



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



PG Botânica

TAXA RESPIRATÓRIA EM SEMENTES RECALCITRANTES DE *INGA VERA* WILLD. SUBSP. *AFFINIS* (DC.) T.D. PENNINGTON

MARCIO ROBERTO BONJOVANI

Tese apresentada ao
Instituto de Biociências, Câmpus de
Botucatu, UNESP, para obtenção do título de
Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas
(Botânica), Área de concentração
Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

BOTUCATU – SP

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

TAXA RESPIRATÓRIA EM SEMENTES RECALCITRANTES DE
INGA VERA WILLD. SUBSP. *AFFINIS* (DC.) T.D. PENNINGTON

MARCIO ROBERTO BONJOVANI

PROF. DR. CLAUDIO JOSÉ BARBEDO

Tese apresentada ao
Instituto de Biociências, Câmpus de
Botucatu, UNESP, para obtenção do título de
Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas
(Botânica), Área de concentração
Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

BOTUCATU – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Bonjovani, Marcio Roberto.

Taxa respiratória em sementes recalcitrantes de *Inga vera* ssp. *affinis* (DC.)

T.D. Pennington / Marcio Roberto Bonjovani. – Botucatu : [s.n.], 2011

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências

Orientador: Claudio José Barbedo

Capes: 20303009

1. Inga (Botânica). 2. Sementes – Conservação.

Palavras-chave: ABA; Conservação de sementes recalcitrante; Estresse;
Oxidação; Respiração.

SEISCENTOS E SESSENTA E SEIS

A vida é uns deveres que nós trouxemos para fazer em casa.

Quando se vê, já são 6 horas: há tempo...

Quando se vê, já é 6^afeira...

Quando se vê, passaram 60 anos...

Agora, é tarde demais para ser reprovado...

E se me dessem - um dia - uma outra oportunidade,

eu nem olhava o relógio.

seguia sempre, sempre em frente ...

E iria jogando pelo caminho a casca dourada e inútil das horas.

Mario Quintana

DEDICO

À Luiza Bonjovani

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao Instituto de Botânica que possibilitou a execução deste trabalho em suas instalações;

Ao meu avô Benedicto, meus pais Elza e Luiz, irmãos Marcelo, Marco e Camila (por adoção) e família pelo incentivo e apóio incondicional para realização deste trabalho;

À minha esposa Aderlete pelo incentivo e apóio incondicional para realização deste trabalho;

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

À Adeliana, Laís e Artur pelo incentivo e apoio;

Aos amigos do Instituto de Botânica e da UNESP pelo incentivo e colaboração durante a realização deste trabalho;

Aos Professores Dr Eduardo Purgatto, Dr Lázaro Eustáquio Pereira Peres e Dr Rogério Mamoru Suzuki, pela atenção e colaboração nos experimentos;

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

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

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

À Secretaria da Educação pela bolsa concedida;

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apóio financeiro ao projeto (Processos: 481484/2007-8 e 477.640/2009);

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela atenção e presteza;

Aos funcionários da UNESP;

À CCR AutoBAn pela permissão e apóio para a coleta dos frutos;

Ao Núcleo de Pesquisas em Sementes e a Fisiologia e Bioquímica de Plantas, do Instituto de Botânica, pela permissão do uso da infra-estrutura disponível;

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

Aos colegas da EE Professor Horácio Quaglio pelo incentivo e apóio;

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

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução	3
2. Revisão de Literatura	5
2.1. Caracterização da espécie <i>Inga vera</i> Willd. subsp. <i>affinis</i> (DC.) T.D. Pennington	5
2.2. Propriedades da água e eventos fisiológicos	6
2.3. Comportamento das sementes durante o armazenamento	9
2.4. Alterações no metabolismo das sementes recalcitrantes	11
2.5. Conservação de sementes recalcitrantes	12
3. Capítulo I: Respiração de embriões de <i>Inga vera</i> ssp. <i>affinis</i> sob diferentes condições de estresse	15
4. Capítulo II: Influência da aplicação de ABA e estresse hídrico na respiração de embriões de <i>Inga vera</i> ssp. <i>affinis</i> sob diferentes condições de estresse.....	50
5. Considerações Finais	111
6. Conclusões	112
7. Referências Bibliográficas	113
8. Anexos	119
8.1. Fluxograma: <i>Taxas respiratórias de embriões sob diferentes temperaturas</i>	119
8.2. Fluxograma: <i>Taxas respiratórias de embriões com diferentes níveis de hidratação</i> ..	119
8.3. Fluxograma: <i>Taxas respiratórias de embriões após aplicação de ácido abscísico e estresse osmótico</i>	120

8.4. Fluxograma: <i>Taxas respiratórias de embriões em diferentes níveis de hidratação após aplicação de ácido abscísico e estresse osmótico</i>	121
8.5. Fluxograma: <i>Taxas respiratórias de embriões em dois níveis de hidratação após aplicação de ácido abscísico e estresse osmótico por 24 e 48 horas</i>	122

BONJOVANI, M.R. TAXA RESPIRATÓRIA EM SEMENTES RECALCITRANTES DE *Inga vera* ssp. *affinis* (DC.) T.D. PENNINGTON. 2011. 122p. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

Resumo: O elevado metabolismo das sementes recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington, é um dos principais fatores que dificultam sua conservação. Uma forma de diminuir os efeitos do intenso metabolismo dessas sementes poderia ser a redução da temperatura do ambiente, pois a temperatura determina a velocidade das reações enzimáticas, afetando as taxas respiratórias. Contudo, as sementes recalcitrantes são intolerantes à dessecação e frequentemente não podem ter seu teor de água reduzido até níveis que permitam a redução da temperatura sem que ocorram danos pelo congelamento da água. Devido à falta de informações sobre o metabolismo respiratório dessas sementes em diferentes condições de estresse, o presente trabalho teve como objetivo verificar as taxas respiratórias desses embriões com diferentes níveis de hidratação e após aplicação de ácido abscísico e estresse osmótico em diferentes temperaturas. Os resultados possibilitaram observar a presença de reações oxidativas que não às da respiração, devido ao consumo elevado de oxigênio, e que as alterações nos níveis de hidratação e temperatura de incubação assim como a aplicação de ácido abscísico e estresse osmótico promoveram alterações nesse metabolismo oxidativo. Os resultados obtidos trazem novas perspectivas para a conservação das sementes recalcitrantes.

