

ANA CLARA FERREIRA BAPTISTA ARAUJO

**Níveis de tolerância à dessecação de sementes
ortodoxas imaturas de *Caesalpinia echinata* Lam.
(pau-brasil)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica
da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL
E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração
de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2016

ANA CLARA FERREIRA BAPTISTA ARAUJO

**Níveis de tolerância à dessecação de sementes
ortodoxas imaturas de *Caesalpinia echinata* Lam.
(pau-brasil)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica
da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL
E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração
de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADOR: DR. CLAUDIO JOSÉ BARBEDO

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Araujo, Ana Clara Ferreira Baptista

A663n Níveis de tolerância à dessecação de sementes ortodoxas imaturas de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) / Ana Clara Ferreira Baptista Araujo -- São Paulo, 2016.
51p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2016.

Bibliografia.

1. Osmocondicionamento. 2. Maturação. 3. Taxas respiratórias. I. Título.

CDU: 582.736

“... Mas as sementes são invisíveis. Elas dormem nas entranhas da terra até que uma cisme em despertar. Então ela se espreguiça e lança, timidamente, para o sol, um inofensivo galinho.”.

Trecho de “O pequeno príncipe” de Antoine de Saint-Exupéry

A minha grande e linda família.

DEDICO

Agradecimentos

À Deus por me permitir a vida.

Ao meu orientador, Claudio, por todos os ensinamentos, pela confiança, incentivo, amizade e grande orientação.

À minha família pelo amor, incentivo, conselhos e afago a qualquer momento.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo pela oportunidade oferecida.

Aos membros da banca de qualificação pelas valiosas críticas e sugestões.

À prefeitura de Paulínia – SP, pela autorização para as coletas e incentivo.

Ao Jardim Botânico de Paulínia pela troca de informações e incentivo à pesquisa.

Aos colegas da Produção de Mudanças pelas conversas valiosas.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisa em Sementes, do Instituto de Botânica de São Paulo, pelo incentivo e colaboração.

A todo o grupo de trabalho do Dr. Claudio José Barbedo, todos alunos, ex alunos e colaboradores, em especial aos Doutores João Paulo Naldi da Silva, Edmir Vicente Lamarca, Danilo da Cruz Centeno e Dra. Rita de Cassia L. Figueiredo Ribeiro pelos ensinamentos diretos ou indiretos e exemplo de conduta acadêmica.

Aos amigos Cibelle, Débora, Aline, Izabela, Mariana, Camila, João e Lamarca pela amizade, companheirismo, incentivo e colaboração.

Aos amigos do alojamento do Instituto de Botânica pelo acolhimento e companheirismo.

Ao meu grande amigo Raphael pelo apoio nos momentos de baixa autoestima intelectual.

Aos amigos Roseli, Vera, Rodrigo, Aline, Camila e Higor pelos momentos bons e pelos ruins, pelo companheirismo de todos eles.

À Família Barbedo pelo acolhimento, exemplo e amizade.

A Capes pela bolsa concedida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

O armazenamento de sementes é uma importante ferramenta para a conservação *ex situ*. A capacidade de tolerar a dessecação, em sementes denominadas ortodoxas, permite que essas sejam armazenadas por longos períodos. Já sementes que não toleram essa perda acentuada de água, denominadas recalcitrantes, apresentam dificuldades no seu armazenamento a longo prazo. Verifica-se grande variação no grau de secagem das sementes de diferentes espécies, levando autores a considerar a existência de níveis de recalcitrância e, recentemente, que as variações sejam decorrentes do estágio de maturação no qual são dispersas pela planta-mãe. Assim, o comportamento recalcitrante seria resultado da dispersão prematura dessas sementes pela planta-mãe. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi estabelecer relações fisiológicas em diferentes estádios imaturos das sementes ortodoxas de *Caesalpinia echinata* com as descritas para sementes recalcitrantes visando a verificar sua proximidade de comportamentos. Para tanto, a ferramenta de análise foi o estudo da tolerância à dessecação, natural e induzida por solução osmótica (PEG a -3MPa), até diferentes níveis (40%, 30%, 20% e 10% de água, em base úmida). Avaliaram-se alterações no potencial hídrico, na germinação, no vigor e nas taxas respiratórias das sementes. Os resultados mostraram que: 1) houve avanço da tolerância à dessecação com a evolução na maturação; 2) a indução com PEG permitiu um deslocamento no comportamento na curva de tolerância à dessecação no último estágio de maturação; 3) a indução com PEG reduziu as taxas de oxidação das sementes, principal fator da sua rápida deterioração em armazenamento.

Palavras-chave: osmocondicionamento, maturação, taxas respiratórias.

ABSTRACT

Seed storage is an important tool for the *ex situ* conservation. The ability to tolerate desiccation in the so-called orthodox seeds allows them to be stored for long periods. Desiccation intolerant seeds, the so-called recalcitrant, have difficulty in their long term storage. However, there is a wide variation in the degree of drying in seeds of different species, leading authors to consider the existence of recalcitrance levels and, recently, that the variations are due to the maturation stage in which the seeds are dispersed. Thus, the recalcitrant behavior would result from a premature shedding. In this context, the objective of this study was to establish physiological relationships at different stages of development in immature *Caesalpinia echinata* orthodox seeds, comparing them to those described for recalcitrant seeds in order to verify their proximity of behavior. Therefore, we analysed desiccation tolerance, with or without stress osmotic treatment (PEG -3MPa solution), at different levels of drying (40%, 30%, 20% and 10% water content, wet basis). Changes in water potential, germination, vigor and respiratory rates of the seeds were analyzed and the results showed that: 1) desiccation tolerance increased with the evolution of the maturation; 2) PEG treatment enabled a shift in behavior in desiccation tolerance curve in the last stage of maturation; 3) PEG treatment decreased the oxidation of seeds which is considered the most important factor on *C. echinata* seed deterioration on storage.

Key words: osmopriming, maturation, respiratory rates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Área de coleta das sementes de *Caesalpinia echinata* em bosque plantado em Paulínia, SP. a) aspecto geral das árvores; b. aspecto geral dos frutos em distintos estádios de desenvolvimento.....24

Figura 2. Aspectos visuais de sementes de *Caesalpinia echinata* das diferentes idades. Da direita para a esquerda, respectivamente, I0, I1, I2, I3 e I4. Escala = 1 cm.24

Figura 3. Procedimentos adotados para os tratamentos de secagem e indução de tolerância à dessecação com solução de PEG, em sementes de *C. echinata* de diferentes idades.28

Figura 4. Características físicas e fisiológicas iniciais das sementes de *Caesalpinia echinata* de diferentes idades (I0, I1, I2, I3, I4). a. potencial hídrico (MPa); b. teor de água (%); c. conteúdo de matéria seca (mg.semente⁻¹); d. porcentagem de germinação (coluna preta) e de plântulas normais (coluna branca). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.....30

Figura 5. Porcentagem de germinação (colunas pretas) e de plântulas normais (colunas vazias) de sementes de *C. echinata* nas idades I1 (A e B), I2 (C e D), I3 (E e F) e I4 (G e H), em cinco níveis de hidratação (S0, S40, S30, S20 e S10), sem incubação em PEG (A, C, E e G) e com incubação (B, D, F e H). Médias seguidas pela mesma letra (minúscula para médias de secagem e maiúscula para médias do tratamento com PEG) não diferem entre si pelo teste de Tukey, 5%33

Figura 6. Oxigênio (O₂, em $\mu\text{mol mgMS}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) consumido por sementes de *C. echinata* de diferentes idades (I1, I2, I3 e I4), em cinco estádios de hidratação (S0: colunas pretas; S40: colunas cinza escuro; S30: colunas cinza médio; S20: colunas cinza claro; S10: : colunas vazias), sem tratamento com PEG (A) ou tratadas (B). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas comparam as secagens dentro de uma dada idade e maiúsculas comparam o uso de PEG em uma dada secagem) não diferem entre si pelo teste de Tukey, 5%.....36

Figura 7. Dióxido de carbono (CO₂, em $\mu\text{mol mgMS}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) liberado por sementes de *C. echinata* de diferentes idades (I1, I2, I3 e I4), em cinco estádios de hidratação (S0: colunas pretas; S40: colunas cinza escuro; S30: colunas cinza médio; S20: colunas cinza claro; S10: colunas vazias), sem tratamento com PEG (A) ou tratadas (B). Médias seguidas pela mesma

letra (minúsculas comparam as secagens dentro de uma dada idade e maiúsculas comparam o uso de PEG em uma dada secagem) não diferem entre si pelo teste de Tukey, 5%.37

Figura 8. Quociente respiratório (QR) em sementes de *C. echinata* de diferentes idades (I1, I2, I3 e I4), em cinco estádios de hidratação (S0: colunas pretas; S40: colunas cinza escuro; S30: colunas cinza médio; S20: colunas cinza claro; S10: colunas vazias), sem tratamento com PEG (A) ou tratadas (B). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas comparam as secagens dentro de uma dada idade e maiúsculas comparam o uso de PEG em uma dada secagem) não diferem entre si pelo teste de Tukey, 5%.38

Figura 9. Oxigenio não utilizado em vias de respiração aeróbica em sementes de *C. echinata* de diferentes idades (I1, I2, I3 e I4), em cinco estádios de hidratação (S0: colunas pretas; S40: colunas cinza escuro; S30: colunas cinza médio; S20: colunas cinza claro; S10: colunas vazias), sem tratamento com PEG (A) ou tratadas (B). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas comparam as secagens dentro de uma dada idade e maiúsculas comparam o uso de PEG em uma dada secagem) não diferem entre si pelo teste de Tukey, 5%.....39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teor de água (%) e potencial hídrico (MPa) de sementes de quatro idades (I1 a I4) de <i>Caesalpinia echinata</i> submetidas a quatro níveis de secagem (S40: 40%; S30: 30%; S20: 20%; S10: 10%), sem ou com tratamento prévio em solução de PEG.	32
---	----

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
1. Introdução	11
1.1. Conservação ex situ em bancos de sementes.....	12
1.2. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes	13
1.3. Relação entre maturação, tolerância à dessecação e potencial de armazenamento.....	15
1.4. Respiração, processos oxidativos e sistemas antioxidantes em sementes.....	18
1.5. Água: quantidade, estado energético e tratamentos de estresse hídrico	19
1.6. Sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam., o pau-brasil.....	21
1.7. Hipóteses e Objetivos.....	23
2. Material e métodos	24
2.1. Obtenção do material vegetal e caracterização dos lotes.....	24
2.2. Determinações físicas e fisiológicas.....	25
2.3. Tratamentos de incubação em PEG e secagens.....	27
2.4. Delineamento experimental e tratamento estatístico	28
3. Resultados e discussão.....	29
4. Considerações finais	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. Introdução

O conhecimento dos níveis de tolerância à dessecação das sementes de espécies vegetais é de suma importância para se definir o modo correto de conservá-las fora do seu habitat natural. O armazenamento de sementes é uma ferramenta indispensável tanto para o setor agrícola quanto como auxílio à conservação de espécies vegetais, especialmente as que entram em algum risco de extinção. No primeiro caso, evidentemente mais importante para espécies de interesse econômico, o armazenamento garante o fornecimento das sementes para a instalação de lavouras em épocas diferentes daquelas nas quais as sementes são produzidas. Neste caso, o armazenamento é realizado por curtos a médios períodos, variando de meses a alguns anos. Estes períodos também são os almejados em programas de restauração de ambientes, porém envolvendo a produção de mudas de espécies nativas da região ou do país. Os programas de restauração ambiental se enquadram também em um segundo caso, que envolve a conservação de espécies vegetais com intuito de preservação da biodiversidade. Neste caso, as sementes são armazenadas em bancos de germoplasma, um tipo de conservação *ex situ* que, por sua vez, é necessária devido aos danos causados pela ação antrópica sobre o meio ambiente (Barbedo *et al.* 2013, FAO 2013, Silva & Ferraz 2015). Considerando os processos de desmatamento ocorridos no Brasil até o presente momento, bem como a perspectiva de sua continuação nos próximos anos, a conservação *ex situ* vêm ganhando importância cada vez maior, a despeito da falta de conhecimento e tecnologia que permita sua utilização em um grande número de espécies vegetais brasileiras.

Assim, tem sido cada vez mais corriqueiro o interesse e disseminação de informações relacionadas ao ambiente. O tema tem sido abordado principalmente em meios de formação de opinião, como escolas, mídia impressa e digital, entre outros. Contudo, diversas vezes há confusão de termos e conceitos, o que dificulta a correta compreensão dos processos envolvidos na preservação ambiental. Sendo assim, é oportuno explicitar os termos utilizados quando se trata das ações antrópicas ao meio ambiente para o aumento da compreensão da população como um todo. Degradação ambiental, por exemplo, refere-se a danos na qualidade do ambiente, ou seja, são alterações adversas das características do meio ambiente afetando a resiliência do mesmo (Brasil 1981). O desmatamento, por sua vez, causa grande impacto devido à descaracterização do habitat natural e é resumidamente definido como a operação que objetiva a supressão total da vegetação nativa de determinada área para uso alternativo do solo (Brasil 2008). Sendo assim, é lícito assimilar o desmatamento como uma característica

quantitativa que leva a um dano tanto quantitativo como qualitativo, a degradação do ambiente (Brasil 1981).

No Brasil, as áreas desmatadas da Floresta Amazônica, da Mata Atlântica e do Cerrado somam 250 milhões de hectares, correspondendo a quase 30% do território brasileiro, ou a soma das superfícies formadas pelos Estados das Regiões Nordeste e Sudeste. Os técnicos florestais estimam que, ao considerar todos os Biomas do país, o desmatamento, em todo o território, é superior a 300 milhões de hectares de matas (Brasil 2008).

Sendo assim, a crescente preocupação da população e das instituições, públicas e privadas, com os problemas oriundos da degradação ambiental e a necessidade urgente de ações para evitar consequências ainda maiores intensificou, nos últimos anos, o interesse pela propagação de espécies florestais nativas, ressaltando-se a necessidade da restauração de áreas degradadas e recomposição de paisagens. A conservação e a recomposição de áreas com espécies florestais, principalmente tropicais e subtropicais, é necessária tendo em vista as demandas sociais e científicas (Araújo Neto *et al.* 2003, Sarmento & Villela 2010). Contudo, há ainda grande carência de informações científicas que permitam o desenvolvimento tecnológico em áreas essenciais, como é o caso da produção e armazenamento de sementes visando à produção de mudas e conservação de germoplasma. Essa dificuldade se acentua pelo fato de que cada espécie apresenta características próprias, especialmente quanto ao seu comportamento em armazenamento (Davide *et al.* 2003, Walters 2015a).

1.1. Conservação ex situ em bancos de sementes

As sementes são o início de uma nova geração de plantas (Black *et al.* 1999). Por isso, a manutenção dessas é imprescindível para a conservação de uma espécie. Porém, segundo Rocha (2004), a conservação de uma espécie não significa apenas sua sobrevivência, mas também manter a variabilidade genética intraespecífica.

