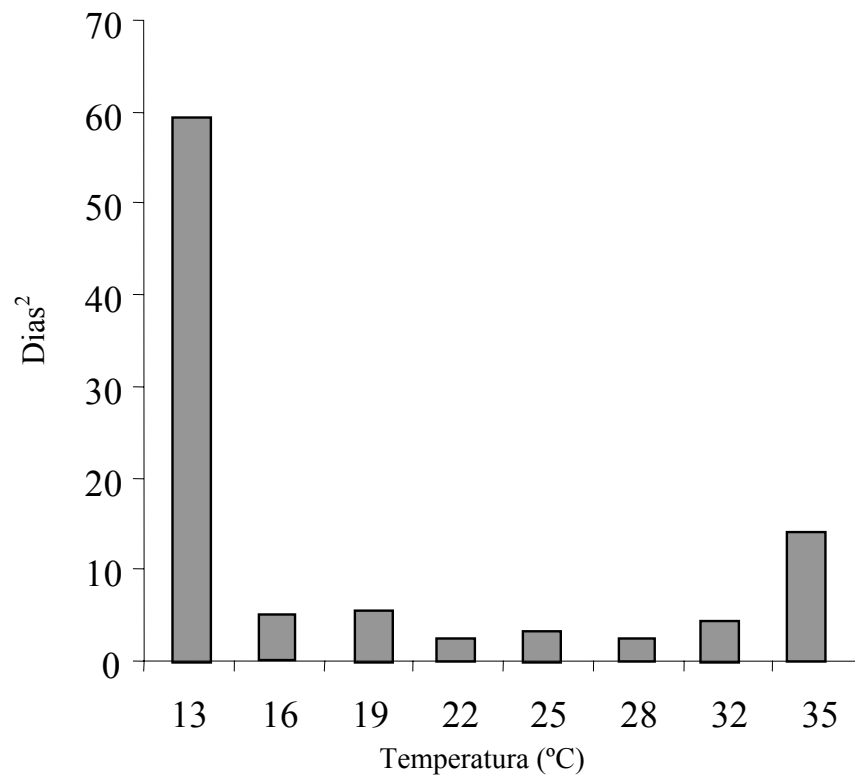


Figura 7. Variância do tempo médio para germinação de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis*, em função da temperatura

Agradecimentos - Os autores agradecem à Fapesp (Proc. 2005/04139-7) pelo apoio financeiro ao projeto; à Secretaria de Educação do Estado de São Paulo/Projeto Bolsa-Mestrado, pela bolsa concedida a M.R. Bonjovani; ao CNPq, pela bolsa de produtividade em pesquisa concedida a C.J. Barbedo; à Prefeitura do Município de Santo André e ao Centro de Exposições Imigrantes, pela permissão para as coletas de sementes.

Referências Bibliográficas

- ANDRÉO, Y., NAKAGAWA, J. & BARBEDO, C.J. 2006. Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Will. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington). Revista Brasileira de Botânica 29:309-318.
- ÁVILA, M.R., BRACCINI, A.L., SCAPIM, J.R.F. & SANTOS, J.L. 2007. Influência do estresse hídrico simulado com manitol na germinação de sementes e crescimento de plântulas de canola. Revista Brasileira de Sementes 29:98-106.
- BARBEDO, C.J. 1990. Influência da idade e do repouso pós-colheita de frutos na qualidade de sementes de pepino (*Cucumis sativus* L.). Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- BARBEDO, C.J. 1997. Armazenamento de sementes de *Inga uruguensis* Hook. & Arn.. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BARBEDO, C.J. & CICERO, S.M. 2000. Effects of initial quality, low temperature and ABA on the storage of seeds of *Inga uruguensis*, a tropical species with recalcitrant seeds. Seed Science and Technology 28:793-808.
- BILIA, D.A.C. & BARBEDO, C.J. 1997. Estudos de germinação e armazenamento de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. Científica 25:379-391.

- BILIA, D.A.C., MARCOS FILHO, J. & NOVENBRE A.D.C.L. 1998. Conservação da qualidade fisiológica de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. *Revista Brasileira de Sementes* 20:48-54.
- BILIA, D.A.C., MARCOS FILHO, J. & NOVENBRE A.D.C.L. 1999. Desiccation tolerance and seed storability of *Inga uruguensis* Hook. et Arn. *Seed Science and Technology* 27:77-89.
- BILIA, D.A.C., BARBEDO, C.J., CICERO, S.M. & MARCOS FILHO, J. 2003. Ingá: uma espécie importante para recomposição vegetal em florestas ripárias, com sementes interessantes para a ciência. *Informativo ABRATES* 13:26-30.
- BORGES, E.E.L. & RENA, A.B. 1993. Germinação de sementes. *In Sementes florestais tropicais* (I.B. Aguiar, F.C.M. Pinã-Rodrigues & M.B. Figlioglia, eds.). ABRATES, Brasília, p.83-135.
- BORGHETTI, F. 2005. Temperaturas extremas e a germinação das sementes. *In Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas* (R.M.C. Nogueira, E.L. Araújo, L.G. Willadino & U.M.T. Cavalcante, eds.). UFRPE, Imprensa Universitária, Recife, p.207-218.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. 1992. Regras para análise de sementes. SNDA/DNDU/CLAV, Brasília.
- CARDOSO, V.J.M. 2004. Dormência: estabelecimento do processo. *In Germinação: do básico ao aplicado* (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre, p.95-108.
- CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4.ed. Funep, Jaboticabal.
- CASTRO, R.D. & HILHORST, H.W.M. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. *In Germinação: do básico ao aplicado* (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre, p.149-162.
- CASTRO, R.D., BRADFORD, K.J. & HILHORST, H.W.M. 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. *In Germinação: do básico ao aplicado* (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre, p.51-67.

- FIGLIOLIA, M.B. 1993. Maturação de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. associada à fenologia reprodutiva e à dispersão de sementes em floresta ripária do rio Moji-Guaçu, município de Moji-Guaçu, SP. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- FIGLIOLIA, M.B. & KAGEYAMA, P.Y. 1994. Maturação de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. em floresta ripária do rio Moji-Guaçu, Município de Moji-Guaçu. *Revista do Instituto Florestal* 6:13-52.
- FIGLIOLIA, M.B., OLIVEIRA, E.C. & PINÃ-RODRIGUES, F.C.M. 1993. Análise de sementes. *In* Sementes Florestais Tropicais (I.B. Aguiar, F.C.M. Pinã-Rodrigues & M.B. Figliolia, orgs.). ABRATES, Brasília, p.137-174.
- HONG, T.D. & ELLIS, R.H. 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. Technical Bulletin. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- ISTA. 1985. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology* 13:356-513.
- LABOURIAU, L.G. 1983. A germinação das sementes. OEA, Washington.
- LIEBERG, S.A. & JOLY, C.A. 1993. *Inga affinis* DC. (Mimosaceae): germinação e tolerância de plântulas à submersão. *Revista Brasileira de Botânica* 16:175-179.
- MARCOS FILHO, J. 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Fealq, Piracicaba.
- MICHEL, B.E. & KAUFMANN, M.R. 1973. The osmotic potential of polyethylene glicol 6000. *Plant Physiology* 51:914-916.
- MIKUSINSK, O.M. 1987. Testes de embebição e germinação em sementes de *Ipomoea aristolochiaefolia*. *Revista Brasileira de Sementes* 9:103-108.
- OKAMOTO, J.M. & JOLY, C.A. 2000. Ecophysiology and respiratory metabolism during the germination of *Inga sessilis* (Vell.) Mart. (Mimosaceae) seeds subjected to hypoxia and anoxia. *Revista Brasileira de Botânica* 23:51-57.
- PENNINGTON, T. D. 2000. The genus *Inga*. Royal Botanic Gardens, Kew.

- PERTEL, J., DIAS, D.C.F., DIAS, L.A.S. & ALVARENGA, E.M. 2001. Efeito do condicionamento fisiológico na germinação e no vigor de sementes de café (*Coffea arabica* L.). Revista Brasileira de Armazenamento 3 (especial):39-45.
- POPINIGIS, F. 1985. Fisiologia da semente. AGIPLAN, Brasília.
- SANTANA, D.G. & RANAL, M. 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. Ed. Universidade de Brasília, Brasília.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. Fisiologia vegetal. 3.ed. Artimed, Porto Alegre.
- VERTUCCI, C.W. 1993. Predicting the optimum storage conditions for seeds using thermodynamic principles. Journal of Seed Technology 17:41-53.

4. Capítulo II

**Tolerância de embriões de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington (Leguminosae)
submetidos à secagem e à redução da temperatura de armazenamento**

(nas normas da Revista Brasileira de Botânica)

**Tolerance of embryos of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington (Leguminosae)
submitted to the drying and to storage at low temperature.**

ABSTRACT - The storage of desiccation-sensitive seeds of many species like *Inga vera* subsp. *affinis* are difficult due to their desiccation sensitivity, since drying is one of the important mechanism of seed conservation. Methods others that drying should be analysed for the conservation of these seeds, as cold storage. This work was carried out to evaluate the tolerance of the *I. vera* embryos from different stages of maturity to storage at cold temperatures. Non-dried embryos and both dried to -4MPa and -6MPa were stored at temperatures from 8 to -18°C for until 45 days. Embryos were evaluated as for water content, water potential, germination and vigour. Results showed that, besides all embryos died at -18°C, some cold tolerance was obtained by mature embryos dried to -4MPa when stored at -2°C.

Key words - freezing, recalcitrant, seed germination, storability, tropical tree

**Tolerância de embriões de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington (Leguminosae)
submetidos à secagem e à redução da temperatura de armazenamento**

RESUMO - O armazenamento de sementes de muitas espécies, como *Inga vera* subsp. *affinis*, é dificultado pela sua sensibilidade à dessecação, uma vez que a secagem é o principal método de conservação de sementes. Métodos alternativos para essa conservação, como o armazenamento sob baixas temperaturas, devem ser estudados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a tolerância de embriões de *I. vera* de diferentes estádios de maturação à redução da temperatura de armazenamento. Os embriões foram submetidos a dois níveis de secagem, até -4,0 e -6,0MPa, além dos não submetidos à secagem, seguindo-se de armazenamento por até 45 dias, nas temperaturas de 8°C a -18°C. Os embriões foram avaliados quanto ao teor de água, potencial hídrico, germinação e vigor. Os resultados permitiram observar que, embora nenhum tratamento tenha proporcionado resistência à temperatura de -18°C, a secagem dos embriões maduros a -4MPa proporcionou maior tolerância à redução de temperatura até níveis de congelamento da água (-2°C).

Palavras-chave - congelamento, recalcitrante, germinação de semente, armazenamento, espécie tropical

Introdução

A conservação de uma espécie implica, entre outros aspectos, na manutenção de sua variabilidade genética e pode ser realizada *in situ* ou *ex situ*. Dentre as técnicas de conservação *ex situ*, a manutenção de germoplasma é a forma mais comum e pode ser feita, por exemplo, com o armazenamento de sementes. Contudo, a metodologia convencional de conservação de sementes em bancos de germoplasma frequentemente utiliza a secagem e o armazenamento em câmaras a temperaturas abaixo de zero como forma de preservar a viabilidade das sementes, práticas nem sempre possíveis para as sementes de muitas espécies tropicais (Barbedo & Bilia 1998, Santos 2001, Rocha 2004).

Dentre as espécies da Mata Atlântica que produzem sementes intolerantes à dessecação, *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington, popularmente conhecida por ingá, pertence à família Leguminosae e ocorre desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais (Joly 1993, Figliolia & Kageyama 1994). É recomendada para plantio nas faixas mais próximas aos cursos d'água, visando à recuperação de áreas degradadas (Carvalho 1994), uma vez que seu sistema radicular é pivotante, superficial, com numerosas raízes secundárias que têm excelente atuação no controle da erosão e evitando o assoreamento (Bilia & Barbedo 1997). Suas sementes, 2 a 13 por fruto, são revestidas pela sarcotesta, muitas vezes bastante adocicada (Oliveira & Beltrati 1993, Barbedo & Bilia 1997). Em condições naturais, essas sementes, após a dispersão, perdem a viabilidade em menos de 15 dias (Carvalho 1994, Bilia & Barbedo 1997).