Palavras-chave: respiração, oxidação, estresse, ABA, conservação de sementes recalcitrante.

BONJOVANI, M.R. RESPIRATORY RATE IN THE RECALCITRANT SEEDS *Inga vera* ssp. *affinis* (DC.) T.D. PENNINGTON. 2011. 122p. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

Abstract: The high metabolism of recalcitrant seeds of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington is one of the main factors that complicate their conservation. One way to lessen the effects of the intense metabolism of these seeds could be the reduction of temperature of the environment, because temperature determines the speed of enzymatic reactions, affecting respiration rates. However, recalcitrant seeds are desiccation intolerant and often can not have their water content reduced to levels that allow a reduction in temperature without damage by the freezing of water. Due to lack of information on the respiratory metabolism of these seeds in different conditions of stress this study aimed to determine respiration rates of embryos with different levels of hydration and after application of abscisic acid and osmotic stress at different temperatures. The results allowed to observe the presence of oxidative reactions than those of breath due to high consumption of oxygen, and that changes in moisture levels and incubation temperature as well as the application of abscisic acid and osmotic stress promoted changes in oxidative metabolism. The results provide new perspectives for the conservation of recalcitrant seeds.

Key words: respiration, oxidation, stress, ABA, conservation of recalcitrant seeds.

1. Introdução

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

Conservar uma espécie não significa apenas garantir sua sobrevivência, esse papel seria mínimo e poderia ser desempenhado mantendo poucos indivíduos de cada espécie em jardins botânicos, zoológicos e outros tipos de coleções de seres vivos. Essa conservação das espécies também deve implicar na manutenção de sua variabilidade genética intra-específica (Rocha, 2004).

Existem, basicamente, duas estratégias de conservação. A conservação *in situ* é aquela realizada dentro dos próprios ecossistemas e em habitats naturais conservados; objetiva manter a biodiversidade dentro do contexto do ecossistema no qual é encontrada. Já a conservação *ex situ* é a manutenção de amostras de organismos fora de seu habitat natural na forma de indivíduos inteiros, como sementes, pólen, propágulos vegetativos e culturas de células ou tecidos (Botanic Gardens Conservation International, 2001).

A conservação de sementes é a forma mais comum de conservação *ex situ*, já que a semente é a unidade de propagação natural da maioria das espécies de plantas superiores (Santos 2001). De modo geral, a secagem pode ampliar a longevidade das sementes, reduzindo as reações metabólicas (Villela & Peres 2004). A capacidade de armazenamento é ampliada, para muitas espécies, quando a redução do teor de água das sementes está associada à diminuição da temperatura do ambiente (Walters *et al.* 1998). Entretanto, existem sementes sensíveis à desidratação e ao congelamento, que não sobrevivem ao armazenamento nessas condições, às quais Roberts (1973), denominou recalcitrantes.

O armazenamento de sementes recalcitrantes com teores de água relativamente altos, mas ainda insuficientes para germinação, tem permitido obtenção de resultados favoráveis ao armazenamento (Marcos Filho 2005). A utilização de inibidores endógenos, como ABA, a regulação da mobilização da água na semente com soluções osmóticas e estresses hídricos também se mostraram favoráveis para a conservação dessas sementes. Outra opção seria a

desidratação parcial, ou seja, a secagem até atingir o menor grau de umidade suportável para semente (Marcos Filho 2005).

Contudo sementes recalcitrantes são aparentemente incapazes de regular seus processos metabólicos durante a desidratação de modo a impedir os desequilíbrios metabólicos que podem resultar na geração de compostos danosos, como radicais livres (Hendry *et al.* 1992, Roach *et al.* 2010). Alternativamente podem faltar sistemas antioxidantes eficientes para impedir os danos de tais compostos (Castro *et al.* 2004).

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

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

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

- Analisar a taxa respiratória dos embriões de *Inga vera* em diferentes estádios de maturação e em diferentes temperaturas;
- Avaliar a influência do grau de hidratação na taxa respiratória desses embriões;
- Avaliar a influência do estresse hídrico e da aplicação de ABA nessa taxa respiratória.

2. Revisão de Literatura

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

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

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

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

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

apresentam elevada porcentagem de germinação verificando-se, inclusive, viviparidade (germinação das sementes dentro do próprio fruto) em algumas delas (Oliveira & Beltrati 1992, Pritchard *et al.* 1995, Bilia & Barbedo 1997).

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

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

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

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

2.2. Propriedades da água e eventos fisiológicos

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

O potencial químico representa a quantidade de energia livre da água (Taiz & Zeiger 2004), expresso em unidades de pressão (MPa), como potencial hídrico (Ψ) (Castro & Hilhorst 2004). A água pura tem um potencial químico elevado, podendo dissolver solutos e hidratar substâncias. Pela definição, a água pura tem um potencial hídrico igual a zero ($\Psi = 0$).