No que diz respeito à preservação dos recursos genéticos das espécies e da biodiversidade como um todo, pode-se considerar duas principais estratégias de conservação: *in situ* e *ex situ*. A conservação *in situ* é referente à continuidade das espécies pela manutenção e reconstituição de populações em seu habitat natural em unidades de conservação dentro dos próprios ecossistemas (Botanic Gardens Conservation International 2001, MMA 2015). Devido ao fato de muitas espécies importantes economicamente não serem nativas do Brasil, criou-se também uma categoria de conservação dentro da conservação *in situ* para espécies cultivadas, denominada *on farm*. Esta objetiva a

conservação genética da agrobiodiversidade, um termo utilizado para se referir à diversidade de seres vivos, de ambientes terrestres ou aquáticos, cultivados em diferentes estados de domesticação (MMA 2015). Já a conservação *ex situ* é a manutenção genética em condições artificiais (coleções permanentes) através de amostras de organismos fora do seu habitat natural, tais como pólen, cultura de tecidos, sementes e plantas vivas (Botanic Gardens Conservation International 2001, MMA 2015).

O armazenamento de sementes é uma importante ferramenta para a conservação *ex situ* (FAO 2013) já que mantém a viabilidade dos propágulos e a preservação da identidade genética (Slageren 2002). Alguns bancos de sementes têm usado estratégias valorosas quando o assunto é armazenar as sementes. Entre eles podemos citar: 1) Svalbard Global Seed Vault, localizado em Spitsbergen na Noruega, que utiliza condições climáticas naturais de temperaturas negativas, dessa forma reduzindo o metabolismo das sementes e prolongando seu armazenamento; 2) National Center for Genetic Resources Preservation, localizado em Fort Collins, Estados Unidos, com ambiente naturalmente árido que mantém as sementes secas e, desta forma, também reduzindo seu metabolismo e maximizando sua conservação; 3) Millennium Seed Bank, localizado no Royal Botanic Gardens, em Kew, UK, um dos maiores e mais consagrados bancos de germoplasma do mundo que utiliza condições controladas tanto de temperatura quanto de umidade relativa (Royal Botanic Gardens Kew 2015, Walters 2015b, Westengen 2015).

No entanto a conservação das espécies presentes nesses e em outros bancos de germoplasma só é possível para sementes tolerantes à dessecação (ortodoxas, segundo Roberts 1973). Para as demais, ainda há falta de estudos que subsidiem planos e ações de conservação da diversidade biológica (Barbedo *et al.* 2002), principalmente no que diz respeito ao comportamento das sementes durante o armazenamento (Davide *et al.* 2003).

1.2. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes

A capacidade de tolerar a secagem até um estado de mínima hidratação, encontrada em alguns animais, plantas ou microrganismos, permite sua sobrevivência por longos períodos e, especificamente em sementes, que sejam armazenadas (Alpert 2005). Quando nessa condição, a água assume um estado diferenciado, denominado estado vítreo, no qual a mobilidade de compostos praticamente cessa, garantindo a sobrevivência (Pagnotta & Bruni 2006). A água controla reações metabólicas na semente, sendo o veículo de transporte e mobilização de substâncias nas células. Nesse caso, reduzir seus teores a valores mínimos resulta em atividade metabólica de baixíssima intensidade, diminuindo a velocidade de

deterioração dos tecidos, permitindo armazenamento a longo prazo (Kermode 1990, Marcos Filho 2015). No entanto, quando as sementes são intolerantes à dessecação (recalcitrantes, segundo Roberts 1973) devem ser mantidas com elevados níveis de hidratação, o que resulta em intensa atividade metabólica (Pammenter & Berjak 2000). Esse metabolismo requer elevadas taxas respiratórias e grande consumo de reservas, diminuindo substancialmente a capacidade de conservá-las em armazenamento por longos períodos. Além disso, durante o período no qual as sementes mantêm intensa atividade, mas não direcionada à germinação ou ao desenvolvimento das plântulas, o metabolismo pode ser desordenado, com liberação de radicais livres, prejudicando ainda mais a conservação de sua viabilidade durante o armazenamento e, conseqüentemente, favorecendo sua rápida deterioração (Barbedo & Marcos Filho 1998, Andréo *et al.* 2006, Marcos Filho 2015).

A grande maioria das sementes de espécies conhecidas pertence à categoria das tolerantes à dessecação, ou ortodoxas. Um dos primeiros relatos de sementes que não passavam por um período natural de secagem drástica ao final do processo de maturação e que, quando secas artificialmente, perdiam a capacidade de sobrevivência foi descrito por Kidd (1914) ao estudar sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* L.). No Brasil, Castro & Krug (1951) verificaram um comportamento semelhante em sementes de ingá (*Inga vera* Willd.). Roberts (1973), propondo-se a desenvolver um protocolo matemático para estimar a longevidade das sementes em armazenamento, necessitou separar as sementes intolerantes à secagem do grupo estudado; foi então que tais sementes receberam a designação de recalcitrantes, em contraste às tolerantes, que foram designadas ortodoxas. Essa classificação, contudo, não comportava um grupo de sementes que não se enquadrava nem entre as ortodoxas, nem entre as recalcitrantes, sendo necessária a criação das sementes de comportamento intermediário (Ellis *et al.* 1990). Estes termos permanecem até os dias atuais e são muito úteis no meio tecnológico, permitindo uma rápida tomada de decisão quanto ao destino dos lotes de sementes recém-colhidas, se podem ou não serem submetidas à secagem e ao armazenamento, ou se devem ser utilizadas em curto período (Mai-Hong *et al.* 2006, Usberti *et al.* 2006).

Com o avanço do conhecimento das sementes das diferentes espécies, novas categorias foram criadas, tais como subortodoxa, de recalcitrância baixa, moderada e alta, entre outras, sendo utilizadas para a recomendação de procedimentos e decisões quanto ao armazenamento (Silva & Ferraz 2015). A partir da década de 90 houve um grande esforço para se entender o comportamento de sementes de espécies nativas, incluindo-se a variabilidade no tempo de conservação da viabilidade em armazenamento. O conhecimento

sobre a capacidade de armazenamento das sementes permite que sejam adotadas condições adequadas para cada espécie, além da elaboração de programas para a conservação de germoplasma (Davide *et al.* 2003).

Contudo, se, por um lado, o agrupamento das sementes em categorias é tecnologicamente útil, por outro, cientificamente resulta em mais dúvidas que soluções, especialmente quanto à conservação das sementes recalcitrantes. Verifica-se uma grande variação de respostas dentro de cada um desses grupos, levando alguns autores a considerarem a existência de níveis de recalcitrância ou gradientes de tolerância à dessecação entre as sementes de diferentes espécies, oscilando das mais intolerantes até as mais tolerantes (Pammenter *et al.* 2003, Walters 2000). A diversidade de respostas à secagem, ao resfriamento ou congelamento, os diferentes períodos de conservação da viabilidade em armazenamento, entre outras características, demonstra que as diferenças entre as sementes são muito mais complexas (Barbedo *et al.* 2013). Além disso, as diferentes respostas das sementes de uma mesma espécie, quando oriundas de diferentes regiões (Daws *et al.* 2004, 2006), bem como as diferenças encontradas até mesmo entre sementes das mesmas matrizes, em anos de produção distintos (Lamarca *et al.* 2011, 2013), corroboram a inconsistência em se agrupar as sementes das diferentes espécies em categorias.

1.3. Relação entre maturação, tolerância à dessecação e potencial de armazenamento

A maturação de sementes é o conjunto de eventos controlado geneticamente que envolve uma sequência ordenada de alterações a fim de proporcionar o sucesso da futura germinação (Marcos Filho 2015). É um processo constituído por diversas alterações morfológicas, físicas, fisiológicas e bioquímicas que se iniciam a partir da singamia, na fecundação, e se encerra no momento em que a semente se desliga fisiologicamente da planta-mãe (Delouche 1971, Popinigis 1985, Mariath *et al.* 2006). Durante o desenvolvimento, ocorrem alterações no tamanho, teor de água, conteúdo de matéria seca, na capacidade de germinar e nos níveis de vigor até que alcancem sua maturidade fisiológica (Carvalho & Nakagawa 2000).

A maturação das sementes pode ser separada em quatro fases igualmente importantes para a qualidade final das sementes no momento de sua dispersão. As fases I e II acontecem rapidamente quando comparadas às demais fases de desenvolvimento das sementes, porém são primordiais para o sucesso dos passos seguintes (Carvalho & Nakagawa 2000). Compreendem o período entre a fecundação do óvulo, quando este apresenta teor de água de

no mínimo 80%, e o início do acúmulo de massa seca; referem-se, respectivamente, à divisão e expansão celular (Marcos Filho 2015). Estas fases são responsáveis pela constituição da estrutura adequada para receber as substâncias de reserva (Egli 1994) definindo o volume do “depósito” que abrigará as reservas provenientes da planta-mãe (Marcos Filho 2015).

A fase III da maturação compreende o acúmulo de massa seca, que será utilizada como reserva pela semente nas primeiras etapas da germinação (Bewley *et al.* 2013). Durante essa fase o teor de água passa a decrescer conforme há o aumento na massa de matéria seca. No entanto, apesar desse decréscimo, os níveis de água permanecem elevados já que a deposição de reservas da planta-mãe para a semente ocorre em meio líquido. Ainda nessa fase as sementes já adquirem capacidade de iniciar a germinação (Delouche 1971, Bewley *et al.* 2013), porém as reservas ainda são incipientes para a formação de plântulas vigorosas (Marcos Filho 2015). É importante salientar que, durante esse período, a manutenção de elevados níveis de matéria seca é dependente das influências ambientais (Borges *et al.* 2005), visto que condições menos favoráveis de temperatura, umidade relativa e o ataque de pragas e microorganismos podem contribuir para a aceleração de processos respiratórios e oxidativos de substâncias de reserva, com redução no peso das sementes (Marcos Filho 2015).

Ao atingir o máximo de matéria seca, cessa-se a conexão vascular planta-semente, ou seja, há o desligamento fisiológico das sementes da planta-mãe e aquelas passam a funcionar como indivíduos independentes. A partir daí, dá-se o início da quarta fase do desenvolvimento das sementes, no qual há o ajuste final da organização das membranas e a indução da síntese de enzimas envolvidas na germinação (Egli 1998, Marcos Filho 2015). Essa fase final da maturação é marcada, para espécies de comportamento ortodoxo, pela intensa desidratação de suas sementes (em torno de 10%) que entram em estado de quiescência (Barbedo & Marcos Filho 1998, Barbedo *et al.* 2013). Por outro lado, as sementes de espécies que apresentam comportamento recalcitrante são dispersas em momento anterior, quando ainda apresentam altos níveis de água, próximos a 60% ou superiores (Barbedo & Marcos Filho 1998, Barbedo & Bilia 1998, Marcos Filho 2015). Portanto, estas sementes são metabolicamente ativas e sensíveis à secagem (Carvalho *et al.* 2006, Berjak & Pammenter 2013).

Os mecanismos de dessecação das sementes ortodoxas, ao final da maturação, não são perfeitamente conhecidos. Alguns estudos sugerem a existência de um mecanismo passivo, em que água é perdida por evaporação, a partir da superfície da semente; outros mencionam a possibilidade da movimentação da água da semente para planta, mediante processo metabolicamente ativo, como se a planta “sugasse” água durante a senescência (Marcos Filho 2015). De qualquer forma, apenas as sementes que adquiriram a capacidade de tolerar a

secagem durante a maturação (ortodoxas) passam por essa fase. E o processo de maturação, que se apresentava até então semelhante para ambos os comportamentos, se distingue nesse ponto (Barbedo *et al.* 2013).

No processo de maturação das sementes há necessidade de se identificar o momento em que atingem sua maturidade fisiológica. Isso porque este seria conceitualmente o momento em que há o máximo de vigor das sementes e, portanto, o maior potencial de armazenamento (Carvalho & Nakagawa 2000, Ricci *et al.* 2013). Apesar de diferenças nas definições e conceitos utilizados por diferentes autores, na maioria das vezes associa-se esse momento ao máximo acúmulo de massa de matéria seca (Delouche 1971, TeKrony & Egli 1997), ou ao momento em que não há mais transferência significativa de massa de matéria seca da planta para a semente (Gunn & Crhstensen 1965, Crookston & Hill 1978, Ellis & Pietra Filho 1992, Carvalho & Nakagawa 2000). Porém, nas sementes recalcitrantes não há evidências de que esse ponto seja atingido em qualquer momento do seu desenvolvimento, pois aparentemente há um *continuum* entre a formação da semente e sua própria germinação (Berjak & Pammenter 2000, Barbedo *et al.* 2013). Algumas espécies, inclusive, dispersam suas sementes já em estágio avançado de germinação, como verificado em *Inga vera* (Bonjovani & Barbedo 2008, Caccere *et al.* 2013).

Durante os primeiros estádios da maturação, os embriões são extremamente sensíveis ao estresse hídrico (Berjak *et al.* 1993) e a tolerância à dessecação é adquirida continuamente durante seu desenvolvimento, assim como a capacidade em germinar (Kermode 1990, Walters 2015). A tolerância à dessecação parece ser um fenômeno multifatorial em que cada componente é igualmente crítico (Leprince *et al.* 1993). A evolução nos níveis de tolerância à dessecação ocorre de forma rápida na maturação dificultando avaliar o momento exato em que há a transição desses níveis durante o processo de desenvolvimento (Vertucci & Farrant 1995). Durante o processo de desenvolvimento das sementes dois momentos são identificados: um período durante o qual a semente é intolerante à redução dos níveis de água (fase de divisão e expansão celular e parte da fase do acúmulo de matéria seca) e o momento em que elas passam a tolerar a secagem, podendo estar ainda na fase final de transferência de reservas da planta-mãe para a semente quanto na fase final do processo clássico de maturação, no qual ocorre o decréscimo rápido dos níveis de água nas sementes (Kermode 1990). Apesar de a aquisição da tolerância à dessecação ocorrer de forma rápida por sementes ortodoxas, há uma fase de transição entre a intolerância e a tolerância total. Esta transição pode ser prematuramente induzida ou prolongada por modificações do meio ou manipulação química.

Uma vez induzido o processo, os embriões imaturos podem tornar-se tolerantes à dessecação em poucos dias (Kermode 1990, Blackman *et al.* 1991, Leduc *et al.* 2012).