Acima de determinados níveis de hidratação, a água torna-se congelável, tanto nas sementes intolerantes à dessecação quanto nas tolerantes, podendo ocasionar danos devido à formação de cristais de gelo nos tecidos e levando à perda da viabilidade (Fonseca & Freire 2003). A principal consequência da formação de cristais de gelo é a ruptura mecânica, tanto da estrutura citoplasmática

quanto da membrana celular, pela expansão da água congelada, resultando na desagregação celular (Taiz & Zeiger 2004). Pode ocorrer, ainda, enorme tensão e estresse físico em células vegetais submetidas ao congelamento. Isso porque, durante a transição de fase do líquido extracelular, com a conseqüente formação de gelo, há dessecação dos tecidos vegetais pela migração da água do interior da célula para o meio extracelular (Guy 2003).

As sementes que toleram desidratação quase completa podem suportar, conseqüentemente, temperaturas extremamente baixas, o que supostamente não ocorre com as sementes intolerantes à dessecação. Contudo, ainda não foram estabelecidos os limites de redução da temperatura para estas sementes.

A aquisição da tolerância à dessecação é um fenômeno complexo, envolvendo a interação de ajustes metabólicos e estruturais, permitindo que as células resistam a perdas consideráveis de água sem a ocorrência de prejuízos. A maior ou menor eficiência desses fatores poderia, dessa forma, acarretar a formação de sementes com diferentes níveis de tolerância à dessecação (Marcos Filho 2005). Possivelmente, tal fato poderia ocorrer, também, em relação à tolerância à redução da temperatura.

A baixa capacidade de manutenção da viabilidade durante o armazenamento das sementes intolerantes à dessecação vem causando problemas para a conservação de germoplasma dessas espécies a longo prazo (Castro *et al.* 2004) e dificultando sua inclusão em programas de restauração vegetal (Bilia *et al.* 2003). Isso porque as principais técnicas de conservação de sementes durante o armazenamento envolvem a redução do seu metabolismo por meio da remoção da água e/ou da redução da temperatura de armazenamento. Essas sementes geralmente apresentam atividade metabólica intensa, tanto durante sua formação, quanto após sua colheita (Barbedo & Marcos Filho 1998, Castro *et al.* 2004). Assim, métodos para o armazenamento das sementes recalcitrantes devem obrigatoriamente considerar a redução do metabolismo (Andréo *et al.* 2006).

Estudos realizados por Barbedo & Cicero (2000) mostraram que sementes de *Inga uruguensis* armazenadas hidratadas e embebidas em solução de ácido abscísico 10^{-4} M, a 10°C , podem apresentar germinação superior a 80% após 40 dias. Andréo *et al.* (2006), por sua vez, controlando a mobilização de água entre a semente e o meio, obtiveram embriões com germinação superior a 80% após 90 dias de armazenamento, também a 10°C , quando mantidos em substratos com soluções de PEG a -2,4 MPa. Bilia *et al.* (1998), estudando os limites de tolerância à dessecação dessas sementes, conseguiram armazená-las, na mesma temperatura utilizadas por aqueles autores, por até 60 dias quando o teor de água foi reduzido até 50%.

A capacidade de armazenamento é ampliada para muitas espécies, quando a redução do teor de água das sementes está associada à diminuição de temperatura do ambiente (Walters 1998). Contudo, há espécies que não toleram grande redução da temperatura principalmente o congelamento (Chin *et al.* 1989). Considerando a dificuldade no armazenamento de sementes intolerantes à dessecação e, ainda, o fato de não terem sido estabelecidos os limites inferiores de temperatura suportados por essas sementes, no presente trabalho foram avaliados os limites de tolerância à baixa temperatura de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de diferentes estádios de maturação, com vistas à ampliar o período de armazenamento das sementes dessa espécie.

Material e Métodos

Obtenção do material vegetal - frutos de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington foram coletados no mês de janeiro de 2007, a partir de dez matrizes plantadas no município de Santo André, SP ($23^{\circ}37'$ S, $46^{\circ}31'$ W).

Os frutos foram levados ao Laboratório de Sementes do Instituto de Botânica, São Paulo, SP ($23^{\circ}37'$ S, $46^{\circ}32'$ W), abertos manualmente e, em seguida, realizou-se a retirada das suas sementes.

Estas foram classificadas segundo o estágio de maturação, baseando-se em informações de Figliolia (1993) e Barbedo & Cicero (2000); assim, as sementes foram agrupadas em quatro estádios conforme a espessura da sarcotesta (tegumento) que as reveste. A seguir essa sarcotesta foi removida, obtendo-se os embriões excisados utilizados nos experimentos. Os embriões foram, então, avaliados quanto à sua qualidade fisiológica, por meio da determinação do seu teor de água e o seu potencial hídrico e, ainda, por testes de germinação e vigor, conforme descrito abaixo.

Secagem - os embriões obtidos, separados por estágio de maturação, após retirada da amostra controle (sem secagem), foram submetidos a dois níveis de secagem, em estufa a 30 ± 1 °C com circulação de ar forçada (Bilia *et al.* 1998), denominadas secagem leve e secagem severa, procurando-se levar os embriões aos potenciais hídricos de, respectivamente, -4 e -6 MPa. Para tanto, amostras de embriões foram retiradas periodicamente e avaliadas quanto ao seu potencial hídrico, até que atingissem valores próximos aos desejados.

Ao final de cada nível de secagem, os embriões foram novamente avaliados quanto à sua qualidade fisiológica, conforme descrito anteriormente.

Temperaturas de armazenamento – após a obtenção dos níveis de secagem desejados, os embriões foram embalados em sacos de polietileno (0,05 mm) fechados, etiquetados e armazenados nas temperaturas de 8 °C, 4 °C, 2 °C, -2 °C e -18 °C.

Após 15, 30 e 45 dias, amostras dos embriões foram removidas das câmaras de armazenamento, mantidas em ambiente de laboratório com temperatura constante de 20 ± 2 °C por 24 horas para aclimação e, em seguida, avaliados novamente quanto à sua qualidade fisiológica.

Avaliações físicas e fisiológicas - o teor de água dos embriões foi avaliados pelo método da estufa a 103 ± 2 °C/ 17 horas (ISTA 1985). O potencial hídrico dos embriões foi avaliado em potenciômetro WP4 (Dewpoint PotentiaMeter, Decagon), baseando-se na temperatura de espelho no ponto de orvalho da atmosfera, após equilíbrio higroscópico com a amostra. Para aferição do potencial hídrico real dos

embriões e do potencial registrado pelo potenciômetro, amostras foram incubadas em soluções de polietileno glicol 6000 (PEG) com diferentes potenciais osmóticos, segundo Michel & Kaufmann (1973), até peso constante, sendo então avaliadas no potenciômetro.

O teste de germinação, com 20 embriões por repetição, foi realizado em rolo de papel germitest, com duas folhas para a base e outra para cobertura, pré-umedecidas na proporção de duas vezes e meia o peso do papel (Brasil 1992), colocados em germinadores Marconi tipo MA400, com circulação interna de água, regulados para a temperatura constante de 25 °C e luz constante (Bilia & Barbedo 1997). As avaliações foram realizadas aos 7 e aos 14 dias, sendo computados os embriões germinados (protrusão de raiz primária com, no mínimo, 1 cm) e as plântulas normais (plântulas com sistema radicular e eofilos desenvolvidos e sem defeitos aparentes). Como a espécie produz sementes poliembriônicas, os embriões contidos em cada semente foram mantidos juntos em todas as avaliações. Mesmo quando houve protrusão de mais de uma raiz primária ou surgimento de mais de uma plântula por embrião, apenas uma raiz e/ou plântula por embrião foram registradas (Bilia & Barbedo 1997).

A condutividade elétrica da solução de embebição dos embriões foi avaliada em condutivímetro de bancada Marconi CA-150, pela imersão de 10 embriões em 75 ml de água deionizada, no interior de copos plásticos com capacidade para 200 ml. Estes embriões imersos permaneceram no interior de câmaras incubadoras tipo BOD, com temperatura regulada para 20°C constante, por 24 horas, para posterior realização da leitura (Barbedo & Cicero 1998).

Delineamento experimental e análise estatística dos dados - o delineamento experimental utilizado para as avaliações fisiológicas foi o inteiramente casualizado, com três repetições para todos os testes, em esquema fatorial 4 x 3 x 6 (estádio de maturação x níveis de secagem x temperatura de armazenamento), para cada período de armazenamento. Os resultados obtidos foram analisados pelo teste F e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (Santana & Ranal

2004). A correção da normalidade e da heterogeneidade dos dados em porcentagem, quando necessária, foi feita pela transformação para $\text{arc sen } (x/100)^{0,5}$.

Resultados e Discussão

Os embriões de *I. vera* dos quatro estádios de maturação avaliados apresentaram elevado teor de água inicial (55,4% a 76,8%), correspondendo a potenciais hídricos de -1,3 MPa (tabela 1), indicando que, por ocasião da colheita, tinham ainda água livre, ou seja, água do tipo 5, retida em potencial de 0 a -1,5 MPa (Vertucci 1993). As características deste tipo de água correspondem a soluções diluídas, não se ligando às macromoléculas e sendo suficiente para germinação (Vertucci & Farrant 1995, Castro *et al.* 2004, Marcos Filho 2005).

As alterações no teor de água e no potencial hídrico desses embriões, decorrentes das secagens, segundo a análise de variância, não foram influenciadas pelo estágio de maturação. Após a secagem leve, os embriões apresentaram, em média, 55,3% de água, correspondendo a água retida com tensões de cerca de -3,9 MPa (tabela 1). Nesse potencial hídrico (-1,5 a -4,0 MPa), que caracteriza ainda água do tipo 4 (Vertucci 1993), tem-se solução mais concentrada, ocupando os espaços intercapilares entre as macromoléculas, mas ainda não interagindo com sua superfície.

Essa água tem importância relevante, uma vez que é favorável à conservação de sementes intolerantes à dessecação (recalcitrantes) e sua remoção pode prejudicar o armazenamento das sementes intolerantes à dessecação (Marcos Filho 2005), como são as da espécie em estudo. A remoção dessa água, obtida com a secagem severa, levou os embriões a teores de água e potenciais hídricos próximos a, respectivamente, 47% e -6 MPa (tabela 1) caracterizando, portanto, presença apenas de água do tipo 3 (-4 a -11 MPa, segundo Vertucci 1993). Essa água se caracteriza por já se associar aos sítios hidrofóbicos das macromoléculas, formando pontes de união (Marcos Filho 2005).

Tabela 1. Teor de água (% base úmida), potencial hídrico (-MPa), conteúdo de matéria seca (g/embrião) germinação (%), desenvolvimento de plântulas normais (%) e condutividade elétrica da solução de embebição ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de quatro estádios de maturação, sem secagem ou após dois níveis de secagem (leve: até que os embriões atingissem potencial hídrico próximo a -4 MPa; severa: até que atingissem potencial próximo a -6 MPa). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas entre secagens, maiúsculas entre estádios de maturação) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Níveis de Secagem	Estádios de maturação				Médias
	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV	
<i>Teor de água (%)</i>					
Sem secagem	76,8	70,3	65,4	55,4	67,0 a
Secagem leve	60,7	57,8	53,5	49,3	55,3 b
Secagem severa	51,6	48,9	46,8	42,2	47,4 c
Médias	63,0 A	59,0 B	55,2 B	49,0 C	
Coefficiente de variação (%)	3,85				
<i>Potencial hídrico (-MPa)</i>					
Sem secagem	1,5	1,1	0,9	1,6	1,3 c
Secagem leve	3,7	3,9	3,9	4,1	3,9 b
Secagem severa	6,0	5,6	5,2	8,1	6,2 a
Médias	3,7 AB	3,5 B	3,3 B	4,6 A	
Coefficiente de variação (%)	19,29				
<i>Conteúdo de matéria seca (g/semte)</i>					
Sem secagem	0,165 aC	0,255 aB	0,339 aA	0,308 bAB	
Secagem leve	0,171 aB	0,212 aB	0,364 aA	0,354 bB	
Secagem severa	0,154 aB	0,201 aB	0,332 aA	0,397 aA	
Coefficiente de variação (%)	10,65				
<i>Germinação (%)</i>					
Sem secagem	100	100	100	100	100 a
Secagem leve	78	100	100	95	97 a
Secagem severa	60	91	98	84	77 b
Médias	85 B	98 A	97 AB	96 AB	
Coefficiente de variação (%)	15,40				
<i>Plântulas normais (%)</i>					
Sem secagem	98 aA	100 aA	98 aA	100 aA	
Secagem leve	73 bB	93 aA	96 aA	71 bB	
Secagem severa	47 bB	76 bAB	93 aA	73 bB	
Coefficiente de variação (%)	12,58				
<i>Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}\cdot\text{g}$)</i>					
Sem secagem	20,1 cB	9,8 cC	6,8 bC	34,0 bA	
Secagem leve	56,0 aA	35,4 bB	12,6 abC	38,3 bB	
Secagem severa	36,9 bC	71,0 aA	17,7 aD	52,0 aB	
Coefficiente de variação (%)	13,70				

Dessa forma, pode-se assumir que as secagens dos embriões dos quatro estádios de maturação levaram a modificações nas propriedades da água, inicialmente do tipo 5 (sem secagem), para os tipos 4 (secagem leve) e 3 (secagem severa). Contudo, é importante salientar que, mesmo no maior nível de secagem, os embriões não atingiram o teor crítico de água descrito por Bilia *et al.* (1999), ou seja, próximo a 37%.

