

Maiara Iadwizak Ribeiro

SIMILARIDADE FISIOLÓGICA ENTRE  
SEMENTES DE LEGUMINOSAS ORTODOXAS  
(*Erythrina speciosa* Andrews) E  
RECALCITRANTES (*Inga vera* Willd.) AO  
LONGO DO SEU DESENVOLVIMENTO

Tese apresentada ao Instituto de Pesquisas Ambientais, da Secretaria de Meio Ambiente, Infraestrutura e Logística, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2024

Maiara Iadwizak Ribeiro

SIMILARIDADE FISIOLÓGICA ENTRE  
SEMENTES DE LEGUMINOSAS ORTODOXAS  
(*Erythrina speciosa* Andrews) E  
RECALCITRANTES (*Inga vera* Willd.) AO  
LONGO DO SEU DESENVOLVIMENTO

Tese apresentada ao Instituto de Pesquisas Ambientais, da Secretaria de Meio Ambiente, Infraestrutura e Logística, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR 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 Bibliotecas e Mapotecas unidade Jardim Botânico – IPA/SEMIL

Ribeiro, Maiara Iadwizak

R484s Similaridade fisiológica entre sementes de leguminosas Ortodoxas (*Erythrina speciosa* Andrews) e recalcitrantes (*Inga vera* Willd.) ao longo do seu desenvolvimento / Maiara Iadwizak Ribeiro - -São Paulo, IPA, 2024.  
87p.;il.

Tese de (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria de Meio Ambiente, Infraestrutura e Logística, 2024.

1. Sementes ortodoxas. 2. Sementes recalcitrantes. 3. Teor de água.  
I. Título.

CDU: 631.53.01

**Banca Examinadora**

Dr. Claudio José Barbedo (Orientador)

Instituto de Pesquisas Ambientais – IPA

Dr. José Márcio Rocha Faria

Universidade Federal de Lavras – UFLA

Dr. Danilo da Cruz Centeno

Universidade Federal do ABC– UFABC

Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Dr. Clovis José Fernandes de Oliveira Junior

Instituto de Pesquisas Ambientais - IPA

## AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre estar ao meu lado e permitir coisas grandiosas em minha vida.

Aos meus pais Nila e Ernesto que em meio a tantas dificuldades nunca disseram não aos meus sonhos, sempre acreditaram na educação e o mais importante sempre estão ao meu lado.

Ao meu noivo e melhor amigo Vinicius, obrigada por ser luz em dias escuros e escolher dividir seus dias comigo.

Para minha madrinha Sofia, uma das mulheres mais inspiradoras que eu tive a honra de conhecer, tenho certeza de que lá do céu você continua me acompanhando.

Ao meu primo Leandro que sempre acreditou nos meus sonhos e muitas vezes auxiliou para que esses sonhos fossem possíveis.

Ao meu orientador Dr. Claudio Barbedo, o qual sempre me fez dar um passo a mais, me fez romper barreiras, por muitas vezes achei que não conseguiria ir além e lá estava você me estendendo a mão e mostrando que era possível. Obrigada por todas as reuniões, conversas, cafés, obrigada por todo o aprendizado, qualquer momento com o professor Claudio é riquíssimo pois ele ensina a todo instante, te faz questionar, te impulsiona e motiva.

A Adelianna Barbedo, que me fez sentir parte da família desde o primeiro momento, eu não tenho outra palavra a não ser gratidão, por toda a confiança e carinho que você depositou em mim.

Ao CNPq pela concessão da bolsa que fez possível a realização desse projeto.

Ao Instituto de Pesquisas Ambientais e aos pesquisadores, por todo ensinamento e suporte nos experimentos.

Aos pesquisadores e alunos do núcleo de sementes, que me receberam muitíssimo bem, por todo apoio durante a pesquisa, dicas, auxílio e suporte.

Aos professores e alunos de outras universidades que embarcaram comigo e com o professor Dr. Claudio e que não pensaram duas vezes em participar do projeto. Agradeço especialmente a professora Dra. Elisete e seu grupo de pesquisa da Univates – RS. E a professora Dra. Neusa Steiner e seu grupo de pesquisa da UFSC – SC, que foram imprescindíveis para que esse trabalho acontecesse.

Aos institutos meteorológicos que forneceram os dados climáticos para esse projeto.

A Dra. Debora Molizane e ao Dr. Marcio Bonjovani os quais me auxiliaram inúmeras vezes durante a adaptação de metodologias do projeto.

Aos responsáveis pelo Parque Catavento e pelo parque Villa-Lobos que possibilitaram as coletas de ocorrerem.

Aos membros da banca de qualificação Dr. Clovis Fernandes, Dra. Jaqueline MalaguttiCorsato e Dr. Edmir Vicente Lamarca, por todas as colocações que só enriqueceram esse trabalho.

Aos professores que participaram indiretamente da realização dessa tese, mas diretamente em minha formação principalmente Dra. Andrea, Dra. Shirley, Dra. Jaqueline, Dra. Ana Tereza, Professor Leandro Warken, entre tantos outros que jamais serão esquecidos.

Aos meus amigos da pesquisa que fizeram com que dias intensos laboratoriais ficassem muito mais leves por poder contar com vocês, principalmente Guilherme Rodrigues, Isabela, Camila, Wesley, Gabriel, Jana, Matheus, Natalia, Aline, Santiago.

Aos amigos que a vida me deu e viraram família amo vocês: Casseano, Milara, Luiz Gustavo, Leonardo, Hamã, Cristina, Ana, Marilena, Chico, Carina, Rê e Nadi.

Aos meus amigos que os jogos me possibilitaram ter e que sempre me apoiaram e estavam comigo durante a tese, principalmente o pessoal do octagrama que levo para a vida.

A todos que participaram de alguma forma para a formação e desenvolvimento dessa tese, meus agradecimentos.

## RESUMO

A conservação *ex situ* utilizando sementes é um método amplamente divulgado, porém que funciona apenas para sementes tolerantes à dessecação, ou seja, as que completam totalmente sua maturação, denominadas ortodoxas. O processo de maturação pode ser simplificado em três fases, sendo que na última as sementes passam por uma secagem pré-determinada, adquirindo tolerância à dessecação; porém, há sementes que não adquirem tolerância à dessecação, denominadas recalcitrantes. A vida curta dessas sementes sensíveis à dessecação e ao congelamento, bem como a falta de conhecimento das potencialidades das intolerantes à dessecação nativas das matas tropicais, dificulta o estabelecimento de adequada estratégia para sua conservação em bancos de germoplasma. Neste trabalho, visou-se compreender comportamentos em relação às fases de maturação entre sementes ortodoxas e sementes recalcitrantes analisando seu desenvolvimento quanto a semelhanças entre as características observadas, correlacionando com a tolerância à dessecação, variações ambientais e períodos de coleta. Para isso, sementes ortodoxas de *Erythrina speciosa* Andrews e recalcitrantes de *Inga vera* Willd. foram avaliadas quanto a teor de água, massa seca, processos fisiológicos e bioquímicos e taxas respiratórias. Os resultados possibilitaram observar que, em sementes ortodoxas imaturas, há grandes variações nas suas características dentro da mesma espécie, dependendo do quanto essas sementes avançaram no processo de maturação e do ambiente onde foram formadas. Além disto, sementes ortodoxas imaturas e recalcitrantes apresentam comportamentos semelhantes fisiológicos antioxidantes e respiratórios semelhantes, principalmente em teores de água próximos. Desta forma, no presente trabalho observou-se grande heterogeneidade nos comportamentos de uma semente ortodoxa imatura coletada em locais diferentes, ou no mesmo local, mas em diferentes épocas, e maior similaridade entre uma espécie com sementes recalcitrantes e uma espécie com sementes ortodoxas imatura do que duas ortodoxas imaturas da mesma espécie.

**Palavras-chave:** sementes ortodoxas, sementes recalcitrantes, teor de água

## ABSTRACT

Ex situ conservation using seeds is a widely publicized method, but it only works for desiccation-tolerant seeds. The maturation process can be simplified into three phases, in which the seeds undergo pre-determined drying in the last phase, where they acquire tolerance to desiccation, but not all seeds undergo drying, and are then generally divided into two groups: tolerant to desiccation (orthodox) and desiccation intolerant (recalcitrant). The short life of seeds sensitive to desiccation and freezing, as well as the lack of knowledge about the potential of desiccation-intolerant seeds native to tropical forests, makes it difficult to establish an adequate strategy for their conservation in germplasm banks. In this work, the aim was to understand behaviors in relation to the maturation phases between orthodox seeds and recalcitrant seeds, analyzing their development and verifying whether or not there are similarities between the observed characteristics, correlating with desiccation tolerance, environmental variations and collection periods. For this, orthodox and recalcitrant seeds were evaluated for water content, dry mass, physiological and biochemical processes and respiratory rates. The results made it possible to observe that, even in orthodox seeds within the same species, there are great variations in the characteristics of the seeds in their immature stages, regarding: water content, germination, production of normal seedlings, tolerance to desiccation, dormancy, among other characteristics, depending on how far these seeds have advanced in the maturation process and the environment where they are found. Furthermore, immature and recalcitrant orthodox seeds show similar physiological antioxidant and respiratory behaviors, especially at close water contents. Thus, in the present work, great heterogeneity in the behaviors of an immature orthodox seed collected in different locations or the same location at different times is observed, in addition to that, we observe greater similarity between a recalcitrant species and an immature orthodox species than two orthodox ones. Immatures of the same species and matrices or even with their own orthodox mature counterpart.

**Keywords:** orthodox seeds, recalcitrant seeds, water content

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: *Erythrina speciosa* com detalhes em suas flores e sementes ..... 17
- Figura 2: Sementes de *Erythrina speciosa* Andrews em seus diferentes estádios de coleta (I-VI) com a metodologia de separação por coloração utilizada no presente trabalho. Escala: 1cm..... 38
- Figura 3: Teor de água (%), massa seca (mg/semente<sup>-1</sup>), germinação (%), plântulas normais (PN, %), dormência (%) e dormência induzida (secagem até 10%) dos estádios I ao VI das sementes de *Erythrina speciosa* dados da coleta de SC I.....39
- Figura 4: Teor de água (%), massa seca (mg/semente<sup>-1</sup>), germinação (%), plântulas normais (PN, %), dormência (%) e dormência induzida (secagem até 10%) dos estádios I ao VI das sementes de *Erythrina speciosa* dados da coleta de SC II ..... 40
- Figura 5: Teor de água (%), massa seca (mg/semente<sup>-1</sup>), germinação (%), plântulas normais (PN, %), dormência (%) e dormência induzida (secagem até 10%) dos estádios I ao VI das sementes de *Erythrina speciosa* dados da coleta de RS I.....41
- Figura 6: Teor de água (%), massa seca (mg/semente<sup>-1</sup>), germinação (%), plântulas normais (PN, %), dormência (%) e dormência induzida (secagem até 10%) dos estádios I ao VI das sementes de *Erythrina speciosa* dados da coleta de RS II. .... 42
- Figura 7: Teor de água (%), massa seca (mg/semente<sup>-1</sup>), germinação (%), plântulas normais (PN, %), dormência (%) e dormência induzida (secagem até 10%) dos estádios I ao VI das sementes de *Erythrina speciosa* dados da coleta de SP ..... 43
- Figura 8: Teor de água (%), massa seca (mg/semente<sup>-1</sup>), germinação (%), plântulas normais (PN, %), dormência (%) e dormência induzida (secagem até 10%) dos estádios I ao IV dos embriões de *Inga vera* dados da coleta de SP. Letras iguais para os estádios não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ..... 53
- Figura 9: Consumo de oxigênio ( $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) e dióxido carbônico ( $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) em embriões de *Inga vera* nos diferentes estádios de maturação (I ao IV). Inicial = Dados iniciais, E1 secagem no estádio I nos níveis de 50, 40, 30 e 20% e secagem com peg P50, P40, P30 e P20%, E2 secagem no estádio II nos níveis de 50, 40, 30 e 20% e secagem com peg P50, P40, P30 e P20%, E3 secagem no estádio III nos níveis de 50, 40, 30 e 20% e secagem com peg P50, P40, P30 e P20% e E4 secagem no estádio IV nos níveis de 50, 40, 30 e 20% e secagem com peg P50, P40, P30 e P20%. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ..... 58
- Figura 10: Consumo de oxigênio ( $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) e dióxido carbônico ( $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) em sementes de *Erythrina speciosa* nos diferentes estádios de maturação (I ao IV). Inicial = Dados iniciais, E1 secagem no estádio I nos níveis de 40, 30 20 e 10% e secagem com peg P40, P30, P20 e P10%, E2 secagem no estádio II nos níveis de 40, 30 20 e 10% e secagem com peg P40, P30, P20 e P10%, E3 secagem no estádio III nos níveis de 40, 30 20 e 10% e secagem com peg P40, P30, P20 e P10%, e E4 secagem no estádio IV nos níveis de 40, 30 20e 10% e secagem com peg P40, P30, P20 e P10%, Médias seguidas pela mesma letra não

diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ..... 59

Figura 11: Consumo de oxigênio ( $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) e dióxido carbônico ( $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) em de sementes de *Erythrina speciosa* nos diferentes estádios de maturação (I ao IV). Inicial = Dados iniciais, E2 secagem no estádio II nos níveis de 40, 30 20 e 10% e secagem com peg P40, P30, P20 e P10%, E3 secagem no estádio III nos níveis de 40, 30 20 e 10% e secagem com peg P40, P30, P20 e P10%, e E4 secagem no estádio IV nos níveis de 40, 30 20 e 10% e secagem com peg P40, P30, P20 e P10%, Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 60

Figura 12: Teor de água (%), dos estádios I ao IV dos embriões de *Inga vera* e I ao VI das sementes de *Erythrina speciosa* ..... 77

Figura 13: Conteúdo de poliaminas (PAs) em embriões de *Inga vera* nos diferentes estádios de maturação dessecação, em relação à semente. A. PAs livres, Putrescina (PUT), Espermidina (SPD), Espermina (SPM) e Cadaverina (CAD). B. Total das PAs livres. C. Razão (PUT/SPD+SPM). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 78

Figura 14: Conteúdo de poliaminas (PAs) em sementes de *Erythrina speciosa* nos diferentes estádios de maturação dessecação, em relação à semente. A. PAs livres, Putrescina (PUT), Espermidina (SPD), Espermina (SPM) e Cadaverina (CAD). B. Total das PAs livres. C. Razão (PUT/SPD+SPM). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ..... 79

Figura 15: Atividades das enzimas antioxidantes nos embriões de *Inga vera* durante a maturação. Atividade APX (A). Atividade CAT (B). Atividade SOD (C). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente Figura 3. Atividades das enzimas antioxidantes nos embriões de *Inga vera* durante a maturação. Atividade APX (A). Atividade CAT (B). Atividade SOD (C). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 80

Figura 16: Atividades das enzimas antioxidantes nas sementes de *Erythrina speciosa* durante a maturação. Atividade APX (A). Atividade CAT (B). Atividade SOD (C). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ..... 81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Coletas de SP secagem das sementes de *Inga vera* nos teores de 50, 40, 30 e 20% com e sem o uso de PEG, números romanos indicam o estágio. Variáveis analisadas: Germinação, Plântulas Normais e Dormência (%). Fatorial duplo sendo Estádio (minúscula) x Secagem (maiúscula), médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ..... 56

Tabela 2: Coletas I e II de SC, secagem das sementes de *Erythrina speciosa* nos teores de 40, 30, 20 e 10% com e sem o uso de PEG, números romanos indicam o estágio. Variáveis analisadas: Germinação, Plântulas Normais e Dormência (%). Fatorial duplo sendo Estádio (minúscula) x Secagem (maiúscula), médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ..... 57

## SUMÁRIO

Introdução Geral.....	10
Referências Bibliográficas .....	19
<b>Capítulo I:</b> Maturação de sementes de <i>Erythrina speciosa</i> coletadas nas regiões Sudeste e Sul do Brasil .....	22
1. Introdução.....	25
2. Materiais e Métodos .....	28
3. Resultados e Discussão .....	30
4. Referências .....	34
<b>Capítulo II:</b> Comparativo da maturação, germinação e respiração das sementes de <i>Erythrina speciosa</i> e <i>Inga vera</i> de diferentes ambientes .....	44
1. Introdução.....	45
2. Materiais e Métodos .....	47
3. Resultados e Discussão .....	50
4. Referências .....	55
<b>Capítulo III:</b> Caracterização do perfil de poliaminas e das enzimas antioxidantes em uma espécie ortodoxa <i>Erythrina speciosa</i> frente a uma espécie recalcitrante <i>Inga vera</i> .....	65
1. Introdução.....	66
2. Materiais e Métodos .....	68
3. Resultados e Discussão .....	70
4. Referências .....	74
<b>Consideração Finais</b> .....	82

## Introdução geral

### 1. Conservação da Biodiversidade

No Brasil encontra-se uma das maiores diversidades de espécies vegetais, possuindo 10 a 20% das espécies conhecidas a nível mundial, tornando o país prioridade em conservação; porém, essa vegetação sofre constantemente com o aumento populacional, atividades agropecuárias e a expansão de cidades. Com isso, eleva-se o número de áreas degradadas e muitas espécies nativas têm seu número reduzido (Pilon *et al.* 2017, Oliveira *et al.* 2017, Monteiro *et al.* 2018). Este crescente avanço da antropização dos ecossistemas pode ser o maior risco de que muitas espécies desapareçam antes mesmo de serem conhecidas ou de terem desvendadas suas potencialidades. Conservar o maior número possível de espécies, principalmente as de ecossistemas tropicais, é o grande desafio para os próximos anos (Barbedo *et al.* 2013).

Conservar uma espécie significa não apenas garantir sua sobrevivência, mas, também, a manutenção de sua variabilidade genética intraespecífica (Rocha 2004). Há, basicamente, duas estratégias de conservação: a) *in situ*, ou local, realizada dentro dos próprios ecossistemas e habitats naturais conservados e b) *ex situ*, mantendo-se amostras de organismos fora de seu habitat natural na forma de indivíduos inteiros, sementes, grãos de pólen, propágulos vegetativos e culturas de células ou tecidos (Botanic Gardens Conservation International 2001). Dentre estes, a conservação de sementes, além de ser a forma mais comum de conservação *ex situ*, já que a semente é a unidade de propagação natural da maioria das espécies de plantas superiores (Santos 2001), é a mais econômica, mais longa, de mais fácil manipulação e a que ocupa os menores espaços físicos. A metodologia convencional de conservação de sementes utilizada em bancos de germoplasma compreende a secagem e armazenamento em câmaras a temperaturas abaixo de zero (Corlett 2016).

Entretanto, há sementes sensíveis à desidratação e ao congelamento, que não sobrevivem ao armazenamento nessas condições. Contudo, há falta de suficiente conhecimento sobre a

tolerância à dessecação das sementes das espécies de matas tropicais, dificultando ainda mais o estabelecimento de estratégias adequadas para a conservação dessas sementes em bancos de germoplasma (Berjak & Pammenter 2013).

Diversos estudos têm sido realizados buscando adequar as metodologias de conservação e aproveitamento das sementes tolerantes à dessecação e ao congelamento àquelas sementes sensíveis. Muitos deles buscam reduzir ao máximo o teor de água e a temperatura de armazenamento até níveis não letais às sementes, outros procuram desenvolver novas técnicas de armazenamento. Contudo, na grande maioria, o que se verifica é a frequente tentativa de aplicação dos modelos clássicos de armazenamento de sementes, com muito pouco sucesso para as sementes sensíveis à dessecação. Portanto, é provável que esse sucesso dependa de se procurar, primeiramente, compreender as diferenças entre as sementes de diferentes comportamentos para, então, se buscar o desenvolvimento de novas tecnologias (Barbedo *et al.* 2013, Barbedo 2018). Um dos aspectos mais importantes para essa compreensão é o conhecimento dos processos envolvidos na própria formação das sementes, particularmente no período de sua maturação, quando a tolerância à dessecação é adquirida.

## 2. Maturação de sementes

Um dos estudos pioneiros sobre o processo de maturação de sementes, foi de Brenchley & Hall (1909), classificando a maturação apenas como um processo de perda de água ainda na planta-mãe. Após 16 anos, Willard, estudando também sementes de soja, foi um dos primeiros autores a descrever a maturação, associando a maturidade com o amarelamento e abscisão das folhas, observando que em conjunto com as mudanças foliares houve um aumento de massa seca das sementes (Marcos Filho 1980; Marcos Filho 2015).

Nos anos seguintes continuaram-se as pesquisas para compreender mais o processo de maturação. Um dos estudos mais detalhados sobre a maturação, que serviu de base para muitos outros, foi o de Andrews (1966), analisando, desde a fecundação, variáveis como teor

de água, massa seca e tamanho, identificando e dividindo os processos em estádios de maturação (Marcos Filho 2015).

Com base nesses trabalhos, diversos autores conseguiram se aprofundar no estudo do processo de maturação. Atualmente, sabemos que, após a fertilização, o óvulo que foi fecundado passa por várias alterações físicas, fisiológicas, morfológicas, histoquímicas e bioquímicas, até que a semente atinja sua maturidade fisiológica, que é quando ela tem seu máximo de massa seca e se desliga da planta-mãe, cessando a translocação de fotossintetizados.

Esse desenvolvimento das sementes ortodoxas pode ser dividido basicamente em três fases: I) formação e diferenciação dos tecidos; II) expansão celular e acúmulo de matéria seca e III) perda de água reduzindo o metabolismo (Bareke 2018). Na primeira fase da maturação ocorre a histodiferenciação, caracterizada como uma intensa taxa de divisão celular mitótica do óvulo fecundado, formando o embrião, com um elevado conteúdo de água. A diferenciação das células em tecidos específicos ocorre com algumas transições no formato do embrião: globular, coração e torpedo. Neste último, sua estrutura celular está toda formada (Bewley & Nonogaki 2017).