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

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

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

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

Sob pressão atmosférica normal, o potencial osmótico da água da semente é normalmente negativo, devido a presença de solutos. O mesmo ocorre com o potencial mátrico, em função dos colóides presentes na semente, pois as forças capilares e de adsorção não são desprezíveis, enquanto a pressão de turgescência é positiva e não se desenvolve em substância não confinada. Assim, o potencial hídrico tem valor negativo, a não ser em células

túrgidas, em que se iguala a zero, de modo que os decréscimos dos potenciais mátrico e osmótico da célula reduzem o potencial de água, tornando-o mais negativo (Marcos Filho 2005).

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

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

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

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

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

A água tipo 3 se associa aos sítios hidrofóbicos das macromoléculas, formando pontes de união. É observada entre os teores de água de 20% a 33% na base úmida e potencial hídrico de -11 a -4 MPa. Neste nível de hidratação, a atividade fisiológica da semente se altera sensivelmente. O transporte de elétrons na mitocôndria é facilitado, a respiração é intensificada, há o início do metabolismo, mas os sistemas de reparo ainda não são ativados.

Sementes recalcitrantes, quando desidratadas até este nível, exibem mecanismos de deterioração semelhantes aos das ortodoxas expostas a níveis elevados de umidade relativa do ar. A água se torna congelável quando atinge níveis mais próximos do limite superior estabelecido para o nível 3 de hidratação (Marcos Filho 2005).

Água tipo 4 não interage diretamente com a superfície das proteínas e ocupa poros e capilares. Verifica-se sua ocorrência entre os teores de água de 33% a 41% correspondendo aos potenciais hídricos de -4 a -1,5 MPa. Nessa fase, o metabolismo das sementes é pouco conhecido. Esse tipo de água inclui os teores de água favoráveis ao armazenamento de várias espécies com sementes recalcitrantes e ao desenvolvimento das sementes durante grande parte do período de maturação (Marcos Filho 2005).

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

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

2.3. Comportamento das sementes durante o armazenamento

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

Na maioria das sementes, o desenvolvimento pode ser dividido convencionalmente em três fases confluentes. A primeira fase é caracterizada pelo crescimento inicial devido à divisão celular e a um aumento rápido no peso fresco da semente inteira e conteúdo de água. Depois disso há uma fase intermediária de maturação, na qual a semente aumenta de tamanho devido, principalmente, à expansão celular e à deposição de reservas. Finalmente, o desenvolvimento da maioria das sementes termina com uma fase pré-programada da secagem

de maturação ou dessecação. Caracteristicamente, essas sementes são chamadas ortodoxas porque se submetem a algum grau de dessecação (Bewley & Black 1994, Castro *et al.* 2004). Isso resulta numa redução gradual no metabolismo da semente e o embrião passa para um estado quiescente. As sementes ortodoxas são exclusivas quanto à tolerância à dessecação, 90 a 95% da água é removida durante o desenvolvimento e a dessecação (Black & Pritchard 2002). Esse estresse osmótico leva o acúmulo de ABA que promove a aquisição da tolerância a dessecação (Taiz & Zeiger 2004, Marcos Filho 2005).

No entanto, para as espécies com sementes recalcitrantes, pode ocorrer passagem direta da fase de desenvolvimento para a germinativa, sem a dessecação, podendo germinar quando ainda está ligada a planta-mãe (Barbedo & Marcos Filho 1998). Portanto, não apresentam período de transição entre a maturação e a germinação e raramente apresentam dormência (Marcos Filho 2005). Estas têm, em geral, períodos de vida muito limitados, morrendo devido à secagem (Castro *et al.* 2004).

As sementes podem ser classificadas, em relação à tolerância à dessecação e a redução de temperatura, como recalcitrantes, intermediárias e ortodoxas, podendo ser conservadas, respectivamente, por curto, médio e longo prazo (Roberts 1973, Eira 1996).

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

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

As sementes ortodoxas podem tolerar desidratação quase completa, o que não ocorre com as sementes recalcitrantes. Após a histo-diferenciação, as células de sementes ortodoxas completam os vacúolos com proteínas, acumulam açúcares, alteram a composição da

membrana, produzem proteínas LEA (“late-embryogenesis-abundant”) e entram no estado vítreo. Essas modificações hipoteticamente seriam responsáveis por conferir tolerância à desidratação. No entanto, estes mesmos processos podem ocorrer nos mesmos graus em sementes recalcitrantes, dificultando a demonstração de que atuariam como protetores (Walters 2000).

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

2.4. Alterações no metabolismo das sementes recalcitrantes

Durante o desenvolvimento da maioria das sementes recalcitrantes não há declínio no conteúdo de água e conseqüentemente apresentam atividade metabólica intensa de modo que passam quase que diretamente da fase de desenvolvimento para a de germinação sem exibir período evidente de latência (Barbedo & Marcos Filho 1998, Castro *et al.* 2004, Pammenter & Berjak 2000), verificando-se, inclusive, viviparidade (germinação das sementes dentro do próprio fruto) em algumas delas (Oliveira & Beltrati 1992, Pritchard *et al.* 1995, Bilía & Barbedo 1997).

Como as alterações metabólicas associadas à germinação continuam durante o armazenamento, as sementes tornam-se cada vez mais sensíveis a dessecação; mesmo quando armazenadas em ambiente úmido, perdem rapidamente a viabilidade, havendo necessidade de absorção de quantidade adicional de água para completar o processo de germinação (Marcos Filho 2005). Segundo Pammenter *et al.* (1994) a perda da viabilidade das sementes recalcitrantes é conseqüência dos danos ligados ao metabolismo germinativo, que simulando

uma condição de germinação muito lenta, culminaria com a falta de água livre suficiente para os processos de divisão e expansão celular.