Ainda pelos resultados da tabela 1 pode-se verificar que os embriões do estádio I apresentaram teor de água superior ao dos estádios II e III e estes, por sua vez, superiores ao do estádio IV. As modificações sugerem que, do estádio I ao IV, as sementes estivessem amadurecendo pois, segundo Figliolia & Kageyama (1994), essa redução no teor de água é comum entre as sementes de *Inga uruguensis* (sinonímia da espécie em estudo no presente trabalho) à medida que amadurecem. Contudo, os resultados de conteúdo de matéria seca desses embriões (tabela 1) demonstram que o máximo acúmulo foi obtido já no estádio III. Diversos autores consideram que o máximo acúmulo de matéria seca nas sementes caracteriza o ponto de maturidade fisiológica (Carvalho & Nakagawa 2000, Marcos Filho 2005, Mai-Hong *et al.* 2006). No caso das sementes em estudo, que não apresentam a clássica dessecação ao final da maturação (Barbedo & Marcos Filho 1998), poderia-se supor, portanto, que os embriões do estádio IV já teriam condições de iniciar o processo de germinação, tendo suficientes maturidade e água disponível. Essa informação concorda com a hipótese de Faria (2006) de que essas sementes não têm comportamento típico, aproximando-se mais ao comportamento de plântulas em crescimento. A máxima qualidade fisiológica das sementes de *Inga vera ssp. affinis*, dessa forma, ocorreria bem antes de sua dispersão, hipótese considerada, também, por Mai-Hong *et al.* (2006) para sementes de *Mimusopis elengis* L.

Considerando os resultados do teste de germinação dos embriões dos quatro estádios e nos três níveis de desidratação (tabela 1), pode-se verificar que todos apresentavam, inicialmente, a mesma capacidade em germinar e produzir plântulas normais. Com a secagem, os embriões demonstraram

comportamento diferenciado, sendo que os do estágio III foram os únicos a suportar a secagem severa sem apresentar alterações na germinação ou na capacidade de desenvolver plântulas normais (tabela 1). Tal fato reforça a idéia de que esses embriões estariam mais próximos ao ponto de maturidade fisiológica que os dos outros três estádios.

Para sementes de *Inga uruguensis*, a identificação do estágio de maturidade fisiológica das sementes e, conseqüentemente, o momento ideal para a colheita são condições ideais para a conservação da sua viabilidade durante o armazenamento (Barbedo & Cicero 2000).

Os resultados de condutividade elétrica da solução de embebição dos embriões, que avalia a integridade das membranas celulares (Marcos Filho 2005), demonstraram os danos promovidos a essas membranas com a remoção de água, principalmente após a secagem severa (tabela 1), uma vez que, de modo geral, aumentaram com o progresso da secagem. De acordo com a classificação de Barbedo & Cicero (1998), baseada na condutividade elétrica, no presente trabalho apenas os embriões dos estádios II e III seriam de elevada qualidade fisiológica.

Comparando-se os resultados de germinação, de plântulas normais e de condutividade elétrica com os de potencial hídrico dos embriões (tabela 1) nota-se que os embriões do estágio III (supostamente na maturidade fisiológica) com água ainda do tipo 4 mas já sem a do tipo 5 (secagem leve) não demonstraram qualquer perda na qualidade fisiológica.

Já com a remoção da água do tipo 4 (secagem severa) apresentaram os primeiros sinais de danos nas membranas (condutividade elétrica), embora sem alterações nos valores de germinação, concordando com Marcos Filho (2005) quanto à necessidade da presença de água do tipo 4 para conservação de sementes recalcitrantes.

Após 15 dias de armazenamento, notou-se que o teor de água (tabela 2) e o potencial hídrico (tabela 3), em geral, não apresentaram grandes diferenças entre as temperaturas utilizadas e, ainda, que o teor de água inicial (tabela 1) manteve-se praticamente constante após esse período de

armazenamento (tabela 2), o potencial hídrico apresentando pequenas alterações (tabelas 1 e 3). Entre os estádios de maturação, os embriões do estágio I mantiveram-se mais hidratados e os do estágio IV mais desidratados (tabela 2), conforme observado inicialmente (tabela 1), comportamento semelhante ao observado para potencial hídrico, com os embriões do estágio I apresentando maiores valores (menos negativos) e os do IV, menores (tabelas 1 e 3).

Tabela 2. Teor de água (% base úmida) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de quatro estádios de maturação, sem secagem ou após dois níveis de secagem (leve: até que os embriões atingissem potencial hídrico próximo a -4 MPa; severa: até que atingissem potencial próximo a -6 MPa), após armazenamento por 15 dias a 5 diferentes temperaturas (8 °C, 4 °C, 2 °C, -2 °C, -18 °C). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, entre níveis de secagem; maiúsculas dentro de linhas, entre estádios de maturação; itálico entre temperaturas de armazenamento) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Estádios de maturação	Níveis de secagem		
	Sem secagem	Secagem leve	Secagem severa
Estádio I	77,8 aA	62,0 aB	52,6 aC
Estádio II	72,7 bA	57,4 bB	48,1 bC
Estádio III	65,5 cA	54,8 bcB	47,8 bC
Estádio IV	64,2 cA	53,4 cB	43,5 cC
Temperaturas de armazenamento	Sem secagem	Secagem leve	Secagem severa
8°C	70,9 aA	57,2 aB	49,6 aC
4°C	69,4 aA	56,1 aB	49,1 aC
2°C	70,8 aA	56,5 aB	48,5 abC
-2°C	70,2 aA	56,4 aB	47,3 abC
-18°C	69,1 aA	58,4 aB	45,6 bC
Coeficiente de variação (%)	5,01		

A manutenção da viabilidade dos embriões foi influenciada pela temperatura já nos primeiros 15 dias de armazenamento (tabela 4), demonstrando a completa intolerância dos embriões de qualquer estágio e qualquer nível de desidratação a -18 °C. Esse resultado já era esperado, uma vez que todos os embriões apresentavam água congelável (tipos 3, 4 e 5), ou seja, com potencial hídrico igual ou superior a -11 MPa (Vertucci & Farrant 1995, Marcos Filho 2005). Surpreendentemente, porém, os embriões suportaram o armazenamento a -2 °C, principalmente os do estágio III (tabela 4), inclusive mantendo elevada capacidade de desenvolver plântulas normais (tabela 5).

Tabela 3. Potencial hídrico (-MPa) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de quatro estádios de maturação, sem secagem ou após dois níveis de secagem (leve: até que os embriões atingissem potencial hídrico próximo a -4 MPa; severa: até que atingissem potencial próximo a -6 MPa), após armazenamento por 15 dias a 5 diferentes temperaturas constantes (8 °C, 4 °C, 2 °C, -2 °C, -18 °C). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, maiúsculas dentro de linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Temperatura de armazenamento	Estádios de maturação			
	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV
8°C	2,34 aC	2,84 abBC	3,13 aAB	3,41 aA
4°C	2,54 aC	2,74 abBC	3,18 aAB	3,35 aA
2°C	2,69 aB	2,76 abB	3,37 aA	3,78 aA
-2°C	2,64 aC	2,93 aBC	3,46 aA	3,24 aAB
-18°C	2,32 aB	2,29 bB	2,45 bB	3,35 aA
Níveis de secagem	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV
Sem secagem	1,26 cB	1,65 cAB	1,61 cAB	1,88 cA
Secagem leve	2,36 bB	2,52 bB	3,48 bA	3,25 bA
Secagem severa	3,89 aB	3,96 aB	4,25 aB	5,15 aA
Temperatura de armazenamento	Níveis de secagem			
	Sem secagem	Secagem leve	Secagem severa	
8°C	1,51 aC	3,02 aB	4,26 abA	
4°C	1,44 aC	3,02 aB	4,39 aA	
2°C	1,63 aC	3,23 aB	4,59 aA	
-2°C	1,67 aC	2,99 aB	4,54 aA	
-18°C	1,75 aC	2,26 bB	3,79 bA	
Coeficiente de variação (%)		14,72		

Os embriões dos estádios I e IV apresentaram redução nos valores de germinação e de desenvolvimento de plântulas normais nas temperaturas de 2 e -2 °C (tabelas 4 e 5), principalmente nesta última. Em contraste, os embriões do estádio III, submetidos a secagens leve e crítica, apresentaram tolerância à redução da temperatura para -2 °C, com germinabilidade acima dos 80% (tabela 4), porém apenas os submetidos a secagem leve mantendo elevada capacidade de produzir plântulas normais (tabela 5).

Tabela 4. Germinação de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de quatro estádios de maturação, sem secagem ou após dois níveis de secagem (leve: até que os embriões atingissem potencial hídrico próximo a -4 MPa; severa: até que atingissem potencial próximo a -6 MPa), após 15 dias de armazenamento a 5 diferentes temperaturas (8 °C, 4 °C, 2 °C, -2 °C, -18 °C). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, entre níveis de secagem; maiúsculas dentro de linhas, entre estádios de maturação; itálico entre temperaturas de armazenamento) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Níveis de secagem	Estádios de maturação			
	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV
	<i>Armazenamento a 8°C</i>			
Sem secagem	47 aBab	98 aAa	100 aAa	95 aAa
Secagem leve	49 aBa	93 aAa	100 aAa	62 bBa
Secagem severa	17 bBa	27 bBa	83 bAa	37 cBa
	<i>Armazenamento a 4°C</i>			
Sem secagem	60 aBa	93 aAa	96 aAa	71 aBb
Secagem leve	40 aCa	85 aBab	100 aAa	58 abCa
Secagem severa	7 bCab	37 bBa	73 bAa	42 bBa
	<i>Armazenamento a 2°C</i>			
Sem secagem	47 aAab	36 bAb	49 bAb	36 bAc
Secagem leve	44 aCa	78 aBab	95 aAa	67 aBCa
Secagem severa	10 bCa	40 bABa	64 bAa	27 bBCab
	<i>Armazenamento a -2°C</i>			
Sem secagem	31 aAb	47 aAb	33 bAb	0 bBd
Secagem leve	33 aCa	66 aBb	91 aAa	13 aCb
Secagem severa	13 aCa	47 aBa	82 aAa	7 aCbc
	<i>Armazenamento a -18°C</i>			
Sem secagem	0 aAc	0 aAc	0 aAc	0 aAd
Secagem leve	0 aAb	0 aAc	0 aAb	0 aAc
Secagem severa	0 aAb	0 aAb	0 aAb	0 aAc
Coeficiente de variação (%)		19,67		

Tabela 5. Plântulas normais desenvolvidas de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de quatro estádios de maturação, sem secagem ou após dois níveis de secagem (leve: até que os embriões atingissem potencial hídrico próximo a -4 MPa; severa: até que atingissem potencial próximo a -6 MPa), após 15 dias de armazenamento a 5 diferentes temperaturas (8 °C, 4 °C, 2 °C, -2 °C, -18 °C). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, entre níveis de secagem; maiúsculas dentro de linhas, entre estádios de maturação; itálico entre temperaturas de armazenamento) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Níveis de secagem	Estádios de maturação			
	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV
	<i>Armazenamento a 8°C</i>			
Sem secagem	42 aBab	33 aAa	100 aAa	49 aBa
Secagem leve	36 aCa	82 aBa	100 aAa	7 bDa
Secagem severa	7 bABa	3 bABa	13 bAa	0 bBa
	<i>Armazenamento a 4°C</i>			
Sem secagem	53 aBa	89 aAa	91 aAa	42 aBa
Secagem leve	25 bCa	56 bBb	100 aAa	2 bDa
Secagem severa	0 cBa	0 cBa	24 bAa	3 bBa
	<i>Armazenamento a 2°C</i>			
Sem secagem	40 aAab	13 bBc	42 bAb	11 aBb
Secagem leve	27 abBa	62 aAab	84 aAb	9 abBa
Secagem severa	10 bAa	7 bABa	16 cAa	0 bBa
	<i>Armazenamento a -2°C</i>			
Sem secagem	29 aAb	46 aAb	27 bAb	0 aBc
Secagem leve	20 aBa	45 aBb	82 aAb	0 aCa
Secagem severa	0 bBa	7 bABa	18 bAa	0 aBa
	<i>Armazenamento a -18°C</i>			
Sem secagem	0 aAc	0 aAc	0 aAc	0 aAc
Secagem leve	0 aAb	0 aAc	0 aAc	0 aAa
Secagem severa	0 aAa	0 aAa	0 aAb	0 aAa
Coeficiente de variação (%)		31,74		