Essa evolução da tolerância à dessecação levou alguns autores a considerar a possibilidade de que as sementes recalcitrantes poderiam ser, na verdade, ortodoxas em sua fase imatura. Antes de atingirem as fases finais da maturação, seriam dispersas ou iniciariam a germinação ainda na planta-mãe (viviparidade) e, em ambos os casos, o processo de maturação seria interrompido (Barbedo *et al.* 2013). A partir desse ponto de vista, esses autores consideraram que seria possível a simulação artificial das condições que tais sementes encontrariam na planta-mãe em sua fase final de maturação, como a remoção controlada da água pela diferença no potencial de água entre a planta e a semente. Esse efeito, na verdade, foi demonstrado para sementes de algumas espécies, inclusive a do presente trabalho (Leduc *et al.* 2012); contudo, pode haver limites nessa simulação, uma vez que as sementes não teriam como adquirir compostos importantes para completar a maturação por terem se desligado da planta-mãe (Barbedo *et al.* 2013). Não sendo possível, até o presente momento, prolongar o tempo de manutenção das sementes recalcitrantes na planta-mãe, uma das formas de se analisar essa possibilidade é o estudo de sementes ortodoxas em suas fases imaturas.

1.4. Respiração, processos oxidativos e sistemas antioxidantes em sementes

A informação disponível na literatura sobre a atividade respiratória das sementes durante sua formação é, ainda, escassa. Contudo, sabe-se que há intensa atividade metabólica durante a embriogênese, o que requer grande fonte de energia, fornecida pela atividade respiratória (Buckeridge *et al.* 2004, Borisjuk & Rolletschek 2008). Marcos Filho (2015) menciona que no início da formação das sementes (fases I e II, correspondendo a divisão e expansão celular) a taxa respiratória se estabiliza. Já no final da maturação, na fase de dessecação, há o desligamento da respiração, como verificado em *Arabidopsis* (Fait *et al.* 2006).

Em relação aos processos oxidativos, há evidente influência na tolerância à dessecação das sementes devido ao fato de que, durante a secagem, as sementes passam por processos inevitáveis de formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio por desbalanços no transporte de elétrons da cadeia respiratória (Kranner & Birtic 2005). Durante a formação das sementes há necessidade, portanto, de que sistemas antioxidantes estejam presentes e eficientes. Em sementes denominadas recalcitrantes, aparentemente esses sistemas ou não existem ou não são eficientes (Berjak & Pammenter 2000, Pammenter & Berjak 1999).

Segundo o modelo de Barbedo *et al.* (2013), as sementes recalcitrantes poderiam ser ortodoxas que não completaram a maturação e, portanto, sementes ortodoxas imaturas também poderiam ter falhas nos sistemas antioxidantes em sua fase intolerante à dessecação. Portanto, o estudo da atividade respiratória e de reações oxidativas das sementes ortodoxas imaturas poderia trazer substancial contribuição ao conhecimento das relações entre sementes ortodoxas e recalcitrantes, mas há muito pouca informação na literatura sobre esse assunto. Análises das taxas de consumo de O₂ e de liberação de CO₂ pelas sementes podem fornecer importantes informações quanto aos processos predominantes, se respiração ou oxidação não respiratória. Excesso de consumo do primeiro em relação à liberação do segundo pode indicar atividade oxidativa não respiratória (Perl 1986) e isso pode ser analisado por meio de medição direta em respirômetros (Dode *et al.* 2012; Lamarca & Barbedo 2012).

1.5. Água: quantidade, estado energético e tratamentos de estresse hídrico

Para compreender o papel da água e seu envolvimento nos processos vitais das sementes, algumas características são de suma relevância. Na formação da molécula da água, quando dois átomos de hidrogênio (1 elétron livre cada) se unem aos dois elétrons livres do átomo de oxigênio, há formação de ligações covalentes que exigem considerável consumo de energia para serem rompidas (Marcos Filho 2015). Por sua natureza espacial e pelo resíduo de carga nessa formação, essa molécula de água pode se ligar a outras, mas por ligações mais fracas e menos duradouras que as anteriores, denominadas ligações de hidrogênio (ou pontes de hidrogênio). Esta força de atração entre as moléculas de água inibe sua separação e escape na forma de vapor, permitindo que a água esteja em estado líquido à temperatura ambiente. Para que as moléculas possam ser liberadas dessas ligações (que também ocorrem entre moléculas de água e outras moléculas com carga residual) há necessidade de acréscimo de energia no sistema, que pode ser medida e é denominada potencial de água, ou potencial hídrico (Lamarca & Barbedo 2015).

As células vivas dos tecidos vegetais são constituídas de membranas semipermeáveis. Essas membranas permitem a passagem de água e não de solutos. Assim a água circula pelas células visando a equilibrar a diluição dos solutos, seguindo o gradiente de menor concentração (maior potencial hídrico) para a maior concentração (menor potencial hídrico) (Castro *et al.* 2004, Taiz & Zeiger 2004).

A energia da água na semente representa um melhor indicador do estado da água do que a quantidade absoluta ou o teor de água, subsidiando o entendimento de seu

comportamento fisiológico (Marcos Filho 2015). A atividade da água nas sementes é responsável por uma série de reações e, além disso, pode interferir na solubilidade e concentração de solutos nas células (Leopold & Vertucci 1989).

Entender os danos causados pela remoção de água nas sementes auxilia a compreensão do fenômeno da tolerância à dessecação. A literatura descreve cinco tipos de água de acordo com o seu potencial hídrico e a sua função fisiológica. A água do tipo 5 é água não retida, ou seja, está livre para realizar reações e ocorre quando o potencial hídrico está acima de -2 MPa. A água do tipo 4 ocupa espaços intracapilares entre as macromoléculas e não interage com suas superfícies; ocorre quando o potencial hídrico está entre -2 e -4 MPa. A água do tipo 3 forma pontes com sítios hidrofóbicos de macromoléculas e ocorre quando o potencial hídrico está entre -4 e -11 MPa. A água do tipo 2 apresenta-se em estado vítreo e interage com sítios hidrofílicos das macromoléculas e ocorre quando o potencial hídrico está entre -12 MPa e -150 MPa. A água do tipo 1 corresponde à água ligada quimicamente por grupos iônicos e ocorre quando o potencial hídrico está abaixo de -150 MPa (Vertucci & Farrant 1995).

Essas características do potencial energético da água nas sementes é um indiscutível parâmetro para entender o que está acontecendo na semente. Segundo Villela & Marcos Filho (1998), sob uma mesma atmosfera, com umidade relativa do ar constante, sementes de diferentes espécies apresentam diferentes teores de água, mas o potencial hídrico normalmente é muito próximo. Os mesmos autores indicam que a utilização do potencial hídrico se mostra um parâmetro mais preciso para obtenção de informações sobre disponibilidade hídrica e/ou seu estado energético. As sementes ortodoxas podem perder água do tipo 5 até do tipo 2, mas as recalcitrantes podem tolerar somente redução até o tipo 4, pois quando começam a perder água do tipo 3 já demonstram sinais de perda da viabilidade (Farrant *et al.* 1992, Berjak *et al.* 1993).

O osmocondicionamento (ou condicionamento osmótico) é a hidratação controlada de sementes até um determinado nível, de modo a permitir a ocorrência das etapas iniciais do processo de germinação sem que ocorra protrusão da radícula (Carvalho *et al.* 2000). O pré-condicionamento de sementes à exposição das mesmas a atmosfera controlada, embebição em substratos úmidos ou imersão em soluções osmóticas, pode ser realizado continuamente até níveis de umidade programados ou em ciclos de hidratação e secagem (Vazquez 1995). Essa técnica permite maior uniformidade e velocidade na formação de plântulas pelo acúmulo de solutos (açúcares, ácidos orgânicos e íons) provenientes da retomada do metabolismo da semente, resultando em maior turgescência na reidratação e promovendo a protrusão da radícula em menor tempo (Bradford 1990). O vigor das sementes mostra-se elevado com o

uso desta técnica e os resultados são superiores aos obtidos em sementes não tratadas de várias espécies, particularmente em condições de estresse, como temperatura sub ou supra ótima, déficit hídrico ou salinidade. Esta técnica de hidratação lenta permite a reparação ou reorganização das membranas plasmáticas, o que possibilita a formação ordenada dos tecidos, reduzindo os riscos de danos ao eixo embrionário (Faria 2006).

Durante a desidratação ou secagem lenta de sementes maduras ocorre intenso redirecionamento no metabolismo levando à paralisação na formação de proteínas de reserva, acompanhada de hidrólise dos polipeptídeos armazenados. Dessa forma, a secagem pode modificar o padrão de síntese proteica, reduzindo a produção de RNAm no eixo embrionário. Com isso, enzimas associadas exclusivamente aos processos pós-germinativos têm sua produção induzida pela secagem da semente durante seu processo de desenvolvimento e maturação (Bewley & Black 1994).

Uma das soluções osmóticas mais utilizadas para o osmocondicionamento é o polietilenoglicol (PEG) (Vasquez 1995), um agente osmótico macromolecular, quimicamente inerte, não degradável, atóxico para as sementes por não penetrar no tegumento devido ao elevado peso molecular (Villela *et al.* 1991) e capaz de estabelecer um gradiente osmótico entre a solução e a semente. Esse composto também vem obtendo sucesso para simular os efeitos do déficit hídrico em plantas (Hasegawa *et al.* 1984).

A regulação da mobilização da água em sementes recalcitrantes tem sido foco de estudo, apresentando-se promissora quando as sementes são submetidas a tratamentos com imersão em soluções osmóticas, sendo o PEG uma das substâncias mais utilizadas para esse fim (Marcos Filho 2015). Andréo *et al.* (2006), por exemplo, verificaram para sementes de *Inga vera* que sua capacidade germinativa pode ser preservada até 90 dias quando armazenadas em substrato umedecido em solução osmótica de PEG 6000 com potencial entre -1,6 e -2,4 MPa, provavelmente, devido ao controle da mobilização da água dentro dos embriões. Poucas informações existem a respeito da aplicação do condicionamento osmótico em sementes de espécies florestais nativas.

1.6. Sementes de *Caesalpinia echinata* Lam., o pau-brasil

O pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), primeiro recurso natural explorado no Brasil pelos descobridores portugueses do século XVI ao século XIX, é a única espécie vegetal a dar nome a um país, teve sua população original reduzida à quase extinção. Inicialmente, portugueses, franceses, holandeses, espanhóis e ingleses utilizaram sua madeira

para extração de corante vermelho e para fabricação de móveis (Rocha *et al.* 2008). Em tempos mais recentes, sua madeira tem sido utilizada para confecção de arcos de violino, pois possui propriedades raramente encontradas em madeiras de outras espécies para esse fim (Franco & Yojo 2008).

As sementes de pau-brasil foram classificadas, inicialmente, como ortodoxas, tolerando secagem até atingirem valores tão baixos quanto 8% a 5%, em base úmida (Barbedo *et al.* 2002, Martini-Neto & Barbedo 2015). Contudo, diferentemente das ortodoxas clássicas, não toleram armazenamento prolongado (superior a 12 meses) ainda que mantidas com baixo teor de água (Hellmann *et al.* 2006). Armazenadas em temperatura de congelamento, porém, podem manter a viabilidade por pelo menos 5 anos (Mello *et al.* 2013). Por tolerarem a dessecação e o congelamento, mas terem curta longevidade em temperatura ambiente, as sementes de pau-brasil não se enquadrariam em quaisquer das categorias descritas anteriormente, ou seja, ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias. Além disso, Lamarca & Barbedo (2012) verificaram que a rápida perda da viabilidade dessas sementes está associada a um elevado consumo de O₂, sem correspondente liberação de CO₂, típico da respiração de carboidratos, sugerindo outros processos oxidativos e a falta ou ineficiência de sistemas antioxidantes. Conforme apontado anteriormente, em sementes recalcitrantes os sistemas antioxidantes ou não existem ou não são eficientes, semelhante ao observado nas sementes de *C. echinata*. No modelo proposto por Barbedo *et al.* (2013), porém, tais características situariam as sementes de *C. echinata* em estágio de maturação correspondente à curva mais acentuada de perda de água do final da maturação das ortodoxas clássicas, porém sem atingir seu final. Tais sementes são, portanto, material de grande interesse científico para compreensão das diferenças nos comportamento de sementes ortodoxas e recalcitrantes.

Borges *et al.* (2005) verificaram que sementes de *C. echinata* acumulam matéria seca dos 32 até os 70 dias após a antese (DAA), atingindo, em média, 316 mg.semente⁻¹, indicando que a maturidade fisiológica provavelmente estaria próxima a 60-65 DAA. Contudo, verificaram também que esse período pode variar de acordo com as condições de temperatura e umidade durante o ciclo sazonal de desenvolvimento no ano da colheita. O crescimento dos frutos e das sementes aumentou até os primeiros 48 DAA, modificando-se pouco até o final do processo. Com relação à capacidade germinativa, aos 40 DAA as sementes já apresentavam cerca de 40% de germinação, atingindo 100% aos 52 DAA, ou seja, muito antes das sementes atingirem o máximo acúmulo de matéria seca (70 DAA). Com relação ao desenvolvimento de plântulas vigorosas, os maiores valores foram observados para sementes colhidas aos 59 DAA. Leduc *et al.* (2012) demonstraram que a maior parte das sementes de *C.*

echinata com 45 DAA são intolerantes à dessecação. Contudo, muitas destas sementes podem tornar-se tolerantes quando submetidas à indução por osmocondicionamento em solução de polietileno glicol (PEG) 6000. Isso, no modelo de Barbedo *et al.* (2013), corresponderia ao leve deslocamento das curvas de tolerância à dessecação e potencial de armazenamento, simulando algum período adicional de maturação.

Conforme mencionado anteriormente, recentemente alguns autores têm considerado a possibilidade de que as sementes não pertençam, de fato, a grupos distintos (ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias, com suas subcategorias), mas que as diferenças sejam decorrentes meramente do estágio de maturação no qual são dispersas pela planta-mãe (Barbedo *et al.* 2013). Assim, o comportamento recalcitrante das sementes seria o resultado da dispersão precoce da planta-mãe comparadas com o das sementes ortodoxas (Barbedo *et al.* 2013, Newton *et al.* 2013, Verdier *et al.* 2013). Portanto, é fundamental que se conheçam as etapas da maturação nas quais as sementes adquirem tolerância à dessecação para que se possa compreender o comportamento recalcitrante e, assim, permitir o desenvolvimento de tecnologia para sua conservação.

Como ainda não há tecnologia desenvolvida para prolongar eficientemente o período de armazenamento de sementes recalcitrantes, estudos devem ser conduzidos com sementes ortodoxas imaturas procurando-se evidências de proximidade de comportamento dessas com as denominadas recalcitrantes. Dentre os vários aspectos a serem analisados, a tolerância à dessecação e as taxas respiratórias figuram entre os principais. Somente após a compreensão das diferenças entre essas sementes será possível desenvolver tecnologia que permita armazenar sementes recalcitrantes em bancos de germoplasma como, por exemplo, o desenvolvimento de técnicas de ampliação do período de maturação das sementes recalcitrantes ainda na planta-mãe.