A manutenção dessa intensa atividade requer, provavelmente, elevadas taxas respiratórias e grande consumo de reservas. Durante o período no qual as sementes mantêm intensa atividade, mas não completam a germinação, o metabolismo pode ser desordenado, com consumo de reservas e liberação de radicais livres, ambas as atividades prejudicando a conservação da viabilidade das sementes durante o armazenamento e, conseqüentemente, favorecendo sua rápida deterioração (Barbedo & Marcos Filho 1998, Ferreira & Borghetti 2004, Andréo *et al.* 2006, Berjak & Pammenter 2008).

Uma temperatura mais baixa pode atrasar ou reduzir a taxa absoluta de respiração (Dahal *et al.* 1996). Assim, uma forma de diminuir os efeitos do intenso metabolismo de sementes poderia ser a redução da temperatura do ambiente, pois a temperatura determina a velocidade das reações enzimáticas, afetando as taxas respiratórias (Taiz & Zeiger 2004, Marengo & Lopes 2007).

Contudo, como as sementes recalcitrantes são intolerantes à dessecação, freqüentemente não podem ter seu teor de água reduzido até níveis de congelamento sem que ocorram dano. A dessecação dessas sementes perturba seu metabolismo levando ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio implicando na morte das sementes (Hendry *et al.* 1992, Bailly 2004, Roach *et al.* 2010).

A conservação de sementes recalcitrantes permanece, portanto, como um desafio para fisiologistas e tecnologistas e pouco se sabe, atualmente, sobre os mecanismos envolvidos em sua rápida deterioração.

2.5. Conservação de sementes recalcitrantes

A principal técnica de conservação de sementes durante o armazenamento é a redução do seu metabolismo por meio da remoção da água. Porém, sementes de várias espécies nativas apresentam um limite letal de umidade, abaixo do qual há perda total de viabilidade do lote, apresentando grande dificuldade em sua conservação (Kohama *et al.* 2006). As sementes dessas espécies geralmente apresentam atividade metabólica intensa, tanto durante sua formação, quanto após sua colheita, por serem mantidas com teores de água relativamente

elevados (Barbedo & Marcos Filho 1998, Castro *et al.* 2004). Portanto, métodos alternativos para o armazenamento dessas sementes devem obrigatoriamente considerar a redução do metabolismo (Andréo *et al.* 2006), ou a indução da tolerância à dessecação em sementes sensíveis, por exemplo com a adição de ABA. O armazenamento de sementes com teores de água relativamente altos, mas ainda insuficientes para permitir a germinação, tem permitido obtenção de resultados favoráveis, embora haja dificuldades para a manutenção desses graus de umidade durante período prolongado (Marcos Filho 2005).

Estudos realizados por Barbedo & Cicero (2000) mostraram que sementes de qualidade elevada de *Inga uruguensis*, quando armazenadas hidratadas e embebidas em solução de ácido abscísico 10^{-4} M em câmara fria, podem apresentar germinação superior a 80% após 40 dias. Uma outra opção que começa a se apresentar promissora para o controle do metabolismo é a regulação da mobilização da água na semente. Embriões de *Inga vera* mantidos em substratos com soluções de PEG a -2,4 MPa a 10°C apresentaram germinação superior a 80% aos 90 dias, enquanto os armazenados em substrato umedecido com água pura (0 MPa), na mesma temperatura, apresentaram germinação inferior a 60% (Andréo *et al.* 2006).

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

A tolerância à dessecação vem sendo estudada, mas, até o presente momento, as pesquisas não apontam para o sucesso na utilização da secagem como forma de armazenar sementes recalcitrantes por períodos prolongados (Barbedo & Marcos Filho 1998). Bilia *et al.* (1998), estudando os limites de tolerância à dessecação das sementes de *Inga uruguensis*, conseguiram armazenar as sementes em sacos de polietileno a 10°C por até 60 dias após a colheita, mantendo a qualidade fisiológica, desde que seja reduzido o teor de água até níveis de 50%. Bonjovani (2007) observou que estresses hídricos diminuíram a sensibilidade dos embriões de *Inga vera* à dessecação, indicando a possibilidade de ampliação da tolerância à dessecação desses embriões e, conseqüentemente sua conservação.

A capacidade de armazenamento é ampliada para muitas espécies, quando a redução do teor de água das sementes está associada à diminuição de temperatura do ambiente

(Walters *et al.* 1998). Contudo, há espécies que não toleram grande redução da temperatura principalmente o congelamento (Chin *et al.* 1989). Sementes com elevados teores de água, ortodoxas ou recalcitrantes, são suscetíveis a danos causados por temperaturas negativas, devido à formação de cristais de gelo nos tecidos, provocando perda da viabilidade (Fonseca & Freire 2003). A principal consequência da formação de cristais de gelo é a ruptura mecânica, tanto da estrutura citoplasmática quanto da membrana celular, pela expansão da água congelada, resultando na desagregação celular (Fujikawa 1980). Pode ocorrer, ainda, enorme tensão e estresse físico em células vegetais submetidas ao congelamento. Isso porque, durante a transição de fase do líquido extracelular, com a consequente formação de gelo, há dessecação dos tecidos vegetais pela migração da água do interior da célula para o meio extracelular (Guy 2003). Bonjovani & Barbedo (2008) observaram que a aplicação de técnicas de estresse nos embriões de *Inga vera* mostrou potencial para se ampliar a tolerância tanto à dessecação quanto às baixas temperaturas.

3. Capítulo I

RESPIRAÇÃO DE EMBRIÕES DE *INGA VERA* SSP. *AFFINIS* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE

Marcio Roberto Bonjovani¹, Claudio José Barbedo²

¹Doutorando do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Instituto de
Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

²Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Sementes, São Paulo, SP.