O agrupamento das sementes em dois tipos, proposto inicialmente por Roberts (1973), considera, basicamente, a intolerância à dessecação, a curta longevidade e a intolerância às temperaturas baixas de um grupo de sementes, então denominadas recalcitrantes. Esse conceito é aceito, ainda, por muitos autores, acrescentando-se a categoria das intermediárias, que também seriam intolerantes às temperaturas de congelamento e, ainda, intolerantes à secagem até 10% de água (Ellis *et al.* 1990, Mai-Hong *et al.* 2006, Usberti *et al.* 2006). Pelos conceitos utilizados por esses autores, as sementes de *Inga vera* seriam enquadradas dentre as recalcitrantes, intolerando mesmo pequenas reduções do teor de água e apresentando baixa capacidade de armazenamento (não superando alguns

dias em condições naturais, segundo Bilia & Barbedo 1997). Contudo, por essa classificação tais sementes não suportariam baixas temperaturas (abaixo de 15 °C), o que não condiz com os resultados obtidos no presente trabalho, pois suportaram temperaturas inferiores à de congelamento da água. Portanto, os resultados apresentados reforçam a hipótese da existência de níveis de recalcitrância (Berjak & Pammenter 1994, Pammenter & Berjak 1999, Pammenter *et al.* 2003), demonstrando a diversidade de respostas das sementes enquadradas em apenas um ou dois grupos (recalcitrantes e/ou intermediárias). De fato, parece mais apropriado o uso da categorização das sementes apenas para fins práticos de previsão de armazenamento (Kermode & Finch-Savage 2002, Dickie & Pritchard 2002).

A secagem leve aumentou, aparentemente, a resistência da maioria dos embriões à redução da temperatura, diferentemente da secagem severa que prejudicou, principalmente, a capacidade dos embriões em desenvolver plântulas normais (tabela 5). Esse comportamento pode estar relacionado com o possível teor de água ótimo para a redução da temperatura, ou seja, com água disponível para prevenir os danos por dessecação, mas em teor de água baixo o suficiente para prevenir os danos por cristalização da água pelo congelamento (Eira *et al.* 1999). Os resultados obtidos para desenvolvimento de plântulas normais, principalmente os do armazenamento a 2 °C e a -2 °C (tabela 5) sugerem, também, que os embriões do estágio II foram mais tolerantes ao frio do que os do estágio IV, talvez indicando maior vigor. Tal fato reforça a idéia de que os embriões do estágio IV foram colhidos em fase bem posterior à sua maturidade fisiológica, conforme discutido anteriormente.

Aos 30 dias de armazenamento o teor de água apresentou tendência à uniformização por estágio e por nível de secagem (tabela 6), praticamente não sendo influenciado pela temperatura de armazenamento. O potencial hídrico, por sua vez, que também foi pouco influenciado pela temperatura de armazenamento, apresentou tendência a manter-se mais negativo, para embriões submetidos a secagem severa, e menos negativos para os não submetidos a secagem, ficando os submetidos a secagem leve em posição intermediária (tabela 7).

A germinação e a produção de plântulas normais, após 30 dias de armazenamento, decresceram em todos os tratamentos, inclusive com a perda completa da viabilidade para os embriões dos estádios I, II e IV em temperatura igual ou inferior a -2 °C (tabelas 8 e 9), demonstrando a baixa longevidade das sementes de *Inga vera* ssp. *affinis*, conforme já descrito por outros autores (Bilia *et al.* 1999, Barbedo & Cicero 2000, Andréo *et al.* 2006). Após esse período de armazenamento, poucos tratamentos apresentaram valores iguais ou superiores a 50% para germinação e desenvolvimento de plântulas normais (estádio III, secagem leve, 8 °C, 4 °C e 2 °C; estágio IV, sem secagem ou secagem leve, 8 °C – tabelas 8 e 9). Após 45 dias de armazenamento, apenas dois tratamentos (estádios III e IV, submetidos a secagem leve) mantiveram germinação e desenvolvimento de plântulas normais com valores superiores a 50% (tabelas 10 e 11).

Tabela 6. Teor de água (% base úmida) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de quatro estádios de maturação, sem secagem ou após dois níveis de secagem (leve: até que os embriões atingissem potencial hídrico próximo a -4 MPa; severa: até que atingissem potencial próximo a -6 MPa), após armazenamento por 30 dias a 5 diferentes temperaturas (8 °C, 4 °C, 2 °C, -2 °C, -18 °C). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, maiúsculas dentro de linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Níveis de secagem	Estádio de maturação				
	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV	
Sem secagem	66,3 aC	74,8 aB	66,3 aC	66,3 aC	
Secagem leve	65,8 bA	60,2 bB	57,9 bC	52,7 bD	
Secagem severa	55,7 cA	52,6 cB	50,4 cB	44,2 cC	
Temperaturas de armazenamento	8°C	4°C	2°C	-2°C	-18°C
Teor de água (%)	61,4 AB	61,9 A	60,3 BC	59,4 C	59,4 C
Coefficiente de variação (%)	3,84				

Tabela 7. Potencial hídrico (-MPa) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de quatro estádios de maturação, sem secagem ou após dois níveis de secagem (leve: até que os embriões atingissem potencial hídrico próximo a -4 MPa; severa: até que atingissem potencial próximo a -6 MPa), após armazenamento por 30 dias a 5 diferentes temperaturas (8 °C, 4 °C, 2 °C, -2 °C, -18 °C). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, entre níveis de secagem; maiúsculas dentro de linhas, entre estádios de maturação; itálico entre temperaturas de armazenamento) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Níveis de secagem	Estádios de maturação			
	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV
	<i>Armazenamento a 8°C</i>			
Sem secagem	1,68 aAa	1,29 bAa	2,29 bAa	1,57 bAa
Secagem leve	2,15 aBa	3,02 aBa	4,76 aAa	4,16 aAa
Secagem severa	2,43 aBb	2,55 aBb	2,90 bBab	4,44 aAa
	<i>Armazenamento a 4°C</i>			
Sem secagem	1,21 bBa	2,08 aABa	1,67 cABa	2,47 bAa
Secagem leve	2,22 aBa	2,34 aBa	4,33 aAab	4,33 aAa
Secagem severa	3,05 aBab	2,30 aBb	2,84 bBb	4,98 aAa
	<i>Armazenamento a 2°C</i>			
Sem secagem	2,00 bAa	1,74 bAa	1,76 bAa	2,20 bAa
Secagem leve	2,37 bBa	2,69 bBa	3,27 aABab	4,19 aAa
Secagem severa	3,51 aAab	3,81 aAa	4,06 aAa	4,58 aAa
	<i>Armazenamento a -2°C</i>			
Sem secagem	1,88 bAa	1,53 bAa	1,97 bAa	2,37 bAa
Secagem leve	2,27 bBa	2,90 aBa	4,12 aAbc	4,34 aAa
Secagem severa	3,69 aBa	3,73 aABa	3,92 aABab	4,83 aAa
	<i>Armazenamento a -18°C</i>			
Sem secagem	1,52 cAa	1,80 bAa	2,10 bAa	2,23 cAa
Secagem leve	2,59 bAa	2,75 bAa	2,72 abAc	3,25 bAa
Secagem severa	4,18 aBa	4,06 aBa	3,36 aBab	5,50 aAa
Coeficiente de variação (%)	17,68			

Tabela 8. Germinação de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de quatro estádios de maturação, sem secagem ou após dois níveis de secagem (leve: até que os embriões atingissem potencial hídrico próximo a -4 MPa; severa: até que atingissem potencial próximo a -6 MPa), após 30 dias de armazenamento a 5 diferentes temperaturas (8 °C, 4 °C, 2 °C, -2 °C, -18 °C). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, entre níveis de secagem; maiúsculas dentro de linhas, entre estádios de maturação; itálico entre temperaturas de armazenamento) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Níveis de secagem	Estádios de maturação			
	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV
	<i>Armazenamento a 8°C</i>			
Sem secagem	47 aBa	0 bCa	0 bCb	70 bAa
Secagem leve	0 bCa	0 bCa	91 aAa	80 aBa
Secagem severa	0 bBa	50 aAa	0 bBb	0 cBa
	<i>Armazenamento a 4°C</i>			
Sem secagem	0 aCa	0 aCa	33 bAa	13 bBb
Secagem leve	0 aCa	0 aCa	57 aAb	30 aBb
Secagem severa	0 aAa	0 aAc	0 cAb	0 cAa
	<i>Armazenamento a 2°C</i>			
Sem secagem	0 aBb	0 bBa	0 bBb	7 bAc
Secagem leve	0 aCa	0 bCa	60 aAb	33 aBb
Secagem severa	0 aCa	40 aBb	53 aAa	0 cCa
	<i>Armazenamento a -2°C</i>			
Sem secagem	0 aAb	0 aAa	0 bAb	0 aAd
Secagem leve	0 aBa	0 aBa	33 aAc	0 aBc
Secagem severa	0 aAa	0 aAc	0 bAb	0 aAa
	<i>Armazenamento a -18°C</i>			
Sem secagem	0 aAb	0 aAa	0 aAb	0 aAd
Secagem leve	0 aAa	0 aAa	0 aAd	0 aAc
Secagem severa	0 aAa	0 aAc	0 aAb	0 aAa
Coeficiente de variação (%)		22,05		

Tabela 9. Plântulas normais desenvolvidas de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de quatro estádios de maturação, sem secagem ou após dois níveis de secagem (leve: até que os embriões atingissem potencial hídrico próximo a -4 MPa; severa: até que atingissem potencial próximo a -6 MPa), após 30 dias de armazenamento a 5 diferentes temperaturas (8 °C, 4 °C, 2 °C, -2 °C, -18 °C). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, entre níveis de secagem; maiúsculas dentro de linhas, entre estádios de maturação; itálico entre temperaturas de armazenamento) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Níveis de secagem	Estádios de maturação			
	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV
	<i>Armazenamento a 8°C</i>			
Sem secagem	30 aBa	0 bCa	0 bCb	60 aAa
Secagem leve	0 bBa	0 bBa	67 aAa	63 aAa
Secagem severa	0 bBa	47 aAa	0 bBb	0 bBa
	<i>Armazenamento a 4°C</i>			
Sem secagem	0 aCb	0 aCa	23 bAa	7 bBb
Secagem leve	0 aCa	0 aCa	50 aAb	17 aBb
Secagem severa	0 aAa	0 aAc	0 cAb	0 cAa
	<i>Armazenamento a 2°C</i>			
Sem secagem	0 aAb	0 bAa	0 bAb	0 bAc
Secagem leve	0 aCa	0 bCa	53 aAb	27 aBb
Secagem severa	0 aCa	23 aBb	47 aAa	0 bCa
	<i>Armazenamento a -2°C</i>			
Sem secagem	0 aAb	0 aAa	0 bAb	0 aAc
Secagem leve	0 aBa	0 aBa	30 aAc	0 aBa
Secagem severa	0 aAa	0 aAc	0 bAb	0 aAa
	<i>Armazenamento a -18°C</i>			
Sem secagem	0 aAb	0 aAa	0 aAb	0 aAc
Secagem leve	0 aAa	0 aAa	0 aAd	0 aAc
Secagem severa	0 aAa	0 aAc	0 aAb	0 aAa
Coeficiente de variação (%)		46,83		