Já na segunda fase da maturação, a semente aumenta de tamanho pela expansão celular, sem necessariamente aumento no número de células, mas aumentando seu volume. Também ocorre a deposição de reservas, que normalmente são proteínas, lipídios e/ou carboidratos. As proteínas mais comuns no armazenamento são albumina, prolamina e globulina; para os carboidratos, o amido é normalmente o mais armazenado nas sementes e em relação aos lipídeos principalmente os triacilgliceróis, esteróis, fosfolipídeos e glicolipídeos. Também nessa fase ocorre deslocamento de água da semente, então aumenta-se proporcionalmente o peso seco e diminui o teor de água da semente (Bewley & Nonogaki 2017; Bareke 2018).

Na terceira fase da maturação, as sementes atingem o máximo de massa seca possível, definindo o ponto de maturidade; passam, então, por uma secagem programada diminuindo

seu conteúdo de água, ocorrendo uma redução em seu metabolismo. As sementes então, possuindo uma elevada porcentagem de massa seca e baixo conteúdo de água, são dispersas pela planta-mãe (Angelovici *et al.* 2010; Devic & Roscoe 2016).

Observa-se que, durante esse processo de maturação, a água é essencial, primeiramente durante a expansão e divisão celular e posteriormente como carreadora dos fotossintetizados que serão parte dos tecidos ou então utilizados nas fases iniciais da germinação. A maioria das sementes comercializadas e utilizadas toleram a dessecação (secagem natural), sendo dispersas com baixa quantidade de água; porém, nem todas as sementes passam por esse processo e podem ser dispersas com elevado conteúdo de água, além da secagem natural, essas sementes também toleram a secagem artificial, que reduzirá ainda mais o seu teor de água pós dispersão (Bewley & Nonogaki 2017; Bareke, 2018).

Dessa forma, a água é um dos indicadores mais importantes da capacidade de conservação *ex situ* (Molizane *et al.* 2020), definindo a classificação das sementes em relação à sua tolerância à dessecação e sua capacidade de armazenamento (Roberts 1973). Sementes capazes de tolerar a dessecação e serem armazenadas por longos períodos foram classificadas como ortodoxas, enquanto as que não toleram a dessecação e não podem ser armazenadas foram classificadas como recalcitrantes.

### 3. Sementes ortodoxas e recalcitrantes

A água é um dos indicadores mais importantes da capacidade de conservação *ex situ*. Com isso, surgiu uma classificação para as sementes em relação à sua capacidade de tolerância à dessecação e ao armazenamento (Roberts 1973). Sementes capazes de tolerar a dessecação e serem armazenadas por longos períodos e, ainda assim, germinarem foram classificadas como ortodoxas; já sementes que não toleram a dessecação e não podem ser armazenadas foram classificadas como recalcitrantes.

Entretanto, ao longo do tempo, os pesquisadores perceberam que essas duas categorias não eram suficientes para enquadrar as sementes de todas as espécies. Então, com base em novos estudos, foi proposta uma nova categoria por Ellis *et al.* (1990): as sementes intermediárias, que permitem a dessecação até próximo de 10%, mas não podem ser armazenadas por longos períodos e não toleram o armazenamento a temperaturas abaixo de zero. Posteriormente, Walters (2000) demonstrou que este não é um processo de tudo ou nada, mas que apresenta níveis de quanto a espécie é tolerante à dessecação ou não.

Com o avanço das pesquisas nessa área, especialmente envolvendo as espécies tropicais, alguns autores questionam se realmente as sementes se encontram em diferentes grupos (ortodoxa, intermediária e recalcitrante), ou se a tolerância à dessecação, entre outras características presentes nas sementes, não poderia ser um gradiente, dependendo do quanto elas avançaram no processo de maturação até serem desligadas da planta-mãe, em conjunto com as características do meio em que foram formadas (Barbedo *et al.* 2013; Barbedo 2018).

Dessa forma, o ciclo de maturação das sementes recalcitrantes poderia se encaixar integralmente dentro de uma fase de maturação das sementes ortodoxas e, conseqüentemente, as sementes recalcitrantes seriam as que tiveram um desligamento prematuro da planta-mãe. Com isso, não teríamos padrões definidos para o comportamento das sementes das diferentes espécies (recalcitrantes ou ortodoxas), mas um comportamento dependente de seu estágio de maturação quando dispersas (níveis de recalcitrância), de acordo com o grau de desenvolvimento das sementes (Barbedo *et al.* 2013; Newton *et al.* 2013; Barbedo 2018).

Estudos recentes têm demonstrado que são vários os fatores responsáveis pelas diferenças no comportamento das sementes e, dessa forma, muitas pesquisas deverão ainda ser realizadas e muitos grupos deverão estar envolvidos nesse esforço. Dentre esses fatores, figuram entre os principais: 1) as condições nas quais as sementes são formadas e amadurecem, considerando-se desde a fase de polinização até a de dispersão; 2) as condições responsáveis pelas alterações nos níveis de tolerância à dessecação; 3) as diferentes

exigências das sementes para germinar e produzir plântulas normais, incluindo-se a dormência e sua superação e o balanço entre promotores e inibidores de germinação; 4) a presença e interação de microrganismos com a semente, desde sua formação até sua germinação ou deterioração durante o armazenamento; 5) os processos metabólicos envolvidos em todas essas etapas, bem como suas alterações e consequências, especialmente o metabolismo respiratório e o de carboidratos (Barbedo 2018).

De fato, Lamarca (2013), utilizando sementes de *Eugenia pyriformis*, espécie tropical nativa do Brasil com sementes recalcitrantes, coletadas em diferentes locais e anos, demonstrou que o ambiente (temperatura, pluviosidade) pode influenciar no comportamento das sementes durante sua formação, resultando em características moldadas pelas condições do meio. Molizane *et al.* (2018 e 2020), observando a indução da dormência nas sementes de uma espécie nativa ortodoxa, *Erythrina speciosa* Andrews durante a maturação, ao longo de diferentes anos, observaram que as condições ambientais interferem na maturação das sementes, observando variações na qualidade fisiológica das sementes ao longo dos anos junto também com variações no nível de dormência das sementes.

Porém, pesquisas sobre o comportamento das sementes comparando ortodoxas e recalcitrantes durante o desenvolvimento, tolerância à dessecação, e em conjunto com fatores climáticos ainda são escassas, sendo um grande obstáculo para o conhecimento da fisiologia do desenvolvimento das sementes e para o armazenamento e manejo das espécies.

Ainda estamos longe de compreender as diferenças e semelhanças entre os comportamentos das sementes, e não ter esse conhecimento em mãos tem sido um impedimento para o desenvolvimento de novas tecnologias para a conservação das sementes (Barbedo 2018). Assim, estudos sobre estes comportamentos são cada vez mais necessários, para a compreensão dos processos da fisiologia das sementes (Walters *et al.* 2013).

#### 4. Espécies utilizadas como modelos de estudo

A família Leguminosae (Fabaceae) é a terceira maior família das angiospermas no mundo; no Brasil essa família é composta por aproximadamente 253 gêneros e 3029 espécies, sendo a família com maior diversidade e número de espécies em nossa flora (Delgado 2015, Flora Do Brasil 2020, Benjamin *et al.* 2020). Antigamente, a família Leguminosae era dividida em 3 subfamílias, Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae; porém, uma nova classificação foi proposta, com divisão em 6 subfamílias: Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Caesalpinioideae, Papilionoideae e Duparquetioideae (LPWG, 2017).

Durante o decorrer dos anos, o grupo de pesquisa liderado pelo professor Dr. Claudio José Barbedo no Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA – SP), antigo Jardim Botânico, vem desenvolvendo vários trabalhos com duas espécies da família Leguminosae: *Erythrina speciosa* e *Inga vera*. Esses estudos levantaram inúmeras informações sobre ambas as espécies e seus comportamentos, tornando-as modelos de estudo muito interessantes de sementes clássicas ortodoxas e recalcitrantes.

*Erythrina speciosa* Andrews é uma espécie com distribuição pela América do Sul. No Brasil ela se encontra principalmente em grande escala nas regiões Sudeste e Sul (Lorenzi 2002). Essa espécie é comumente encontrada em florestas fluviais, planícies úmidas costeiras e áreas alagadas; entretanto, por mais que essa espécie possua essa característica de ocorrência em áreas úmidas, suas sementes são classificadas como ortodoxas, finalizando seu processo de maturação com baixo teor de água, apresentando dormência tegumentar e podendo ser armazenadas por longos períodos (Lorenzi 2002, Delgado 2015, Hell *et al.* 2019).



Figura 1: Imagens de *Erythrina speciosa*. A: adulto em seu período de floração; B: flores; C: flores e frutos.

Dentre os trabalhos realizados com *E. speciosa*, muitas informações foram relevantes para o presente trabalho. Com o trabalho de Molizane *et al.* (2018) foi possível observar que essas sementes possuem variações no nível de dormência tegumentar de acordo com as condições ambientais nas quais a planta-mãe está inserida e durante sua maturação. Também se observou que sementes imaturas que passam por secagem artificial (secagem em estufa) são capazes de adquirir a dormência tegumentar, variando de acordo com as condições ambientais impostas durante a maturação, sendo mais uma vez o ambiente um dos maiores responsáveis por essas respostas (Molizane 2020).

Em relação à bioquímica das sementes de *E. speciosa*, observou-se os componentes de reserva das sementes, sendo 3% de ciclitóis e 13% de rafinose em conjunto com 71% de ácidos graxos insaturados (Mello *et al.* 2010a, b). Também a atividade metabólica destas sementes é reduzida durante os estádios II e III de maturação, o que ocorre antes da maturidade fisiológica, que se instala principalmente no estágio V (Hell *et al.* 2019). Os conhecimentos adquiridos das sementes de *Erythrina speciosa* tornaram essa espécie um bom modelo para análise de sementes ortodoxas clássicas.

Outra espécie também da família Fabaceae, porém que apresenta sementes com características recalcitrantes, é *Inga vera*, de ocorrência em locais com elevada quantidade de água no solo (Pennington 1997, Miller *et al.* 2003). As sementes dessa espécie possuem elevada germinação, são dispersas com alto teor de água e, por não passarem pela fase de dessecação durante a maturação, perdem a viabilidade rapidamente. Diversas pesquisas também foram realizadas com essas sementes, principalmente quanto à fisiologia do armazenamento, taxas respiratórias e sensibilidade à dessecação. Devido a essa característica a não existência de técnicas adequadas para o armazenamento, essas sementes não conseguem ser conservadas por longos períodos (Barbedo & Bilia 1994), normalmente pouco mais de 60 a 90 dias (Bonjovani & Barbedo 2008, Bonjovani & Barbedo 2014).

Com base em todos os conhecimentos adquiridos das sementes de *E. speciosa* e *I. vera*, em conjunto com a falta de relatos da comparação dos comportamentos de sementes ortodoxas em suas fases imaturas frente a sementes recalcitrantes e a relação com o ambiente em que as espécies estão inseridas, ambas as espécies se tornaram bons modelos de estudos comparativos.

## 5. Objetivo Geral

Analisar as similaridades fisiológicas e bioquímicas entre as sementes de duas espécies de Leguminosae, uma com sementes ortodoxas e outra com recalcitrantes, coletadas em diferentes regiões/e ou épocas.

## 6. Objetivos específicos

- Analisar o comportamento fisiológico das sementes ortodoxas de *Erythrina speciosa* coletadas em diferentes regiões e/ou épocas, em seus diferentes estádios iniciais de maturação e quando submetidas à dessecação, comparando suas diferenças com o ambiente em que as sementes foram formadas e as matrizes estão inseridas.

- Comparar o comportamento fisiológico entre as sementes de *Erythrina speciosa* (ortodoxa clássica) e de *Inga vera* (recalcitrante clássica), coletadas em diferentes regiões e/ou épocas, em seus diferentes estádios de maturação e submetidas à dessecação.
- Analisar o comportamento respiratório entre as sementes das duas espécies *Erythrina speciosa* (ortodoxa clássica) e *Inga vera* (recalcitrante clássica), coletadas em diferentes regiões e/ou épocas, em seus diferentes estádios de maturação e submetidas à dessecação.
- Verificar o comportamento das poliaminas e sua atividade antioxidante nas sementes das duas espécies estudadas *Erythrina speciosa* (ortodoxa clássica) e *Inga vera* (recalcitrante clássica) em seus diferentes estádios de maturação.

## 7. Referências

- ANGELOVICI, R.; GALILI G.; FERNIE, A.R.; FAIT, A. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends in Plant Science**, v.15, p. 1360–1385, 2010. DOI: 10.1016/j.tplants.2010.01.003
- BARBEDO, C. J.; CENTENO, D. da C.; RIBEIRO, R. de C. L. F. Do recalcitrante seeds really exist? **Hoehnea**, v.40, p.583-593, 2013. DOI:[10.1590/S2236-89062013000400001](https://doi.org/10.1590/S2236-89062013000400001)
- BARBEDO, C.J. A new approach towards the so-called recalcitrant seeds. **Journal of Seed Science**. v.40, n.3, p.221-236, 2018. DOI:[10.1590/2317-1545v40n3207201](https://doi.org/10.1590/2317-1545v40n3207201)
- BARBEDO, C. J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botânica Brasília**. São Paulo, v.12, n.2, p. 145-164, 1998. DOI: 10.1590/S0102- 33061998000200005
- BARBEDO, C.J. A recalcitrância da semente. **Editora do Autor**. p.173, 2021.
- BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, v.14, p.1-16, 2004.
- BAREKE, T. Biology of seed development and germination physiology. **Advances in Plants & Agriculture Research**, v.8, n.4, p.336-346, 2018. DOI: 10.15406/apar.2018.08.00335
- BENJAMIM JKF, COSTA KAD, SANTOS AS. 2020. Chemical, Botanical and Pharmacological Aspects of the Leguminosae. **Pharmacog Rev**. v.14, n. 28, p.106-120, 2020.

BEWLEY, J.D.; NONOGAKI, H. Seed Maturation and Germination. In: Reference Module in Life Sciences. Elsevier; 2017.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Frontiers in Plant Science**, n. 4, 2013. DOI:10.3389/fpls.2013.00478

BOTANIC GARDENS CONSERVATION INTERNATIONAL. Normas internacionais de conservação para jardins botânicos. Rio de Janeiro: Conselho Nacional do Meio Ambiente/Rede Brasileira de Jardins Botânicos/Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro/EMC, 2001.

DEKKERS, B.J.; COSTA, M.C.; MAIA, J.; BENTSINK, L., LIGTERINK, W.; HILHORST, H.W. Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. **Planta**, v.241, p.563– 577, 2015.

DELGADO, C. M. L.; COELHO, C. M. M.; BUBA, G. P. Mobilization of reserves and vigor of soybean seeds under desiccation with glufosinate ammonium. **Journal of Seed Science**, v. 37, n.2, p. 154-161, 2015.

DEVIC, M.; ROSCOE, T. Seed maturation: Simplification of control networks in plants. **Plant Science**, v. 252, p.335-346, 2016. DOI: doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.08.012

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. Na intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, v.41, n.319, p. 1167-1174, 1990.

HELL, A.; KRETZSCHMAR, F.S.; SIMÕES, K.; HEYER, A.G.; BARBEDO, C.J.; BRAGA, M.R.; CENTENO, D.C. Metabolic changes on the acquisition of desiccation tolerance in seeds of the Brazilian native tree *Erythrina speciosa* **Frontiers in Plant Science**, v.10, n.1356, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01356>

FLORA DO BRASIL 2020 - Algas, Fungos e Plantas. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020. *Fabaceae in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB115>

LAMARCA, E. V.; PRATAVIERA, J. S.; BORGES, I. F.; DELGADO, L. F.; TEIXEIRA, C. C.; CAMARGO, M. B. P. de, Faria; JOSÉ, M. R.; BARBEDO, C. J. Maturation of *Eugenia pyriformis* seeds under different hydric and thermal conditions. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85 n.1, p.223-233, 2013.

LPWG - The Legume Phylogeny Working Group. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, p. 44–77, 2017. DOI: 10.12705/661.3

Lorenzi, H. 2002. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Instituto Plantarum**, p. 368.

MARCOS FILHO, J. 2015. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. **ABRATES**. Piracicaba.

MELLO, J. I. O., BARBEDO, C. J., SALATINO, A., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. DE C. L. 2010. Reserve carbohydrates and lipids from the seeds of four tropical tree species with different sensitivity to desiccation. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 53, 889–899. DOI: 10.1590/S1516-89132010000400019

MELLO, J. I. O., CENTENO, D. C., BARBEDO, C. J., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. 2011. Changes in carbohydrate composition in seeds of three tropical tree species submitted to drying and storage at freezing temperature. **Seed Sci. Technol.** 39, 465–480. DOI: 10.15258/sst.2011.39.2.18

MOLIZANE, D.M.; JULIO, P.G.S.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M.; BARBEDO, C.J. Physical, physiological and anatomical changes in *Erythrina speciosa* Andrews seeds from different seasons related to the dormancy degree. **Journal of Seed Science**, v.40, n.3, p.331-341, 2018.

MOLIZANE, D.M.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; BARBEDO, C. J. Induction of seed coat water impermeability during maturation of *Erythrina speciosa* seeds. **Journal of Seed Science**, v.42, 2020. DOI 10.1590/2317-1545v42n1221062

MONTEIRO, L.; MACHADO N.; MARTINS, E.; POUGY, N.; VERDI, M.; MARTINELLI, G.; LOYOLA, R. Conservation priorities for the threatened flora of mountaintop grasslands in Brazil. **Flora**, v. 238, p. 234-243, 2018. DOI: [10.1016/j.flora.2017.03.007](https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.03.007)

NEWTON, R. J.; HAY, F. R.; ELLIS, R. H. Seed development and maturation in early springflowering *Galanthus nivalis* and *Narcissus pseudonarcissus* continues post-shedding with little evidence of maturation in planta. **Annals of Botany**, v.111, p.945-55, 2013

OLIVEIRA, U.; SOARES-FILHO, B. S.; PAGLIA A. P.; BRESCOVIT, A. D.; CARVALHO, C. J. B.; SILVA, D. P.; REZENDE, D. T.; LEITE, F. S. F.; BATISTA, J. A. N. B.; BARBOSA, J. P. P. P.; STEHMANN, J. R.; ASCHER, J. S.; VASCONCELOS, M. F.; MARCO, P.; LÖWENBERG-NETO, P.; FERRO, V. G.; SANTOS, A. J. Biodiversity conservation gaps in the Brazilian protected areas. **Scientific Reports – Nature**, v.7, p.1-9, 2017. DOI:10.1038/s41598-017-08707-2

PILON, A. C.; VALLI, M.; DAMETTO, A. C.; PINTO, M. E. F; FREIRE, R. T.; CASTRO-GAMBOA, I.; ANDRICOPULO, A. D.; BOLZANI V.S. NuBBEdb: an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. **Scientific Reports – Nature**, v. 7, p.1-12, 2017. DOI:10.1038/s41598-017-07451-x

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v.1, n. 3, p. 499-514, 1973.

ROCHA, Y. T. Ibirapitanga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam. Leguminosae) do descobrimento à atualidade. Tese (Doutorado). São Paulo, USP, 2004.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.20, p.60-65, 2001.

WALTERS, C. Level of recalcitrance in seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. especial, p. 7-21, 2000.

WALTERS, C.; BERJAK, P; PAMMENTER, P.; KENNEDY, K.; RAVEN, P. Preservation of recalcitrant seeds. **Plant Science**, v. 339, p. 915-916, 2013.

## Capítulo I

### **MATURAÇÃO DE SEMENTES DE *Erythrina speciosa* COLETADAS NAS REGIÕES SUDESTE E SUL DO BRASIL**

\*Artigo aceito na revista Journal of Seed Science

## Maturation of *Erythrina speciosa* Andrews seeds from different regions

### Maturation of *Erythrina speciosa* Andrews seeds collected in the Southeast and South Regions of Brazil

ABSTRACT – Analyzing immature phases of orthodox seeds and the variations in traits depending on environmental conditions at which they were formed is a way of gaining knowledge on the differences and similarities between orthodox and recalcitrant seed behavior. From this perspective, in this study fruits of *Erythrina speciosa* Andrews were collected in Florianópolis (SC), Lajeado (RS) and Sao Paulo (SP) in August and November. Seeds were extracted and classified into six different maturation stages. Seeds were stored at 7°C for a maximum of five days until the beginning of the experiments. The water content and dry weight were measured through the oven method ( $103 \pm 3$  °C). Germination was analyzed at 25 °C and 70% of relative humidity, with evaluations being made every two days for 30 days. To induce dormancy, seeds were dried until 10% of water content. We ran an analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test at 5% as statistical analysis. We observed that immature seeds presented a wide behavior variation depending on the collection period and site, for a same chronological age, reinforcing the idea that the seed behavior variation may be due to the maturation degree at the moment of seed dispersal.

Key words: *Seed development*, orthodox seeds, *seed dormancy*

RESUMO- Uma das formas de se obter conhecimento sobre as diferenças e semelhanças entre os comportamentos das sementes ortodoxas e recalcitrantes durante o processo de maturação é analisando as fases imaturas das sementes ortodoxas e as variações em suas características, conforme as condições ambientais nas quais foram formadas. Diante disto, neste trabalho, os frutos de *Erythrina speciosa* Andrews foram coletados em Florianópolis

(SC), Lajeado (RS) e São Paulo (SP) entre os meses de agosto e novembro. As sementes, extraídas, foram classificadas em seis estádios diferentes de maturação. Armazenadas a 7°C, e os experimentos realizados iniciaram em até cinco dias. O teor de água e a massa seca foram medidos pelo método da estufa a  $103 \pm 3^\circ\text{C}$ . A germinação foi analisada a 25°C e 70% de umidade relativa, com avaliações a cada dois dias por 30 dias. Para indução de dormência, as sementes foram secas até 10% de água. A análise estatística usou ANOVA e teste de Tukey a 5%. Observou-se que as sementes imaturas apresentaram grandes variações de comportamento em função de época e local de coleta, para uma mesma idade cronológica, reforçando a ideia de que variações no comportamento das sementes podem ser decorrentes do seu grau de maturação no momento em que são dispersas.