1.7. Hipóteses e Objetivos

No presente trabalho levantaram-se as hipóteses de que sementes de pau-brasil situam-se entre as dispersas imaturas (recalcitrantes clássicas) e as plenamente maduras (ortodoxas clássicas); também que pode-se deslocar as curvas de tolerância à dessecação pela aplicação de métodos artificiais de simulação das condições verificadas na planta-mãe nas fases subsequentes. Para tanto, objetivou-se estudar a tolerância à dessecação, natural e induzida, de sementes de *C. echinata*, em quatro idades distintas, todas imaturas.

2. Material e métodos

2.1. Obtenção do material vegetal e caracterização dos lotes

Frutos de *Caesalpinia echinata* Lam. foram colhidos em árvores do Bosque Brasil 500 (figura 1), em Paulínia, SP (22°45' S, 47°09' O, altitude de 690 m) entre outubro e novembro de 2014.

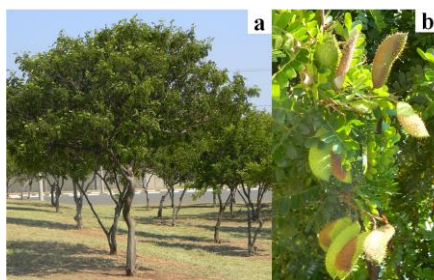


Figura 1. Área de coleta das sementes de *Caesalpinia echinata* em bosque plantado em Paulínia, SP. a) aspecto geral das árvores; b. aspecto geral dos frutos em distintos estádios de desenvolvimento.

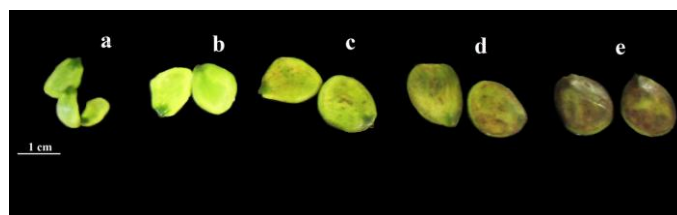


Figura 2. Aspectos visuais de sementes de *Caesalpinia echinata* das diferentes idades. Da direita para a esquerda, respectivamente, I0, I1, I2, I3 e I4. Escala = 1 cm.

Após a colheita, os frutos foram embalados em sacos de malha plástica e levados ao Laboratório de Sementes do Instituto de Botânica, em São Paulo, SP (23°39' S, 46°37' O, altitude de 785 m), onde foi realizada a extração das sementes. Esta foi realizada manualmente, com pequena torção dos frutos para desprendimento das sementes, que foram, então, separadas em cinco estádios distintos de maturação, doravante denominados idades, de acordo com suas características morfológicas (tamanho e coloração). Foram obtidas sementes de cinco idades, sendo I0 a mais imatura e I4 a mais madura (figura 2). Uma estimativa cronológica do tempo decorrido entre a antese e cada colheita (dias após a antese - DPA) foi realizada por meio da etiquetagem de flores no momento de sua antese e acompanhamento do desenvolvimento de frutos e sementes quanto aos seus aspectos visuais externos.

A aferição da separação das sementes por idade foi realizada avaliando-se o teor de água e o conteúdo de massa seca, comparando-se esses dados com os descritos por Borges *et al.* (2005). Além do teor de água e do conteúdo de massa seca, amostras de sementes de cada idade foram tomadas para caracterizar, também, seu potencial hídrico, suas taxas respiratórias e sua capacidade em germinar e produzir plântulas normais, conforme descrito a seguir.

2.2. Determinações físicas e fisiológicas

O teor de água e o conteúdo de massa seca foram determinados gravimetricamente, pelo método de estufa a 103 °C por 17 horas, sendo os resultados apresentados em porcentagem, em base úmida, para teor de água e em mg semente⁻¹, para massa seca (Brasil 2009).

O potencial hídrico foi medido em potenciômetro WP4 (Decagon Devices, Pullman, EUA), que se baseia na temperatura do ponto de orvalho do ar em equilíbrio com a amostra examinada (Decagon 2001, Delgado & Barbedo 2012). Para este teste, as sementes foram cortadas longitudinalmente visando à rapidez de equilíbrio higroscópico entre a amostra e o ar e imediatamente colocadas em cápsulas plásticas, que foram tampadas. Após atingirem temperatura próxima à do potenciômetro, as cápsulas foram abertas e inseridas na câmara de avaliação, registrando-se os resultados em MPa (Lamarca *et al.* 2009, Martini-Neto & Barbedo 2015).

O teste de germinação foi realizado em rolo de papel Germitest, com as sementes sendo colocadas em duas folhas para base e uma para cobertura, umedecidas sem excesso visível de água (Brasil 2009). Os rolos foram acondicionados dentro de germinadores com 100% de umidade relativa do ar e temperatura constante de 25 °C, com luz contínua (Mello & Barbedo 2007), em sala de germinação no laboratório do Núcleo de Pesquisa em Sementes do Instituto de Botânica. Foram realizadas avaliações a cada dois dias registrando-se o número de sementes com protrusão de, no mínimo, 1cm de raiz primária, para o cálculo da porcentagem de germinação, e o de sementes que produziram plântulas normais (plântulas com sistema radicular desenvolvido e o primeiro par de folhas visível), para o cálculo da porcentagem plântulas normais (Barbedo *et al.* 2002).

As taxas respiratórias, ou seja, o consumo de oxigênio (O₂) e a produção de dióxido de carbono (CO₂), foram determinadas por meio de analisador modelo ILL6600 (Illinois Instruments, Inc., Johnsbury, EUA), segundo metodologia descrita por Lamarca & Barbedo (2012). A porcentagem de O₂ e CO₂ no ar do recipiente de incubação das sementes foi obtida por sensores à base de óxido de zircônio (ZrO₂) para o O₂ e infravermelho para o CO₂. As

amostras de sementes foram acondicionadas em frascos de vidro de 600 mL, hermeticamente fechados, com orifícios na tampa recobertos por septo de borracha impedindo trocas gasosas com o meio externo, por onde foram inseridos os eletrodos do equipamento para a tomada da amostra de ar das embalagens. Antes da incubação da amostra, foi determinada a massa fresca (g) das sementes, bem como o volume total do ar das embalagens (segundo o princípio da hidrostática), para os cálculos do volume resultante de ar depois de descontado o volume ocupado pelas sementes. O fechamento das embalagens foi determinado como o início do experimento, correspondendo à atmosfera normal (20,9% de oxigênio e 0,03% de dióxido de carbono). O consumo de O₂ e a produção de CO₂ pelas sementes foram estimados pela diferença entre os valores medidos e os da atmosfera normal após 48 h do fechamento das embalagens.

Considerando-se a pressão atmosférica local (em atm), os valores obtidos em porcentagem de O₂ ou de CO₂ foram convertidos para pressão parcial do gás, segundo a fórmula $p_1/P = v_1\%/V\%$ (Feltre 1982), sendo:

p_1 = pressão parcial do gás (em atm);

P = pressão atmosférica local (em atm);

$v_1\%$ = volume do gás, em porcentagem;

$V\%$ = volume total (100%).

A seguir, baseando-se no volume das embalagens e na temperatura do ambiente de avaliação, os valores foram convertidos para μmol de O₂ e de CO₂, pela equação de Clapeyron, $p_1V = nRT$, sendo:

V = volume total de ar do frasco (em L);

n = número de mols do gás

R = constante universal dos gases perfeitos (0,082 atm L mol⁻¹ K⁻¹)

T = temperatura (em Kelvin)

Os valores obtidos nas avaliações foram divididos pela massa seca total da amostra e pelo tempo de incubação, obtendo-se o valor de O₂ ou CO₂ em micromols do gás por grama de massa seca, por dia ($\mu\text{mol gMS}^{-1} \text{ dia}^{-1}$). Foi calculado, também, o quociente respiratório (QR), ou seja, a razão entre a produção de CO₂ e o consumo de O₂ ($\text{QR} = \text{CO}_2 \text{ O}_2^{-1}$), conforme Kader & Saltveit (2002).

2.3. Tratamentos de incubação em PEG e secagens

Sementes da idade I0 não puderam ser incluídas nos tratamentos de secagem e incubação em PEG, em função da baixa capacidade germinativa, como será discutido posteriormente. As sementes das demais idades foram divididas em dois grupos. No primeiro, foram submetidas a secagens progressivas até que atingissem teores de água de 40%, 30%, 20% e 10% (doravante denominados, respectivamente, S40, S30, S20 e S10). Após as secagens, foram novamente avaliadas quanto ao teor de água, conteúdo de massa seca, potencial hídrico, germinação e taxas respiratórias, conforme descrito anteriormente. As secagens foram realizadas em estufa com circulação forçada de ar, regulada para 40 ± 2 °C, controlando-se a variação entre o peso inicial das sementes e o peso final calculado para cada teor de água pretendido. Na estufa, as sementes foram colocadas em prateleiras forradas com tela sombrite, em camadas simples sem sobreposição. A secagem foi intermitente, alternando-se períodos de 8 horas de secagem por 16 horas de repouso. Durante a fase de repouso as sementes foram acondicionadas em sacos de plástico perfurados e mantidas em geladeira a aproximadamente 7 °C até a retomada da secagem em estufa. Para nenhum tratamento foi necessário mais que um período de repouso.

No segundo grupo, visando à indução de tolerância à dessecação, as sementes foram incubadas em solução de polietilenoglicol 6000 (PEG) a -3 MPa (baseando-se nos resultados obtidos por Leduc *et al.* 2012), seguido das mesmas secagens e avaliações do grupo anterior. Para essa incubação, as sementes foram colocadas sobre duas folhas de papel de germinação previamente saturados com a solução de PEG, mantidas por 24 h a 25 °C e, então, enxaguadas rapidamente em água destilada e secas superficialmente com papel de germinação seco. A seguir, foram imediatamente secas em estufa até atingirem os níveis de secagem pré-estabelecidos, conforme descrito anteriormente.

Os processos envolvidos na obtenção dos tratamentos acima descritos estão ilustrados na figura 3.

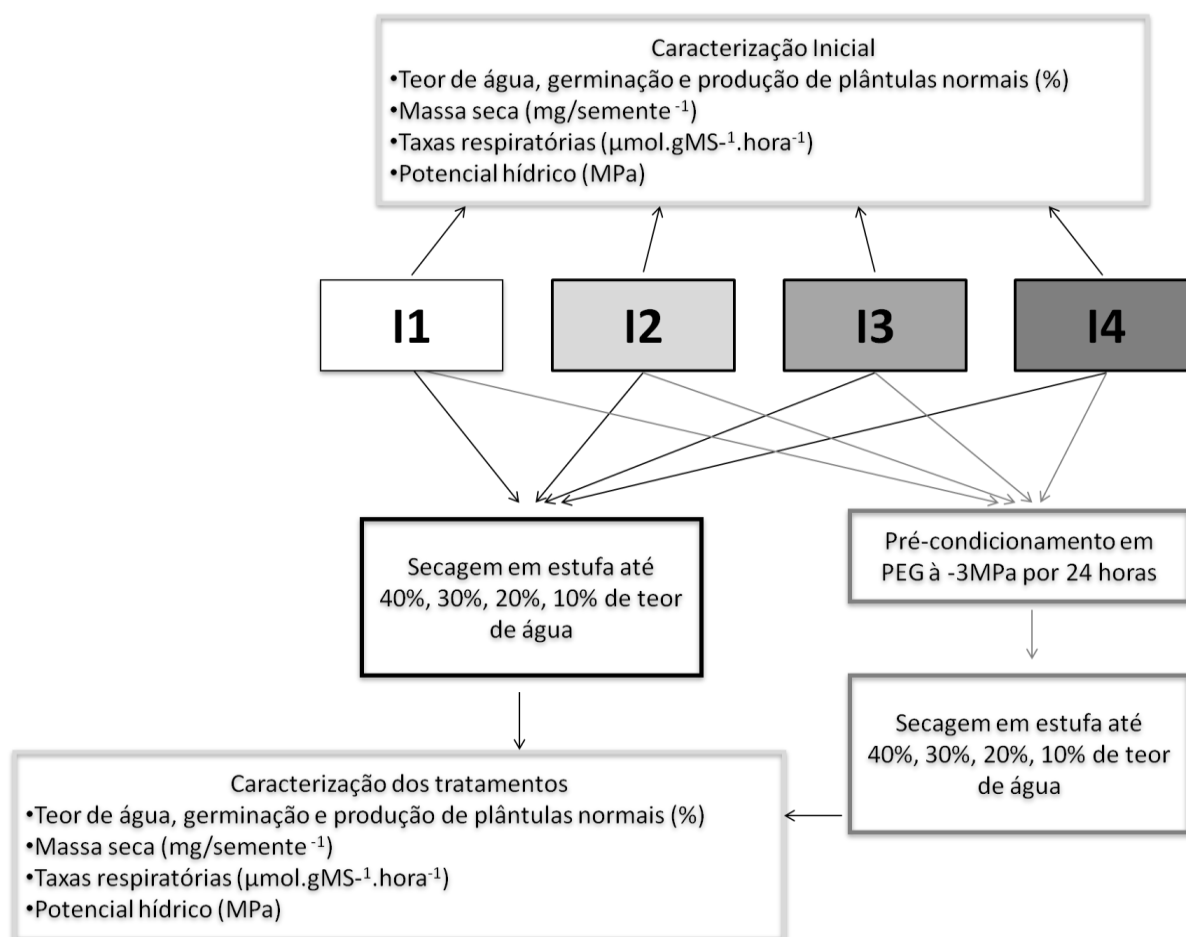


Figura 3. Procedimentos adotados para os tratamentos de secagem e indução de tolerância à dessecação com solução de PEG, em sementes de *C. echinata* de diferentes idades.

2.4. Delineamento experimental e tratamento estatístico

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 2 (níveis de secagem x condicionamento osmótico) dentro de cada idade, com quatro repetições de quinze sementes para os testes de germinação, três repetições de quinze sementes para as taxas respiratórias e três repetições de cinco sementes para teor de água, massa seca e potencial hídrico. Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando significativo, à comparação de médias pelo teste de Tukey, sempre ao nível de 5% (Ferreira 2008).

3. Resultados e discussão

O avanço da maturação das sementes de I0 a I4 resultou em redução progressiva no teor de água e aumento no conteúdo de massa seca (figura 4). Esses parâmetros têm sido considerados excelentes indicadores do ponto de maturação de um lote de sementes (Barbosa *et al.* 2015), pois o avanço no processo clássico de maturação de sementes frequentemente resulta em redução no teor de água, e o acúmulo de reservas eleva o conteúdo de massa seca (Marcos Filho 2015). No entanto, sementes de todas as idades estudadas no presente trabalho podem ser consideradas ainda imaturas pois, segundo Borges *et al.* (2005), a maturidade fisiológica de *C. echinata* é alcançada quando as sementes apresentam teor de água entre 30% e 40% e conteúdo de matéria seca em torno de 316 mg semente⁻¹, valores não atingidos no presente estudo (figura 4).