Tabela 10. Germinação de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de quatro estádios de maturação, sem secagem ou após dois níveis de secagem (leve: até que os embriões atingissem potencial hídrico próximo a -4 MPa; severa: até que atingissem potencial próximo a -6 MPa), após 45 dias de armazenamento a 5 diferentes temperaturas (8 °C, 4 °C, 2 °C, -2 °C, -18 °C). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, entre níveis de secagem; maiúsculas dentro de linhas, entre estádios de maturação; itálico entre temperaturas de armazenamento) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Níveis de secagem	Estádios de maturação			
	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV
<i>Armazenamento a 8°C</i>				
Sem secagem	0 aAa	0 aAa	0 bAa	0 bAa
Secagem leve	0 aBa	0 aBa	87 aAa	60 aAa
Secagem severa	0 aAa	0 aAa	0 bAa	0 bAa
<i>Armazenamento a 4°C</i>				
Sem secagem	0 aAa	0 aAa	0 aAa	0 aAa
Secagem leve	0 aAa	0 aAa	17 aAb	0 aAb
Secagem severa	0 aAa	0 aAa	0 aAa	0 aAa
<i>Armazenamento a 2°C</i>				
Sem secagem	0 aAa	0 aAa	0 bAa	0 aAa
Secagem leve	0 aAa	0 aAa	0 bAb	10 aAb
Secagem severa	0 aAa	0 aAa	23 aAb	0 aAa
<i>Armazenamento a -2°C</i>				
Sem secagem	0 aAa	0 aAa	0 aAa	0 aAa
Secagem leve	0 aAa	0 aAa	0 aAb	0 aAb
Secagem severa	0 aAa	0 aAa	10 aAa	0 aAa
<i>Armazenamento a -18°C</i>				
Sem secagem	0 aAa	0 aAa	0 aAa	0 aAa
Secagem leve	0 aAa	0 aAa	0 aAb	0 aAb
Secagem severa	0 aAa	0 aAa	0 aAa	0 aAa
Coeficiente de variação (%)		41,98		

Tabela 11. Plântulas normais desenvolvidas de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de quatro estádios de maturação, sem secagem ou após dois níveis de secagem (leve: até que os embriões atingissem potencial hídrico próximo a -4 MPa; severa: até que atingissem potencial próximo a -6 MPa), após 45 dias de armazenamento a 5 diferentes temperaturas (8 °C, 4 °C, 2 °C, -2 °C, -18 °C). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, entre níveis de secagem; maiúsculas dentro de linhas, entre estádios de maturação; itálico entre temperaturas de armazenamento) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Níveis de Secagem	Estádios de maturação			
	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV
	<i>Armazenamento a 8°C</i>			
Sem secagem	0 aAa	0 aAa	0 bAa	0 bAa
Secagem leve	0 aBa	0 aBa	87 aAa	60 aAa
Secagem severa	0 aAa	0 aAa	0 bAa	0 bAa
	<i>Armazenamento a 4°C</i>			
Sem secagem	0 aAa	0 aAa	0 aAa	0 aAa
Secagem leve	0 aAa	0 aAa	10 aAb	0 aAb
Secagem severa	0 aAa	0 aAa	0 aAa	0 aAa
	<i>Armazenamento a 2°C</i>			
Sem secagem	0 aAa	0 aAa	0 bAa	0 aAa
Secagem leve	0 aAa	0 aAa	0 bAb	10 aAb
Secagem severa	0 aAa	0 aAa	20 bAb	0 aAa
	<i>Armazenamento a -2°C</i>			
Sem secagem	0 aAa	0 aAa	0 aAa	0 aAa
Secagem leve	0 aAa	0 aAa	0 aAb	0 aAb
Secagem severa	0 aAa	0 aAa	7 aAa	0 aAa
	<i>Armazenamento a -18°C</i>			
Sem secagem	0 aAa	0 aAa	0 aAa	0 aAa
Secagem leve	0 aAa	0 aAa	0 aAb	0 aAb
Secagem severa	0 aAa	0 aAa	0 aAa	0 aAa
Coeficiente de variação (%)		41,99		

De maneira geral, a secagem leve (-4 MPa) proporcionou, aos embriões de *Inga vera*, maior tolerância à redução de temperatura até níveis de congelamento da água (-2 °C), principalmente para os estádios II e III. Contudo, tal tolerância não significou melhora na capacidade de armazenamento, uma vez que embriões armazenados a 8 °C conservaram-se por período superior aos armazenados sob temperaturas inferiores. Apesar disso, a possibilidade de submeter embriões dessa espécie a temperaturas próximas a 0 °C, sugere que seja possível reduzir substancialmente seu metabolismo, principal fonte de sua deterioração durante o armazenamento (Barbedo & Marcos Filho 1998) e, ainda,

fomenta a possibilidade de armazená-los por períodos superiores aos maiores obtidos até o presente momento, ou seja, 90 dias (Andréo *et al.* 2006).

A remoção de toda a água do tipo 5, ou seja, água livre (Vertucci & Farrant 1995, Marcos Filho 2005), parece ser fundamental para o sucesso da redução da temperatura de armazenamento, assim como a identificação e obtenção de embriões com a máxima qualidade fisiológica e, principalmente, antes de iniciarem a germinação dentro do próprio fruto, ainda que não visível.

Futuros trabalhos para identificação desse ponto de colheita, bem como estudos associando-se níveis e tipos de secagem a temperaturas de armazenamento, podem trazer ainda maiores benefícios. A associação de outros processos de controle do metabolismo desses embriões como, por exemplo, a utilização de inibidores da germinação (ABA, por exemplo) e o controle da mobilização de água (em soluções osmoticamente controladas, com o uso de PEG, por exemplo), já iniciados por alguns autores (Bilia *et al.* 1999, Barbedo & Cicero 2000, Faria 2006, Andréo *et al.* 2006), também podem trazer benefícios. Contudo, os resultados obtidos até o presente momento são, ainda, insuficientes para a adequada conservação da viabilidade dessas sementes durante seu armazenamento.

Agradecimentos - Os autores agradecem à Fapesp (Proc. 2005/04139-7) pelo apoio financeiro ao projeto; à Secretaria de Educação do Estado de São Paulo/Projeto Bolsa-Mestrado, pela bolsa concedida a M.R. Bonjovani; ao CNPq, pela bolsa de produtividade em pesquisa concedida a C.J. Barbedo; à Prefeitura do Município de Santo André, pela permissão para as coletas de sementes.

Referências Bibliográficas

ANDRÉO, Y., NAKAGAWA, J. & BARBEDO, C.J. 2006. Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Will. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington). Revista Brasileira de Botânica 29:309-318.

- BARBEDO, C.J. & BILIA, D.A.C. 1997. Germinação de plântulas de *Inga uruguensis* Hook. & Arn. em função da remoção da sarcotesta. Informativo ABRATES 7:54-56.
- BARBEDO, C.J. & BILIA, D.A.C. 1998. Evolution of research on recalcitrant seeds. Scientia Agricola 55(especial):121-125.
- BARBEDO, C.J. & CICERO, S.M. 1998. Utilização do teste de condutividade elétrica para previsão do potencial germinativo de sementes de ingá. Scientia Agricola 55:249-259.
- BARBEDO, C.J. & CICERO, S.M. 2000. Effects of initial quality, low temperature and ABA on the storage of seeds of *Inga uruguensis*, a tropical species with recalcitrant seeds. Seed Science and Technology 28:793-808.
- BARBEDO, C.J. & MARCOS FILHO, J. 1998. Tolerância à dessecação em sementes. Acta Botanica Brasílica 12:145-164.
- BERJAK, P. & PAMMENTER, N.W. 1994. Recalcitrant is not an all-or-nothing situation. Seed Science Research 4:263-264.
- BILIA, D.A.C. & BARBEDO, C.J. 1997. Estudos de germinação e armazenamento de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. Científica 25:379-391.
- BILIA, D.A.C., MARCOS FILHO, J. & NOVENBRE A.D.C.L. 1998. Conservação da qualidade fisiológica de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. Revista Brasileira de Sementes 20:48-54.
- BILIA, D.A.C., MARCOS FILHO, J. & NOVENBRE A.D.C.L. 1999. Desiccation tolerance and seed storability of *Inga uruguensis* Hook. et Arn. Seed Science and Technology 27:77-89.
- BILIA, D.A.C., BARBEDO, C.J., CICERO, S.M. & MARCOS FILHO, J. 2003. Ingá: uma espécie importante para recomposição vegetal em florestas ripárias, com sementes interessantes para a ciência. Informativo ABRATES 13:26-30.

- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. 1992. Regras para análise de sementes. SNDA/DNDU/CLAV, Brasília.
- CARVALHO, P.E.R. 1994. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Embrapa/CNPF, Brasília.
- CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4.ed. Funep, Jaboticabal.
- CASTRO, R.D., BRADFORD, K.J. & HILHORST, H.W.M. 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. *In* Germinação: do básico ao aplicado (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre, p.51-67.
- CHIN, H.F., KRISHNAPILLAY, B. & STANWOOD, P.C. 1989. Seed moisture: recalcitrant vs orthodox seeds. *In* Seed moisture (P.C. Stanwood & M.B.McDonald, eds.). Crop Science Society of America, Madison, p.15-22.
- DICKIE, J.B. & PRITCHARD, H.W. 2002. Systematic and evolutionary aspects of desiccation tolerance in seeds. *In* Desiccation and survival in plants: drying without dying (M. Black & H.W. Pritchard, eds.). CABI Publishing, New York, p.239-259.
- EIRA, M.T.S., WALTERS, C., CALDAS, L.S., FAZUOLI, L.C., SAMPAIO, J.B. & DIAS, M.C.L.L. 1999. Tolerance of *Coffea* spp. seeds to desiccation and low temperature. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 11:97-105.
- ELLIS, R.H., HONG, T.D. & ROBERTS, E.H. 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. *Journal of Experimental Botany* 41:1167-1174.
- FARIA, J.M.R. 2006. Desiccation tolerance and sensitivity in *Medicago truncatula* and *Inga vera* seeds. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

- FIGLIOLIA, M.B. 1993. Maturação de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. associada à fenologia reprodutiva e à dispersão de sementes em floresta ripária do rio Moji-Guaçu, município de Moji-Guaçu, SP. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- FIGLIOLIA, M.B. & KAGEYAMA, P.Y. 1994. Maturação de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. em floresta ripária do rio Moji-Guaçu, Município de Moji-Guaçu. Revista do Instituto Florestal 6:13-52.
- FONSECA, S.C.L. & FREIRE, H.B. 2003. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. Bragantia 62:297-303.
- GUY, C.L. 2003. Freezing tolerance of plants: current understanding and selected emerging concepts. Canadian Journal of Botany 81:1216-1223.
- ISTA. 1985. International rules for seed testing. Seed Science and Technology 13:356-513.
- JOLY, A.B. 1993. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. 11.ed. Ed. Nacional, São Paulo.
- KERMODE, A.R. & FINCH-SAVAGE, B.E. 2002. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In Desiccation and survival in plants: drying without dying (M. Black & H.W. Pritchard, eds.). CABI Publishing, New York, p.149-184.
- MAI-HONG, T., HONG, T.D., HIEN, N.T., HAI, H.H., TUNG, T.D., LE-TAM, V.T., NGOC-TAM, B. & ELLIS, R.H. 2006. Seed development, maturation and storage behaviour of *Mimusops elengi* L. New Forest 32:9-19.
- MARCOS FILHO, J. 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Fealq, Piracicaba.
- MICHEL, B.E. & KAUFMANN, M.R. 1973. The osmotic potential of polyethylene glicol 6000. Plant Physiology 51:914-916.
- OLIVEIRA, D.M.T. & BELTRATI, C.M. 1993. Aspectos anatômicos dos frutos e sementes em desenvolvimento de *Inga fagifolia* (Fabaceae: Mimosoideae). Revista Brasileira de Biologia 53:625-636.

- PAMMENTER, N.W. & BERJAK, P. 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* 9:13-37.
- PAMMENTER, N.W., NAIDOO, S. & BERJAK, P. 2003. Desiccation rate, desiccation response and damage accumulation: can desiccation sensitivity be quantified? *In* The biology of seeds: recent research advances (G. Nicolás, K.J. Bradford, D. Côme & H.W. Pritchard, eds.). CABI Publishing, Oxon/Cambridge, p.319-325.
- PENNINGTON, T. D. 2000. The genus *Inga*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- ROBERTS, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1:499-514.
- ROCHA, Y.T. 2004. Ibirapitanga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) do descobrimento à atualidade. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SANTANA, D.G. & RANAL, M. 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. Ed. Universidade de Brasília, Brasília.
- SANTOS, I.R.I. 2001. Criopreservação de germoplasma vegetal. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 20:60-65.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. *Fisiologia vegetal*. 3.ed. Artmed, Porto Alegre.
- USBERTI, R., ROBERTS, E.H. & ELLIS, R.H. 2006. Prediction of cottonseed longevity. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41:1435-1441.
- VERTUCCI, C.W. 1993. Predicting the optimum storage conditions for seeds using thermodynamic principles. *Journal of Seed Technology* 17:41-53.
- VERTUCCI, C.W. & FARRANT, J.M. 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. *In* Seed development and germination (J. Kigel & G. Galili, eds.). Marcel Dekker Inc., New York, p.237-271.