Palavras-chave: maturação de sementes, sementes ortodoxas, sementes dormentes

## Introdução

O Brasil conta com uma das maiores diversidades de espécies vegetais, exigindo prioridade em iniciativas de conservação de sua flora (Forzza et al., 2012). Conservar uma espécie significa não apenas garantir sua sobrevivência mas, também, a manutenção de sua variabilidade genética intra-específica (Pilon et al., 2017; Oliveira et al., 2017; Monteiro et al., 2018). A conservação de sementes, além de ser a forma mais comum de conservação *ex situ*, já que a semente é a unidade de propagação natural da maioria das espécies de plantas superiores, é a mais econômica, mais longa, de mais fácil manipulação e a que ocupa os menores espaços físicos (Botanic Gardens Conservation International, 2001). Contudo, há espécies com sementes intolerantes à dessecação e que, por isso, não podem ser armazenadas por longos períodos, estas são denominadas recalcitrantes.

Diversos estudos têm sido realizados, como os de Hossel et al. (2016), Bonjovani e Barbedo (2018) e Félix et al. (2017), entre outros, buscando adequar as metodologias clássicas de armazenamento, ou seja, as aplicadas às sementes tolerantes à dessecação (denominadas ortodoxas) às sementes recalcitrantes, especialmente buscando reduzir o teor de água ao mínimo possível e reduzir a temperatura de armazenamento até níveis não letais às sementes, mas com resultados pouco promissores. Esse insucesso se deve, principalmente, ao fato de não se ter conhecimento suficiente das características das sementes sensíveis à dessecação quando comparadas às tolerantes. Talvez o sucesso do desenvolvimento de metodologias adequadas ao armazenamento das sementes recalcitrantes dependa de, primeiramente, compreender as diferenças entre as sementes ortodoxas e recalcitrantes, então, se buscar o desenvolvimento de novas tecnologias (Barbedo, 2018). Uma das formas de se compreender o comportamento das sementes recalcitrantes, e suas diferenças em relação às ortodoxas, é analisando as fases imaturas das sementes ortodoxas, quando ainda são sensíveis à dessecação. Contudo, pesquisas sobre o

comportamento das sementes ortodoxas durante suas fases imaturas também são escassos, especialmente quanto à influência do ambiente, em que as sementes são formadas.

Ainda há grandes lacunas do conhecimento acerca das diferenças e semelhanças entre os comportamentos das sementes ortodoxas e recalcitrantes e não ter esse conhecimento tem sido um entrave para o desenvolvimento de novas tecnologias para a conservação das sementes (Barbedo, 2018; Barbedo, 2021). Assim, estudos sobre esses comportamentos são cada vez mais necessários, para a compreensão dos processos da fisiologia das sementes (Walters et al., 2013). Um outro aspecto importante para a conservação das sementes é a aquisição e presença de dormência, como os mecanismos que impedem, ou ao menos dificultam, a embebição de água, denominado dormência física, como verificado em sementes de *Erythrina speciosa* Andrews (Molizane et al., 2018).

*Erythrina speciosa* é uma espécie nativa do Brasil, que possui sementes ortodoxas com dormência física. Face à falta de suficiente conhecimento do comportamento das sementes ortodoxas em seus estados imaturos, especialmente quando relacionado às condições ambientais nas quais a semente se desenvolve, neste trabalho buscou-se estudar o comportamento de sementes ortodoxas de *E. speciosa* em suas fases imaturas, formadas em diferentes locais e épocas.

## **Material e Métodos**

### *Obtenção do material vegetal*

Os frutos de *E. speciosa* foram coletados em Florianópolis, SC (27°36'14.0"S, 48°31'17.9"O), com duas coletas, em agosto (SCI) e outubro (SCII), Lajeado, RS (29°25'48.56" S e 51°56'32.83" O), duas coletas, em outubro (RSI) e novembro (RSII) e São Paulo, SP (23° 32' 39" S 46° 37' 41" O), uma coleta, em outubro (SP).

A extração das sementes dos frutos de coloração verde a amarelada de *E. speciosa* coletadas em Lajeado foi realizada no laboratório de Botânica da Univates; já os frutos da coleta de Florianópolis foram acondicionados em sacos térmicos e levados para o laboratório de sementes do Instituto de Pesquisas Ambientais, em São Paulo, onde tiveram suas sementes extraídas, não excedendo 24 horas da coleta; as sementes coletadas em São Paulo foram extraídas no mesmo laboratório. Essas extrações de todas as coletas, foram realizadas por quebra manual dos frutos e retirada das sementes, que foram separadas em seis estádios de maturação (Figura 1), de acordo com a classificação da pigmentação do tegumento de verde claro ao castanho, baseando-se na separação realizada por Molizane et al. (2018) e Hell et al. (2019).

Todos os experimentos foram iniciados em até no máximo 5 dias da extração das sementes do fruto, durante esse período as sementes ficaram armazenadas em BOD a 7°C.

#### *Determinações fisiológicas iniciais*

O teor de água e a massa seca das sementes foram avaliados pelo método de estufa a  $103 \pm 3^\circ\text{C}$ , durante 17 horas, em 4 repetições de 5 sementes cada (ISTA, 2008). O cálculo do teor de água foi realizado em base úmida, sendo expresso em porcentagem (%) e a massa seca foi expressa em  $\text{mg. semente}^{-1}$  (Brasil, 2009).

O teste de germinação, com sementes não escarificadas dos seis estádios de maturação descritos anteriormente, foi realizado com 4 repetições de 20 sementes de cada estádio em rolos de papel, pré-umedecidos com água em 2,5 vezes o peso seco do papel, incubados em sala de germinação a  $25^\circ\text{C}$ , com umidade relativa de 70% sob luz constante (Brasil, 2009). As avaliações de germinação foram realizadas a cada dois dias, durante 30 dias. Após esse período, as sementes não germinadas foram escarificadas manualmente e colocadas novamente para germinar. Considerou-se como germinadas aquelas sementes que apresentaram comprimento de raiz primária igual ou superior a 2 mm e considerou-se

como plântulas normais (PN) as que apresentavam raiz e parte aérea sem defeitos e com desenvolvimento proporcional.

#### *Indução de dormência*

Para análise de indução de dormência tegumentar, como descrito por Molizane et al. (2020), as sementes de todos os estádios de maturação das diferentes coletas foram secas até atingirem 10% de água, utilizando-se estufa com circulação forçada de ar a 40 °C. Após a secagem, a germinação foi avaliada novamente, conforme descrito anteriormente. As sementes apenas foram escarificadas quando não germinadas após 30 dias foram escarificadas manualmente e colocadas novamente para germinar por mais 30 dias, com o objetivo de se confirmar estarem vivas.

#### *Delineamento experimental e tratamento estatístico dos dados*

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado para todos os experimentos. Os dados foram analisados estatisticamente a partir de uma ANOVA de uma via pelo software R 4.1.3, ao nível de 5%, e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, também a 5%.

### **Resultados e Discussão**

A separação dos seis estádios de maturação encontrados pelas características morfológicas das sementes resultou em variações nas características fisiológicas entre os locais de coleta e, em alguns casos, até mesmo no mesmo local, mas em épocas diferentes (Figuras 2 a 6). O teor de água, por exemplo, teve a maior redução entre os estádios V e VI para as sementes de SCI, SCII e RSI (Figuras 2, 3 e 4), mas entre os estádios IV e V para RSII e SP (Figuras 5 e 6). Para diversos autores, o avanço do teor de água é um dos melhores diagnósticos do estágio de maturação das sementes, principalmente das que apresentam comportamento ortodoxo (Marcos-Filho, 2015). Por outro lado, as características morfológicas de frutos e sementes são utilizadas como critérios para definição do momento

apropriado para colheita e obtenção de sementes com o máximo em qualidade (Borges et al., 2005; Vidigal et al., 2011). Pelos resultados do presente trabalho, verifica-se que a utilização desses parâmetros pode ser utilizada com estimativa da evolução do processo, mas que há variações conforme as condições ambientais nas quais as sementes são formadas. Portanto, a utilização dessas características para estimativa do estágio de maturação das sementes e definição do momento de colheita pode ter sua vantagem em termos de rapidez e praticidade, mas ficou evidente, pelos resultados obtidos, que a correta definição do estágio de maturação depende de uma análise mais cautelosa, principalmente considerando-se variações do ambiente, como local e época.

A influência das condições ambientais sobre a evolução da maturação das sementes, algumas vezes de forma diferenciada sobre cada característica, foi preconizada por Barbedo (2018). De fato, a própria evolução do teor de água foi diferente nas diferentes condições. Por exemplo, os menores valores de teor de água até o estágio IV foram das sementes de SCII e, nos estádios seguintes, em SP. Sementes de SC II do estágio I tinham 74% de água, e as de SP, nesse mesmo estágio, 81%. Ao final, no estágio VI, esses valores caíram, respectivamente, para 18% e 9% (Figuras 3 e 6).

Outra característica muito utilizada em conjunto com o teor de água para diagnóstico do estágio de maturação das sementes é a determinação da massa seca. Alguns autores, inclusive, consideram que o máximo acúmulo de massa seca identifica a maturidade fisiológica das sementes (Borges et al., 2005; Araujo e Barbedo, 2017). Contudo, também para essa característica notou-se variação, principalmente entre locais de coleta. À medida que o processo de maturação avançou, as sementes aumentaram a quantidade de massa seca em todos os locais e épocas, mas os maiores valores não foram atingidos sempre no mesmo estágio. Por exemplo, em SCI, SCII e RSII foi atingido no estágio IV (Figuras 2, 3 e 5), enquanto em RSI e SP no estágio III (Figuras 4 e 6). Além disso, o valor máximo de massa

seca também foi diferente entre os diferentes locais e épocas, chegando a diferenças próximas a duas vezes entre diferentes locais, como na comparação entre as sementes de RSII (0,411 mg/semente, figura 5) e as de SCI (0,254 mg/semente, figura 2), ou até mesmo no mesmo local, em épocas diferentes, como na comparação entre RSI e RSII (Figuras 4 e 5, respectivamente).

A capacidade germinativa, por sua vez, aumentou gradativamente ao longo do desenvolvimento das sementes em todos os locais e épocas (exceto em RSII, em que não foi possível obter sementes dos estádios mais imaturos - Figura 5). Contudo, também para essa característica os maiores valores não ocorreram no mesmo estágio para os diferentes locais e épocas. Por exemplo, em SCI e SCII foi atingido no estágio IV (Figuras 2 e 3), em RSI no estágio VI (Figura 4) e em RSII e SP no estágio III (Figuras 5 e 6). É curioso observar que, para SC II, esta característica já estava presente desde o estágio I (Figura 3), enquanto para SCI, ou seja, nas mesmas plantas, mas em época diferente, o início da germinação surgiu somente no estágio III (Figura 2).

A porcentagem de sementes com capacidade de desenvolver plântulas normais foi máxima no último estágio de maturação para todas as coletas (Figuras 2, 3, 5 e 6), exceto para RSI (Figura 4), mas também apresentou variações na evolução ao longo da maturação para os diferentes locais e épocas. Por exemplo, no estágio IV as sementes de SCI ainda não haviam desenvolvido esta capacidade (Figura 2), enquanto as de SCII (mesmas plantas, épocas diferentes) já apresentavam mais de 50% das sementes com essa capacidade (Figura 3).

Finalmente, o surgimento e a porcentagem de dormência nas sementes também apresentaram variações. Tomando-se RS como exemplo, em RSI a dormência surgiu no estágio V, atingindo máximo valor em VI, quando mais de 90% das sementes eram dormentes (Figura 4), enquanto em RSII (mesmas plantas, épocas diferentes) a dormência

praticamente não apareceu (Figura 5). Essas diferenças, embora em menor grau, também foram observadas entre SCI e SCII (Figuras 2 e 3).

A dormência em sementes de *E. speciosa* está fortemente relacionada com a redução no teor de água (Molizane et al., 2018). É possível, por exemplo, induzir dormência em sementes imaturas pela secagem (Molizane et al., 2020). Portanto, para uma correta avaliação do grau de dormência dessas sementes é essencial que sejam submetidas a secagem antes de se instalar o teste de germinação. De fato, nas sementes de SCII a secagem aumentou o grau de dormência nas sementes do estágio V (Figura 3), chegando a superar os 90% contra os menos de 20% antes da secagem. Essas sementes, antes da secagem, estavam com teor de água bem elevado. Contudo, até mesmo essa indução foi dependente de local e época, como observado para sementes de RSII desse mesmo estágio V, que não tiveram aumento da dormência após a secagem (Figura 5). Também é importante notar os valores de sementes dormentes do estágio V de RSI, mesmo com valores ainda elevados de teor de água (Figura 4), bem como a quase inexistência de dormência nas sementes do estágio VI de SCI e RSII, mesmo com os valores muito baixos de teor de água (Figuras 2 e 5).

Em relação especificamente à dormência de sementes de *E. speciosa*, já foi demonstrado que as condições ambientais interferem não apenas no grau de dormência, mas, ainda, na sensibilidade das sementes à quebra dessa dormência (Molizane et al., 2018). Também foi demonstrado que, apesar dessa dormência poder ser induzida em sementes imaturas pela secagem, a eficiência dessa indução também é dependente das condições nas quais as sementes são formadas (Molizane et al., 2020). Os resultados do presente trabalho confirmam não apenas essa influência do ambiente sobre a dormência, mas também sobre todas as demais características analisadas das sementes, como teor de água, massa seca, germinação e capacidade de produzir plântulas normais.

Em todos os locais de coleta, apesar dessas diferenças entre os estádios nas diferentes condições em que as sementes foram formadas, observou-se que as sementes de *E. speciosa* seguiram o modelo clássico de sementes ortodoxas (Ali et al., 2022; Matilla, 2022), perdendo água até valores baixos (próximo a 10%) nos últimos estádios, aumentando a massa seca de forma progressiva até atingir um máximo e aumentando, também progressivamente, a porcentagem de sementes com capacidade de germinar e de produzir plântulas normais à medida que avançavam no seu processo de maturação.

Segundo Barbedo (2018), as variações nas características das sementes formadas sob diferentes condições podem ser interpretadas sob duas escalas temporais. Na primeira, condicionada à própria evolução das espécies nos diferentes ambientes, as respostas são de longo prazo, gerando grandes variações, levando a grandes diferenças no comportamento das sementes de diferentes espécies. Também pode levar a diferenças entre populações distintas da mesma espécie, em locais com condições ambientais bem distintas entre eles. Na segunda, condicionada às variações climáticas momentâneas e pontuais, as diferenças nas características das sementes são menores e podem ocorrer até mesmo nas oriundas das mesmas plantas, porém em épocas distintas (Molizane et al., 2020). Este parece ser o caso das sementes de *E. speciosa*, em que variações em todas as características analisadas ocorreram tanto entre populações distintas, quanto entre sementes das mesmas plantas, produzidas em épocas distintas. Em alguns casos, é possível notar, inclusive, maior proximidade de comportamentos entre sementes de diferentes locais, do que entre sementes das mesmas plantas produzidas em épocas diferentes. Por exemplo, o surgimento e aumento gradativo da capacidade das sementes em produzir plântulas normais tem comportamento mais semelhante entre RSI e SCII do que entre estas e as de SCI. Da mesma forma, a presença e grau de dormência nas sementes têm mais semelhança entre SP e RSI, do que entre estas e RSII. Portanto, as diferenças no comportamento das sementes, durante

sua maturação, podem ser não apenas em função de suas características genética, mas também das condições do ambiente no qual são formadas.

### **Conclusão**

Sementes de *Erythrina speciosa* Andrews apresentam grandes diferenças em seu processo de maturação dependendo do local e da época em que são formadas, coletas RSI e SCII apresentaram comportamento mais semelhante do que entre as duas coletas de SC, e o grau de dormência entre SP e RSI foi mais semelhante do que estas e RSII, sendo produzidas sementes com níveis diferentes das características conforme o ambiente de sua produção.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.

## Referências

ALI, F.; QANMBER, G.; FUGUANG, L.; WANG, Z. Update role of ABA in seed maturation, dormancy, and germination. *Journal of Advanced Research*, v.35, p.199-214, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.03.011>

ARAUJO, A.C.F.B.; BARBEDO, C.J. Changes in desiccation tolerance and respiratory rates of immature *Caesalpinia echinata* Lam. seeds. *Journal of Seed Science*, v.39, p.123-132, 2017.

<https://doi.org/10.1590/2317-1545v39n2167788>

BARBEDO, C.J. A new approach towards the so-called recalcitrant seeds. *Journal of Seed Science*. v.40, p.221-236, 2018.

<https://doi.org/10.1590/2317-1545v40n3207201>

BARBEDO, C.J. *A recalcitrância da semente*. São Paulo: Archangelus, 2021.

BONJOVANI, M.R.; BARBEDO, C.J. 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*, v.31, p.345-356, 2008.

<http://www.scielo.br/pdf/rbb/v31n2/v31n2a17.pdf>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA, 2009. 395p.

<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/regras-para-analise-de-sementes.pdf/view>

BORGES, I.F.; DEL GIUDICE NETO, J.; BILIA, D.A.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; BARBEDO, C.J. Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.48, p. 851–861, 2005.

<https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000800001>

BOTANIC GARDENS CONSERVATION INTERNATIONAL. *Normas internacionais de conservação para jardins botânicos*. Rio de Janeiro: MMA/JBRJ/RBJB, 2001. 112p.

FÉLIX, F.C.; ARAÚJO, F.S.; FERRARI, C.S.; PACHECO, M.V. Dessecação e armazenamento de sementes de *Adonidia merrillii* (Becc.) Becc. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.12, p.86-91, 2017.

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=119050448014>

FORZZA, R.C.; LEITMAN, P.M.; COSTA, A.F.; CARVALHO Jr., A.A.; PEIXOTO, A.L.; WALTER, B.M.T.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; Costa, D.P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; LIMA, H.C.; PRADO, J.; STEHMANN, J.R.; BAUMGRATZ, J.F.A.; PIRANI, J.R.; SYLVESTRE, L.; MAIA, L.C.; LOHMANN, L.G.; QUEIROZ, L.P.; SILVEIRA, M.; COELHO, M.N.; MAMEDE, M.C.; BASTOS, M.N.C.; MORIM, M.P.; Barbosa, M.; Menezes, M.; Hopkins, M.; Secco, R.; CAVALCANTI, T. B.; SOUZA, V.C. 2012. Introdução. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>.

HELL, A.; KRETZSCHMAR, F.S.; SIMÕES, K.; HEYER, A.G.; BARBEDO, C.J.; BRAGA, M.R.; CENTENO, D.C. Metabolic changes on the acquisition of desiccation tolerance in seeds of the

Brazilian native tree *Erythrina speciosa*. *Frontiers in Plant Science*, v.10, n.1356, 2019.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01356>

HOSSEL, C.; HOSSEL, J.S.A.O.; ALEGRETTI, A.L.; WAGNER JUNIOR, A.; DALLAGO, A. Hidrocondicionamento e atmosfera modificada ou controlada para a conservação da viabilidade de sementes de cerejeira-da-mata. *Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science*, v.9, p.99-106, 2016.

<https://doi.org/10.5935/PAeT.V9.N2.11>

MARCOS-FILHO, J. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. 2.ed. ABRATES: Londrina, 2015. 659p.

MATILLA, A.J. The orthodox dry seeds are alive: a clear example of desiccation tolerance. *Plants*, v.11, p.1-20, 2022.

<https://doi.org/10.3390/plants11010020>

MOLIZANE, D.M.; JULIO, P.G.S.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M.; BARBEDO, C.J. Physical, physiological and anatomical changes in *Erythrina speciosa* Andrews seeds from different seasons related to the dormancy degree. *Journal of Seed Science*, v.40, p.331-341, 2018.

<https://doi.org/10.1590/2317-1545v40n3199428>

MOLIZANE, D.M.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M.; BARBEDO, C.J. Induction of seed coat water impermeability during maturation of *Erythrina speciosa* seeds. *Journal of Seed Science*, v.42, e202042019, 2020.

<https://doi.org/10.1590/2317-1545v42228614>

MONTEIRO, L.; MACHADO N.; MARTINS, E.; POUGY, N.; VERDI, M.; MARTINELLI, G.; LOYOLA, R. Conservation priorities for the threatened flora of mountaintop grasslands in Brazil. *Flora*, v.238, p.234-243, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.03.007>

OLIVEIRA, U.; SOARES-FILHO, B.S.; PAGLIA A.P.; BRESCOVIT, A.D.; CARVALHO, C.J.B.; SILVA, D.P.; REZENDE, D.T.; LEITE, F.S.F.; BATISTA, J.A.N.B.; BARBOSA, J.P.P.P.; STEHMANN, J.R.; ASCHER, J.S.; VASCONCELOS, M.F.; MARCO, P.; LÖWENBERG-NETO, P.; FERRO, V.G.; SANTOS, A.J. Biodiversity conservation gaps in the Brazilian protected areas. *Scientific Reports*, v.7, 9141, 2017.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-08707-2>

PILON, A.C.; VALLI, M.; DAMETTO, A.C.; PINTO, M.E.F.; FREIRE, R.T.; CASTRO-GAMBOA, I.; ANDRICOPULO, A.D.; BOLZANI V.S. NuBBEdb: an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. *Scientific Reports*, v. 7, 7215, 2017.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-07451-x>

VIDIGAL, D. S.; DIAS, D.C.F. S.; DIAS, L.A.S.; FINGER, F.L. Changes in seed quality during fruit maturation of sweet pepper. *Scientia Agricola*, v.68, p.535-539, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S0103-90162011000500004>

WALTERS, C.; BERJAK, P; PAMMENTER, P.; KENNEDY, K.; RAVEN, P. Preservation of recalcitrant seeds. *Science*, v.339, p.915-916, 2013.