Simultaneamente à redução no teor de água com o avanço da maturação, as sementes apresentaram potencial hídrico progressivamente menor de I1 a I3 (figura 4). Tal fato demonstra um provável aumento dos sítios de ligação da água em função da maior quantidade de massa seca depositada. Os baixos valores desse potencial nas sementes de I0 podem ser resultado da imprecisão na avaliação, uma vez que a massa de sementes era muito pequena e pode ter sido insuficiente para atingir equilíbrio higroscópico com o ar da câmara de avaliação. As sementes do estágio de maturação mais precoce (I0) foram oriundas de frutos colhidos com menos de 30 DPA. Estas sementes ainda se encontravam no início do desenvolvimento, quando a transferência de reservas da planta-mãe para as sementes ocorre lentamente. O conteúdo médio de massa seca destas sementes foi próximo a 30 mg semente⁻¹ (figura 4), ou seja, menos de 1/6 da massa seca das sementes da última idade estudada (I4, com cerca de 190 mg semente⁻¹), indicando que tais sementes ainda estavam no início do seu desenvolvimento, quando a divisão e expansão celular são intensas com o propósito de conceber uma estrutura adequada para receber as substâncias de reserva (Egli 1994, Borges *et al.* 2005, Marcos Filho 2015). Ao se obterem os resultados da capacidade germinativa e produção de plântulas normais, este primeiro estágio de desenvolvimento (I0) não foi incluído nos tratamentos de secagem, pois as sementes apresentaram capacidade germinativa inicial muito baixa (germinação inferior a 40% e plântulas normais inferior a 20%, figura 4).

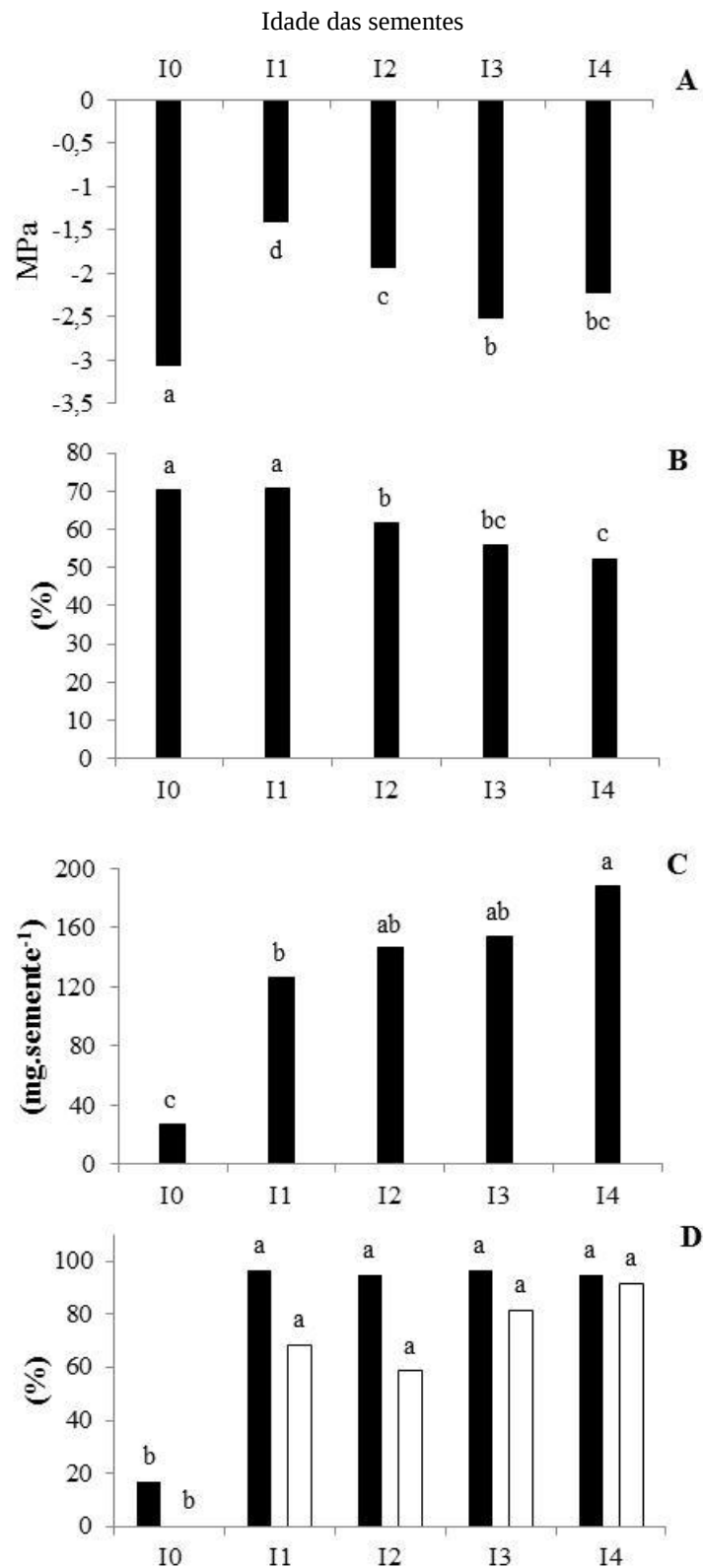


Figura 4. Características físicas e fisiológicas iniciais das sementes de *Caesalpinia echinata* de diferentes idades (I0, I1, I2, I3, I4). A. potencial hídrico (MPa); B. teor de água (%); C. conteúdo de matéria seca (mg.semente⁻¹); D. porcentagem de germinação (coluna preta) e de plântulas normais (coluna branca). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Na idade I1, as sementes estavam com potencial hídrico de -1,4 MPa (figura 4), indicando que suas células apresentaram água livre suficiente para realizar reações, ou seja, no tipo 5 descrito por Vertucci & Farrant (1995). Isso indica elevada atividade metabólica das sementes e, portanto, se não houver germinação, grande probabilidade de reações de deterioração acelerada (Marcos Filho 2015). Esse fenômeno que ocorre durante o desenvolvimento das sementes de uma espécie se assemelha ao que ocorre entre espécies com diferentes níveis de recalcitrância. Sementes com o comportamento recalcitrante, se não encontrarem condições ideais de germinação, deterioram-se com uma velocidade superior quando comparadas às sementes imaturas de espécies de comportamento ortodoxo (Barbedo & Marcos Filho 1998, Walters *et al.* 2013).

Apesar do potencial hídrico diminuir com o avanço da maturação das sementes, ainda permaneceu elevado, com água do tipo 4 (de -1,5 a -4,0 MPa, segundo Vertucci & Farrant 1995). Este estado de hidratação corresponde a graus de umidade favoráveis ao desenvolvimento das sementes durante sua maturação (Marcos Filho 2015). O metabolismo das sementes mantidas nesse estágio é pouco conhecido, mas sabe-se que há atividade de síntese protéica e de ácidos nucléicos, permitindo evolução em direção à germinação. Não havendo germinação, é altamente interessante que tais sementes sejam submetidas a rápida secagem, evitando sua acelerada deterioração (Barbedo *et al.* 2013).

A secagem das sementes das diferentes idades proporcionou valores de teor de água muito próximos aos almejados (tabela 1). Essas secagens levaram o nível de hidratação das sementes do tipo 4 (-1,5 a -4,0 MPa) para os tipos 3, em S40 (-4,0 a -11,0 MPa) e 2, em S30, S20 e S10 (-11 a -150 MPa), segundo Vertucci & Farrant (1995). Portanto, não foi atingido o tipo 1 (<-150 MPa), que seria o indicado para armazenamento de sementes ortodoxas (Walters 2015), mas em S10 foi superado o limite inferior considerado para separar sementes tolerantes e sensíveis à dessecação (Vertucci & Farrant 1995, Alpert 2005).

Após o tratamento com PEG, seguido de secagem, os valores de teor de água e de potencial hídrico não apresentaram grandes alterações, comportando-se, em geral, de forma semelhante às sementes não tratadas (tabela 1), exceto por uma ligeira diminuição no potencial hídrico das sementes secas até S10. Tal fato também foi observado por Leduc *et al.* (2012), que atribuíram essa ligeira diminuição a um provável aumento nos sítios de ligação, decorrente do tratamento com PEG.

Tabela 1. Teor de água (%) e potencial hídrico (MPa) de sementes de quatro idades (I1 a I4) de *Caesalpinia echinata* submetidas a quatro níveis de secagem (S40: 40%; S30: 30%; S20: 20%; S10: 10%), sem ou com tratamento prévio em solução de PEG.

Nível de secagem	Secagem sem pré-tratamento				Secagem após tratamento com PEG			
	I1	I2	I3	I4	I1	I2	I3	I4
Teor de água (%)								
S0	70,5aA	61,6aA	55,8aA	52,3aA	70,5aA	61,6aA	55,8aA	52,3aA
S40	-	39,6bA	38,5bA	35,5bA	-	39,5bA	40,1bA	39,2bB
S30	31,6bA	32,0cA	27,7cA	28,8cA	30,0bB	34,8cA	31,1cB	26,0cB
S20	18,7cA	19,1dA	21,1dA	20,9dA	17,8cB	21,4dA	20,0dA	17,6dB
S10	14,6dA	12,7dA	12,5eA	12,0eA	11,6dB	12,2eA	10,6eA	10,8eA
Potencial hídrico (-MPa)								
S0	1,4aA	1,9aA	2,5aA	2,2Aa	1,4aA	0,9aA	2,5aA	0,2aA
S40	-	7,4bA	5,6bA	7,7bA	-	7,7bA	5,7bA	5,8bA
S30	14,0bA	12,5cA	11,5cA	10,5cA	15,8bA	11,0cA	10,4cA	14,3cA
S20	38,2cA	39,2cA	24,5cdA	24,6cdA	38,3cA	26,7cA	25,5cA	32,9dB
S10	64,8dA	61,7cA	74,4dB	81,3dA	90,7dA	68,8cA	87,8cB	104,5dB

Durante a evolução do desenvolvimento das sementes de *C. echinata* foi observado que quanto maior o avanço no processo de maturação, ou seja, quanto mais maduras apresentaram-se, maior sua capacidade de tolerar a secagem e sobreviver a níveis de desidratação mais intensos (figura 5). Quanto mais avançada a idade das sementes, maior a quantidade de água a ser removida antes de se iniciarem os prejuízos na capacidade das sementes em manter suas porcentagens de germinação e de produção de plântulas normais. Tal fato já foi verificado para sementes de *C. echinata* (Leduc *et al.* 2012), mas também em outras espécies, sendo comportamento esperado (Castro *et al.* 2004).

As sementes de I1, que mantiveram relativamente elevada porcentagem de germinação até aproximadamente 18% de água, apresentaram elevada queda na germinação quando o teor caiu para, aproximadamente, 15%, e reduzindo em mais de três vezes a sua capacidade em produzir plântulas normais já nos primeiros níveis de secagem (tabela 1 e figura 5).

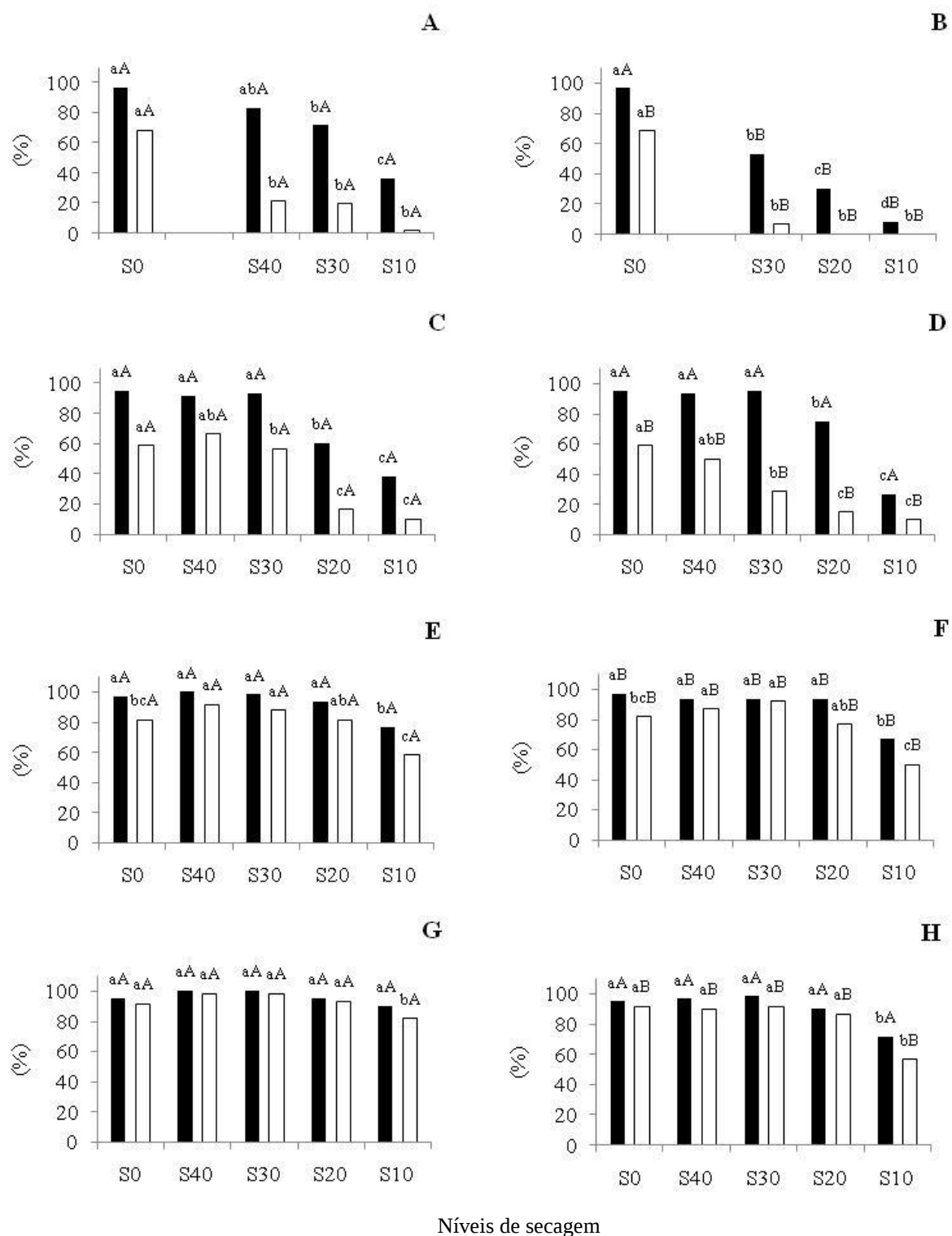


Figura 5. Porcentagem de germinação (colunas pretas) e de plântulas normais (colunas vazias) de sementes de *C. echinata* nas idades I1 (A e B), I2 (C e D), I3 (E e F) e I4 (G e H), em cinco níveis de hidratação (S0, S40, S30, S20 e S10), sem incubação em PEG (A, C, E e G) e com incubação (B, D, F e H). Médias seguidas pela mesma letra (minúscula para médias de secagem e maiúscula para médias do tratamento com PEG) não diferem entre si pelo teste de Tukey, 5%

O tratamento com PEG, nessas sementes, resultou em prejuízos já no primeiro nível de secagem, quando as sementes apresentavam aproximadamente 30% de água. Sua capacidade de produzir plântulas normais foi ainda mais reduzida, chegando a 7% no primeiro nível de secagem, e perdendo completamente a capacidade de produzir plântulas normais com a evolução do processo de secagem. Sendo assim, o tratamento osmótico com o intuito de aumentar os níveis de tolerância à dessecação, nessa idade, não só foram ineficazes como também se apresentaram prejudiciais, reduzindo as taxas de sobrevivência e vigor.