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

5. Capítulo III

Indução da tolerância à dessecação de embriões de *Inga vera* subsp. *affinis* (DC.) T.D.

Pennington (Leguminosae)

(nas normas da Revista Brasileira de Botânica)

Induction of desiccation tolerance of the embryos of *Inga vera* subsp. *affinis* (DC.) T.D.**Pennington (Leguminosae)**

ABSTRACT: The storage of orthodox seeds is based on their ability to tolerate desiccation to very low water content. However, seeds of several species are intolerant to desiccation. It was demonstrated that it is possible to establish desiccation tolerance to germinating orthodox seeds with water stress treatments. Therefore experiments should be carried out to analyse the effects of treatments of water stress before the drying of recalcitrant seeds. In this work, embryos of *Inga vera* subsp. *affinis* were incubated in -1,5 and -2,0 MPa solutions, at 20°C by 24 hours, washed and dried. They showed increasing in desiccation tolerance after dried from the original 55,4% initial water content to 44,8% when pre-stressed at -2,0 MPa, with high values of germination, whereas non-stressed embryos had half of the initial values of germination.

Key words: water stress, recalcitrant seed, tropical tree

Indução de tolerância à dessecação de embriões de *Inga vera* subsp. *affinis* (DC.) T.D.**Pennington (Leguminosae)**

RESUMO: A metodologia convencional de conservação de sementes ortodoxas compreende a desidratação até teores de água extremamente baixos. Sementes de muitas espécies, denominadas recalcitrantes, são sensíveis a essa dessecação. Pesquisas têm demonstrado que, uma vez colocadas para germinar e após perderem a tolerância à dessecação, algumas sementes ortodoxas podem readquirir tal tolerância se forem submetidas a estresses hídricos. Portanto, é necessário que se desenvolvam estudos analisando a possibilidade de indução de tolerância à dessecação nas sementes recalcitrantes, que foi o objetivo do presente trabalho. Embriões de *Inga vera* subsp. *affinis* foram submetidos a estresses hídricos (-1,5 e -2,0 MPa), incubados a 20°C por 24 horas, lavados em água corrente e submetidos a secagens. A possibilidade de indução de tolerância à dessecação desses embriões foi demonstrada após a redução do seu teor de água de 55,4% (inicial) para 44,8% que, quando submetidos a estresse de -2,0 MPa, mantiveram os maiores valores de germinação, desenvolvimento de plântulas normais e IVG, enquanto que os não submetidos ao estresse perderam cerca de metade da sua capacidade germinativa.

Palavras-chave: estresse hídrico, semente recalcitrante, árvore tropical

Introdução

A metodologia convencional de conservação de sementes ortodoxas, utilizada em bancos de germoplasma, compreende a desidratação até teores de água extremamente baixos, próximos a 5%, e armazenamento em câmaras a temperaturas abaixo de zero (Santos 2001).

Sementes de muitas espécies são sensíveis à dessecação e ao congelamento e, portanto, sua inclusão nesses bancos muitas vezes apresenta grandes dificuldades. Inicialmente, tais sementes foram denominadas recalcitrantes, sendo acrescentada posteriormente a categoria das de comportamento intermediário entre as recalcitrantes e as ortodoxas (Ellis *et al.* 1990, Roberts 1973).

A tolerância à dessecação vem sendo estudada mas, até o presente momento, as pesquisas não apontam para o sucesso na utilização da secagem como forma de armazenar essas sementes por períodos prolongados (Barbedo & Marcos Filho 1998). Para sementes de *Inga uruguensis*, por exemplo, Bilia *et al.* (1998) verificaram que o teor de água crítico (abaixo do qual iniciam-se prejuízos à qualidade das sementes) é bastante elevado. Contudo, com pequenas reduções no conteúdo de água (até valores próximos a 50%), conseguiram armazenar as sementes em sacos de polietileno a 10°C por até 60 dias após a colheita (período quatro vezes superior ao obtido até então), mantendo a qualidade fisiológica.

Pesquisas demonstraram, também, que a redução da temperatura de armazenamento pode ser importante para a conservação dessas sementes, mas há limites térmicos inferiores suportado pelas sementes principalmente pelo elevado grau de hidratação dos tecidos (Chin *et al.* 1989). Portanto, mesmo neste caso a redução do teor de água assume fundamental importância. A capacidade de armazenamento é ampliada para muitas espécies, quando a redução do teor de água das sementes está associada à diminuição de temperatura do ambiente (Walters *et al.* 1998).

Sementes ortodoxas apresentam tolerância à dessecação em período determinado, do final da maturação até o início da germinação. Ainda que sejam, nesse período, tolerantes à dessecação, nos demais comportam-se como as recalcitrantes ou intermediárias. As sementes ortodoxas após algum período (variável com a espécie) de germinação podem, portanto, fornecer importantes informações quanto à intolerância à dessecação. De fato, alguns estudos sobre intolerância à dessecação são realizados com sementes ortodoxas em germinação. Por outro lado, as mesmas sementes ortodoxas no início de sua formação apresentam intolerância à dessecação e também são estudadas para que se compreenda os fatores envolvidos no processo (Barbedo & Cicero 1998, Marcos Filho 2005, Faria 2006).

Desses estudos com sementes ortodoxas em germinação, uma perspectiva surge com a possibilidade de re-indução da tolerância à dessecação. Em outras palavras, pesquisas têm demonstrado que, uma vez colocadas para germinar e após perderem a tolerância à dessecação, algumas sementes ortodoxas podem readquirir tal tolerância se forem submetidas a estresses hídricos, normalmente feitos com soluções de PEG de potencial osmótico conhecido (Faria 2006). Até o presente momento não está identificada, para sementes recalcitrantes, a origem de sua intolerância à dessecação, se não há genes indutores ou se não estão ativos. Portanto, é necessário que se desenvolvam estudos analisando a possibilidade de indução de tolerância à dessecação nessas sementes, que foi o objetivo do presente trabalho.

Material e Métodos

Obtenção do material vegetal - Frutos de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington foram coletados no mês de março de 2006 de 20 matrizes plantadas na área pertencente ao Centro de Exposições Imigrantes, São Paulo, SP (23°38'S e 46°32'W).

Os frutos foram levados ao Laboratório de Sementes do Instituto de Botânica, São Paulo, SP (23°37'S, 46°32'W), abertos manualmente e, em seguida, realizou-se a retirada das suas sementes. A seguir, a sarcotesta (tegumento) que as reveste foi removida, obtendo-se os embriões excisados utilizados nos experimentos. Os embriões foram, então, avaliados quanto às suas qualidades *físicas e fisiológicas*, por meio da determinação do seu teor de água e o seu potencial hídrico e, ainda, por testes de germinação e vigor, conforme descrito abaixo.

Estresse hídrico e tolerância à dessecação - após retirada amostra controle (sem estresse), os embriões foram submetidos a dois níveis de estresse hídrico, -1,5 (estresse leve) e -2,0 MPa (estresse moderado). Para tanto, utilizaram-se soluções de polietileno glicol 6000 (PEG), calculando-se as quantidades de PEG segundo fórmula descrita por Michel & Kaufmann (1973).

Os embriões foram incubados em bandeja plástica (26,5cm comprimento x 19,5cm largura x 5cm de altura), com a base transparente e a tampa esbranquiçada e opaca, com duas folhas de papel tipo Germitest para base e uma para cobertura. Essas folhas foram previamente umedecidas com 250 ml das soluções. Para a incubação, os embriões permaneceram submersos até sua metade.

As bandejas foram devidamente tampadas e mantidas no interior de câmaras incubadoras tipo BOD, com temperatura constante regulada para $20\pm 1^\circ\text{C}$, por 24 horas. Ao final da incubação, os embriões foram lavados em água corrente, para a retirada superficial da solução de PEG (Pertel *et al.* 2001) e, em seguida, submetidos às secagens.

Após a retirada de amostra sem secagem, o restante dos embriões foi submetido a secagem em estufa, a $30\pm 1^\circ\text{C}$ com circulação forçada de ar (Bilia *et al.* 1998), até seis níveis, doravante denominados pelo nível de secagem (1ª a 6ª secagem), procurando-se levar os embriões a teores de água de 50% a 20% (base úmida). Para tanto, amostras de embriões foram retiradas periodicamente e avaliadas quanto a sua massa, até que atingissem valores próximos aos desejados, utilizando a equação descrita por Hong & Ellis (1996).

Ao final de cada nível de estresse e de secagem, os embriões foram novamente avaliados quanto à sua qualidade fisiológica, conforme descrito abaixo.

Avaliações físicas e fisiológicas - o teor de água dos embriões foi avaliados pelo método da estufa a $103\pm 2^{\circ}\text{C}/17$ horas ISTA (1985). O potencial hídrico dos embriões foi avaliado em potenciômetro WP4 (Dewpoint PotentiaMeter, Decagon), baseando-se na temperatura de espelho no ponto de orvalho da atmosfera, após equilíbrio higroscópico com a amostra. Para aferição do potencial hídrico real dos embriões e do potencial registrado pelo potenciômetro, amostras foram incubadas em soluções de polietileno glicol 6000 com diferentes potenciais osmóticos, segundo Michel & Kaufmamm (1973), até peso constante, sendo então avaliadas no potenciômetro.

O teste de germinação, com 20 embriões por repetição, foi realizado em rolo de papel Germitest, com duas folhas para a base e outra para cobertura, pré-umedecidas na proporção de duas vezes e meia o peso do papel (Brasil 1992), colocados em germinadores Marconi tipo MA400, com circulação interna de água, regulados para a temperatura constante de 25°C e luz constante (Bilia & Barbedo 1997). As avaliações foram realizadas a cada dois dias, sendo computados os embriões germinados (protrusão de raiz primária com, no mínimo, 1 cm) e as plântulas normais (plântulas com sistema radicular e eofilos desenvolvidos e sem defeitos aparentes). Foi também calculado o índice de velocidade de germinação (IVG), segundo fórmula de Maguire (1962, *apud* Barbedo 1990). Como a espécie produz sementes poliembriônicas, os embriões contidos em cada semente foram mantidos juntos em todas as avaliações. Mesmo quando houve protrusão de mais de uma raiz primária ou surgimento de mais de uma plântula por embrião, apenas uma raiz e/ou plântula por embrião foram registradas (Bilia & Barbedo 1997).

Delineamento experimental e análise estatística dos dados - O delineamento experimental utilizado para as avaliações fisiológicas foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições para todos os testes de todos os experimentos, em esquema fatorial 3×7 (3 níveis estresses x 7 níveis secagens). Os

resultados obtidos foram analisados pelo teste F e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (Santana & Ranal 2004). A correção da normalidade e da heterogeneidade dos dados em porcentagem, quando necessária, foi feita pela transformação para $\text{arc sen}(x/100)^{0,5}$.

Resultados e Discussão

Os embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* sem estresse e sem secagem tinham, inicialmente, teor de água bastante elevado, de 55,4% (tabela 1). Este teor de água, como era esperado (Marcos Filho 2005), correspondeu à água retida com tensões próximas a -1,5 MPa (tabela 1), sendo classificada como tipo 5 (Vertucci 1993), ou seja, apresenta características de uma solução diluída.

Com a secagem, os embriões apresentaram redução significativa no teor de água apenas a partir da 2ª secagem, ou seja, quando tiveram teor de água reduzido para valores iguais ou inferiores a 44,8%, chegando a 22,4% após a última secagem (tabela 1). Essas secagens proporcionaram modificações nas propriedades da água, chegando ao tipo 2 (Vertucci 1993), ou seja, água que interage com a matriz celular (Marcos Filho 2005).

Um aspecto importante a ser ressaltado, com a secagem dos embriões, é que a completa remoção de água livre, ou seja, do tipo 5 (Vertucci 1993), considerada não fundamental mesmo para sementes recalcitrantes (Castro *et al.* 2004), não prejudicou sua capacidade germinativa (tabelas 1 e 2). De fato, aparentemente a remoção desse tipo de água chegou a proporcionar aumentos na capacidade germinativa dos embriões, passando de 44% a 82% (tabela 2).

Tabela 1. Teor de água (% base úmida) e potencial hídrico (-MPa) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* submetidos a sete níveis de secagem, antes ou após serem submetidos a estresse hídrico a -1,5 e -2,0 MPa, a 20 °C, por 24 horas.