<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1230935>



Figura 1: Sementes de *Erythrina speciosa* Andrews em seus diferentes estádios de coleta (I-VI) com a metodologia de separação por coloração utilizada no presente trabalho. Escala: 1cm.

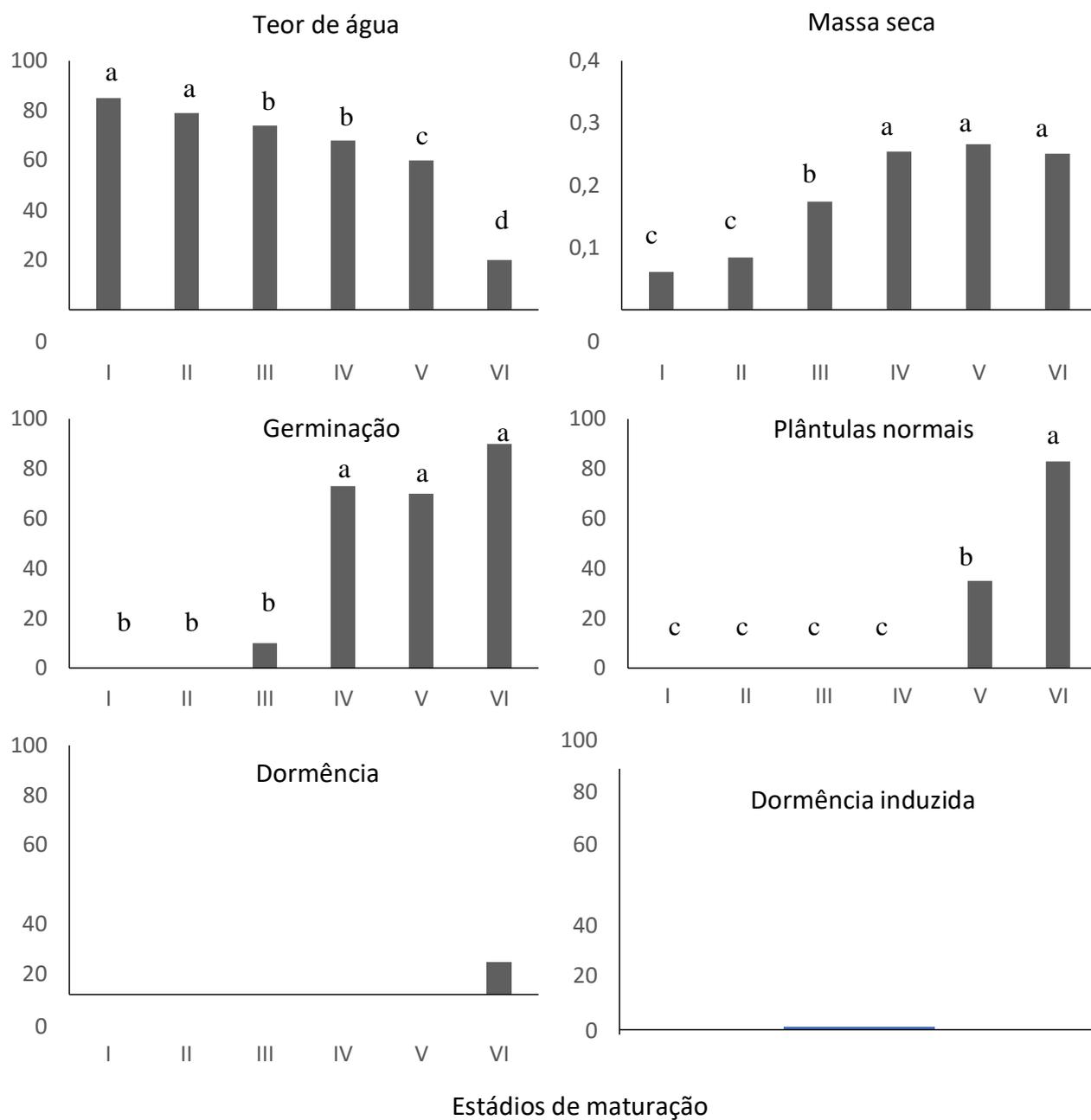


Figura 2. Teor de água (%), massa seca (mg. semente<sup>-1</sup>), germinação (%), desenvolvimento de plântulas normais (%), dormência (%) e dormência induzida (%) das sementes de *Erythrina speciosa* Andrews, dos estádios I a VI, da coleta de SC I. Letras iguais para os estádios não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

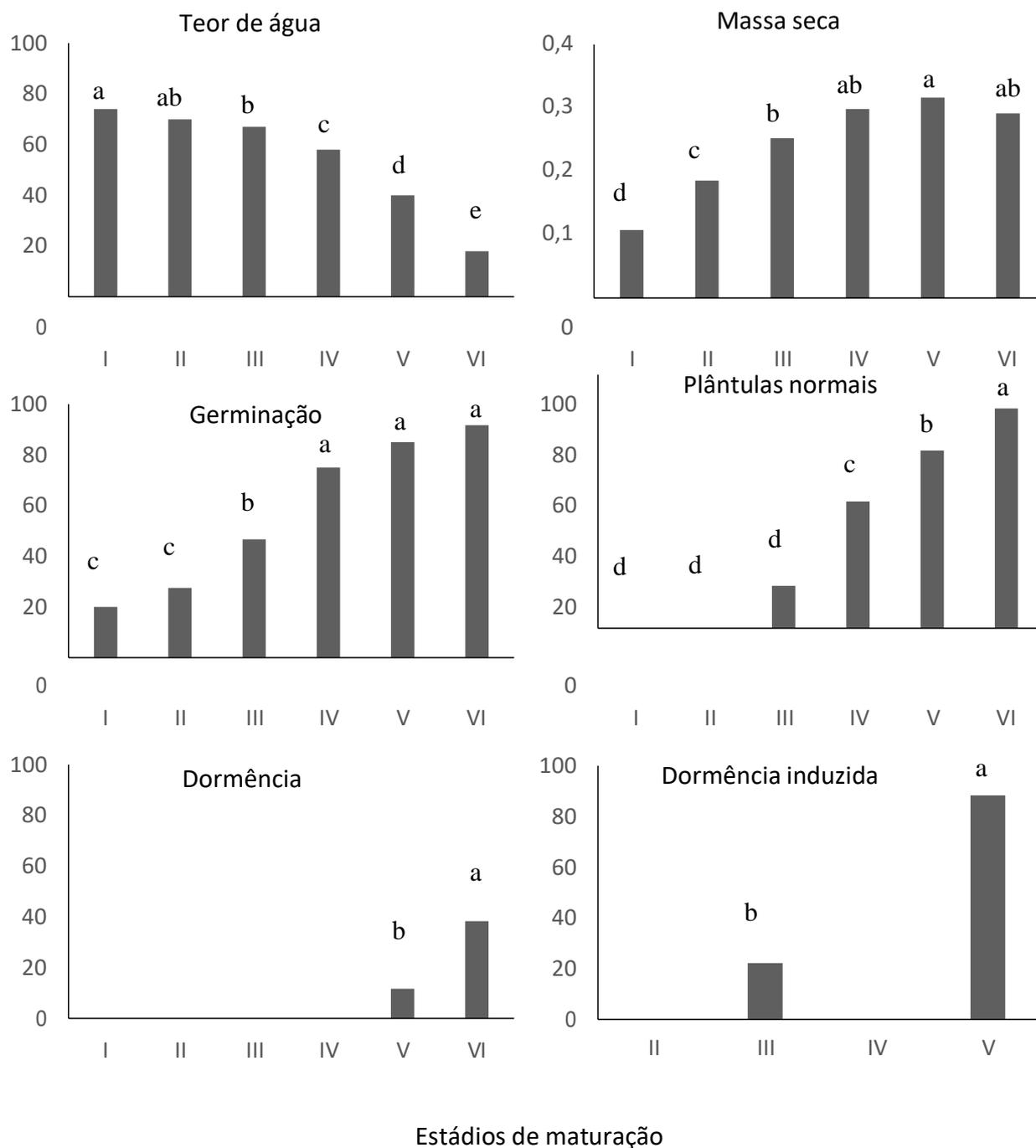


Figura 3. Teor de água (%), massa seca (mg. semente<sup>-1</sup>), germinação (%), plântulas normais (%), dormência (%) e dormência induzida (%) das sementes de *Erythrina speciosa* Andrews, dos estádios I a VI, da coleta de SC II. Letras iguais para os estádios não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

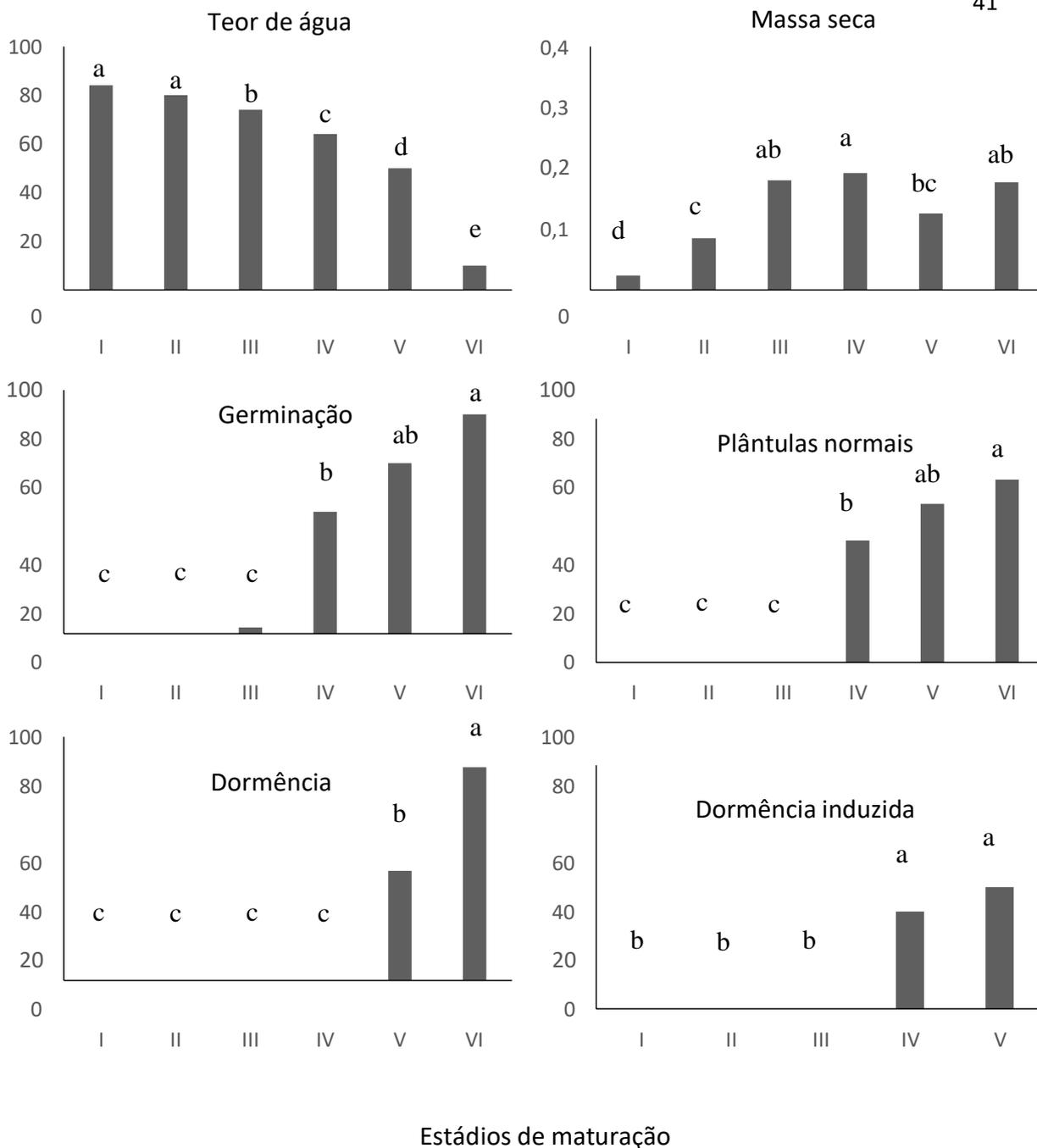


Figura 4. Teor de água (%), massa seca (mg. semente<sup>-1</sup>), germinação (%), plântulas normais (%), dormência (%) e dormência induzida (%) das sementes de *Erythrina speciosa* Andrews, dos estádios I a VI, da coleta de RS I. Letras iguais para os estádios não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

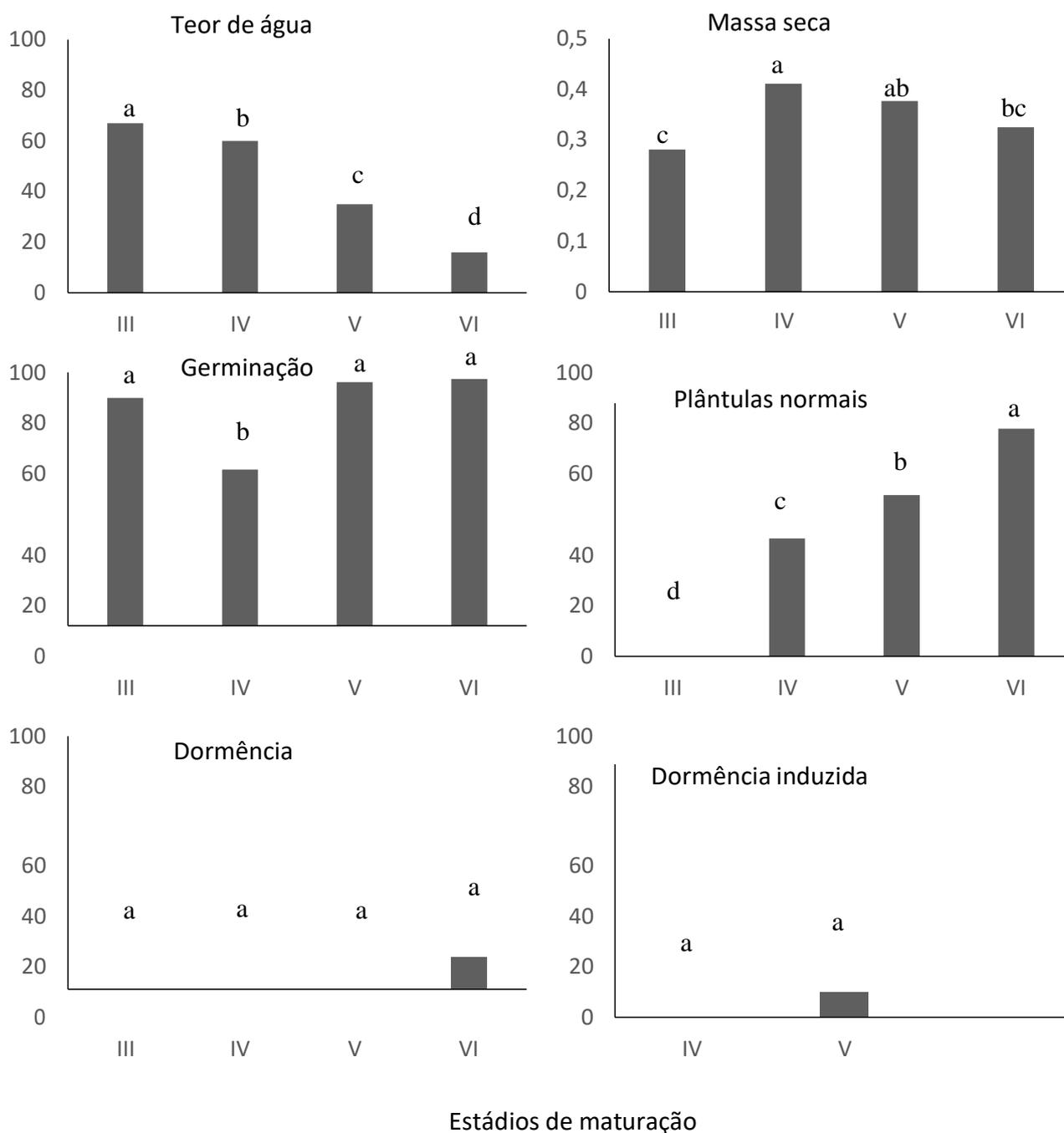


Figura 5. Teor de água (%), massa seca (mg. semente<sup>-1</sup>), germinação (%), plântulas normais (%), dormência (%) e dormência induzida (%) das sementes de *Erythrina speciosa* Andrews, dos estádios I a VI, da coleta de RS II. Letras iguais para os estádios não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

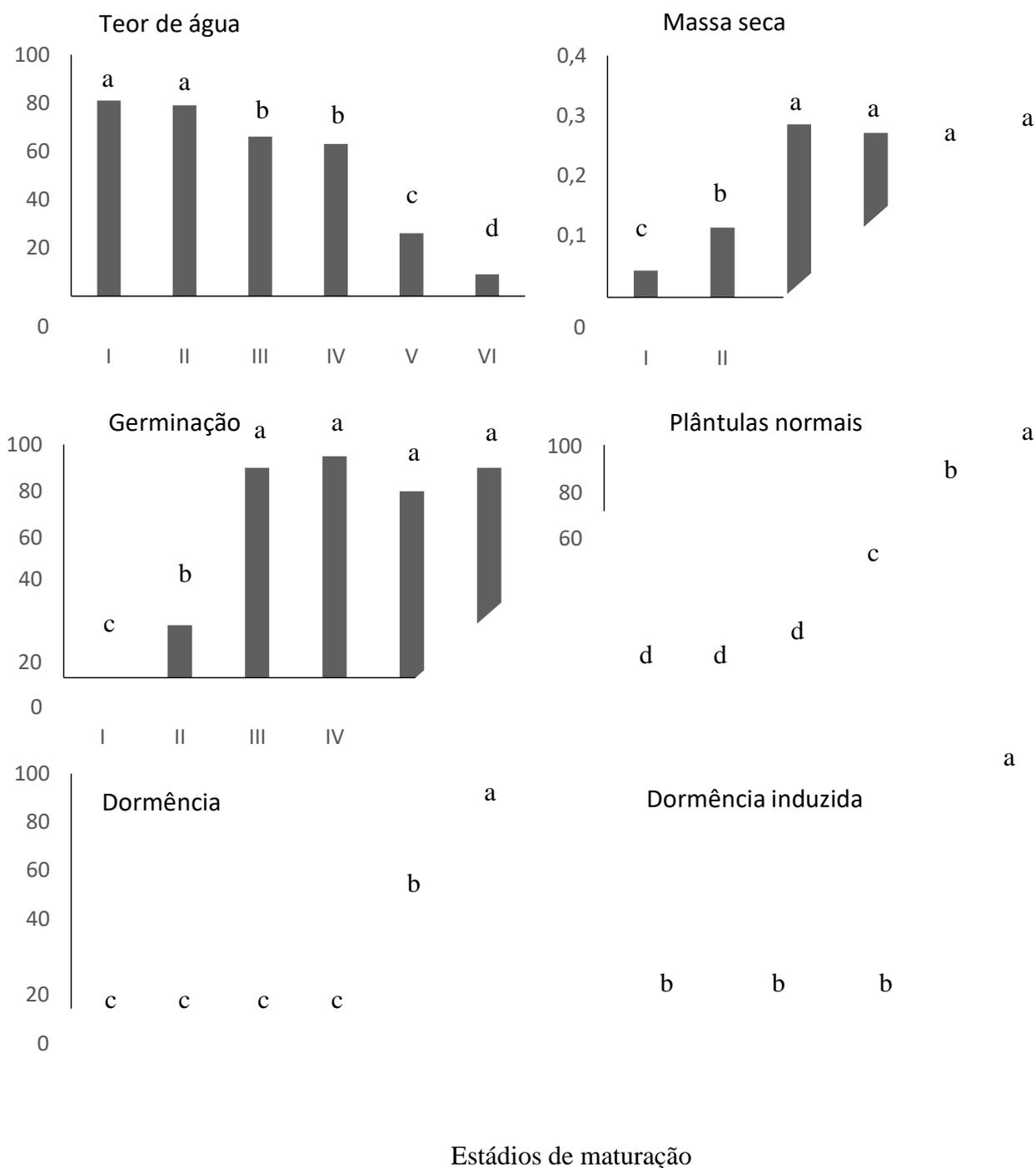


Figura 6. Teor de água (%), massa seca (mg. semente<sup>-1</sup>), germinação (%), plântulas normais (%), dormência (%) e dormência induzida (%) das sementes de *Erythrina speciosa* Andrews, dos estádios I a VI, dados da coleta de SP. Letras iguais para os estádios não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## Capítulo II

**Comparativo da maturação, germinação e respiração das sementes de  
*Erythrina speciosa* e *Inga vera* de diferentes ambientes**

## Resumo

Sementes recalcitrantes são dispersas com elevado teor de água, sendo esse um dos principais problemas em relação a conservação e armazenamento dessas sementes; já sementes ortodoxas são dispersas com baixo teor de água e conseguem ser armazenadas por longos períodos. Neste trabalho, buscou-se estudar o comportamento de sementes ortodoxas de *Erythrina speciosa* e recalcitrantes de *Inga vera*, observando as semelhanças e as diferenças entre os dois grupos durante a maturação. As sementes foram caracterizadas conforme seu estágio de maturação e os estádios imaturos passaram por secagens progressivas, precedidas ou não de osmocondicionamento. Analisaram-se germinação, produção de plântulas normais e taxas respiratórias de ambas as espécies. Os resultados possibilitaram observar que as sementes ortodoxas imaturas de *E. speciosa* apresentaram maior semelhança de comportamento com as recalcitrantes de *I. vera*, do que com as suas respectivas maduras.