Com o avanço da maturação, sementes de I2 submetidas a secagem apresentaram um comportamento germinativo semelhante a I1, mantendo elevadas taxas germinativas quando secas até o segundo nível (S30). Conforme a redução nos níveis de desidratação foi ampliada, houve redução progressiva nas taxas germinativas. As sementes ainda mantiveram uma boa germinação (60%) quando o seu teor de água foi reduzido a 19% e chegou a 38% quando secas até 13%. No entanto, apesar de o comportamento germinativo entre essas duas idades ter se apresentado semelhante, o mesmo não ocorreu quando se observa sua capacidade de produzir de plântulas normais. As porcentagens de plântulas normais foram mantidas em mais da metade em S40 e S30. Essa taxa só apresentou queda significativa quando o teor de água do lote foi reduzido até 19%. E, quando secas à 13%, ainda produziram 10% de plântulas normais (figura 5, tabela 1).

O tratamento com PEG, nas sementes de I2, não apresentou efeito na germinação das sementes nos dois primeiros níveis de secagem (S40 e S30), quando os teores da água aproximados foram de 40 e 30% respectivamente. No entanto, em S20, com teores obtidos de 19% e 21%, o tratamento com PEG elevou as taxas de germinação de 60% para 75%. No nível mais avançado de secagem, em que as sementes atingiram cerca de 12% de água, houve redução na germinação. Apesar desse tratamento ter apresentado algum resultado na germinação, em relação a capacidade de produzir plântulas normais, o tratamento apresentou diferença maior no segundo nível de secagem quando a produção de plântulas normais reduziu de 57% (32% de água) para 28% (35% de água, figura 5, tabela 1).

As sementes de I3 já se apresentaram com maior tolerância à secagem que as idades anteriores, mantendo-se com máximo poder germinativo mesmo quando secas até 21%, e só foi significativamente reduzido quando suas sementes apresentavam 13% de água, em que sua germinação foi de 77%. A secagem das sementes desta idade até 39% a 28%, foi profícua para o aumento do vigor, já que a produção de plântulas normais foi aumentada, quando comparada ao controle sem secagem (figura 5, tabela 1).

A última idade avaliada, mais próxima do ponto de maturidade fisiológica descrito por Borges *et al.* (2005), porém ainda imatura, já se apresentou tolerante à secagem até altos níveis de desidratação, quando seu teor de água foi reduzido à 12%. A porcentagem de germinação nesse momento foi muito elevada (90%), com 82% de plântulas normais. Esses dois fatores em níveis ótimos não haviam sido atingidos nas outras idades estudadas no presente estudo. Quando as sementes de I4 foram submetidas ao tratamento com PEG, houve prejuízo tanto na taxa germinativa quanto na capacidade de produzir plântulas normais, apresentando-se adverso nesse ponto da maturação. Resultados inconsistentes do tratamentos com PEG em sementes imaturas foram obtidos em trabalhos anteriores, inclusive com a própria *C. echinata* (Silva 2010). De acordo com o modelo proposto por Barbedo *et al.* (2013), processos artificiais de indução ao amadurecimento, aplicados a sementes imaturas isoladas, podem alterar ligeiramente sua tolerância à dessecação e sua longevidade. No entanto, este efeito teria limites estreitos, não se comparando aos obtidos com o amadurecimento na planta-mãe. Portanto, as distorções observadas nos resultados de tratamento com PEG, ora beneficiando, ora prejudicando, parecem enquadrar-se dentro desse modelo.

Em relação às trocas gasosas, medidas para sementes de *C. echinata* de diferentes idades (figuras 6 e 7), verificou-se que tanto o consumo de O₂ quanto a liberação de CO₂ foram tanto menores quanto mais maduras as sementes, indicando redução na atividade metabólica com o avanço da maturação.

Com a secagem, sementes de I1 apresentaram redução na liberação de CO₂ em qualquer nível de hidratação, enquanto as taxas de O₂ reduziram conforme o avanço no processo de secagem. Isso resultou, até o terceiro nível de secagem, em redução nos valores de QR, que chegaram a ser inferiores a 0,4 (figura 8). Valores muito baixos de QR sugerem a presença de processos oxidativos não relacionados com a respiração, como observados para sementes recalcitrantes de *Inga vera* (Bonjovani 2011) e mesmo para de *C. echinata* armazenadas em temperatura ambiente (Lamarca & Barbedo 2012). Analisando-se esses resultados, juntamente com os referentes à germinação, no qual se nota a substancial redução da capacidade germinativa e de produção de plântulas normais (figuras 4 e 5), pode-se inferir que a secagem resultou em danos na capacidade respiratória das sementes, aumentando processos oxidativos não relacionados com a obtenção de energia.

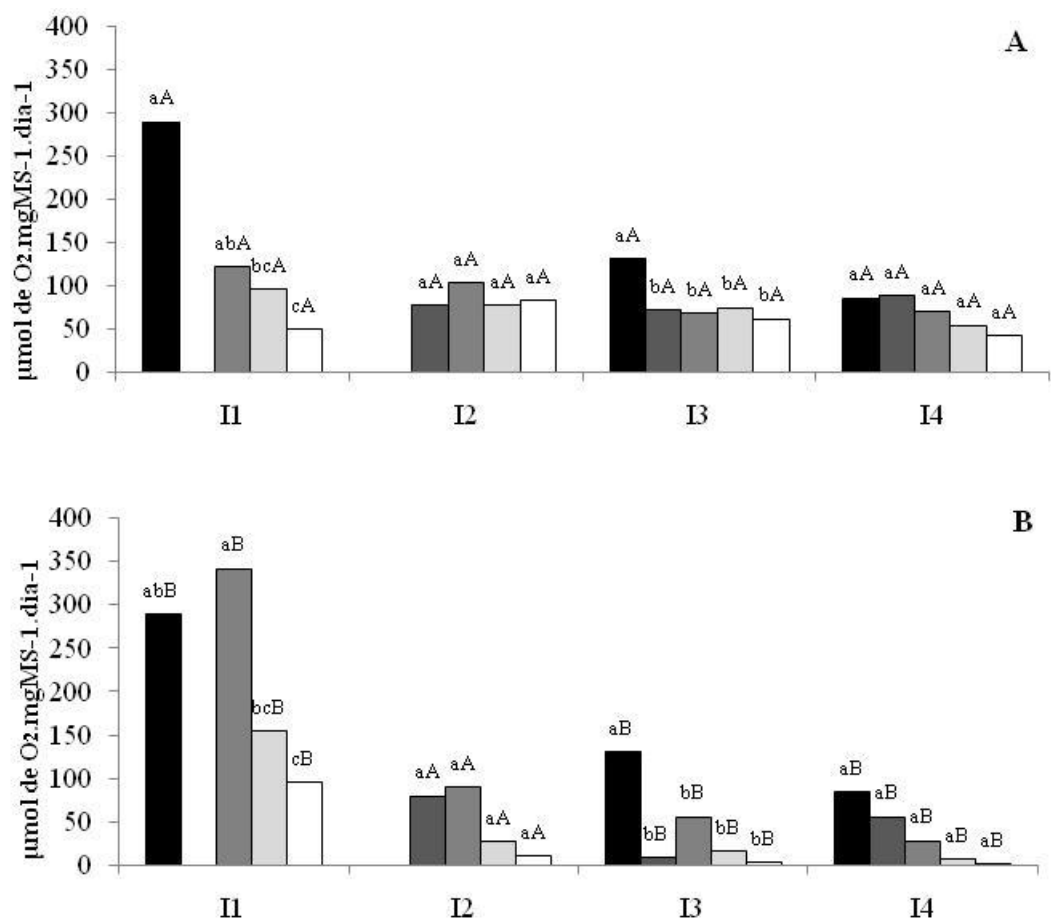


Figura 6. Oxigênio (O₂, em $\mu\text{mol mgMS}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) consumido por sementes de *C. echinata* de diferentes idades (I1, I2, I3 e I4), em cinco estádios de hidratação (S0: colunas pretas; S40: colunas cinza escuro; S30: colunas cinza médio; S20: colunas cinza claro; S10: : colunas vazias), sem tratamento com PEG (A) ou tratadas (B). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas comparam as secagens dentro de uma dada idade e maiúsculas comparam o uso de PEG em uma dada secagem) não diferem entre si pelo teste de Tukey, 5%.

As sementes de I2, por sua vez, apresentaram, em quaisquer níveis de secagem, QR inferior a 0,5 (figura 8) indicando a existência de outros processos oxidativos que não propriamente a respiração (Bonjovani 2011).

A liberação de CO₂ em S20 (figura 7) reduz tanto quando comparados aos mesmos níveis de secagem da idade anterior, quanto comparado ao primeiro e segundo níveis de secagem na mesma idade. A liberação de O₂ (figura 6), por sua vez, se mostrou sem muita alteração durante todos os níveis de secagem, o que mostra um aumento na quantidade de O₂ não utilizado em respiração aeróbica conforme a continuação da secagem e mantendo-se constante em S20 e S10, exatamente quando há redução na liberação de CO₂. O O₂

consumido não estava, portanto, sendo direcionado apenas à respiração aeróbica nas mitocôndrias.

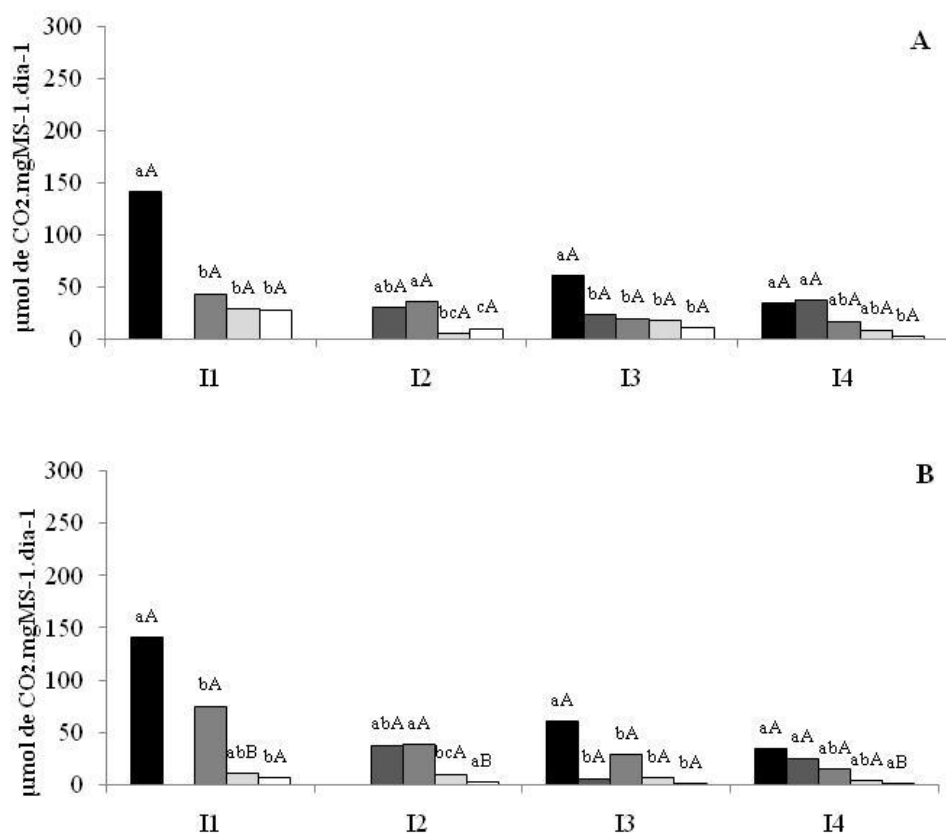


Figura 7. Dióxido de carbono (CO_2 , em $\mu\text{mol mgMS}^{-1} \text{dia}^{-1}$) liberado por sementes de *C. echinata* de diferentes idades (I1, I2, I3 e I4), em cinco estádios de hidratação (S0: colunas pretas; S40: colunas cinza escuro; S30: colunas cinza médio; S20: colunas cinza claro; S10: colunas vazias), sem tratamento com PEG (A) ou tratadas (B). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas comparam as secagens dentro de uma dada idade e maiúsculas comparam o uso de PEG em uma dada secagem) não diferem entre si pelo teste de Tukey, 5%.

A partir do início da secagem das sementes de I3 pode-se observar uma redução na liberação de CO_2 (figura 7). Quando não secas, essas sementes liberavam $2,534 \mu\text{mol g}^{-1} \text{dia}^{-1}$ ao consumo de $5,416 \mu\text{mol g}^{-1} \text{dia}^{-1}$ de O_2 (figura 6) e, com o início do processo de secagem, houve consumo de $2,974 \mu\text{mol g}^{-1} \text{dia}^{-1}$ de O_2 liberando apenas $0,967 \mu\text{mol g}^{-1} \text{dia}^{-1}$ de CO_2 . O QR apresentou queda constante durante o avanço na secagem (figura 8). Essa idade, em fase mais próxima ao ponto de maturação fisiológica do que as duas anteriores, mostrou redução das taxas respiratórias conforme a redução de água em seu conteúdo enquanto o oxigênio não utilizado em respiração aeróbica (figura 9) permaneceu praticamente constante durante a

secagem das sementes, apresentando um pequeno aumento apenas no terceiro nível de secagem.