Níveis de secagem	Nível de estresse		
	Sem estresse	-1,5 MPa	-2,0 MPa
<i>Teor de água (%)</i>			
Inicial	55,4 aA	56,6 aA	53,8 aA
1 ^a secagem	52,1 aA	50,3 bA	53,7 aA
2 ^a secagem	44,8 bA	41,8 cA	45,7 bA
3 ^a secagem	38,7 cA	36,0 dA	39,6 cA
4 ^a secagem	34,1 cdA	32,9 dA	34,9 cA
5 ^a secagem	31,2 dA	24,3 eB	29,3 dA
6 ^a secagem	22,4 eA	19,0 fB	22,6 eA
Coeficiente de variação (%) = 3,49			
<i>Potencial hídrico (-MPa)</i>			
Inicial	1,5 aA	1,2 aA	1,3 aA
1 ^a secagem	3,3 bA	4,0 bA	3,9 bA
2 ^a secagem	6,1 bcA	7,7 cA	5,6 bcA
3 ^a secagem	8,9 bcdA	9,7 cA	5,5 cdA
4 ^a secagem	10,9 cdeA	9,0 cdA	11,8 cdA
5 ^a secagem	15,7 deB	23,3 cdA	13,9 dB
6 ^a secagem	30,1 eB	38,0 dA	25,2 dB
Coeficiente de variação (%) = 29,83			

Tabela 2. Germinação, desenvolvimento de plântulas normais (%) e índice de velocidade de germinação (IVG) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* submetidos a sete níveis de secagem, antes ou após serem submetidos a estresse hídrico a -1,5 e -2,0 MPa, a 20 °C, por 24 horas.

Níveis de secagem	Nível de estresse		
	Sem estresse	-1,5 MPa	-2,0 MPa
		<i>Germinação (%)</i>	
Inicial	44 bcB	82 aAB	58 bB
1 ^a secagem	82 aB	90 aA	95 aA
2 ^a secagem	62 bB	51 bB	88 aA
3 ^a secagem	38 cdAB	24 cB	46 bA
4 ^a secagem	20 dA	0 dB	21 cA
5 ^a secagem	0 eA	0 dA	0 dA
6 ^a secagem	0 eA	0 dA	0 dA
Coeficiente de variação (%) = 17,58			
		<i>Desenvolvimento de plântulas normais (%)</i>	
Inicial	21 cdB	55 bA	39 bA
1 ^a secagem	65 aB	79 aB	90 aA
2 ^a secagem	52 abB	36 bcB	78 aA
3 ^a secagem	34 bcA	18 cB	38 bcA
4 ^a secagem	15 dA	0 dB	18 cA
5 ^a secagem	0 eA	0 dA	0 dA
6 ^a secagem	0 eA	0 dA	0 dA
Coeficiente de variação (%) = 21,46			
		<i>IVG</i>	
Inicial	1,07 cC	5,89 aA	2,32 cB
1 ^a secagem	3,91 aB	4,29 bB	5,62 aA
2 ^a secagem	2,51 bA	1,54 cC	3,50 bA
3 ^a secagem	1,12 cAb	0,72 dB	1,38 dA
4 ^a secagem	0,41 cdA	0 dA	0,47 eA
5 ^a secagem	0 dA	0 dA	0 eA
6 ^a secagem	0 dA	0 dA	0 eA
Coeficiente de variação (%) = 20,99			

Por outro lado, quando houve remoção de água do tipo 4, restando apenas água do tipo 3, os embriões manifestaram evidente queda na germinação e no vigor (tabelas 1 e 2).

O estresse hídrico pela incubação em PEG não chegou a promover alterações no teor de água dos embriões nem no seu potencial hídrico (tabela 1). Além disso, mesmo após a incubação dos embriões no estresse moderado (-2,0 MPa) nota-se que, de maneira geral, não houve grande alteração no teor de água ou no potencial hídrico entre os níveis de secagem (tabela 1).

Antes das secagens, os estresses leve (-1,5 MPa) e moderado (-2,0 MPa) promoveram aumento significativo na germinação e na capacidade de produzir plântulas normais dos embriões sem secagem. O estresse leve (-1,5 MPa) aparentemente promoveu o mesmo efeito na germinação da 1ª secagem (tabelas 1 e 2). Curiosamente, o estresse moderado (-2,0 MPa) parece ter promovido algum ganho em tolerância à dessecação, pois comparando-se os dados de teor de água e de potencial hídrico dos embriões submetidos ou não ao estresse moderado (estatisticamente iguais, tabela 1), após a 1ª secagem nota-se que estes apresentaram germinação e vigor inferiores àqueles (tabela 2). Tal fato é comum para sementes recalcitrantes (Castro *et al.* 2004, Marcos Filho 2005).

De modo geral, observa-se, na tabela 2, que há o comprometimento na germinação e na capacidade de produzir plântulas normais quando os embriões tiveram seus teores de água reduzidos a valores próximos a 30% (tabelas 1 e 2), o que corrobora com os resultados obtidos por Bilia *et al.* (1998). Esses valores corresponderam à água retida com tensões de aproximadamente -9,0MPa (tabela 1), ou seja, a água classificada como tipo 3 (-4 a -11 MPa) que, nos embriões, provavelmente está associada aos sítios hidrofóbicos das macromoléculas (Vertucci 1993). Além disso, sementes intolerantes à dessecação apresentam mecanismos de deterioração quando desidratadas até esse nível (Marcos Filho 2005). De maneira geral a remoção de água retida com tensões abaixo de -11 MPa, ou seja, água do tipo 2 (entre -12 e -150 MPa, segundo Vertucci 1993), no presente trabalho, se mostrou letal para os embriões. Essa água interage com os sítios polares das macromoléculas, ligando-se através de pontes de hidrogênio. Assim, aparentemente a remoção de água com algum tipo de ligação à matriz das sementes é a que provoca danos a embriões de *Inga vera ssp. affinis*.

Finalmente, a possibilidade de indução de tolerância à dessecação em embriões de *Inga vera ssp. affinis* foi demonstrada após a 2ª secagem, quando os embriões tiveram redução do seu teor de água de 55,4% para 44,8% (tabela 1) que, segundo Bilia *et al.* (1999), já causaria prejuízos à sua qualidade fisiológica, confirmado no presente trabalho para embriões não submetidos a estresse (tabela

2). Contudo, quando submetidos a estresse leve (-2,0 MPa), esses embriões mantiveram os maiores valores de germinação, desenvolvimento de plântulas normais e IVG (tabela 2). Tais resultados assumem importância ainda maior pelo fato de que, nesse nível de hidratação, toda a água do tipo 4 havia sido removida, restando apenas água do tipo 3 que, para muitos autores, representaria algum grau de deterioração às sementes recalcitrantes.

Os resultados obtidos no presente trabalho não permitem, ainda, considerar que as sementes de *Inga vera ssp. affinis* possam, após algum tratamento de estresse, tolerar os níveis de dessecação suportados pelas sementes ortodoxas. Contudo, tais resultados indicam a necessidade de estudos aprofundando os efeitos do estresse hídrico sobre as sementes. Neste caso, vale ressaltar os importantes resultados de re-indução da tolerância à dessecação obtidos para sementes ortodoxas, como *Medicago truncatula* (Faria 2006), também com tratamentos de estresse osmótico previamente à secagem.

Agradecimentos - Os autores agradecem à Fapesp (Proc. 2005/04139-7) pelo apoio financeiro ao projeto; à Secretaria de Educação do Estado de São Paulo/Projeto Bolsa-Mestrado, pela bolsa concedida a M.R. Bonjovani; ao CNPq, pela bolsa de produtividade em pesquisa concedida a C.J. Barbedo; ao Centro de Exposições Imigrantes, pela permissão para as coletas de sementes.

Referências Bibliográficas

BARBEDO, C.J. 1990. Influência da idade e do repouso pós-colheita de frutos na qualidade de sementes de pepino (*Cucumis sativus* L.). Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

- BARBEDO, C.J. & CICERO, S.M. 1998. Utilização do teste de condutividade elétrica para previsão do potencial germinativo de sementes de ingá. *Scientia Agricola* 55:249-259.
- BARBEDO, C.J. & MARCOS FILHO, J. 1998. Tolerância à dessecação em sementes. *Acta Botanica Brasílica* 12:145-164.
- BILIA, D.A.C. & BARBEDO, C.J. 1997. Estudos de germinação e armazenamento de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. *Científica* 25:379-391.
- BILIA, D.A.C., MARCOS FILHO, J. & NOVENBRE A.D.C.L. 1998. Conservação da qualidade fisiológica de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. *Revista Brasileira de Sementes* 20:48-54.
- BILIA, D.A.C., MARCOS FILHO, J. & NOVENBRE A.D.C.L. 1999. Desiccation tolerance and seed storability of *Inga uruguensis* Hook. et Arn. *Seed Science and Technology* 27:77-89.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. 1992. Regras para análise de sementes. SNDA/DNDU/CLAV, Brasília.
- CASTRO, R.D., BRADFORD, K.J. & HILHORST, H.W.M. 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. *In Germinação: do básico ao aplicado* (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre, p.51-67.
- CHIN, H.F., KRISHNAPILLAY, B. & STANWOOD, P.C. 1989. Seed moisture: recalcitrant vs orthodox seeds. *In Seed moisture* (P.C. Stanwood & M.B.McDonald, eds.). Crop Science Society of America, Madison, p.15-22.
- ELLIS, R.H., HONG, T.D. & ROBERTS, E.H. 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. *Journal of Experimental Botany* 41:1167-1174.
- FARIA, J.M.R. 2006. Desiccation tolerance and sensitivity in *Medicago truncatula* and *Inga vera* seeds. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands (PhD thesis).

- HONG, T.D. & ELLIS, R.H. 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. Rome, IPGRI. 62p. (Technical Bulletin, 1).
- ISTA. 1985. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology* 13:356-513.
- MARCOS FILHO, J. 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Fealq, Piracicaba.
- MICHEL, B.E. & KAUFMANN, M.R. 1973. The osmotic potential of polyethylene glicol 6000. *Plant Physiology* 51:914-916.
- PENNINGTON, T. D. 2000. The genus *Inga*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- PERTEL, J., DIAS, D.C.F., DIAS, L.A.S. & ALVARENGA, E.M. 2001. Efeito do condicionamento fisiológico na germinação e no vigor de sementes de café (*Coffea arabica* L.). *Revista Brasileira de Armazenamento* 3 (especial):39-45.
- ROBERTS, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1:499-514.
- SANTANA, D.G. & RANAL, M. 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. Ed. Universidade de Brasília, Brasília.
- SANTOS, I.R.I. 2001. Criopreservação de germoplasma vegetal. *Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento* 20:60-65.
- VERTUCCI, C.W. 1993. Predicting the optimum storage conditions for seeds using thermodynamic principles. *Journal of Seed Technology* 17:41-53.
- WALTERS, C. 1998. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Science Research* 8:223-244.

6. Considerações Finais

Com o desmatamento da Mata Atlântica, é indispensável a criação de bancos de germoplasma desse bioma para programas de revegetação e conservação do patrimônio genético. Porém, existem duas formas de conservação, a *in situ*, aquela realizada dentro dos próprios ecossistemas e habitats naturais conservados e a *ex situ*, onde há a manutenção de amostras de organismos fora de seu habitat natural.

A conservação de sementes é a forma mais comum de conservação *ex situ*, e a principal técnica de conservação de sementes durante o armazenamento é a redução do seu metabolismo por meio da remoção de água. Porém, sementes de várias espécies nativas apresentam um limite letal de umidade, abaixo do qual há perda total de viabilidade do lote, apresentando grande dificuldade em sua conservação.

Tais sementes são denominadas recalcitrantes e, geralmente, apresentam atividade metabólica intensa por serem mantidas com teores de água elevados.

A secagem é uma opção que pode ampliar a longevidade das sementes, reduzindo as reações metabólicas. Bilia *et al.* (1998), estudando os limites de tolerância à dessecação das sementes de *Inga uruguensis*, conseguiram armazenar as sementes em sacos de polietileno a 10°C por até 60 dias após a colheita, mantendo a qualidade fisiológica, desde que seja reduzido o teor de água até níveis de 50%. Estudos realizados por Barbedo & Cicero (2000) mostraram que as sementes de elevada qualidade de *Inga uruguensis*, quando armazenadas hidratadas e embebidas em solução de ácido abscísico 10^{-4} M em câmara fria, podem apresentar germinação superior a 80% após 40 dias. Contudo, tais pesquisas não foram, ainda, suficientes para preservar tão amplo germoplasma nativo do Brasil.