BREATH OF EMBRYOS INGA VERA SSP. AFFINIS UNDER DIFFERENT CONDITIONS OF STRESS

Abstract: The breath of embryos of *Inga vera* ssp. *affinis* under different stress conditions was evaluated. Were tested different temperatures, drying levels beyond treatments with abscisic acid and osmotic stress (-2.5 MPa PEG) for 15 days. The results showed that depending on the maturation stage, a small reduction in water content can improve both its tolerance to the desiccation as to low temperatures. The reduction of the storage temperature reduces the metabolism, decreasing respiration rates of seeds and increasing its storage potential. The treatments can reduce stress-induced oxidative reactions and simultaneously increase respiratory rates hurting the germination of these seeds, therefore, should be studied in more detail.

Key words: recalcitrant seeds, drying, freezing temperature, oxidative stress.

RESPIRAÇÃO DE EMBRIÕES DE *INGA VERA* SSP. *AFFINIS* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE

Resumo: A respiração de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* sob diferentes condições de estresse foi avaliada. Foram testadas diferentes temperaturas, níveis de secagem além de tratamentos com ácido abscísico e estresse osmótico (PEG -2,5MPa) por 15 dias. Os resultados mostraram que dependendo do estágio de maturação, uma pequena redução no teor de água pode melhorar a sua tolerância tanto à dessecação quanto às baixas temperaturas. A redução da temperatura de armazenamento reduz o metabolismo, diminuindo as taxas respiratórias das sementes e ampliando o seu potencial de armazenamento. Os tratamentos de estresse induzido podem reduzir reações oxidativas e, simultaneamente, aumentar as taxas respiratórias prejudicando a capacidade germinativa dessas sementes, portanto, devem ser estudados mais detalhadamente.

Palavras-chave: sementes recalcitrantes, dessecação, temperatura de congelamento, estresse oxidativo.

Introdução

Sementes recalcitrantes apresentam atividade metabólica intensa, tanto durante sua formação quanto após sua colheita, principalmente por serem mantidas com teores de água elevados (Barbedo & Marcos Filho 1998, Castro *et al.* 2004, Pammenter & Berjak 2000). A manutenção dessa intensa atividade requer, provavelmente, elevadas taxas respiratórias e grande consumo de reservas. Durante o período no qual as sementes mantém intensa atividade mas não completam a germinação ou o desenvolvimento inicial das plântulas, o metabolismo pode ser desordenado, com consumo de reservas e liberação de radicais livres, ambas as atividades prejudicando a conservação da viabilidade das sementes durante o armazenamento e, conseqüentemente, favorecendo sua rápida deterioração (Barbedo & Marcos Filho 1998, Ferreira & Borghetti 2004, Andréo *et al.* 2006).

O processo de deterioração em uma semente é inevitável, mas seus efeitos podem ser minimizados durante o armazenamento como, por exemplo, diminuindo-se o grau de hidratação e a temperatura como meios de redução da atividade metabólica, com reflexos sobre os níveis de respiração do embrião (Walters *et al.* 1998, Carvalho & Nakagawa 2000). Uma temperatura mais baixa pode atrasar ou reduzir a taxa absoluta de respiração (Dahal *et al.* 1996). Assim, uma forma de diminuir os efeitos do intenso metabolismo de sementes poderia ser a redução da temperatura do ambiente, pois a temperatura determina a velocidade das reações enzimáticas, afetando as taxas respiratórias (Taiz & Zeiger 2004, Marengo & Lopes 2007). Contudo, como as sementes recalcitrantes são intolerantes à dessecação, freqüentemente não podem ter seu teor de água reduzido até níveis que permitam a redução da temperatura sem que ocorram danos pelo congelamento da água. A conservação de sementes recalcitrantes permanece, portanto, como um desafio para fisiologistas e tecnologistas e pouco se sabe, atualmente, sobre os mecanismos envolvidos em sua rápida deterioração.

Inga vera Wild. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington, cuja sinonímia é *Inga uruguensis* Hook. & Arn., é popularmente conhecida como ingá (Joly 1993) e possui sementes recalcitrantes (Bilia *et al.* 2003). Dados relativos ao comportamento das sementes de ingá durante o armazenamento indicam que estejam situadas entre as de maior intolerância à dessecação e de mais baixa longevidade natural (Bilia & Barbedo 1997). Essas sementes mostram-se, então, como de grande interesse nos estudos que visam ao desenvolvimento de procedimentos para ampliar a capacidade de armazenamento de sementes recalcitrantes (Bilia *et al.* 2003). Diversas tentativas de ampliar a conservação dessas sementes resultaram em algum sucesso (Bilia *et al.* 1999, Barbedo & Cicero 2000, Andréo *et al.* 2006, Faria 2006), mas são ainda insuficientes para a conservação. A aplicação de técnicas de estresse nos embriões também mostrou potencial para se ampliar a tolerância tanto à dessecação quanto às baixas temperaturas (Bonjovani & Barbedo 2008). Contudo, em todos esses estudos há carência de informação sobre as alterações metabólicas decorrentes dos tratamentos aplicados, dificultando uma melhor compreensão da fisiologia de sementes recalcitrantes. Esse conhecimento poderia auxiliar na busca por tecnologia que permita conservar as sementes por períodos mais longos, compatíveis com a preservação da espécie em bancos de germoplasma.

Diante do exposto, considerando-se a ausência de informações sobre o metabolismo respiratório de sementes recalcitrantes, o presente trabalho teve por objetivo analisar a taxa respiratória dos embriões de *Inga vera* em diferentes estádios de maturação, incubados em diferentes temperaturas e sua relação com a capacidade de conservação das sementes. Teve o objetivo, também, de analisar a taxa respiratória desses embriões com diferentes graus de hidratação e os efeitos da aplicação de ácido abscísico e de estresse osmótico nessas taxas respiratórias e na manutenção da capacidade germinativa.