Termos para indexação: Tolerância à dessecação, sementes ortodoxas, sementes recalcitrantes

## Abstract

Recalcitrant seeds are shed with a high water content, which is one of the main problems regarding the conservation and storage of these seeds; orthodox seeds are shed with low water content and can be stored for long periods. In this work, we sought to study the behavior of orthodox *Erythrina speciosa* and recalcitrant *Inga vera* seeds, observing the similarities and differences between the two groups during maturation. The seeds were characterized according to their maturation stage and the immature stages underwent progressive drying, followed or not by osmopriming. Germination, production of normal seedlings and respiratory rates of both species were analyzed. The results showed that the immature orthodox seeds of *E. speciosa* showed greater similarity in behavior with the recalcitrant *I. vera*, than with their respective mature ones.

Index terms: Desiccation tolerance, orthodox seeds, recalcitrant seeds

## Introdução

A conservação de espécies florestais, pode ser realizada baseada em duas estratégias: *in situ* ou *ex situ*; a segunda, mais amplamente utilizada, mantém amostras de organismos fora de seu habitat natural. A conservação de sementes é o método mais amplamente empregado para a conservação *ex situ* visto que é a mais econômica, mais longa, de mais fácil manipulação e a que ocupa os menores espaços físicos (Botanic Gardens Conservation International 2001).

A metodologia convencional de conservação de sementes utilizada em bancos de germoplasma compreende a secagem e armazenamento em câmaras a temperaturas abaixo de zero (Corlett 2016). Entretanto, nem todas as sementes são dispersas com baixo conteúdo de água, sendo então desenvolvida uma classificação para as sementes em relação a sua tolerância à dessecação e capacidade de armazenamento (Roberts 1973). Sementes que não toleram a dessecação e não podem ser armazenadas por muito tempo são chamadas de recalcitrantes e as que são capazes de tolerar à dessecação e serem armazenadas por longo período e ainda assim germinarem são consideradas ortodoxas (Dekkers *et al.* 2015).

Com o avanço das pesquisas nessa área, especialmente com as espécies tropicais, cada vez mais trabalhos surgem, nos quais os autores questionam se realmente as sementes se encontram em diferentes grupos (ortodoxa ou recalcitrante), ou se a tolerância à dessecação entre outras características presentes nas sementes não seria um gradiente, dependendo do

quanto elas avançaram no processo de maturação até serem desligadas da planta-mãe em conjunto com as características do meio em que foram formadas (Walters 2000, Barbedo *et al.* 2013, Barbedo 2018).

Essa tendência a comportamento ortodoxo ou recalcitrante das sementes pode ser altamente influenciável por diversos fatores, tais como: condições ambientais em que a planta-mãe e as sementes em sua formação e desenvolvimento foram submetidas, clima, temperatura, pluviosidade, regiões nas quais a espécie se encontra, anos de coleta. Todos esses fatores podem influenciar no ciclo reprodutivo e maturação das sementes, até mesmo na presença ou ausência de dormência nas sementes (Baskin & Baskin 2004, Marcos Filho 2015).

Estudos recentes têm demonstrado que são vários os fatores responsáveis pelas diferenças no comportamento das sementes e, dessa forma, sementes recalcitrantes em suas fases de maturação se encaixariam em algum período imaturo das sementes ortodoxas, já que, as sementes recalcitrantes seriam as que tiveram um desligamento prematuro da planta mãe. Com isso, não teríamos padrões definidos em relação a maturação das sementes (recalcitrantes ou ortodoxas), massim níveis de comportamento de acordo com o grau de desenvolvimento das sementes (Barbedo *et al.* 2013, Newton *et al.* 2013, Barbedo 2018).

Em sementes recalcitrantes, devido ao seu elevado teor de água, há intensa atividade metabólica; conseqüentemente, essas sementes apresentam elevadas taxas respiratórias. Entretanto, quando se utilizam meios de secagens comuns, a quantidade de água que fica disponível não é a adequada para o metabolismo tão ativo como o dessas sementes, com isso

elevadas são as chances de ocorrência de danos ligados ao metabolismo e a respiração, resultando em danos ou não ocorrência da germinação (Fonsenca & Freire 2003, Bonjovani & Barbedo 2019).

Em algumas pesquisas, observa-se a tentativa de desenvolver novas técnicas de armazenamento para as sementes recalcitrantes. Uma dessas técnicas é a utilização de soluções osmóticas em potenciais hídricos conhecidos, também chamada pré-hidratação, evitando assim que a semente aumente ou diminua sua quantidade de água. Uma alternativa é a secagem até o menor nível de água suportado pela semente sem comprometer seus sistemas respiratório e antioxidante; para isso, um dos materiais mais utilizados é o polietilenoglicol (PEG), um polímero inerte de alto peso molecular (Bonjovani & Barbedo 2020).

Dessa forma, com o objetivo de esclarecer partes do desenvolvimento e maturação das sementes em conjunto com a tolerância à dessecação, estudou-se o comportamento de duas espécies (*Erythrina speciosa*, ortodoxa, e *Inga vera* recalcitrante) durante seu desenvolvimento, observando se há características em comum entre as espécies, relacionando-as com a tolerância à dessecação, em conjunto com a respiração ao longo do desenvolvimento.

## **Material e Métodos**

### *Obtenção do material vegetal*

Os frutos maduros de acordo com a coloração e quantidade de endosperma da semente de *I. vera* foram coletados em 2023 no Parque Villa-Lobos em São Paulo (23°32'48"S, 46°43'16"O), acondicionados em sacos e encaminhados para o laboratório de sementes do

Instituto de Pesquisas Ambientais – IPA. Os embriões foram extraídos não excedendo 24 horas da coleta. Já os frutos de *E. speciosa* foram coletados em Florianópolis, SC, no campus da UFSC (27°36'14,0"S, 48°31'17,9"O), em duas épocas: agosto (SCI) e outubro (SCII). Após a coleta, os frutos foram acondicionados em sacos térmicos e levados para o laboratório de sementes do Instituto de Pesquisas Ambientais – IPA, onde as sementes foram extraídas, não excedendo 24 horas da coleta.

Para os embriões de *I. vera*, realizou-se a extração com a abertura manual dos frutos e retirada das sementes. As sementes tiveram sua sarcotesta (tegumento) removida, permitindo a obtenção dos embriões, que foram utilizados nos experimentos. Estes foram separados em 4 estádios de maturação de acordo com informações de Bonjovani & Barbedo (2008). Já as sementes de *E. speciosa*, foram separadas em seis estádios de maturação, de acordo com a classificação da pigmentação do tegumento de verde claro ao castanho, baseando-se na separação feita por Molizane *et al.* (2018) e Hell *et al.* (2019), utilizando-se os estádios I, II, III e IV. Todos os experimentos foram iniciados em até no máximo 5 dias da extração dos embriões/sementes dos frutos.

#### *Determinação do teor de água e massa seca*

O teor de água e o conteúdo de massa seca das sementes e embriões foram avaliados pelo método de estufa a  $103 \pm 3^\circ\text{C}$ , durante 17 horas (ISTA 1985). Utilizaram-se, para cada amostra, 4 repetições de 5 sementes. O cálculo do teor de água foi realizado em base úmida, sendo expresso em porcentagem (%) e a massa seca foi expressa em mg/semente (Brasil 2009).

#### *Secagens das sementes*

Para análise dos efeitos do teor de água dos embriões e das sementes de *I. vera* e *E. speciosa*, respectivamente, realizaram-se dois métodos de secagem: no primeiro, a secagem foi realizada diretamente em estufa com circulação forçada de ar a  $40^\circ\text{C}$ ; no segundo, foi realizado um tratamento osmótico prévio à secagem. Este consistiu da incubação de

sementes/embriões em solução de PEG 6000 (PEG), no potencial de -3,0 MPa. Para tanto, as sementes/embriões foram colocadas (os), sobre 2 folhas de papel filtro pré-umedecido com a solução de PEG até a cobertura completa das sementes/embriões, cobertas por mais uma folha também pré-umedecida, e dispostas em bandejas plásticas. Estas foram armazenadas em câmeras do tipo B.O.D a 8° C durante 24 horas e, em seguida, as sementes/embriões foram retiradas (os), lavados para remoção de resíduos do PEG e submetidos à secagem, conforme descrito anteriormente.

Em ambos os métodos de secagem os teores de água foram reduzidos até 50%, 40%, 30% e 20%, para os embriões de *I. vera*, e até 40%, 30%, 20% e 10%, para as sementes de *E. speciosa*. Após cada ciclo de secagem, o teor de água, a germinação e a capacidade de formação de plântulas normais foram avaliados.

#### *Germinação*

O teste de germinação foi realizado com as sementes/embriões acomodadas em rolos de papel pré-umedecidos com água, em 2,5 vezes o peso seco do papel, sendo colocadas posteriormente na sala de germinação a 25 °C, com umidade relativa de 70% sob luz constante. Registraram-se embriões/sementes com protrusão da raiz primária (igual ou superior a 2 mm, Hadas 1976), para germinação, e com produção de plântulas normais, seguindo os critérios de Bonjovani & Barbedo (2008), para *I. vera*, e Molizane *et al.* (2018), para *E. speciosa*. Para os embriões de *I. vera*, as avaliações foram realizadas a cada dois dias, durante 14 dias. Como a espécie possui poliembrionia, quando ocorreu mais de uma germinação os embriões foram mantidos juntos durante as avaliações, sendo registrado apenas um. Já para as sementes de *E. speciosa* as avaliações foram realizadas a cada dois dias, durante 30 dias. Ao final, as sementes que não embeberam e não germinaram passaram por escarificação mecânica e foram colocadas novamente para germinar por mais 30 dias.

#### *Análise das taxas respiratórias*

As taxas respiratórias e o quociente respiratório ( $QR = \text{CO}_2 \text{ liberado} / \text{O}_2 \text{ consumido}$ ) dos embriões de *I. vera* e das sementes de *E. speciosa*, foram estimados pela avaliação do consumo de oxigênio ( $\text{O}_2$ ) e da liberação de gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ), das sementes e embriões incubados em frascos herméticos (respirômetros), de acordo com as metodologias de Lamarca & Barbedo (2012) e Bonjovani & Barbedo (2019). As amostras do ar dos frascos foram analisadas em Analisador de Gases 6600 Systechn Illinois (Illinois USA).

Para início dos experimentos considerou-se a atmosfera normal (21% de  $\text{O}_2$  e 0,03% de  $\text{CO}_2$ ) e pressão atmosférica local de 0,9 atm. O consumo de  $\text{O}_2$  e a liberação de  $\text{CO}_2$  foram estimados pela diferença entre os valores obtidos e os valores iniciais. Os valores obtidos em porcentagem de volume dos gases foram convertidos para pressão parcial do gás, de acordo com a fórmula  $P_1/P \times V_1/ V_2$  (Feltre 1985), na qual:

$P_1$  = pressão parcial do gás (em atm);

$P_2$  = pressão atmosférica local (0,9 atm);

$V_1$  = volume do gás (em %);

$V_2$  = volume total de ar (100%).

A pressão parcial de cada gás foi, então, convertida para mols de  $\text{O}_2$  e de  $\text{CO}_2$ , pela equação de Clapayron  $PV = nRT$ , na qual:

$P$  = pressão parcial do gás

$V$  = volume total do frasco (0,6 L);

$n$  = número de moles do gás;

$R$  = constante universal dos gases perfeitos (0,082 atm.L. mol<sup>-1</sup>. K<sup>1</sup>);

$T$  = temperatura (em Kelvin).

O valor de número de mols foi convertido para  $\mu\text{mols}$  e dividido pela massa seca respirante (em gramas, baseando-se nos valores de teor de água das sementes/embriões e do peso de embriões/sementes colocados para incubar nos respirômetros) e pelo tempo de incubação (em horas), obtendo-se os valores em  $\mu\text{mol} \cdot \text{gMS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Além dos valores de

consumo de O<sub>2</sub>, liberação de CO<sub>2</sub> e QR, calculou-se, ainda, a taxa oxidativa pela diferença entre o O<sub>2</sub> consumido e o CO<sub>2</sub> liberado, ou seja,  $TO = O_2 - CO_2$  (Bragante *et al.* 2018).

#### *Delineamento experimental e tratamento estatístico dos dados*

Os experimentos foram em delineamento totalmente casualizado e as análises estatísticas foram realizadas pelo software RStudio 4.1.3. Os dados iniciais dos estádios em diferentes locais de coleta foram submetidos à análise de variância ao nível de 5% e as médias dos estádios foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para as secagens de ambas as espécies se utilizou análise fatorial entre estágio de maturação x tipo de secagem (com ou sem pré-tratamento com PEG). Para a respiração as médias do consumo de O<sub>2</sub> e liberação de CO<sub>2</sub> foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **Resultados e Discussão**

Tanto para sementes recalcitrantes quanto para sementes ortodoxas, o teor de água dos embriões e/ou sementes é uma das características mais utilizadas para se ter como base o estágio de maturação, entretanto frequentemente há grandes variações dentro da espécie nessa e em outras características da maturação (Capítulo I). Para os embriões de *I. vera*, não houve diferença entre o teor de água dos quatro estádios de maturação (Figura 1), que ficou próximo a 57%. Esse valor seria equivalente ao estágio IV das sementes de *E. speciosa* de SCII e V de SCI (Capítulo I). Considerando-se os 4 estádios iniciais de *E. speciosa*, verifica-se que o teor de água também se altera muito pouco (Capítulo I). Essa pequena variação no teor de água desses 4 estádios, das duas espécies, é comum para sementes classificadas como recalcitrantes, sendo elevados até a dispersão, já que não passam pelo processo de secagem ao final da maturação. Nas sementes de *E. speciosa*, classificadas como ortodoxas, a grande alteração no teor de água ocorre somente nos dois últimos estádios, ou seja, ao final do seu desenvolvimento, caracterizando a típica secagem da maturação (Bewley & Nonogaki 2017, Devic & Roscoe 2016). Porém, mesmo nessas sementes ortodoxas observa-se que, por mais

que siga o padrão de diminuição do teor de água, ocorreram variações nas sementes das mesmas plantas, mas em épocas diferentes (Capítulo I).

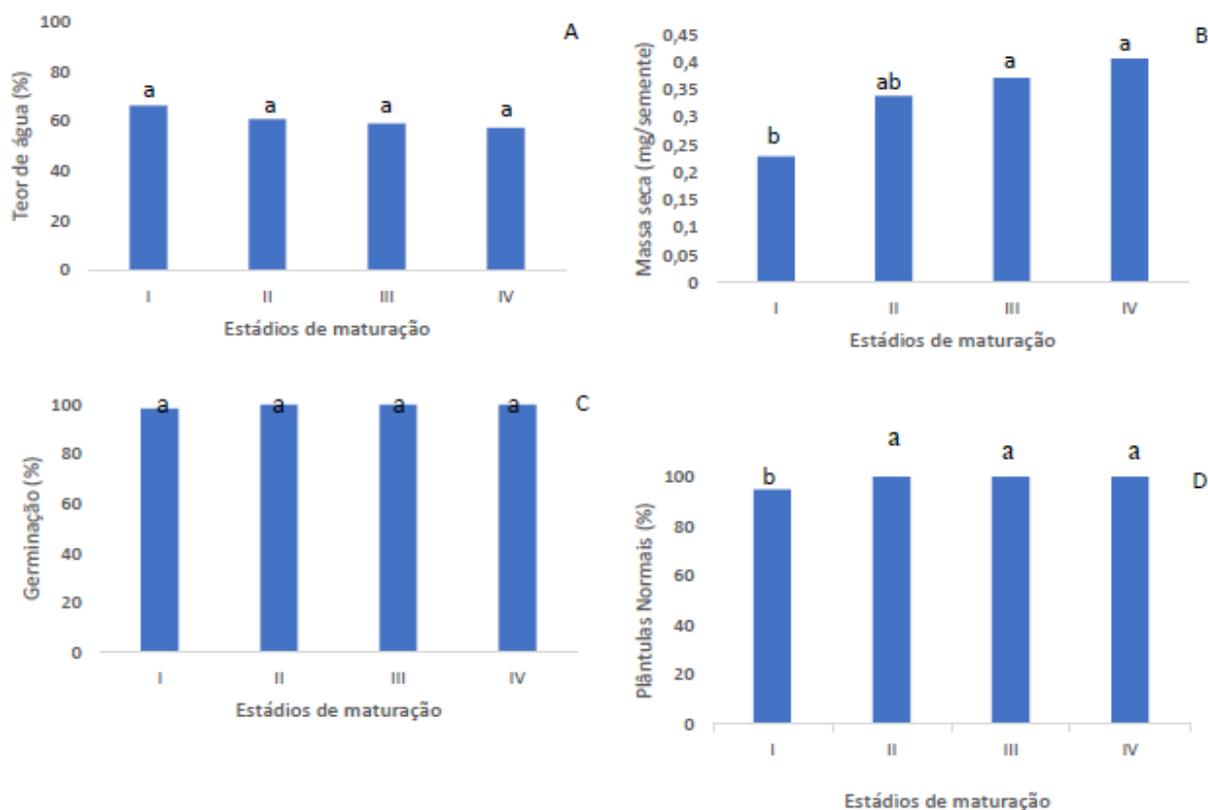


Figura 1: Teor de água (%), massa seca ( $\text{mg/semente}^{-1}$ ), germinação (%) e plântulas normais (%) dos estádios I ao IV dos embriões de *Inga vera*. Letras iguais para os estádios não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Alguns autores discutem essas variações dentro da mesma espécie, considerando que há variações individuais e/ou devido às condições ambientais durante o desenvolvimento das sementes. Além da variabilidade genética que ocorre dentro de uma mesma população, nem todos os indivíduos têm a floração no mesmo tempo, por exemplo, influenciando o desenvolvimento das suas sementes, (Carvalho & Nakagawa 2000, Walters *et al.* 2013, Nascimento *et al.* 2021). Entretanto, fica evidente que, mesmo em sementes ortodoxas coletadas nas mesmas matrizes no mesmo ano, ocorrem grandes diferenças em seus teores de água nos estádios imaturos, sendo muitas vezes mais semelhantes com uma espécie recalcitrante do que com ela mesma no final da sua maturação, ou com sementes do mesmo estágio de maturação produzidas em outras condições.

Em relação a quantidade de massa seca, observa-se que os maiores valores foram atingidos, para *I. vera*, entre os estádio II e III (Figura 1), enquanto nas sementes de *E. speciosa* foram nos estádios III e IV (Capítulo I). Para germinação e desenvolvimento de plântulas normais, em *I. vera* as sementes atingiram mais de 90% já no estádio II (Figura 1), enquanto em *E. speciosa* o estádio em que os maiores valores de germinação foram encontrados tiveram grande variação, oscilando conforme a região e a época de coleta (Capítulo I). Já para a capacidade em produzir plântulas normais, em *E. speciosa* houve aumento com a evolução da maturação e os máximos foram atingidos nos estádios finais, V e VI ou seja, após o estádio IV (Capítulo 1).

Sementes recalcitrantes como as de *I. vera* são dispersas com elevada quantidade de água e, como demonstrado anteriormente, mesmo nos estádios mais imaturos possuem elevada capacidade de germinar e produzir de plântulas normais, fato observado também por outros autores, na própria *I. vera* mas também em outras espécies com sementes recalcitrantes (Lamarca *et al.* 2013, Caccere *et al.* 2013). Dessa forma, são dispersas com pronta capacidade de colonizar o ambiente, tendo suficiente água e capacidade de germinar. Contudo, também em função do elevado teor de água, essas sementes possuem alta taxa de deterioração, sendo, portanto, importante a rápida colonização da espécie no espaço, como estratégia adaptativa.

Já em sementes que passam pela secagem pré-programada, normalmente consegue-se observar que essas características estão mais acentuadas quando o metabolismo está reduzido e essas sementes estão prontas para serem dispersas, sendo então nos últimos estádios de maturação. Além de que, sementes de *E. speciosa* apresentam dormência tegumentar normalmente no seu último estádio de desenvolvimento (estádio VI), conseguindo dessa maneira se propagar no tempo, sendo essa uma estratégia adaptativa (Molizane *et al.* 2018, Molizane *et al.* 2020, Klupczynska & Pawłowski 2021).

Em relação às secagens, verificou-se que, em sementes de *E. speciosa* dos estádios iniciais (estádios I e II de SCI e estádio I de SCII), que possuíam elevados teores de água, não

houve germinação em nenhuma das secagens (tabela 1). Isso se deve, principalmente, ao fato de que sementes ortodoxas possuem o desenvolvimento do seu sistema de proteínas e enzimas protetoras das estruturas citoplasmáticas em relação a desidratação ao final do seu processo de maturação, quando essas sementes irão passar pela secagem programada (Marcos-Filho 2015). Já quando se observa sementes do estágio III (74% de água) começa-se a observar a germinação para SCII (tabela 1).

Nas sementes de *E. speciosa* de SCI, observou-se a germinação e a produção de plântulas normais no estágio VI, com uma taxa de 68%. Houve germinação mesmo com até 20% de secagem. Na segunda coleta, a produção de plântulas normais também ocorreu quando as sementes tinham um teor de água menor, semelhante ao dos embriões de *Inga vera* nos estádios III e IV, com 67% e 58% de água, respectivamente. Nos embriões de *I. vera* ocorreu elevada germinação e formação de plântulas normais nas secagens até 50% e 40% de água, em todos os estádios, mas sem germinação quando o teor de água foi reduzido para 30% (tabela 2). Com o pré-tratamento com PEG, houve algum aumento na tolerância à dessecação desses embriões, mas ainda muito pequeno. Esse pré-tratamento, para as sementes de *E. speciosa*, produziu algum benefício apenas para sementes de SCII, estágio II.

Evidenciou-se mais uma vez que, não apenas o teor de água rege o desenvolvimento das características das sementes. Em conjunto com ele temos os fatores ambientais e um mínimo desenvolvimento das sementes. Porém, nas sementes imaturas encontrou-se mais semelhanças em relação ao comportamento durante o osmocondicionamento das espécies (ortodoxa e recalcitrante), do que entre as duas coletas de *E. speciosa*.