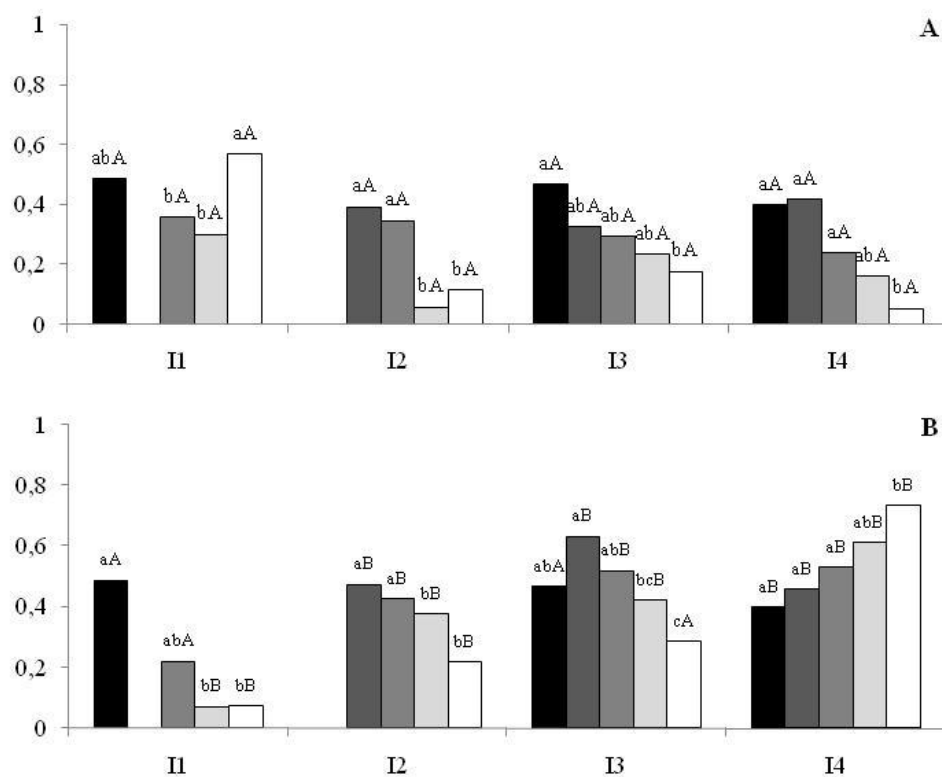


Figura 8. Quociente respiratório (QR) em sementes de *C. echinata* de diferentes idades (I1, I2, I3 e I4), em cinco estádios de hidratação (S0: colunas pretas; S40: colunas cinza escuro; S30: colunas cinza médio; S20: colunas cinza claro; S10: colunas vazias), sem tratamento com PEG (A) ou tratadas (B). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas comparam as secagens dentro de uma dada idade e maiúsculas comparam o uso de PEG em uma dada secagem) não diferem entre si pelo teste de Tukey, 5%.

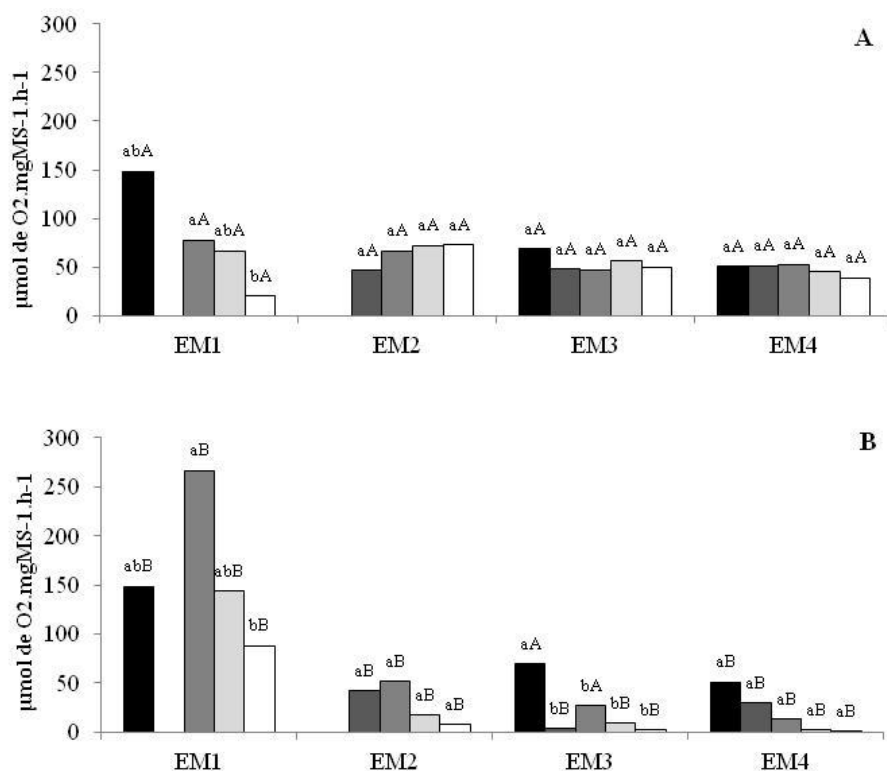


Figura 9. Oxigênio não utilizado em vias de respiração aeróbica em sementes de *C. echinata* de diferentes idades (I1, I2, I3 e I4), em cinco estádios de hidratação (S0: colunas pretas; S40: colunas cinza escuro; S30: colunas cinza médio; S20: colunas cinza claro; S10: colunas vazias), sem tratamento com PEG (A) ou tratadas (B). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas comparam as secagens dentro de uma dada idade e maiúsculas comparam o uso de PEG em uma dada secagem) não diferem entre si pelo teste de Tukey, 5%

Nas sementes de I4, conforme houve avanço da secagem reduziu-se lenta e proporcionalmente o consumo de O_2 e a liberação de CO_2 . Os dados de oxigênio não utilizado na respiração aeróbica (figura 9) auxiliam a compreender que, nesse ponto, ao serem secas, as sementes reduzem as suas taxas respiratória sem que haja aumento no consumo de oxigênio para utilização em processos que não a respiração anaeróbica. Ou seja, provavelmente os processos deteriorativos nessa idade sejam menores quando as comparamos às idades mais prematuras.

Quanto ao tratamento com PEG, em I1, no segundo nível de secagem, houve grande aumento tanto na liberação de CO_2 quanto no consumo de O_2 quando comparada a mesma idade seca a teor de água semelhante, sem incubação prévia em solução de PEG. Esse aumento na atividade respiratória pode indicar situação de estresse, previsto na avaliação do vigor de sementes em testes de tetrazólio (Lamarca *et al.* 2009). Nos níveis de secagem S20 e S10, essas taxas, assim como o QR e as taxas de oxigênio não utilizado em respiração

aeróbica, reduziram significativamente em relação à primeira secagem nesse tratamento (S30). Porém, quando comparadas à mesma idade sem incubação prévia em solução de PEG, as taxas de consumo de O_2 foram mais intensas, alterando o QR que se apresentou menor em todos os níveis de secagem. Nesse mesmo contexto, as taxas de oxigênio não utilizado em respiração aeróbica apresentaram-se maiores em todos os níveis de secagem. Isso indica redução nos processos respiratórios mas não necessariamente em seu metabolismo já que as taxas de consumo de O_2 se mostraram intensas e consonante aos resultados obtidos na germinação retratando esse tratamento prejudicial durante esse estágio de desenvolvimento.

As sementes de I2 e I3, secas após incubação em PEG, apresentaram comportamento semelhante, porém em diferentes proporções devido ao seu estágio de maturação. Apresentaram QR decrescente durante o avanço na secagem, chegando a valores mínimos no último nível de secagem (S10); e, quando comparados aos mesmos tratamentos sem tratamento osmótico, todos os valores de QR se apresentaram maiores (figura 8). Todas as taxas de oxigênio não utilizado em respiração aeróbica foram menores nesses tratamentos, mostrando que o oxigênio consumido nessas fases da maturação durante a secagem após pré-condicionamento osmótico em PEG foram mais direcionados às reações de respiração aeróbica do que para outras vias, em comparação as mesmas idades sem prévio tratamento com PEG. É importante ressaltar que em um ponto em comum nas idades I2 e I3, quando secas no segundo nível de secagem, apresentando 35% e 31% de água respectivamente, essas apresentaram consumo de oxigênio não utilizado em respiração aeróbica maior do que nos outros níveis de secagem no mesmo tratamento (figura 9).

As sementes de I4, quando passaram por solução de PEG apresentaram aspectos diferentes de todos os outros níveis de desenvolvimento, estando aparentemente mais estruturadas. Já no primeiro nível de secagem apresentaram taxas de consumo de O_2 e liberação de CO_2 reduzidos em comparação a essa idade sem tratamento osmótico (figuras 6 e 7). Esse comportamento foi progredindo, apresentando redução conforme o avanço da secagem. Os valores de QR, durante a secagem, apresentaram-se crescentes (figura 8). Já as taxas de oxigênio não utilizado em respiração aeróbica (figura 9) ficaram com valores mais próximos de zero quando comparada a qualquer outro tratamento aqui realizado, evidenciando que o oxigênio consumido durante essa fase de desenvolvimento, após incubação em PEG na pré-secagem das sementes, foi praticamente direcionado para os processos de respiração aeróbica estando menos presente em outras vias metabólicas.

4. Considerações finais

Conforme o exposto neste trabalho, a tolerância à dessecação foi adquirida progressivamente durante o desenvolvimento das sementes de *C. echinata*, como previsto pela literatura. A capacidade de produzir plântulas normais se mostrou um parâmetro tecnológico mais confiável do que a germinação para a compreensão do momento em que as sementes passam a sobreviver à secagem. Mesmo quando são inicialmente viáveis com elevadas taxas de sobrevivência, como é o caso das sementes aqui avaliadas, quanto mais imaturas, mais rapidamente perdem o vigor quando expostas ao estresse da secagem. Ainda que as sementes mais imaturas permaneçam viáveis até certo conteúdo de água, quando a secagem foi mais intensa tais sementes perderam a capacidade de produzir plântulas normais, apresentando em diferentes pontos da maturação características que se assemelham aos comportamentos encontrados em espécies com sementes recalcitrantes ou com diferentes níveis de recalcitrância.

No entanto, os parâmetros tecnológicos, como a germinação e capacidade de produzir plântulas normais, ainda se mostraram insuficientes para o correto diagnóstico das alterações decorrentes da secagem. Por outro lado, as taxas respiratórias acrescentaram substancial contribuição na compreensão das alterações. Por exemplo, a indução da tolerância à dessecação com solução de PEG não alterou substancialmente as porcentagens de germinação e plântulas normais. Contudo, quando se analisa o consumo e liberação de gases envolvidos em processos respiratórios e oxidativos, verificaram-se importantes diferenças no metabolismo das sementes quando sofreram incubação em solução de PEG (-3MPa) a partir de I2. As sementes de I4 apresentaram expressiva redução no consumo de O₂ direcionado às vias de oxidação que não a respiração durante a secagem quando passaram por pré-condicionamento em PEG, quando comparada às sementes da mesma idade sem o tratamento, representando que o metabolismo de vias que envolvem oxigênio foi reduzido. Lamarca & Barbedo (2012) demonstraram que a rápida deterioração das sementes de *C. echinata* armazenadas sem refrigeração ou congelamento está relacionada com processos oxidativos não voltados à respiração. Quanto mais se reduz a temperatura de armazenamento, menor a ação desses processos e mais longo pode ser o armazenamento dessas sementes. No presente trabalho verificou-se que o tratamento com PEG aparentemente também pode reduzir esse efeito deletério de processos oxidativos em sementes de *C. echinata*. Tal fato pode trazer importante contribuição à conservação das sementes dessa importante espécie arbórea tropical sem o elevado custo do uso da refrigeração ou congelamento.

Além disso, a redução de metabolismo em sementes ortodoxas imaturas com pré-condicionamento em PEG, especialmente o relacionado com processos oxidativos não respiratórios, pode ter simulado, em parte, processos envolvidos com a própria maturação das sementes. Conforme as sementes amadurecem, também são ampliados e aperfeiçoados os sistemas antioxidantes, preparando a semente para a fase de secagem da maturação que envolverá ação intensa de espécies reativas de oxigênio. Esse fato reforça o modelo proposto por Barbedo *et al.* (2013) da similaridade entre sementes denominadas recalcitrantes com as ortodoxas imaturas. Porém, também conforme previsto por Barbedo *et al.* (2013), o tratamento com soluções osmóticas, apesar de prolongar as condições adequadas para um avanço no desenvolvimento das sementes, não tem capacidade de atingir comportamento idêntico ao encontrado em sementes que permaneceram na planta-mãe até estádios mais avançados de maturação. Futuros estudos visando a prolongar essas características em sementes ortodoxas imaturas podem ampliar a compreensão do comportamento recalcitrante nas mesmas condições.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alpert P.** 2005. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integrative and Comparative Biology* 45: 685-695.
- 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.
- Araújo Neto, J.C.; Aguiar, I.B. & Ferreira, V.M.** 2003. Efeito da temperatura e da luz na germinação de sementes de *Acacia polyphylla* DC. *Revista Brasileira de Botânica* 26: 249-256.
- Barbedo, C.J. & Bilia, D.A.C.** 1998. Evolution of research on recalcitrant seeds. *Scientia Agricola* 55(SPE): 121-125.
- Barbedo, C.J. & Marcos Filho, J.** 1998. Tolerância à dessecação em sementes. *Acta Botanica Brasilica* 12: 145-164.
- Barbedo, C.J.; Bilia, D.A.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *Revista Brasileira de Botânica* 25: 431-439.
- Barbedo, C.J.; Centeno, D.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2013. Do recalcitrant seeds really exist? *Hoehnea* 40: 583-593.
- Barbosa, J.M.; Rodrigues, M. A.; Barberio, M.; & Araujo, A.C.F.B.** 2015. Maturação de sementes de espécies florestais tropicais. *In*: Piña-Rodrigues, F.C.M.; Figliolia, M.B. & Silva, A. (eds). *Sementes Florestais Tropicais: da ecologia à produção*. Abrates, Londrina, pp. 180-189.
- Berjak, P. & Pammenter, N.** 2000. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 22-55.
- Berjak, P., & Pammenter, N. W.** 2013. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Frontiers in plant science*, 4.
- Berjak, P.; Vertucci, C.W. & Pammenter, N.W.** 1993. Effects of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation sensitivity in recalcitrant seeds of *Camellia sinensis*. *Seed Science Research* 3: 155-166.
- Bewley, J. D. & Black, M.** 1994. *Seeds: physiology of development and germination*. 2 ed: Plenum, New York.
- Bewley, J.D.; Bradford, K.J.; Hilhorst, H.W.M. & Nonogaki, H.** 2013. Longevity, storage, and deterioration. *In* J.D. Bewley, K.J. Bradford, H.W.M. Hilhorst & H. Nonogaki

- (eds.). Seeds: physiology of development, germination and dormancy. 3ed. Springer, New York, pp. 341-376.
- Black, M.; Corbineau, F.; Gee, H. & Côme, D.** 1999. Water content, raffinose and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. *Plant Physiology* 120:463-471.
- Blackman, S.A.; Wettlaufer, S.H.; Obendorf, R.L. & Leopold, A.C.** 1991. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean seeds. *Plant Physiology* 96:868-874.
- Bonjovani, M.R. & Barbedo, C.J.** 2008. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. toleram temperatura sub-zero. *Revista Brasileira de Botânica* 31: 345-356.
- Bonjovani, M. R.** 2011. Taxa respiratória em sementes recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) TD Pennington. Tese de doutorado, Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu.
- Borges, I.F.; Giudice, J.D.; Bilia, D.A.C.; Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Barbedo, C.J.** 2005. Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 851-861.
- Borisjuk, L. & Rolletschek, H.** 2008. The oxygen status of the developing seed. *New Phytologist* 182: 17-30.
- 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.
- Bradford, K.J.** 1990. A water relation analysis of seed germination rates. *Plant Physiology* 94: 840-849.
- Brasil.** 1981. Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L6938.htm. Acesso em 17 de Novembro de 2015.
- Brasil.** 2008. Presidência da república. Casa Civil. Plano Amazônia Sustentável: Diretrizes para o desenvolvimento sustentável da Amazônia Brasileira.: Ministério do Meio Ambiente, Brasília.