Material e Métodos

Coleta dos frutos e extração das sementes - Os frutos de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington, foram coletados no mês de janeiro de 2009 a partir de 10 matrizes plantadas na Rodovia dos Bandeirantes, Jundiaí, SP (23°04,914' S, 47°01,436' W). Após a coleta os frutos foram levados ao Laboratório de Sementes, do Instituto de Botânica, em São Paulo, SP (23°37' S, 46°32' W), onde foram abertos manualmente. As sementes foram removidas manualmente, agrupadas em dois estádios de maturação (Estádios III e IV, segundo Bonjovani & Barbedo 2008) e, em seguida, tiveram sua sarcotesta removida, obtendo-se os embriões excisados utilizados nos experimentos. O material foi armazenado em sacos plásticos, em câmara tipo BOD ajustada para temperatura constante de 6°C, sem luz, por até sete dias, período este necessário para que todo o lote coletado fosse beneficiado.

Determinações físicas e fisiológicas - Os embriões foram caracterizados, inicialmente, quanto ao teor de água, conteúdo de massa seca, potencial hídrico, condutividade elétrica da solução de embebição, germinação e capacidade de produção de plântulas normais. O teor de água e o conteúdo de massa seca foram determinados gravimetricamente, pelo método de estufa a 103°C por 17 horas (Ista 1985), com três repetições de 10 embriões, sendo os resultados apresentados em porcentagem, em base úmida, para teor de água e em mg.semente⁻¹, para massa seca (Brasil 2009).

O potencial hídrico foi medido por meio de potenciômetro WP4 (Decagon Devices, Inc., Pullman, EUA), basendo-se na temperatura do ponto de orvalho do ar em equilíbrio com a amostra examinada, com três repetições de três embriões. Para aferição do potencial hídrico real dos embriões e do potencial registrado pelo potenciômetro, amostras foram incubadas em soluções de polietileno glicol 6000 com diferentes potenciais osmóticos, segundo Michel & Kaufmamm (1973), até peso constante, sendo então avaliadas no potenciômetro.

A condutividade elétrica foi determinada por meio de condutímetro digital de

bancada MA150 (Marconi, Piracicaba, Brasil), com três repetições de 10 embriões. Para tanto, os embriões foram acondicionadas em copos plásticos descartáveis de 300 mL, contendo 75 mL de água deionizada, incubados por 24 horas em câmara tipo BOD ajustada para temperatura constante de 20°C, sem luz (Barbedo & Cicero 1998).

O teste de germinação e de produção de plântulas normais foi conduzido em rolo de papel para germinação, com duas folhas para a base e outra para cobertura, pré-umedecidas na proporção de duas vezes e meia o peso do papel (Brasil 2009), com três repetições de 20 embriões, colocados em germinadores Marconi tipo MA400 (Marconi, Piracicaba, Brasil), com circulação interna de água, regulados para a temperatura constante de 25 °C e luz constante (Bilia & Barbedo 1997). As avaliações foram realizadas a cada dois dias, durante 14 dias, sendo registrados os embriões germinados (protrusão de raiz primária com, no mínimo, 1 cm) e os que mantiveram a capacidade de produzir as plântulas normais (plântulas com sistema radicular e eófilos desenvolvidos e sem defeitos aparentes). Como a espécie produz sementes poliembriônicas, os embriões contidos em cada semente foram mantidos juntos em todas as avaliações. Mesmo quando houve protrusão de mais de uma raiz primária ou surgimento de mais de uma plântula por embrião, apenas uma raiz e/ou plântula por embrião foram registradas (Bilia & Barbedo 1997).

Incubação de embriões e avaliação de taxas respiratórias - As taxas respiratórias e a presença de outras reações oxidativas foram estimadas pela avaliação do consumo de oxigênio (O₂) e da produção de dióxido de carbono (CO₂) de embriões incubados em frascos herméticos, segundo metodologia descrita por Lamarca (2009). Para tanto, amostras do ar dos frascos foram tomadas e analisadas em analisador Modelo 6600 (Illinois Instruments, Inc., Johnsbury, EUA). A análise de O₂ foi baseada em sensor potenciométrico, com eletrólito sólido cerâmico na forma de tubo à base de óxido de zircônio (ZrO₂), onde interna e externamente são depositados dois eletrodos. O zircônio possui a habilidade de conduzir íons

de oxigênio em temperaturas superiores a 650°C. A medida é dada mediante a diferença de potencial da pressão parcial do oxigênio entre os dois eletrodos (Steil *et al.* 2002, Caproni 2007). A análise de CO₂ foi realizada em sensor de infravermelho, baseando-se na absorção, pelo CO₂, de radiação no espectro do vermelho. Os valores foram registrados em porcentagem, em volume, do gás analisado (O₂ ou CO₂) na amostra em relação ao volume total de ar.

Os embriões, necessários para realizar teor de água, conteúdo de massa seca, potencial hídrico, condutividade elétrica da solução de embebição, germinação e capacidade de produção de plântulas normais, após as avaliações da respiração, foram acondicionados em embalagens de vidro de 600ml, hermeticamente fechados, com tampas perfuradas, formando orifícios que foram recobertos por um septo de borracha; por este septo foi inserido o eletrodo do equipamento por onde foi tomada a amostra do ar da embalagem. Antes da introdução dos embriões nas embalagens, foram determinadas as massas frescas e o volume desses embriões. O volume total do ar das embalagens foi determinado segundo o princípio da hidrostática para que se calculasse o volume resultante do ar depois de descontado o volume ocupado pelos embriões.