Esses comportamentos são facilmente explicados com o modelo de Barbedo *et al.* (2013), segundo o qual o grau de maturação em que a semente é dispersa da planta-mãe é o que rege o comportamento das sementes. Além disso, este é altamente influenciado pelas características do meio, podendo adiantar ou atrasar a aquisição da capacidade germinativa (Barbedo, 2018).

Tabela 1. Germinação (%) e produção de plântulas normais (%) de sementes de *Erythrina speciosa*, de duas épocas (SCI e SCII), de 4 estádios de maturação (I a IV), submetidas a secagem até teores de 40%, 30%, 20% e 10%, com ou sem pré-tratamento com PEG. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas comparando estádios de maturação, maiúsculas comparando níveis de secagem) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Estádios de maturação - SCI									
Teor de água	I		II		III		IV		
	Sem PEG	Com PEG							
Germinação									
40%	0	0	0	0	13 bA	0	65 aA	0	
30%	0	0	0	0	23 bA	0	45 aA	0	
20%	0	0	0	0	3 bA	0	55 aA	0	
10%	0	0	0	0	0	0	0	0	
Plântulas Normais									
40%	0	0	0	0	0	0	20 aA	0	
30%	0	0	0	0	0	0	30 aA	0	
20%	0	0	0	0	0	0	40 aA	0	
10%	0	0	0	0	0	0	0	0	
Estádios de maturação - SCII									
Teor de água	I		II		III		IV		
	Sem PEG	Com PEG							
Germinação									
40%			20	50	62	0	78	42	
30%			40	0	64	11	78	0	
20%			0	0	0	13	69	18	
10%			0	0	32	0	0	20	
Plântulas Normais									
Teor de água	Sem PEG	Com PEG							
40%			0	0	36 bA	0	56 aA	16 aA	
30%			0	0	18 bA	11 bA	69 aA	0	
20%			0	0	0	2 bAB	42 aAB	2 aAB	
10%			0	0	14 bB	0	0	0	

Tabela 2: Germinação (%) e formação de plântulas normais (%) de embriões de *Inga vera* de quatro estádios de maturação (I a IV), nos teores de água de 50%, 40%, 30% e 20%, com e sem tratamento pré-secagem de PEG. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas para comparação entre estádios de maturação, maiúsculas entre teores de água) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Teor de água	Estádios de maturação							
	I		II		III		IV	
	Sem PEG	Com PEG	Sem PEG	Com PEG	Sem PEG	Com PEG	Sem PEG	Com PEG
	Germinação							
50%	100 aA	100 aA	100 aA	100 aA	100 aA	100 aA	100 aA	100 aA
40%	97 aA	97 aA	93 aA	93 aA	90 aA	90 aA	95 aA	95 aA
30%	0 bB	0 bA	0 bA	13 bA	0 bB	18 bA	0 cB	15 cA
20%	0 bB	0 bA	0 bA	0 cA	0 bA	0 cA	0 dA	0 dA
	Plântulas Normais							
50%	95 aA	95 aA	92 aA	92 aA	98 aA	100 aA	100 aA	100 aA
40%	92 aA	87 aA	88 aA	93 aA	78 bA	90 bA	95 bA	95 bA
30%	0 bB	0 bB	0 bA	0 bA	0 cA	0 cA	0 cA	0 cA
20%	0 bB	0 bB	0 bA	0 bA	0 cA	0 cA	0 cA	0 cA

De modo geral, as variações na taxa respiratória O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol. gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) em relação aos estádios iniciais de maturação de *Inga vera* (figura 2) obteve uma variação estatisticamente semelhante, em todos os estádios em média 8  $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para os valores de O<sub>2</sub> e 6  $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para os valores de CO<sub>2</sub>.

Durante as secagens sem PEG e com PEG, observa-se que, há uma variação bem semelhantes nos níveis de O<sub>2</sub>, exceto no E1 no tratamento P50, no qual o consumo foi superior até dos tratamentos iniciais, já quando observamos as variações de CO<sub>2</sub>, foi no qual mais sofreu variações, principalmente nos menores teores de água de ambas as secagens (30% e 40%), os valores decresceram em comparação aos outros tratamentos.

Em relação as sementes de *E. speciosa*, (figuras 3 e 4), para SCI fica evidente o decréscimo das taxas respiratórias durante o desenvolvimento das sementes, sendo os maiores valores encontrados no E1 em média 24,52  $\mu\text{mol. gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para os valores de O<sub>2</sub> e 12,60  $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para os valores de CO<sub>2</sub>, sendo esses valores no mínimo 4 vezes maior do que os dados encontrados nos outros estádios de desenvolvimento. Já em SII, observou-se também um decréscimo na atividade respiratória, entretanto, menos acentuada do que SCI.

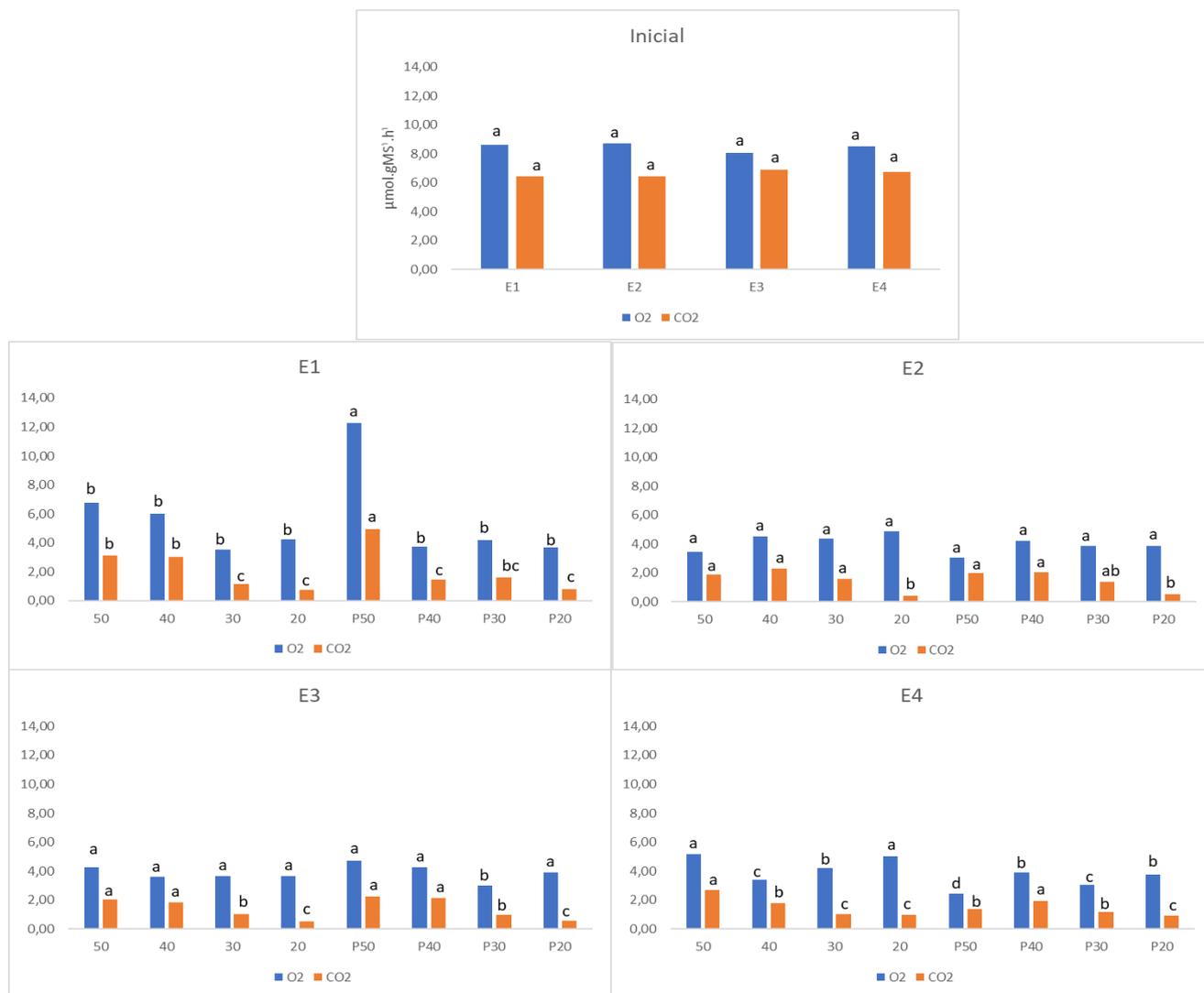


Figura 2. Consumo de O<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol} \cdot \text{gMS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) e liberação de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol} \cdot \text{gMS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) em embriões de *Inga vera* nos diferentes estádios de maturação (I a IV), submetidos a secagem até teores de água de 50%, 40%, 30% e 20% sem pré-tratamento com PEG, ou submetidas a pré-tratamento (P50, P40, P30 e P20) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

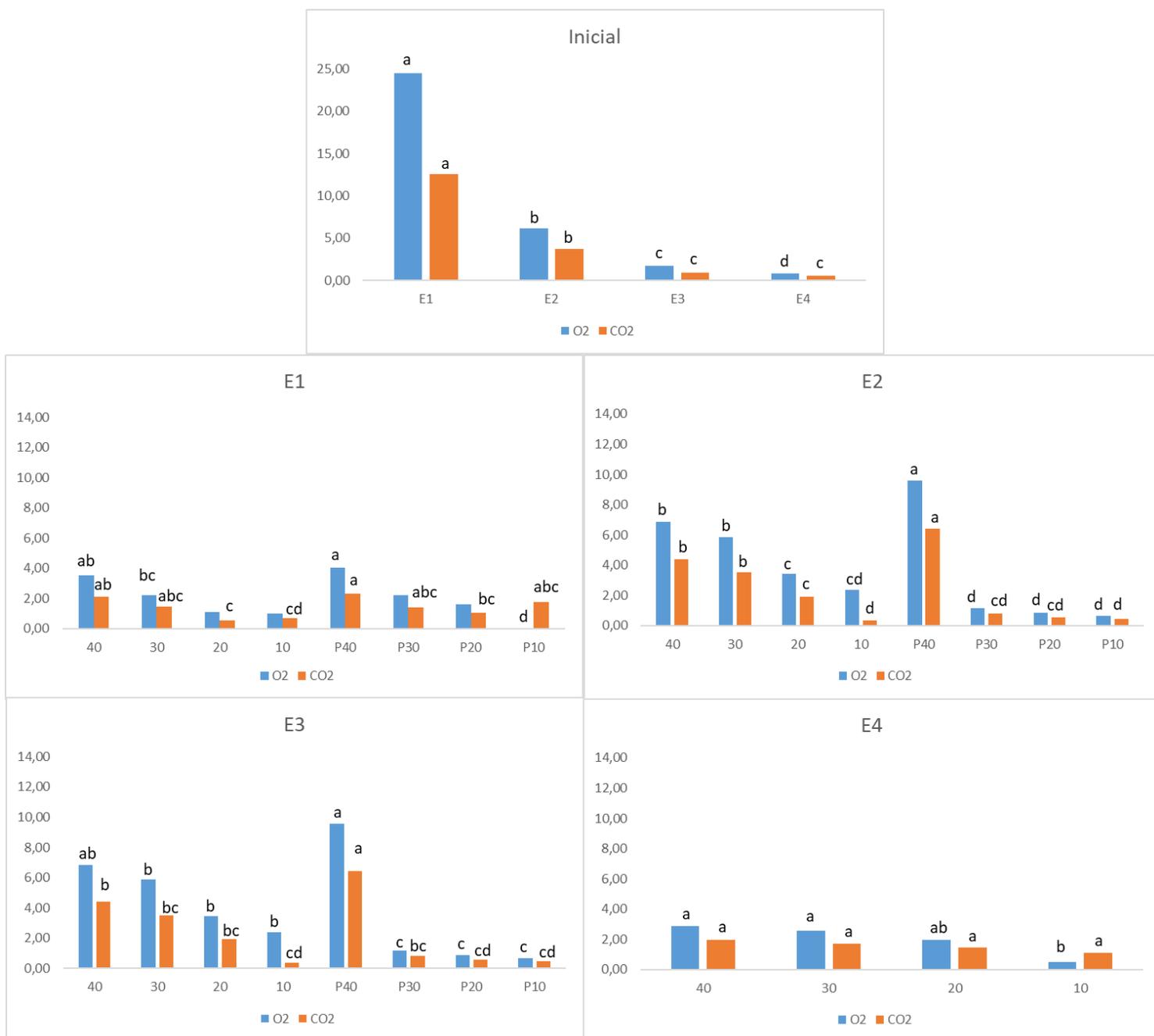


Figura 3. Consumo de O<sub>2</sub> (μmol. gMS<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) e liberação de CO<sub>2</sub> (μmol. gMS<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) em sementes de *Erythrina speciosa* SC I de diferentes estádios de maturação (E1 a E4, equivalendo aos estádios I a IV), submetidas a secagens até atingirem 40%, 30%, 20% e 10% sem pré- tratamento com PEG, ou submetidas ao pré-tratamento (P40, P30, P20 e P10). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

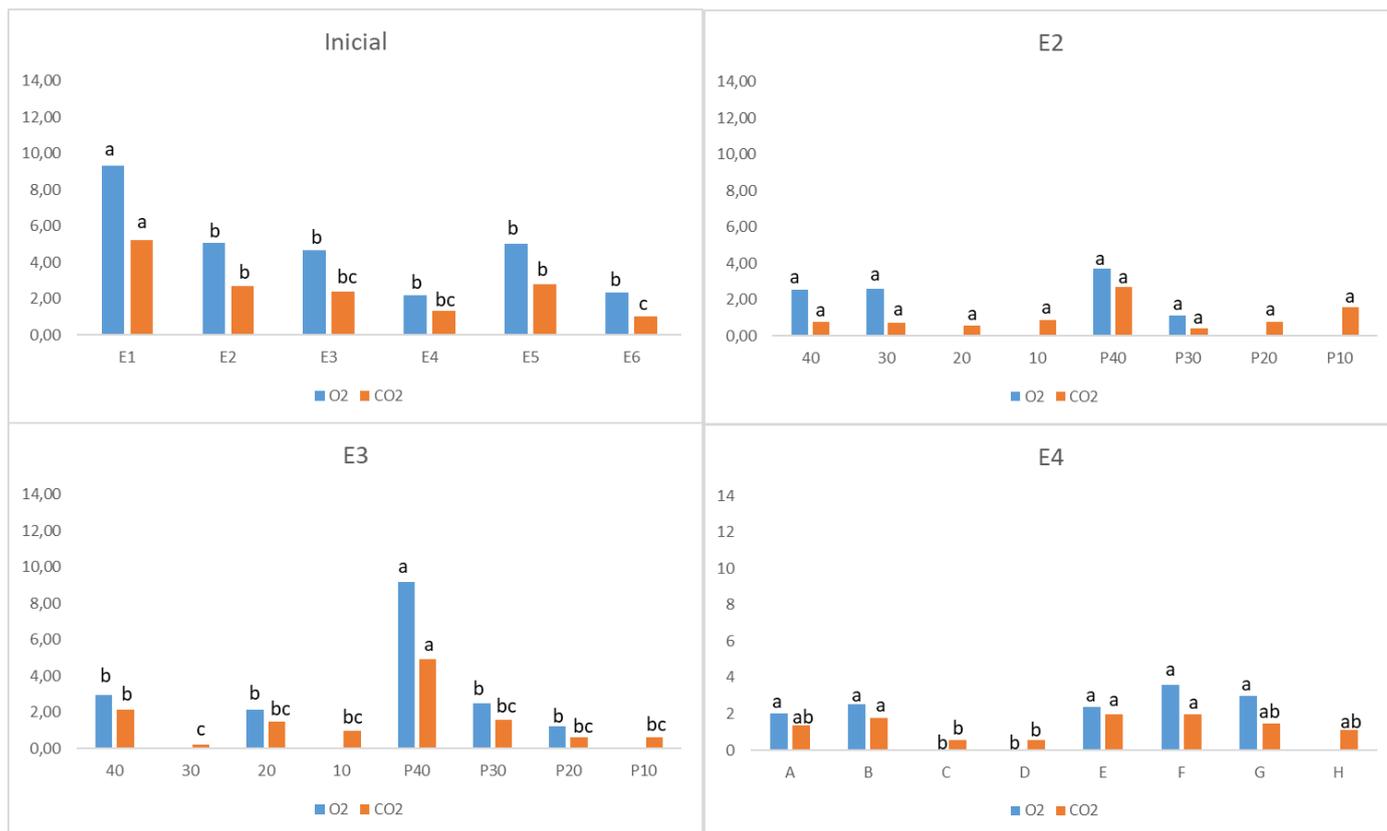


Figura 4. Consumo de O<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol. gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) e liberação de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol. gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) em sementes de *Erythrina speciosa* SC II de diferentes estádios de maturação (E1 a E4, equivalendo aos estádios I a IV), submetidas a secagens até atingirem 40%, 30%, 20% e 10% sem pré- tratamento com PEG, ou submetidas ao pré-tratamento (P40, P30, P20 e P10). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nota-se para os embriões de *I. vera* e para os estádios iniciais de *E. speciosa*, que o consumo de O<sub>2</sub> sempre foi maior do que a liberação de CO<sub>2</sub>, um dos principais fatores para a ocorrência são as reações oxidativas que ocorrem na semente, podendo ser a peroxidação de lipídios, superóxido e outros processos envolvidos com a deterioração desses embriões e sementes imaturas (Bonjovani & Barbedo 2020).

Em relação as secagens utilizadas nos diferentes estádios em *E. speciosa*, em alguns estádios não se conseguiu captar a taxa de O<sub>2</sub> apenas de CO<sub>2</sub>, principalmente em estádios nos quais a secagem acabou matando as sementes e essas sementes apresentaram um crescimento elevado de fungos rapidamente.

Se a secagem danificar o sistema protetor da semente/embrião, ainda mais em desenvolvimento, pode levar a morte, ou seja, essas células já não estarão mais metabolicamente ativas não consumindo mais  $O_2$ ; entretanto, durante a degradação da matéria que compõe a semente, ocorre a liberação do dióxido de carbono  $CO_2$ , principalmente quando temos a atividade de microrganismos (fungos). Sementes ortodoxas clássicas que apresentam dormência essa redução abrupta do  $O_2$  também pode ser notada, principalmente devido ao fato de que essa semente estando dormente suas taxas metabólicas vão para níveis basais.

Em SCI, observa-se que sementes que passaram apenas pela secagem tiveram um decréscimo em suas taxas respiratórias à medida que diminui seu teor de água, porém quando as sementes passam pelo PEG esse decréscimo é maior da primeira secagem (50%) para as próximas, entretanto as taxas respiratórias se tornaram semelhantes em 30% a 10% de água.

Lamarca & Barbedo (2013), estudando embriões de *Inga vera* de diferentes localidades, também perceberam diferenças entre as coletas, obtendo variações em suas coletas, sendo essa uma característica observada tanto em sementes recalcitrantes, quanto em sementes ortodoxas imaturas. Observou-se também que à medida que as secagens ficavam mais intensas a quantidade de sementes germinantes e produzindo plântulas normais decresceu, observou-se no presente trabalho, porém com o tratamento com PEG tivemos germinação até 30% de água, enquanto sementes apenas secas em estufa não germinaram.

Trabalhos como os de Bonjovani *et al.* (2008), Lamarca & Barbedo (2021) e Cecél & Barbedo (2021) mostram que há diferenças nas taxas de respiratórias em relação as diferentes temperaturas em que embriões/sementes são armazenados. No presente trabalho, verificou-se que diferenças no teor de água e maturação das sementes também afetam diretamente a respiração das sementes, não apenas em sementes recalcitrantes, mas também em estádios imaturos de sementes ortodoxas.

## Conclusão

Sementes ortodoxas imaturas de *E. speciosa* podem apresentar notáveis diferenças no teor de água nos mesmos estádios e nas características fisiológicas mesmo sendo coletadas nas mesmas matrizes e no mesmo ano, mas em épocas diferentes; ao mesmo tempo; que sementes recalcitrantes de *I. vera*, com teores de água similares, podem apresentar comportamentos semelhantes em seu desenvolvimento fisiológico.

## Referências

- Baskin, J. M.; Baskin, C. C.** 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, v.14, p.1-16. <https://doi.org/10.1079/SSR2003150>
- Barbedo, C. J.; Centeno, D. da C.; Ribeiro, R. de C. L. F.** 2013. Do recalcitrante seeds really exist? *Hoehnea*, v.40, p.583-593. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-29/2020>
- Barbedo, C.J.** 2018. A new approach towards the so-called recalcitrant seeds. *Journal of Seed Science*. v.40, n.3, p.221-236. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v40n3207201>
- Bewley J.D.; Nonogaki H.** 2017. Seed Maturation and Germination. In: Reference Module in Life Sciences. Elsevier.
- Botanic Gardens Conservation International.** 2001. Normas internacionais de conservação para jardins botânicos. Rio de Janeiro: Conselho Nacional do Meio Ambiente/Rede Brasileira de Jardins Botânicos/Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro/EMC.
- Bonjovani, M.R.; Barbedo, C.J. (2008).** Recalcitrant Seeds: Intolerant to Low Temperatures? Recalcitrant Embryos of *Inga vera* Willd. subsp. *Affinis* (DC.) T. D. Penn., a Tropical Species, Are Tolerant to Subzero Temperature Toleram Temperatura Sub-Zero. *Revista Brasileira de Botanica*, 31, 345-356. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042008000200017>
- Bonjovani, M. R., Barbedo, C. J.** 2020. Respiração de embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington sob diferentes temperaturas, potenciais osmóticos e aplicação de ABA. *Hoehnea*, 47. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-01/2020>.
- 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*, v.170, n.9, p.791-800. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161713000199>
- Carvalho, N. M.; Nakagawa, J.** 2012. Semente: Ciência, Tecnologia e produção. Editora Funep, Jaboticabal.
- Cécel A.T. & Barbedo C.J.** 2021. Taxas respiratórias de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) sob atmosferas modificadas. *Hoehnea* 48, pp.1-8.