Uma opção que começa a se mostrar promissora para o controle do metabolismo é a regulação da mobilização de água na semente. Embriões de *Inga vera* mantidos em substratos com soluções de PEG a -2,4 MPa a 10°C apresentaram germinação superior a 80% aos 90 dias, enquanto os armazenados em substrato umedecido com água pura (0 MPa), na mesma temperatura, apresentaram germinação inferior a 60% (Andréo *et al.* 2006).

A capacidade de armazenamento é ampliada para muitas espécies, quando a redução do teor de água das sementes está associada à diminuição de temperatura do ambiente. Contudo, há espécies que não toleram grande redução da temperatura, principalmente o congelamento. Uma espécie intolerante à dessecação e à redução de temperatura, presente na Mata Atlântica, é *Inga vera* ssp. *affinis*.

Visando a ampliar a conservação da qualidade fisiológica de embriões de *I. vera* durante o armazenamento, submeteram-se embriões, em diferentes estádios de maturação, a diferentes condições

de estresses. Nota-se que, após a aplicação de secagem e estresse hídrico, embriões maduros apresentaram um aumento na tolerância à dessecação e à redução da temperatura a níveis de congelamento; porém, não proporcionou aumento significativo no período de armazenamento. Contudo, criaram-se novas perspectivas quanto à conservação de sementes sensíveis à dessecação e à redução da temperatura.

7. Conclusões

Os estudos realizados permitem concluir que:

- ✓ Embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* suportam redução de temperatura até -2°C ;
- ✓ Esses embriões são dispersos após sua maturidade fisiológica, já em início de germinação;
- ✓ Estresses hídricos diminuem a sensibilidade dos embriões de *I. vera* à dessecação, indicando a possibilidade de ampliação da tolerância à dessecação desses embriões e, conseqüentemente, de sua conservação no armazenamento.

8. Referências Bibliográficas

- ANDRÉO, Y., NAKAGAWA, J. & BARBEDO, C.J. 2006. Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Will. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington). *Revista Brasileira de Botânica* 29:309-318.
- BAJAJ, Y.P.S. 1995. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. *In* Biotechnology in agriculture and forestry, Cryopreservation of plant germplasm (Y.P.S. Bajaj, ed.). Springer-Verlag, Berlin, p.3-28.
- BARBEDO, C.J. & BILIA, D.A.C. 1997. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de *Inga uruguensis* Hook. & Arn. em função da remoção de sarcotesta. *Informativo ABRATES* 7:54-56.
- BARBEDO, C.J. & CICERO, S.M. 2000. Effects of initial quality, low temperature and ABA on the storage of seeds of *Inga uruguensis*, a tropical species with recalcitrant seeds. *Seed Science and Technology* 28:793-808.
- BARBEDO, C.J. & MARCOS FILHO, J. 1998. Tolerância à dessecação em sementes. *Acta Botanica Brasilica* 12:145-164.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1994. *Seeds: physiology of development and germination*. 2.ed. Plenum Press, New York.
- BILIA, D.A.C. & BARBEDO, C.J. 1997. Estudos de germinação e armazenamento de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. *Científica* 25:379-391.
- BILIA, D.A.C., BARBEDO, C.J., CICERO, S.M. & MARCOS FILHO, J. 2003. Ingá: uma espécie importante para recomposição vegetal em florestas ripárias, com sementes interessantes para a ciência. *Informativo ABRATES* 13:26-30.
- BILIA, D.A.C., MARCOS FILHO, J. & NOVEMBRE A.D.C.L. 1998. Conservação da qualidade fisiológica de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. *Revista Brasileira de Sementes* 20:48-54.
- BLACK, M. & PRICHARD, H.W. 2002. *Disiccation and survival in plants: drying without dying*. CABI Publishing, Wallingford.
- BOTANIC GARDENS CONSERVATION INTERNATIONAL. 2001. Normas internacionais de conservação para jardins botânicos. Conselho Nacional do Meio Ambiente/Rede Brasileira de jardins botânicos/Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro/EMC, Rio de Janeiro

- BROCKLEHURST, P.A., DEARMAN, J. & DREW, R.K.L. 1984. Recent development in osmotic treatment of vegetable seeds. *Acta Horticulturae* 215:193-200.
- CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4.ed. Funep, Jaboticabal.
- CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. 1983. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 2.ed. Fundação Cargill, Campinas.
- CARVALHO, P.E.R. 1994. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Embrapa/CNPQ, Brasília.
- CASTRO, R.D. & HILHORST, H.W.M. 2004. Embebição e reativação do metabolismo, In *Germinação: do básico ao aplicado* (A. G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre, p.149-162.
- CASTRO, R.D., BRADFORD, K.J. & HILHORST, H.W.M. 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In *Germinação: do básico ao aplicado* (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre, p.51-67.
- CHIN, H.F., KRISHNAPILLAY, B. & STANWOOD, P.C. 1989. Seed moisture: recalcitrant vs orthodox seeds. In *Seed moisture* (P.C. Stanwood & M.B.McDonald, eds.). Crop Science Society of America, Madison, p.15-22.
- CUSTÓDIO FILHO, A. & MANTOVANI, W. 1986. Flora fanerogâmica da Reserva Estadual das Fontes do Iperanga. *Hoehnea* 13:113-140.
- DURIGAN, G., FIGLIOLIA, M.B., KAWABATA, M., GARRIDO, M.A.O. & BAITELLO, J.B. 1997. Sementes e mudas de árvores tropicais. Páginas & Letras, São Paulo.
- EGLI, D.B. & TEKRONY, D.M. 1997. Species differences in seed water status during seed maturation and germination. *Seed Science Research* 7:3-11.
- EIRA, M.T.S. 1996. Classificação de sementes em ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias. In *Curso Sobre Conservação De Germoplasma Vegetal*, Brasília, 1994. IICA-PROCISUR, Montevideo, p. 119-22. (IICA-PROCISUR, Diálogo, 45).
- FIGLIOLIA, M.B. & KAGEYAMA, P.Y. 1994. Maturação de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. em floresta ripária do rio Moji-Guaçu, Município de Moji-Guaçu. *Revista do Instituto Florestal* 6:13-52.
- FONSECA, S.C.L. & FREIRE, H.B. 2003. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. *Bragantia* 62:297-303.

- FUJIKAWA, S. 1980. Freeze -fracture and etching studies on membrane damage on human erythrocytes caused by formation of intracellular ice. *Cryobiology* 17:351-362.
- GARNCZARSKA, M., ZALEWSKI, T. & KEMPKA, M. 2007. Water uptake and distribution in germinating lupine seeds studied by magnetic resonance imaging and NMR spectroscopy. *Physiologia Plantarum* 130:23-32
- GUY, C.L. 2003. Freezing tolerance of plants: current understanding and selected emerging concepts. *Canadian Journal of Botany* 81:1216-1223.
- HEYDECKER, W. & COOLBEAR, P. 1977. Seed treatments for improved performance - survey and attempted prognosis. *Seed Science & Technology* 5:353-425.
- HONG, T.D. & ELLIS, R.H. 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. Rome, IPGRI. 62p. (Technical Bulletin, 1).
- JOLY, A.B. 1993. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. 11.ed. Ed. Nacional, São Paulo.
- KERMODE, A.R. 1995. Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: interactions between the embryo and the seed environment. *In* Seed development and germination (KIGEL, J. & GALILI, G.). Marcel Dekker Inc., New York, p. 273-332.
- KERMODE, A.R. & FINCH-SAVAGE, B.E. 2002. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. *In* Desiccation and survival in plants: drying without dying (M. Black & H.W. Pritchard, eds.). CABI Publishing, New York, p.149-184.
- KIKUCHI, K., KOIZUMI, M., ISHIDA, N. & KANO, H. 2006. Water uptake by beans observed by micro-magnetic resonance imaging. *Annals of Botany* 98: 545-553.
- KOHAMA, S.; BILIA, D. A. C.; MALUF, A. M. & BARBEDO, C.J. 2006. Secagem de sementes de grumixama (*Eugenia brasiliensis*). *Revista Brasileira de Sementes* 28:01.
- LARCHER, W. 2000. Ecofisiologia vegetal. Ed. Rima, São Carlos.
- LEPRINCE, O., HARREN, F.J.M. BUITINK, J., ALBERNA, M. & HOEKSTRA, F.A. 2000. Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating redicels. *Plant Physiology* 122:597-608.
- LLERAS, E. 1992. Conservação de recursos genéticos florestais. *Revista do Instituto Florestal* 4:179-184.
- LORENZI, H. 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Plantarum, Nova Odessa.
- MARCOS FILHO, J. 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Fealq, Piracicaba.

- MCDONALD, M.B., SULLIVAN, J. & LAUER M. J. 1994. The pathway of water uptake in maize seeds. *Seed Science and Technology* 22:79-90.
- MCDONALD, M.B. 1999. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science & Technology* 27:177-237.
- MEYER, C.J., STEUDLE, E. & PETERSON, C.A. 2007. Patterns and kinetics of water uptake by soybean seeds. *Journal of Experimental Botany* 58: 717-732.
- MITTERMEIER, R. A., MYERS, N., GIL, P. R. & MITTERMEIER, C. G. 1999. Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. CEMEX, Sierra Madre.
- MONTAGNINI, F., FAZERES, A. & VINHA, S.G. 1995. The potentials of 20 indigenous tree species for soil rehabilitation in the Atlantic Forest region of Bahias, Brazil. *Journal of Applied Ecology* 32:841-856.
- OKAMOTO, J.M. & JOLY, C.A. 2000. Ecophysiology and respiratory metabolism during the germination of *Inga sessilis* (Vell.) Mart. (Mimosaceae) seeds subjected to hypoxia and anoxia. *Revista Brasileira de Botânica* 23:51-57.
- OLIVEIRA, D.M.T. & BELTRATI, C.M. 1992. Morfologia e desenvolvimento das plântulas de *Inga agifolia* e *I. uruguensis*. *Turrialba* 42:306-313.
- OLIVEIRA, D.M.T. & BELTRATI, C.M. 1993. Aspectos anatômicos dos frutos e sementes em desenvolvimento de *Inga fagifolia* (Fabaceae: Mimosoideae). *Revista Brasileira de Biologia* 53:625-636.
- PARMAR, M.T. & MOORE, R.P. 1996. Effect of simulate growth by polyethylene glycol solutions on corn germination and seedling development. *Agronomy Journal* 58:391-392.
- PENNINGTON, T. D. 2000. The genus *Inga*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- PRITCHARD, H.W., HAYE, A.J., WRIGHT, W.J. & STEADMAN, K.J. 1995. A comparative study of seed viability in *Inga* species: desiccation tolerance in relation to the physical characteristics and chemical composition of the embryo. *Seed Science & Technology* 23:85-100.
- ROBERTS, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science & Technology* 1:499-514.
- ROCHA, Y.T. 2004. Ibirapitanga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) do descobrimento à atualidade. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SANCHOTENE, M.C.C. 1989. Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana. FEPLAN, Porto Alegre.

- SANTOS, I.R.I. 2001. Criopreservação de germoplasma vegetal. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 20:60-65.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. *Fisiologia vegetal*. 3.ed. Artmed, Porto Alegre.
- TERSKIKH, V.V., FEURTADO, J.A., REN, C., ABRAMS, S.R. & KERMODE, A.R. 2005. Water uptake and oil distribution during imbibition of seeds of western white pine (*Pinus monticola* Dougl. ex D. Don) monitored in vivo using magnetic resonance imaging. *Planta* 221:17-27.
- VERTUCCI, C.W. & FARRANT, J.M. 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. *In* Seed development and germination (J. Kigel & G. Galili, eds.). Marcel Dekker Inc., New York, p.237-271.
- VERTUCCI, C.W. 1993. Predicting the optimum storage conditions for seeds using thermodynamic principles. *Journal of Seed Technology* 17:41-53.
- VILLELA, F.A. 1998. Water relations in seed biology. *Scientia Agricola* 55(Especial):98-101.
- VILLELA, F.A.; DONI-FILHO, L. & SERQUEIRA, E.L. 1991. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6000 e da temperatura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 26:1957-1968.
- VILLELA, F.A. & MARCOS FILHO, J. 1998. Estados energéticos e tipos de água na semente. *Revista Brasileira de Sementes* 20:317-321.
- VILLELA, F. A. & PERES, W. B. 2004. Coleta, beneficiamento e armazenamento. *In* Germinação: do básico ao aplicado (A. G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre, p. 265-281.
- WALTERS, C., RAO, N.K. & HU, X. 1998. Optimizing seed water content to improve longevity in *ex situ* genebanks. *Seed Science Research* 8:15-22.
- WALTERS, C. 2000. Levels of recalcitrance in seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia* 12(especial): 7-21.