O fechamento das embalagens e o acondicionamento dos vidros em BODs, em temperaturas pré determinadas, foi determinado como sendo o início do experimento, o tempo zero correspondendo à atmosfera normal (21% de oxigênio e 0,03% de dióxido de carbono). O consumo de O₂ e a produção de CO₂ pelos embriões embalados foram estimados pela diferença entre os valores medidos e os da atmosfera normal. Após cada medida, as embalagens foram abertas por alguns minutos para re-equilíbrio com a atmosfera normal, sendo, em seguida, novamente fechadas para a continuidade do experimento. Considerando-se a pressão atmosférica local como 0,90 atm (A. B. Pereira, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2007, comunicação pessoal), os valores obtidos em porcentagem de O₂ ou de CO₂

foram convertidos para pressão parcial do gás, segundo a fórmula $p_1/P = v_1\%/V\%$ (Feltre 1985), sendo:

p_1 = pressão parcial do gás (em atm);

P = pressão atmosférica local (0,90 atm);

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

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

A seguir, baseando-se no volume das embalagens e na temperatura registrada em cada avaliação, os valores foram convertidos para μmol de O_2 e de CO_2 , pela equação de Clapeyron, $p_1V = nRT$, sendo:

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

n = número de moles do gás

R = constante universal dos gases perfeitos ($0,082 \text{ atm.L.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$)

T = temperatura (em Kelvin)

Baseando-se em experimentos prévios da média de consumo diário de O_2 (e de liberação de CO_2) pelos embriões de *Inga vera* (dados não publicados), as avaliações foram realizadas no intervalo de um dia para embriões incubados em temperaturas positivas e a cada cinco dias para embriões incubados em temperaturas negativas. Os valores obtidos nas avaliações foram somados e divididos pela massa seca total da amostra de embriões e pelo número de dias em que os embriões permaneceram nas embalagens, obtendo-se o valor expresso em micromol por grama de massa seca por dia ($\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$). Foi calculado, também, o quociente respiratório (QR), dividindo-se o valor obtido para produção de CO_2 pelo obtido para consumo de O_2 ($\text{QR} = \text{CO}_2/\text{O}_2$), ambos em $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$, segundo descrito por Kader & Saltveit (2002).

Taxas respiratórias de embriões sob diferentes temperaturas - Embriões dos dois estádios de maturação foram acondicionados em embalagens de vidro como descrito anteriormente e

incubados por até 15 dias a -21, -15, -6, -3, 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), para avaliação das taxas respiratórias, conforme descrito anteriormente. Ao final da incubação, os embriões foram avaliados física e fisiologicamente, conforme descrito anteriormente.

Taxas respiratórias de embriões com diferentes níveis de hidratação - visando analisar a relação entre nível de hidratação e taxas respiratórias, embriões foram submetidos a quatro níveis de hidratação: a) teor de água original, nos quais os embriões não foram submetidos à secagem e apresentavam 61% a 64% de água; b) secagem em ambiente de laboratório ($24 \pm 2^\circ\text{C}/40 \pm 5\% \text{ UR}$) até atingirem aproximadamente 55% de água, o que aconteceu após 36 horas; c) secagem até atingirem aproximadamente 45% de água, o que aconteceu após 72 horas; d) secagem até atingirem aproximadamente 35% de água, o que aconteceu após 120 horas. Após as secagens os embriões foram acondicionados em embalagens de vidro como descritos anteriormente e incubados em câmaras tipo BOD, sem fotoperíodo, ajustadas para temperaturas constantes a -3, 3, 9, 15 e 21°C, para avaliações das taxas respiratórias.

Ao final de cada nível de secagem e da incubação para as avaliações de consumo de O_2 e produção de CO_2 , os embriões foram novamente avaliados física e fisiologicamente, conforme descrito anteriormente.

Taxas respiratórias de embriões após aplicação de ácido abscísico e estresse osmótico - embriões foram submetidos a dois tratamentos de estresse, um por regulador vegetal e outro por solução osmótica. Para esta última, baseando-se em resultados de Bonjovani (2007), uma solução de polietileno glicol 6000 (PEG) com potencial osmótico de -2,5 MPa, ligeiramente mais negativo que o potencial hídrico dos embriões, foi preparada calculando-se a quantidade de PEG segundo fórmula descrita por Michel & Kaufmann (1973). Para o efeito de estresse por regulador vegetal (ácido abscísico - ABA), preparou-se solução de 10^{-4} M, baseando-se em resultados de Barbedo & Cicero (2000). Os embriões foram incubados em ambas as soluções utilizando-se bandejas plásticas (36,5 x 26 x 7 cm) com tampa, opacas, com duas folhas de

papel de germinação no fundo. Os embriões, cobertos por uma terceira folha de papel de germinação, permaneceram submersos nas soluções (Bonjovani, 2007) por 24 horas, em câmaras tipo BOD, com temperatura constante regulada para $6\pm 1^{\circ}\text{C}$. Ao final da incubação, os embriões foram lavados em água corrente, tiveram o excesso superficial de água removido em papel filtro e, em seguida, foram acondicionados nas embalagens de vidro, como descrito acima e incubados a -3, 3, 9, 15 e 21°C , para avaliações das taxas respiratórias. Ao final da aplicação de ABA, do estresse osmótico e da incubação para as avaliações das taxas respiratórias, os embriões foram novamente avaliados física e fisiologicamente, conforme descrito anteriormente.

Delineamento experimental e análise estatística dos dados – No primeiro experimento, para obtenção das taxas respiratórias em diferentes temperaturas, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, em esquema fatorial 2 x 13 (estádios de maturação x temperaturas de incubação). No segundo experimento, para analisar as taxas respiratórias de embriões com diferentes níveis de hidratação incubados em diferentes temperaturas, foi utilizado fatorial 2 x 4 x 5 (estádios de maturação x níveis de hidratação x temperaturas de incubação). No terceiro experimento, para avaliar a taxa respiratória de embriões após a aplicação de ABA e de PEG foi utilizado fatorial 2 x 3 x 5 (estádios de maturação x pré-tratamentos x temperaturas de incubação). Os resultados obtidos foram analisados pelo teste F e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (Santana & Ranal 2004).