**Corlett, R.T.** 2016. Plant diversity in a changing world: Status, trends, and conservation needs. *Plant Diversity*, v.38, n.1, p.10-16. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2016.01.001>

**Dekkers, B.J.; Costa, M.C.; Maia, J.; Bentsink, L.; Ligterink, W.; Hilhorst, H.W.** 2015. Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. *Planta*, v.241, p.563– 577. [10.1007/s00425-014-2240-x](https://doi.org/10.1007/s00425-014-2240-x)

**Devic, M.; Roscoe, T.** 2016. Seed maturation: Simplification of control networks in plants. *Plant Science*, v. 252, p.335-346. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.08.012>

**Klupczyńska, E. A.; Pawłowski, T. A.** (2021). Regulation of seed dormancy and germination mechanisms in a changing environment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 1357. <https://doi.org/10.3390/ijms22031357>

**Lamarca, E.V.; Bonjovani, M.R.; Faria, J.M.R.; Barbedo, C.J.** 2013. Germinação em temperatura sub-ótima de embriões de *Inga vera* subsp. affinis obtidos sob diferentes condições ambientais. *Rodriguésia*, v.64, n.4, p.877-885.

**Marcos Filho, J.** 2015. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. ABRATES. Piracicaba.

**Molizane, D.M.; Julio, P.G.S.; Carmello-Guerreiro, S.M.; Barbedo, C.J.** 2018. Physical, physiological and anatomical changes in *Erythrina speciosa* Andrews seeds from different seasons related to the dormancy degree. *Journal of Seed Science*, v.40, n.3, p.331- 341.

**Molizane, D.M.; Carmello-Guerreiro, S. M.; Barbedo, C. J.** 2020. Induction of seed coat water impermeability during maturation of *Erythrina speciosa* seeds. *Journal of Seed Science*, v.42. DOI [10.1590/2317-1545v42n1221062](https://doi.org/10.1590/2317-1545v42n1221062)

**Newton, R. J.; Hay, F. R.; Ellis, R. H.** 2013. Seed development and maturation in early springflowering *Galanthus nivalis* and *Narcissus pseudonarcissus* continues post-shedding with little evidence of maturation in planta. *Annals of Botany*, v.111, p.945-55. [10.1093/aob/mct051](https://doi.org/10.1093/aob/mct051).

**Roberts, E. H.** Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*, v.1, n. 3, p. 499-514, 1973.

**Walters, C.** 2000. Level of recalcitrance in seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, n. especial, p. 7-21.

**Walters, C.; Berjak, P; Pammenter, P.; Kennedy, K.; Raven, P.** 2013. Preservation of recalcitrant seeds. *Plant Science*, v. 339, p. 915-916.

## Capítulo III

**Caracterização do perfil de poliaminas e das enzimas antioxidantes em sementes de uma espécie ortodoxa *Erythrina speciosa* frente a uma espécie recalcitrante *Inga vera***

## Resumo

O desenvolvimento das sementes envolve várias alterações, incluindo a formação do plano básico do embrião, deposição de reservas e secagem que ocorre em sementes ortodoxas. Essas etapas envolvem reações que levam a produção de radicais livres, que podem gerar danos celulares, sendo necessários mecanismos para a atenuação da ação de radicais livres. O objetivo do trabalho foi caracterizar o perfil de poliaminas e das enzimas do sistema antioxidantes de sementes recalcitrantes de *Inga vera* e de *Erythrina speciosa*. Os resultados demonstraram que as poliaminas são moléculas que parecem controlar diretamente a atividade das enzimas de *I. vera*, enquanto em *E. speciosa* esses compostos parecem estar mais relacionados aos eventos iniciais do desenvolvimento das sementes. No entanto, o sistema antioxidante de ambas as espécies apresenta maiores atividades em estádios de desenvolvimento com teores de água próximos a 56 e 57%, independente da presença de poliaminas.

Palavras chaves: atividade enzimática, conservação, espécies nativas

## Abstract

Seed development involved several changes, including the formation of the embryo's basic plan, deposition of reserves and drying that occurs in orthodox seeds. These steps involve reactions that lead to the production of free radicals, which can cause cellular damage, requiring mechanisms to attenuate the action of free radicals. The objective of the work was to characterize the profile of polyamines and enzymes of the antioxidant system of recalcitrant seeds of *Inga vera* and *Erythrina speciosa*. The results demonstrated that polyamines are molecules that appear to directly control the activity of *I. vera* enzymes, while in *E. speciosa* these compounds appear to be more related to the initial events of seed development. However, the antioxidant system of both species presents greater activities at development stages with water contents close to 56 and 57%, regardless of the presence of polyamines.

Key words: enzyme activity, conservation, native species

### **Introdução**

O desenvolvimento de sementes angiospermas pode ser dividido em três estádios. O primeiro e segundo estágio são caracterizados pela formação do plano básico do embrião, seguido da deposição de reservas energéticas, enquanto a terceira etapa ocorre em um grupo de plantas, classificadas como ortodoxas (Bewley et al., 2013).

A capacidade de tolerar ou a sensibilidade à dessecação inclui uma série de mecanismos que determinam se uma semente vai ou não permitir a redução do metabolismo devido a perda de água. Assim, para melhorar a conservação do material genético vegetal é necessário a compreensão de aspectos relacionados à fisiologia e ao perfil metabólico das espécies recalcitrantes e ortodoxas, buscando identificar padrões dos eventos associados a tolerância à dessecação (Barbedo et al. 2018).

Todo o processo de desenvolvimento e maturação das sementes envolve reações que levam a formação de radicais livres. Esses radicais livres (ROS) são moléculas altamente reativas, que atacam o sistema de endomembranas das células, causando estresse oxidativo. Ao mesmo tempo que a presença de mecanismos eficientes para conter essa desordem metabólica, parecem estar associados à capacidade de tolerar ou a sensibilidade à dessecação (Hendry, 1993, Berjak & Pammenter, 2014).

Dentre os mecanismos envolvidos com a eliminação e/ou atenuação da ação de radicais livres e manutenção da homeostase celular, destacam-se as poliaminas (PAs) e o

sistema de enzimas antioxidantes, incluindo a ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (Bailly, 2004). As principais poliaminas observadas nos vegetais são a putrescina, espermidina e espermina. Essas moléculas são encontradas em plantas superiores e conhecidas pela ação no crescimento vegetal e ativação da resposta ao estresse (Chen et al. 2019). Segundo Liu et al. 2015 o perfil e o conteúdo dessas moléculas podem se alterar quando as plantas são colocadas sob estresse.

Neste contexto, torna-se interessante investigar o perfil de poliaminas e atividade de enzimas do sistema antioxidante vegetal, correlacionando esses aspectos com a sensibilidade ou tolerância à dessecação de sementes recalcitrantes e ortodoxas (Vicent et al. 2020).

O objetivo do trabalho foi caracterizar o perfil de poliaminas e das enzimas do sistema antioxidantes de sementes recalcitrantes de *Inga vera* frente as sementes ortodoxas de *Erythrina speciosa*.

## **Material e Métodos**

### **Obtenção do material vegetal**

Os frutos de *Inga vera* foram coletados no Parque Villa-Lobos, localizado na cidade de São Paulo, SP e levados ao laboratório do Núcleo de Sementes do IPA do Jardim Botânico de São Paulo. Após beneficiamento das sementes, os embriões de *I. vera* foram separados em quatro estádios de maturação e liofilizados. As sementes de *Erythrina speciosa* foram coletadas no campus da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) de Florianópolis,

Santa Catarina, totalizando seis estádios de maturação, as quais foram armazenadas sob refrigeração (4 a 8°C) até o início das análises.

### **Teor de água**

O teor de água e o conteúdo de massa seca das sementes foram determinados pelo método de estufa a  $103 \pm 3^\circ\text{C}$ , por 17 horas (ISTA, 2004). Para cada espécie e seu respectivo período de maturação, foram utilizadas 4 repetições de 5 sementes por tratamento. O resultado do cálculo do teor de água foi expresso em porcentagem com base no peso úmido das sementes (BRASIL, 2009).

### **Quantificação de poliaminas**

A quantificação das poliaminas (PAs), seguiu a metodologia proposta por Steiner et al. (2007). Os embriões de *I. vera* e *E. speciosa* foram macerados em 1,6 mL de ácido perclórico a 5% (v/v). As PAs livres foram determinadas diretamente do sobrenadante obtido, após o mesmo passar por derivatização com cloreto de dansila. O método de quantificação das PAs foi a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando uma coluna C18 de fase reversa e 5  $\mu\text{m}$  (Shimadzu Shin-pack CLC ODS). Para a corrida cromatográfica foi utilizada acetonitrila absoluta de grau HPLC como fase móvel (FM) e o gradiente da FM programado para 65% durante os primeiros 10 minutos, de 65 a 100% por 10 a 13 minutos e 100% por 13 a 21 minutos, usando  $1 \text{ mL min}^{-1}$  vazão a  $40^\circ\text{C}$ .

A quantificação de PAs foi determinada utilizando um detector de fluorescência com comprimento de onda de 340 nm (excitação) e 510 nm (emissão). As áreas de pico e os tempos de retenção foram medidos por comparação com PAs padrão: CAD (cadaverina), PUT (putrescina), SPD (espermidina) e SPM (espermina). O composto 1,7-diaminoheptano (DAH) foi utilizado como padrão interno e os teores de PAs foram expressos em base úmida.

### **Análises das enzimas antioxidantes**

Para as análises de enzimas, as amostras foram maceradas em 1 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) contendo ácido etilenodiamino tetra-acético 1 mM (EDTA) e polivinilpirrolidona (PVP) a 1% com o auxílio de um homogeneizador conforme metodologia proposta por Bailly e Kranner (2011). O homogeneizado foi centrifugado a 15.000 g por vinte minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi filtrado e utilizado para os ensaios enzimáticos.

A atividade da superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) foi determinada pela inibição da redução fotoquímica do NBT em 560 nm, de acordo com Giannopolite e Ries (1977). A atividade da ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) foi determinada de acordo com a diminuição em 290 nm (coeficiente de extinção  $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Koshiba, 1993). A atividade da catalase (CAT; EC 1.11.1.6) foi determinada seguindo o consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (coeficiente de extinção  $39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) a 240 nm (Peixoto et. al., 1999).

### **Análise estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) e para cada estágio de desenvolvimento as análises foram realizadas em triplicata. Os dados foram submetidos a análise de variância ao nível de 5% e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software RStudio 4.1.3.

### **Resultados e Discussão**

Os teores de água das sementes de *I. vera* não diferiram estatisticamente entre si estando em torno de 57 a 66%, ao longo dos quatro estágios de maturação avaliados (E1, E2, E3 e E4). Já para as sementes de *E. speciosa* ocorreu um decréscimo no conteúdo de água ao longo da maturação. Para essa espécie, foram registrados seis estágios de desenvolvimento, sendo as sementes dispersas com 9% de água, comportamento característico de sementes ortodoxas.

As espécies analisadas demonstram semelhanças entre os teores de água inicial do desenvolvimento. A intensa atividade metabólica dessas sementes nos estágios iniciais justifica os elevados teores de água observados nas sementes de *I. vera* e *E. speciosa* e as elevadas taxas de divisão celular necessárias para a formação do plano básico do embrião, também conhecida como embriogênese, que ocorre no início do desenvolvimento das sementes (Sreenivasulu e Wobbus, 2013).

Já a redução no teor de água observado em sementes de *E. speciosa* é característico de sementes ortodoxas. Essa redução acentuada da água nas fases finais do desenvolvimento,

está associada a redução do metabolismo dessas sementes e manutenção da viabilidade, até que as condições para a germinação sejam favoráveis (Walters et al. 2013).

Entretanto, variações no conteúdo de água no ciclo de vida das sementes recalcitrantes e ortodoxas podem gerar estresse seguido de uma desordem metabólica. Neste contexto, os trabalhos relatam que é comum observar a presença de moléculas osmoprotetoras e antioxidantes em sementes, as quais auxiliam a minimizar os potenciais danos às membranas e material genético, permitindo a sobrevivência dessas espécies no ambiente (Kranner et al. 2010).

A análise das poliaminas livres totais e a razão de poliaminas, demonstrou que houve um aumento significativo no conteúdo dessas moléculas à medida que as sementes de *I. vera* avançam nos estádios de maturação, sendo os maiores valores encontrados para o estágio quatro (E4).

Não foi verificada a presença de cadaverina (CAD) em nenhum ponto de maturação das sementes de *I. vera*. No entanto, o aumento das PAs livres parece estar diretamente relacionado com o aumento da putrecina, poliamina de maior concentração observada nas sementes de *I. vera*. Assim como para as PAs livres totais, os maiores valores de putrecina também foram observados no estágio quatro de maturação dessas sementes.

Os maiores acúmulos de espermidina foram observados no primeiro estágio de maturação, seguido de uma redução significativa desse grupo de poliaminas nos demais estádios de desenvolvimento. Já o conteúdo de espermina teve um aumento significativo nos estádios três (E3) e quatro (E4).

A análise da atividade das enzimas do sistema antioxidante das sementes de *I. vera* demonstrou que o estágio quatro (E4) de maturação apresentou as maiores atividades para a ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD), quando comparado com os estádios E1, E2 e E3. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas para a atividade da enzima catalase (CAT) ao longo do desenvolvimento.

O acúmulo de poliaminas é considerado como uma resposta geral das plantas ao estresse abiótico. O maior conteúdo das PAs livres e atividade das enzimas antioxidantes no E4 da maturação das de *I. vera*, pode estar relacionado com o fato das sementes recalcitrantes serem dispersas já com o metabolismo direcionado para o início do processo de germinação, sendo necessário para reverter danos gerados durante o desenvolvimento. Outro aspecto interessante observado, é que a maior atividade das enzimas APX e SOD está acompanhada dos maiores teores de PAs livres, o que segundo Liu et al. (2015) demonstra a relação dessas moléculas com a regulação da atividade do sistema antioxidante para a manutenção da homeostase celular.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas pelo metabolismo aeróbico das células eucarióticas, incluem os radicais superóxido, oxigênio singlete, hidroxila e peróxido de hidrogênio, ambos potencialmente prejudiciais às células devido a sua elevada reatividade (Bailly, 2004; Bailly, 2009). Neste contexto a ação conjunta de poliaminas e enzimas do sistema antioxidante auxiliam na manutenção de níveis aceitáveis de ROS, permitindo que a germinação de sementes de *I. vera* ocorra logo após a dispersão no estágio E4 do desenvolvimento.

Para as sementes de *E. speciosa* os maiores conteúdos de poliaminas livres totais foram encontrados nos estádios E1 e E2 do desenvolvimento, os quais apresentavam os maiores teores de água, em torno de 74 a 70%. Já a maior razão de poliaminas foi observada apenas no primeiro estágio de desenvolvimento (E1), seguido de um decréscimo.

O perfil de poliaminas demonstrou que a putrescina, spermidina e espermina seguiram comportamento semelhante ao observado para as poliaminas livres totais e razão de poliaminas, apresentando os maiores conteúdos dessas moléculas no primeiro estágio de desenvolvimento (E1) das sementes de *E. speciosa*. Uma diferença significativa se comparado com as sementes de *I. vera*, é que para *E. speciosa* verificamos a presença de cadaverina nos estádios E5 e E6 do desenvolvimento.

A análise da atividade das enzimas antioxidantes das sementes de *E. speciosa* demonstrou que apenas a ascorbato peroxidase (APX) apresenta maior atividade no estágio E1, seguido de um decréscimo e menor atividade no estágio E6. As enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase tiveram suas maiores atividades registradas nos estádios E4/E5 e E5 respectivamente. Observa-se que o incremento da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase está associado à presença de cadaverina nos estádios E4 e E5.

O comportamento ortodoxo das sementes de *E. speciosa* demonstra que as poliaminas são moléculas requeridas no início do processo de desenvolvimento, demonstrando que essas moléculas parecem estar associadas ao controle de processos como a divisão e histodiferenciação celular (Tyagi et al. 2023). Já a atividade das enzimas CAT e SOD nos estádios E4 e E5 são eficientes para minimizar os danos associados aos ROS, removendo

essas moléculas de maneira eficiente, minimizando os danos relacionados à secagem e auxiliando no processo de tolerância à dessecação (Bailly, 2019).

O estresse abiótico é responsável por grande perda de material vegetal tanto para germoplasma quanto em relação a produtividade. Todo o processo evolutivo dos vegetais está acompanhado do desenvolvimento de mecanismos associados à tolerância ao estresse, os quais podem se manifestar nos níveis morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e molecular (Liu et al. 2015, Tyagi et al. 2023).

Segundo Chen et al. (2019) e González-Hernández et al. (2022), as poliaminas variam o seu conteúdo intracelular em resposta ao estresse abiótico, sendo considerada uma estratégia efetiva para a tolerância ao estresse. A ação dessas moléculas está diretamente relacionada com a ação de um conjunto de enzimas pertencentes ao sistema antioxidante, o qual tem a função de remover os radicais livres gerados devido ao estresse abiótico.

### **Conclusão**

Conclui-se que as poliaminas são moléculas que parecem controlar diretamente a atividade das enzimas de *I. vera*, enquanto em sementes de *E. speciosa* esses compostos parecem estar mais relacionados aos eventos iniciais do desenvolvimento das sementes, como a divisão e a histodiferenciação celular. No entanto, o sistema antioxidante de ambas as espécies analisadas, apresentam maiores atividades em estádios de desenvolvimento com teores de água próximos a 56 e 57%, independente da presença de poliaminas.

## Referências

- Bailly, C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* v.14: 93-107.
- Bailly, C., EL-Maarouf-Bouteau, H., Corbineau, F. 2008. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Science Direct* 331: 806-814.
- Bailly, C. 2019. The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy. *Biochemical Journal* 476: 3019-3032.
- Barbedo, C.J. 2018. A new approach towards the so-called recalcitrant seeds. *Journal of Seed Science* 40: 221-236.
- Bewley, D.J.; Bradford, K.; Hilhorst, H. 2013. *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. Springer Science and Business Media.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para Análise de Sementes. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 398p.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K. 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59: 309-314.
- González-Hernández, A. I., Scalschi, L., Vicedo, B., Marcos-Barbero, E.L., Moucuende, R., Camañes, G. 2022. Putrescine: a key metabolite involved in plant development, tolerance and resistance responses to stress. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 1-23.
- Hendry, G.A.F. 1993. Oxygen, free radical processes and seed longevity. *Seed Science Research* 3: 141-153.
- International Seed Testing Association. 2004. Germination. In: ISTA. *International Rules for Seed Testing* Bassersdorf: ISTA.
- Koshiha, T. 1993. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant and Cell Physiology* 34: 713-721.
- Liu, J., Wang, W., Wu, H., Gong, X., Moriguchi. 2015. Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. *Frontiers in Plant Science* 6: 1-10.
- Peixoto, P.H.P., Cambraia, J., Sant'anna, R., Mosquim, P.R., Moreira, M.A. 1999. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11: 137-143.
- Roberts, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1: 499-514.
- Steiner, N.; Santa-Catarina, C.; Silveira, V.; Floh, E.I.; Guerra, M.P. 2007. Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 89: .55-62.

Tyagi, A., Ali, S., Ramakrishna, G., Park, S., Mahnoudi, H., Bae, H. 2023. Revisiting the role of polyamines in plant growth and abiotic stress resilience: mechanisms, crosstalk, and future perspectives. *Journal of Plant Growth Regulation* 42: 5074-5098.

Walters, C. 2000. Levels of recalcitrance in seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 7-21.

Walters, C., Berjak, P., Pammenter, N., Kennedy, K., Raven, P. 2013. Preservation of recalcitrant seeds. *Science* 339: 915-916.

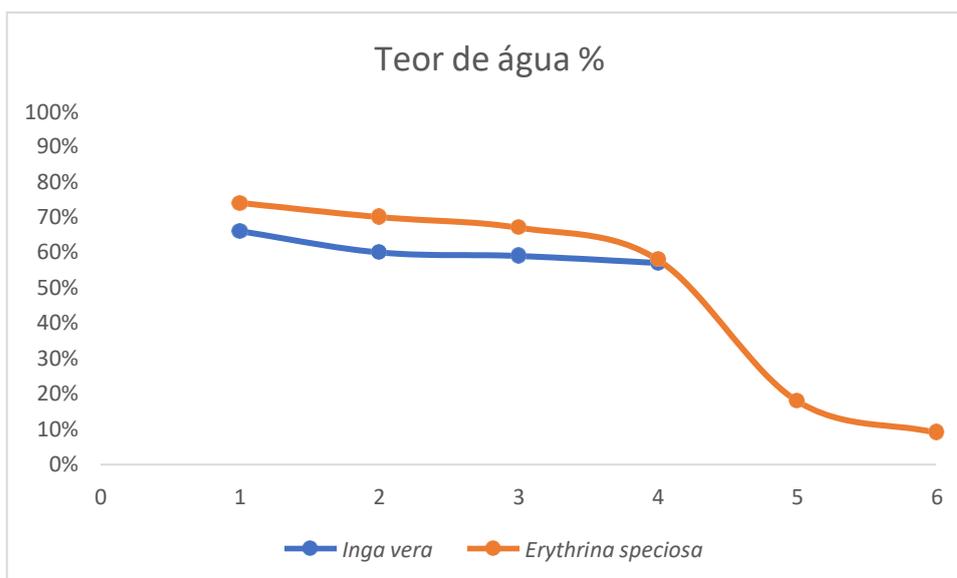


Figura 1: Teor de água (%), dos estádios I ao IV dos embriões de *Inga vera* e I ao VI das sementes de *Erythrina speciosa*.