- Brasil.** 2009. Regras para análise de sementes. Ministério Da Agricultura, pecuária e Abasteciment,. Brasília
- Buckeridge, M. S., Aidar, M. P. M., Santos, H. D., & Tiné, M. A. S.** 2004. Acúmulo de reservas. *In:* Ferreira, A. G., & Borghetti, F. (eds). Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre, pp 31-50.
- Caccere, R.; Teixeira, S.P.; Centeno, D.C.; Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Braga, M.R.** 2013. Metabolic and structural changes during early maturation of *Inga vera* seeds are consistent with the lack of a desiccation phase. *Journal of Plant Physiology* 170: 791-800.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J.** 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4.ed. Funep, Jaboticabal.
- Carvalho, L.F.; Medeiros-Filho, S.; Rossetti, A.G. & Teófilo, E.M.** 2000. Condicionamento osmótico em sementes de sorgo. *Revista Brasileira de Sementes* 22: 185-192.
- Carvalho, L. R.; Amaral Da Silva, E. A. & Davide, A. C.** 2006. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no Armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, 28: 15-25.
- Castro, Y.G.P. & Krug, H.P.** 1951. Experiencias sobre germinacao e conservacao de sementes de *Inga edulis*, especie usada em sombreamento em cafeeiros. *Ciencia e Cultura* 3: 263-264.
- Castro, R.D.; Bradford, K.J.& Hilhorst, H.M.** 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. *In:* A.G. Ferreira & F. Borghetti, (eds.) Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre. 51-67.
- Crookston, R. K. & Hill, D. S.** 1978. A visual indicator of the physiological maturity of soybean seed. *Crop Science*. 18:867-870.
- Davide, A.C.; Carvalho, L.R & Carvalho, M.L.M.; Guimarães, R.M.** 2003. Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais pertencentes à família lauraceae quanto à capacidade de armazenamento. *Cerne*, Lavras, 9 : 29-35.
- Daws, M.I.; Lydall, E.; Chmielarz, P.; Leprince, O.; Matthews, S.; Thanos, C.A. & Pritchard, H.W.** 2004. Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastanum* across Europe. *New Phytologist* 162: 157-166.
- Daws, M.I.; Cleland, H.; Chmielarz, P.; Gorin, F.; Leprince, O.; Matthews, S.; Mullins, C.E.; Thanos, C.A.; Vandvik, V. & Pritchard, H.W.** 2006. Variable desiccation

- tolerance in *Acer pseudoplatanus* seeds in relation to developmental conditions: a case of phenotypic recalcitrance? *Functional Plant Biology* 33: 59-66.
- Decagon.** 2001. WP4 Dewpoint PotentaMeter Operator's Manual. Pullman: Decagon Devices, Inc.
- Delgado, L.F. & Barbedo, C.J.** 2012. Water potential and viability of seeds of *Eugenia* (Myrtaceae), a tropical tree species, based upon different levels of drying. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55: 583-590
- Delouche, J.C.** 1971. Seed maturation. *In: HANDBOOK of seed technology.*: Mississippi State University, Mississippi. pp.17-21.
- Dode, J.S.; Meneghello, G.E.; Moraes, D.M. & Peske, S.T.** 2012. Teste de respiração para avaliar a qualidade fisiológica de sementes de girassol. *Revista Brasileira de Sementes* 34: 686-691.
- Egli, D.E.** 1994. Seed growth and development. *In: Boote, K. J.; Bennett, J. M.; Sinclair, T. R. & Paulsen, G. M. (eds.). Physiology and determination of crop yield.*: American Society of Agronomy, Madison. pp.127-148.
- Egli, D.B.** 1998. Seed biology and the yield of grain crops. CAB International, New York.
- Egli, D.B. & Tekrony, D.M.** 1997. Species differences in seed water status during seed maturation and germination. *Seed Science Research*, Wallingford, 7: 3-11.
- Ellis, R.H. & Pietra Filho, C.** 1992. Seed development and cereal seed longevity. *Seed Science Research* 2: 9-15.
- Ellis, R.H.; Hong, T.D. & Roberts, E.H.** 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? *Coffee. Journal of Experimental Botany* 41:1167-1174.
- Fait, A.; Angelovici, R.; Less, H.; Ohad, I.; Urbanczyk-Wochniak, E.; Fernie, A.R. & Galili, G.** 2006. Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology* 142: 839-854.
- FAO.** 2013. Genebank standards for plant genetic resources for food and agriculture. FAO, Roma.
- Faria, J.M.R.** 2006. Desiccation tolerance and sensitivity in *Medicago truncatula* and *Inga vera* seeds. Tese de doutorado, Wageningen University, Wageningen.
- Farrant, J.M.; Berjak, P. & Pammenter, N.W.** 1992. Proteins in development and germination of desiccation-sensitive (recalcitrant) seed species. *Plant Growth Regulation* 11: 257-265.
- Feltre, R.** 1982. Química geral. 2.ed. Moderna. São Paulo.

- Ferreira, D.F.** 2008. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium* 6: 36-41.
- Franco, N. & Yojo T.** 2008 Propriedades físicas, mecânicas e acústicas da madeira de pau-brasil. *In: Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.; Barbedo, C.J.; Alves, E.S.; Domingos, M. & Braga, M.R. (eds.). Pau-brasil: da semente à madeira: conhecer para preservar. Instituto de Botânica São Paulo, pp.154-158*
- Gunn, R. B. & Christensen, R..** 1965. Maturity relationships among early to late hybrids of maize (*Zea mays* L.). *Crop Science* 4: 299-301.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A.; Handa, S. & Handa, A.K.** 1984. Cellular mechanisms of tolerance to water stress. *HortScience* 19: 371-377.
- Hellmann, M.E.; Mello, J.I.O.; Figueiredo-Ribeiro; R.C.L. & Barbedo, C.J.** 2006. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 91-99.
- Hong, T.D.; Ellis, R.H.** 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. IPGRI, Rome.
- Kader, A.A. & Saltveit, M.E.** 2002. Respiration and gas exchange. *In: J.A. Bartz, J.K. Brecht & J. Weichmann. Postharvest physiology and pathology of vegetables. Marcel Dekker, New York, pp.7-29.*
- Kermode, A.R.** 1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Reviews in Plant Sciences* 9: 155-195.
- Kidd, F.** 1914. The controlling influence of carbon dioxide in the maturation, dormancy and germination of seeds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 7: .408-421.
- Kranner, I. & Birtic, S.** 2005. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integrative and Comparative Biology* 45: 734-740.
- Lamarca, E.V. & Barbedo, C.J.** 2012. Short storability of *Caesalpinia echinata* Lam. seeds as a consequence of oxidative process. *Hoehnea* 39: 577-586.
- Lamarca, E. V., & Barbedo, C. J.** 2015. Sensibilidade à dessecação de embriões de *Inga vera* Willd. Formados sob diferentes condições ambientais. *Revista Árvore*, 39: 1083-1092.
- Lamarca, E. V., Leduc, S. N. M., & Barbedo, C. J.** 2009. Viability and vigor of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam.(brazilwood-Leguminosae) by tetrazolium test. *Brazilian Journal of Botany* 32: 793-803.

- Lamarca, E.V.; Silva, C.V. & Barbedo, C.J.** 2011. Limites térmicos para a germinação em função da origem de sementes de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) nativas do Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 25: 293-300.
- Lamarca, E.V., Prata, J.S.; Borges, I.F.; Delgado, L.F.; Teixeira, C.C.; Camargo, M.B.P., Faria, J.M.R. & Barbedo, C.J.** 2013. Maturation of *Eugenia pyriformis* seeds under different hydric and thermal conditions. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 85: 223-233.
- Leduc, S.N.M.; Silva, J.P.N.; Gaspar, M.; Barbedo, C.J. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2012. Non-structural carbohydrates of immature seeds of *Caesalpinia echinata* (Leguminosae) are involved in the induction of desiccation tolerance. *Australian Journal of Botany* 60: 42-48.
- Leopold, A. C., Vertucci, C. W., Stanwood, P. C., & McDonald, M. B.** 1989. Moisture as a regulator of physiological reaction in seeds. In: P.C. Stanwood & M.B. McDonald (eds.) *Seed moisture*, pp.51-67.
- Leprince, O.; Hendry, G. A. F. & Mckersie, B. D.** 1993. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seed. *Seed Science Research*. 3: 231-246.
- 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.** 2015. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. 2.ed. ABRATES, Londrina.
- Mariath, J.E.A.; Santos, R.P. & Bittencourt Jr., N.S.** 2006. Flor. In: B. Appezato-da-Glória & S.M. Carmello-Guerreiro (eds.). *Anatomia Vegetal*. 2.ed. Ed. UFV, Viçosa, pp. 329-373.
- Martini-Neto, N. & Barbedo, C.J.** 2015. Viability of brazilwood seeds (*Caesalpinia echinata* Lam.) stored at room temperature in controlled atmospheres. *Journal of Seed Science* 37: 93-101.
- Mello, J.I.O. & Barbedo, C.J.** 2007. Temperatura, luz e substrato para germinação de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae - Caesalpinioideae). *Revista Árvore* 31: 645-655.
- Mello, J.I.O.; Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Barbedo, C.J.** 2013. Sub-zero temperature enables storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. *Journal of Seed Science* 35: 519-523.

- MMA.** 2015. Conservação In situ, ex situ e on farm. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conservacao-e-promocao-do-uso-da-diversidade-genetica/agrobiodiversidade/conserva%C3%A7%C3%A3o-in-situ,-ex-situ-e-on-farm> (acesso em 03/08/2015).
- Newton, R.J.; Hay, F.R.. & Ellis, R.H.** 2013. Seed development and maturation in early spring-flowering *Galanthus nivalis* and *Narcissus pseudonarcissus* continues post-shedding with little evidence of maturation. *In planta. Annals of Botany* 111: 945-955.
- Pagnotta, S.E. & Bruni, F.** 2006. The glassy state of water: a 'stop and go' device for biological processes. *In: G.H. Pollack, I.L. Cameron & D.N. Wheatley (eds.). Water and the cell.* Springer, Dordrecht, pp. 93-112
- 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. & Berjak, P.** 2000. Aspects recalcitrant seed physiology. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal.* 12:56-69.
- Pammenter, N.W.; Naidoo, S. & Berjak, P.** 2003. Desiccation rate, desiccation response and damage accumulation: can desiccation sensitivity be quantified? *In: G. Nicolás, K.J. Bradford, D. Côme & H.W. Pritchard (eds.). The biology of seeds: recent research advances.* CAB International, Cambridge.pp.319-325.
- Perl, M.** 1986. ATP synthesis and utilization in the early stage of seed germination in relation to seed dormancy and quality. *Physiologia Plantarum* 66: 177-182.
- Popinigis, F.** 1985. Fisiologia da semente. 2.ed.: ABRATES, Londrina.
- Ricci, N.; Pacheco A. C.; Conde, A. S. & Custódio. C. C.** 2013. Qualidade de sementes de pimenta jalapenho em função da maturação e tempo de permanência nos frutos. *Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia.* 43: 123-129.
- 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.
- Rocha, Y.T.; Del Giudice Neto, J.; Alves, E.S.; Barbedo, C.J.; Domingos, M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2008. *In: Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.; Barbedo, C.J.; Alves, E.S.; Domingos, M. & Braga, M.R. (eds.). Pau-brasil: conhecer para conservar. Ciência Hoje* pp 22-29.

- Royal Botanic Gardens Kew.** 2015. Seed information database (SID). Version 7.1. Disponível em: <http://data.kew.org/sid/> (acesso em 11/11/2015).
- Sarmiento, M.B. & Villela, F.A.** 2010. Sementes de espécies florestais nativas do Sul do Brasil. Informativo ABRATES 20: 39-44.
- Silva, J.P.N.** 2010. Mecanismos de controle de controle de tolerância à dessecação em sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) e de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth). Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Silva, A. & Ferraz, I.D.K.** 2015. Armazenamento de sementes. In: Piña-Rodrigues, F.C.M.; Figliolia, M.B.; Silva, A. (eds.) Sementes florestais tropicais: da ecologia à produção. ABRATES, Londrina pp.219-242.
- Slageren, M.W.** 2003. The millennium seed bank: building partnerships in arid regions for the conservation of wild species. *Journal of Arid Environments*, 54: 195- 201.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2004. Fisiologia vegetal. 3.ed. Artmed, Porto Alegre.
- Tekrony, D.M.; Egli D.B.** 1997. Accumulation of seed vigour during development and maturation. In: Ellis, R., Black, M., Murdoch, A., & Hong, T. D. (eds). Basic and applied aspects of seed biology. Springer Netherlands pp.369-384.
- Usberti, R.; Roberts. E.H. & Ellis, R.H.** 2006. Prediction of cottonseed longevity. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41:1435-1441.
- Vasquez, G.H.** 1995. Condicionamento fisiológico de sementes de soja: efeitos sobre germinação, vigor e potencial de armazenamento. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Verdier, J.; Lalanne, D.; Pelletier, S.; Torres-Jerez, I.; Righetti, K.; Bandyopadhyay, K.; Leprince, O.; Chatelain, E.; Vu, B.L.; Gouzy, J.; Gamas, P.; Udvardi, M.K. & Buitink, J.** 2013. A regulatory network-based approach dissects late maturation processes related to the acquisition of desiccation tolerance and longevity of *Medicago truncatula* seeds. *Plant Physiology*. 163: 757-774
- Vertucci, C.W. & Farrant, J.M.** 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: Kigel, J.; Galili, G. (eds.). Seed development and germination. New York/ Basel/ Hong Kong: Marcel Dekker. p.237-271.
- 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.
- Walters, C.** 2000. Levels of recalcitrance in seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 7-21.

- Walters, C.** 2015a. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. *Planta*, 242:397–406.
- Walters, C.** 2015b. The modern seed bank: promise, uncertainties and cross-cutting issues. *In: Lohwasser, U. & Börner, A. (eds.). Seed Longevity Workshop, Book of Abstracts. International Society for Seed Science, Wernigerode pp.3.*
- Walters, C.; Berjak, P.; Pammenter, N.; Kennedy, K. & Raven, P.** 2013. Preservation of recalcitrant seeds. *Science* 339: 915-916.
- Westengen, O.** 2015. The global back-up. *In: Seed Longevity Workshop, Wernigerode, 2015. Book of Abstracts. Lohwasser, U. and Börner, A. (eds.). International Society for Seed Science, Wernigerode. pp.8.*