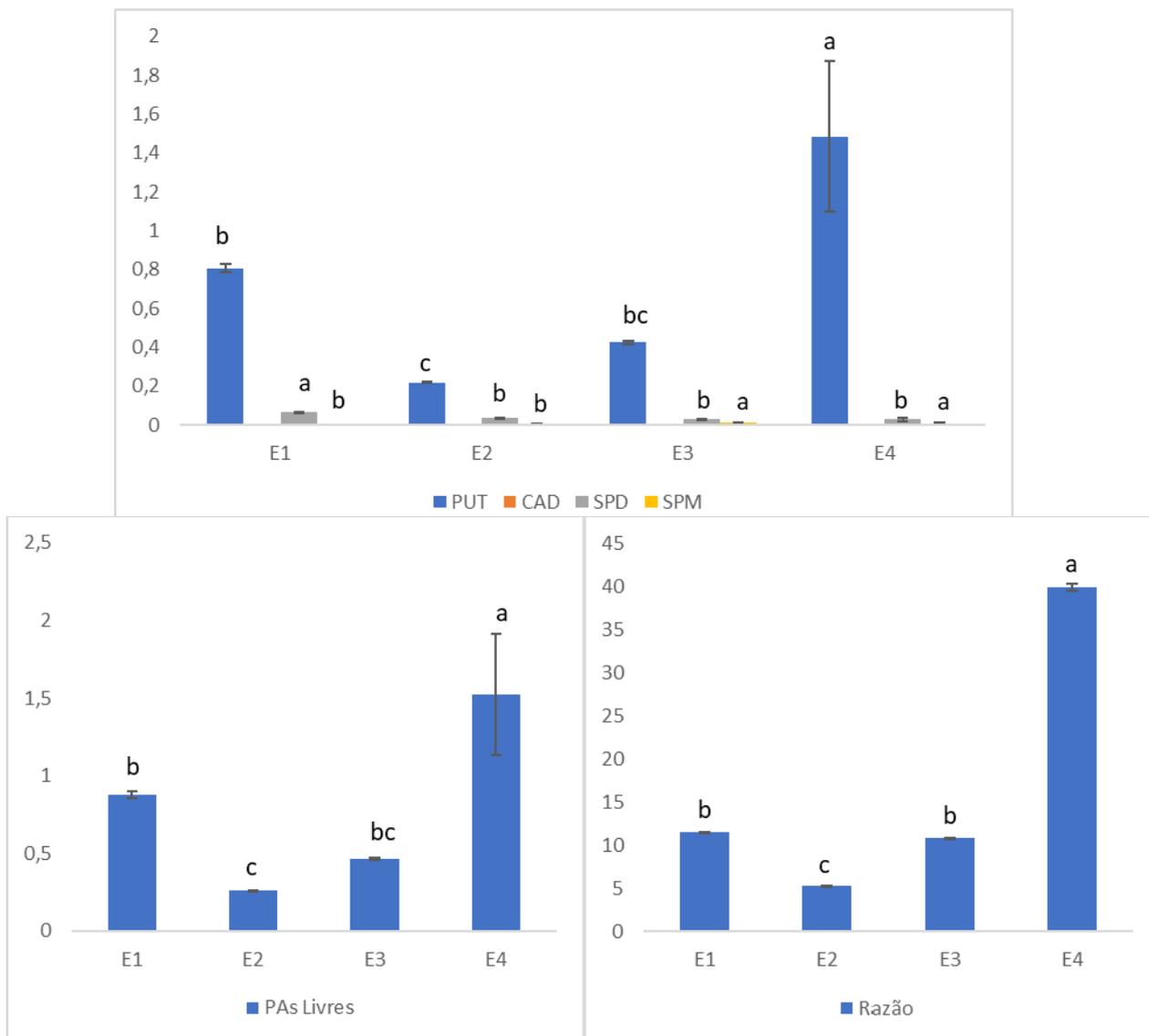


Figura 2. Conteúdo de poliaminas (PAs) em embriões de *Inga vera* nos diferentes estádios de maturação dessecação, em relação à semente. A. PAs livres, Putrescina (PUT), Espermidina (SPD), Espermina (SPM) e Cadaverina (CAD). B. Total das PAs livres. C. Razão (PUT/SPD+SPM). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

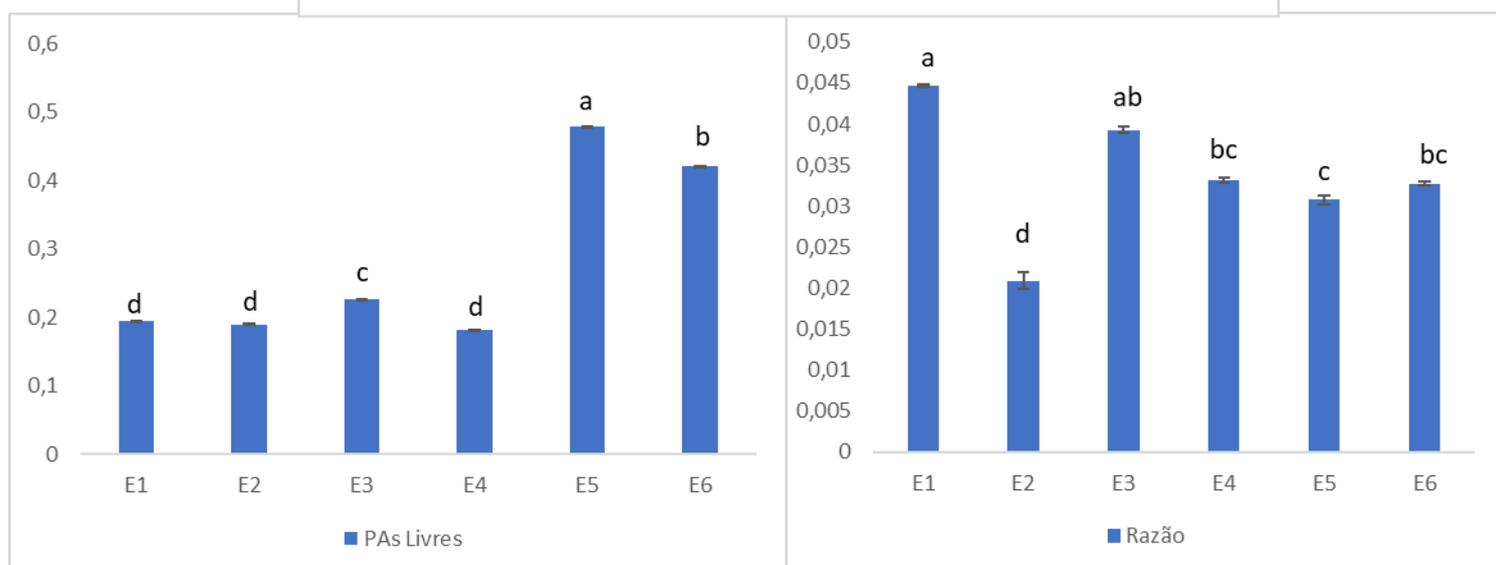
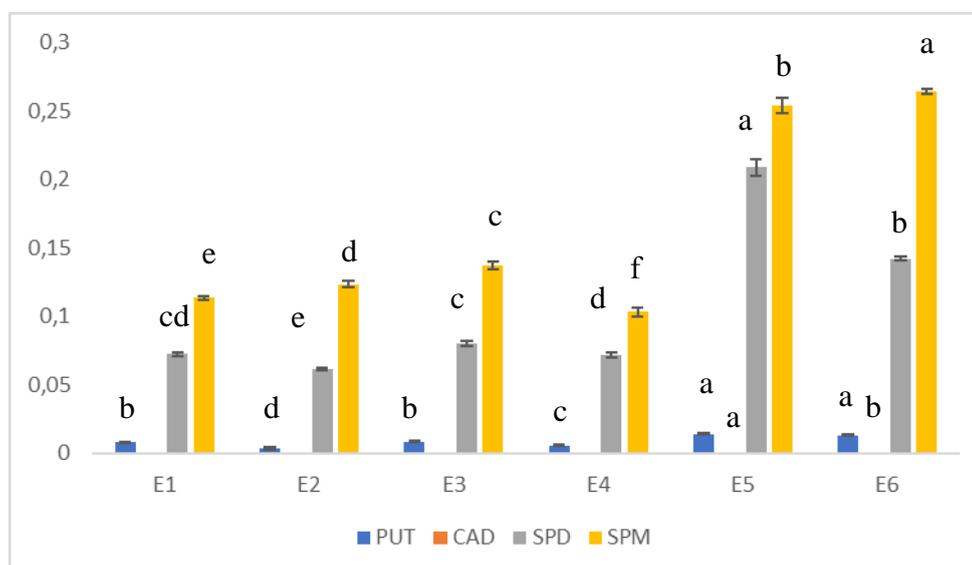


Figura 3. Conteúdo de poliaminas (PAs) em sementes de *Erythrina speciosa* nos diferentes estádios de maturação dessecação, em relação à semente. A. PAs livres, Putrescina (PUT), Espermidina (SPD), Espermina (SPM) e Cadaverina (CAD). B. Total das PAs livres. C. Razão (PUT/SPD+SPM). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

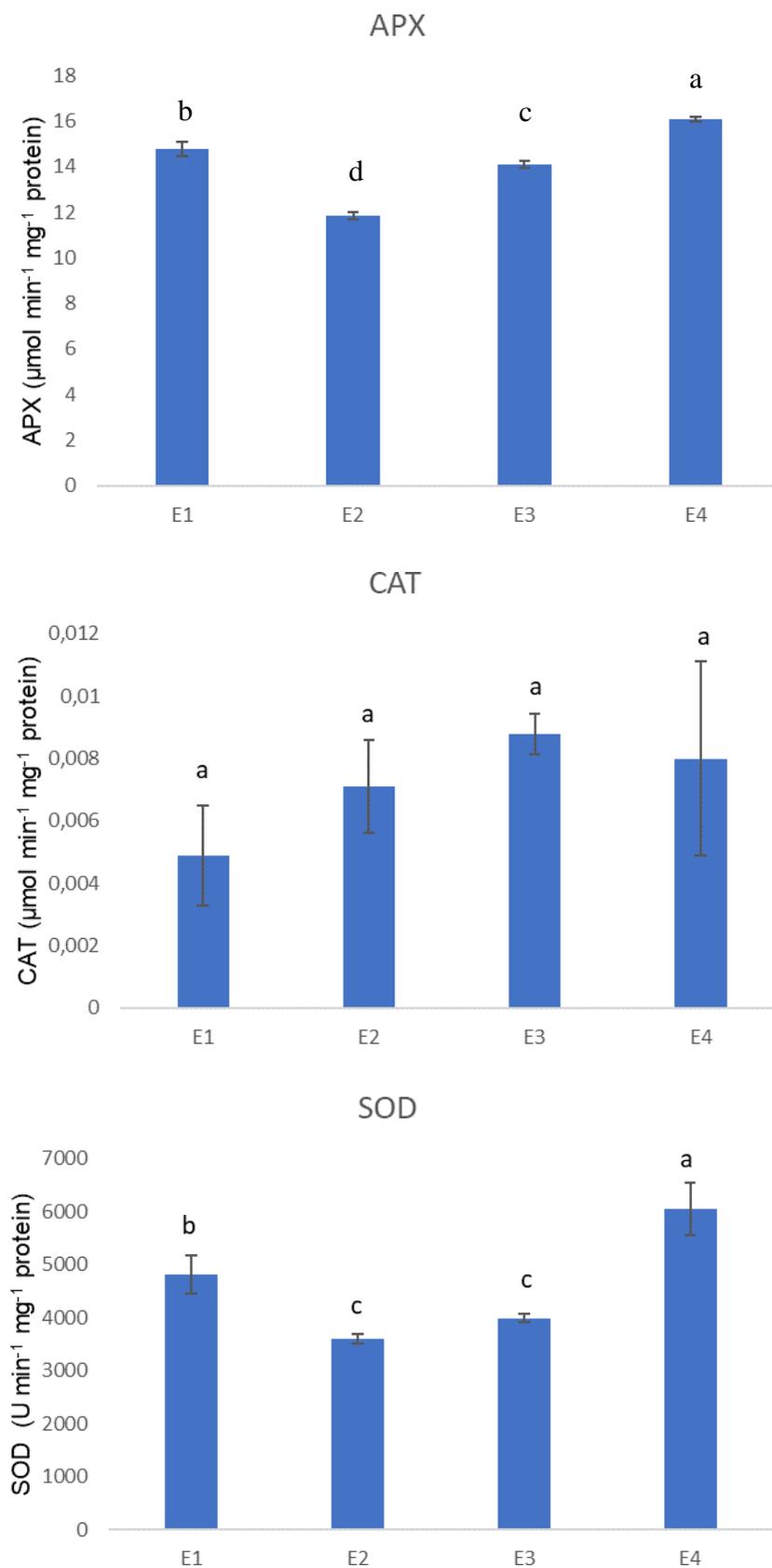


Figura 4. Atividades das enzimas antioxidantes nos embriões de *Inga vera* durante a maturação. Atividade APX (A). Atividade CAT (B). Atividade SOD (C). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

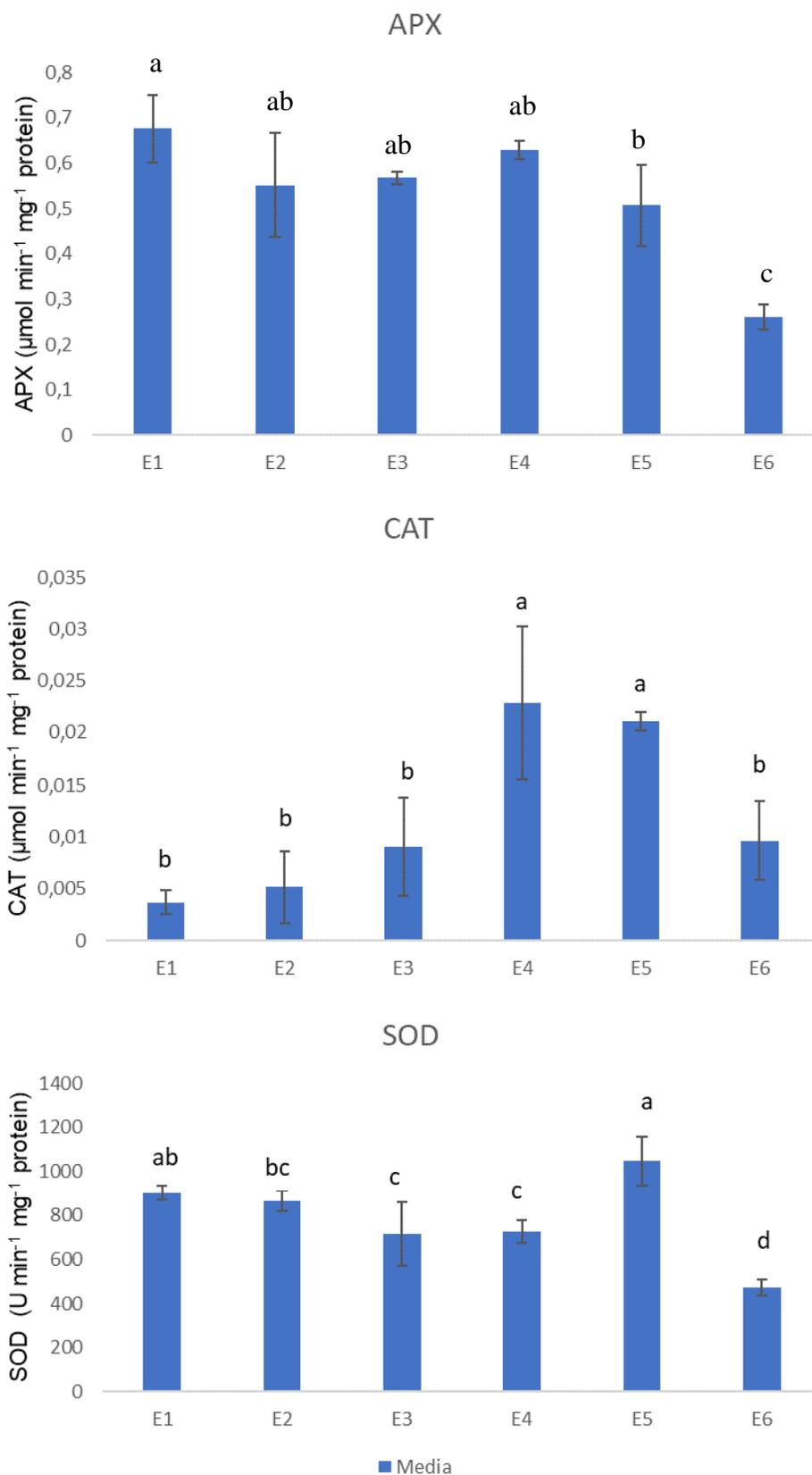


Figura 5. Atividades das enzimas antioxidantes nas sementes de *Erythrina speciosa* durante a maturação. Atividade APX (A). Atividade CAT (B). Atividade SOD (C). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## Considerações finais

A água é um dos indicadores mais importantes da capacidade de conservação *ex situ*, com isso, surgiu uma classificação para as sementes em relação a sua capacidade de tolerância a dessecação e armazenamento (Roberts, 1973). Sementes capazes de tolerar à dessecação e serem armazenadas por longos períodos e ainda assim germinarem foram classificadas como ortodoxas, já sementes que não toleram a dessecação e não podem ser armazenadas foram classificadas como recalcitrantes.

Entretanto, ao longo do tempo, várias espécies começaram a não se enquadrar nessas duas classificações, então com base em novos estudos foi proposta uma nova classe por Ellis *et al.*, (1990) as sementes intermediárias, sendo sementes que permitem a dessecação, mas não podem ser armazenadas por longos períodos (Barbedo *et al.*, 2013, Dekkers *et al.*, 2015). Com base nesses estudos e classificações, Walters (2000), também trabalhando com tolerância a dessecação, demonstrou que este não é um processo de tudo ou nada, mas que apresenta níveis de quanto a espécie é tolerante à dessecação ou não.

E, com o avanço das pesquisas na área, tendo um olhar também para as espécies tropicais, novas pesquisas surgiram, nas quais, os autores questionam se realmente as sementes se encontram em diferentes grupos (ortodoxa, intermediária ou recalcitrante), ou se a tolerância a dessecação entre outras características presentes nas sementes não seria um gradiente, dependendo do quanto elas avançaram no processo de maturação até serem

desligadas da planta-mãe em conjunto com as características do meio em que foram formadas (Barbedo *et al.*, 2013; Barbedo, 2018).

Mesmo em uma espécie ortodoxa na qual se esperaria normalmente um comportamento uniforme e padrão, observou-se grande heterogeneidade de comportamentos entre as sementes ortodoxas imaturas da mesma espécie, quando coletadas em diferentes locais, ou então no mesmo local em diferentes épocas. Quando se compara as coletas de sementes imaturas de *E. speciosa* coletadas em Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo, e até mesmo na mesma localidade em épocas diferentes SC I e SC II, essas sementes apresentaram diferenças no teor de água, massa seca, germinação, plântulas normais, grau de dormência e indução de dormência, respiração e tolerância à dessecação mesmo sendo da mesma espécie.

Além disto, sementes ortodoxas imaturas e recalcitrantes apresentam comportamentos fisiológicos, antioxidantes e respiratórios semelhantes, principalmente na coleta de sementes de *I. vera* quando comparadas com a segunda coleta de SC em teores de água próximos, podemos observar essa similaridade nos comportamentos do desenvolvimento fisiológico.

No que se refere a tolerância à dessecação, observa-se que, o osmocondicionamento auxilia na redução do teor de água até níveis não letais as sementes, tendendo a manter em equilíbrio as taxas respiratórias, ficando mais evidente quando comparamos (Coleta de SP de *Inga vera* com a Coleta SC II de *Erythrina speciosa*).

Em relação ao sistema antioxidante em teores de água próximos a 56 e 57%, observa-se semelhanças onde em ambas as espécies (ortodoxa e recalcitrante) ocorre uma intensa atividade metabólica. Acerca das poliaminas, percebe-se que aparentemente em *I. vera* essas

parecem controlar diretamente a atividade das enzimas, enquanto em sementes de *E. speciosa* esses compostos parecem estar mais relacionados aos eventos iniciais do desenvolvimento das sementes, como por exemplo a divisão e a histodiferenciação celular.

Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram e demonstram como em trabalhos publicados anteriormente (Barbedo *et al.* 2013, Barbedo, 2018) no qual, essa tendência ao comportamento ortodoxo ou recalcitrante das sementes é altamente influenciável, não sendo uma característica de tudo ou nada, existindo sim níveis de ortodoxia ou recalcitrância nas sementes. Essa tendência de comportamento depende de vários fatores, entre eles: o local, época, condições climáticas, região, disponibilidade hídrica em que a planta mãe está exposta e que as sementes são formadas, entre outras características.

Com isso, no presente trabalho observa-se, grande heterogeneidade nos comportamentos de uma semente ortodoxa imatura coletada em locais diferentes ou mesmo local em diferentes épocas, além de que, observamos maior similaridade entre uma espécie recalcitrante e uma espécie ortodoxa imatura do que duas ortodoxas imaturas da mesma espécie e matrizes ou até mesmo com sua própria correspondente ortodoxa matura.

**Referências**

Barbedo, C. J.; Centeno, D. C.; Ribeiro, R. de C. L. F. 2013. Do recalcitrante seeds really exist? *Hoehnea*, v.40, p.583-593, 2013.

Barbedo, C.J. 2018. A new approach towards the so-called recalcitrant seeds. *Journal of Seed Science* 40: 221-236.

Berjak, P.; Pammenter, N. W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Frontiers in Plant Science*, n. 4, 2013.

Corlett, R.T. 2016. Plant diversity in a changing world: Status, trends, and conservation needs. *Plant Diversity*, v.38, n.1, p.10-16. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2016.01.001>