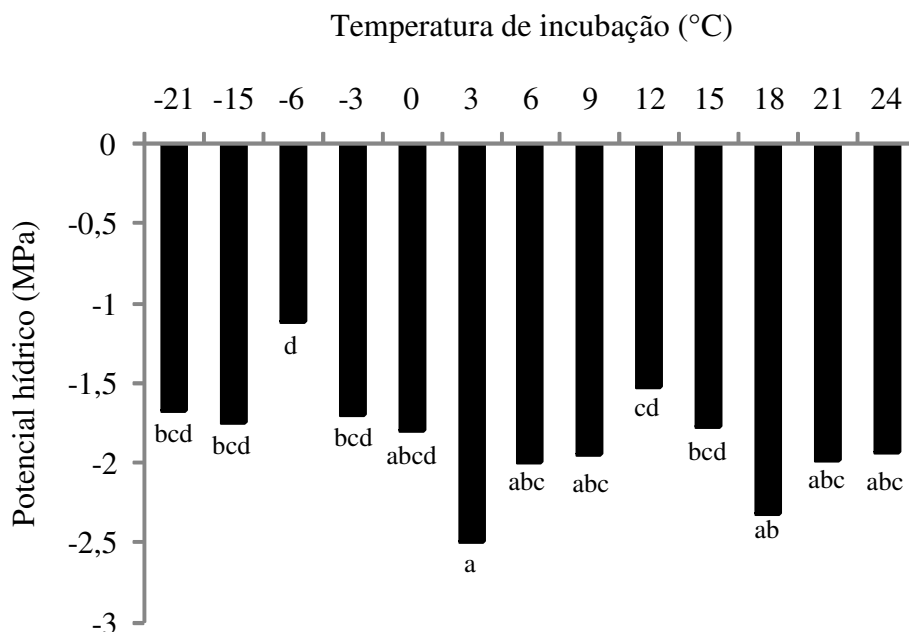
Resultados e Discussão

Os embriões de *I. vera* apresentaram, no momento da colheita, 66,1% e 61,4% de água e 0,19 e 0,30 g.semente⁻¹ de massa seca, respectivamente para os estádios classificados como

III e IV. Esses valores sugerem que os embriões do estágio IV eram, de fato, mais maduros que os do estágio III, conforme anteriormente descrito por Bonjovani & Barbedo (2008). Os valores iniciais de germinação, produção de plântulas normais (ambos 100%) e condutividade elétrica ($15 \pm 1 \mu\text{S} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) foram praticamente os mesmos para os dois estádios, confirmando estudos prévios que descrevem que a capacidade germinativa, em sementes de *I. vera*, é adquirida logo no início do processo de maturação.

Taxas respiratórias de embriões sob diferentes temperaturas - o teor de água dos embriões pouco se alterou durante os 15 dias de incubação, os do estágio III diminuindo no máximo 2% e os do estágio IV aumentando no máximo 1%, independentemente da temperatura na qual foram incubados. O conteúdo de massa seca, por sua vez, permaneceu praticamente inalterado. Se, de um lado, a quantidade de água presente nos embriões apresentou variações mínimas, sua atividade foi diferente em função da temperatura de incubação. Embora essa diferença fosse esperada, pois a atividade da água é termodependente (Pollack *et al.* 2006), não se observou tendência evidente com a redução da temperatura, conforme observado pelos valores de potencial hídrico (figura 1). Além disso, o potencial hídrico foi sempre maior nos embriões do estágio III (em média, -1,74 MPa) do que nos do estágio IV (-1,95 MPa), indicando uma quantidade maior de sítios de ligação nestes.

As variações nas taxas respiratórias decorrentes das mudanças na temperatura de incubação foram semelhantes para embriões dos dois estádios de maturação, embora com algumas pequenas diferenças (figura 2). À medida que se diminuiu a temperatura houve redução na produção de CO_2 (figura 2B), comportamento esperado, pois a variação na temperatura do ambiente pode afetar o metabolismo da planta, determinando a velocidade das reações enzimáticas, afetando as taxas respiratórias (Taiz & Zeiger 2004, Marengo & Lopes 2007). É interessante ressaltar, contudo, que a liberação de CO_2 ocorreu até em temperaturas abaixo de 0°C , e que explicaria, por exemplo, a baixa capacidade de conservação da



viabilidade dessas sementes mesmo quando armazenadas em temperaturas próximas às de congelamento (Bilia et al. 1999, Barbedo & Cicero 2000, Andréo et al. 2006, Faria 2006, Bonjovani & Barbedo 2008). Figura 1. Potencial hídrico de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* (média dos estádios) após 15 dias de incubação em diferentes temperaturas. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

O consumo de O_2 , porém, apresentou comportamento totalmente diferente da produção de CO_2 , exibindo claramente dois patamares, um mais elevado em temperaturas acima de $0^\circ C$ e outro mais baixo em temperaturas abaixo de $0^\circ C$ (figura 2A). Ou seja, independente de variações dentro de cada faixa de temperatura, nas temperaturas positivas o consumo de O_2 permaneceu entre 150 e 230 $\mu mol.gMS^{-1}.dia^{-1}$, enquanto que nas negativas esse consumo ficou entre 20 e 50 $\mu mol.gMS^{-1}.dia^{-1}$. Essa abrupta mudança no consumo de O_2 poderia ser atribuída à maior dificuldade de difusão do gás decorrente do congelamento da água, num processo semelhante à secagem e formação do estado vítreo da água nas células (Pagnotta & Bruni 2006).

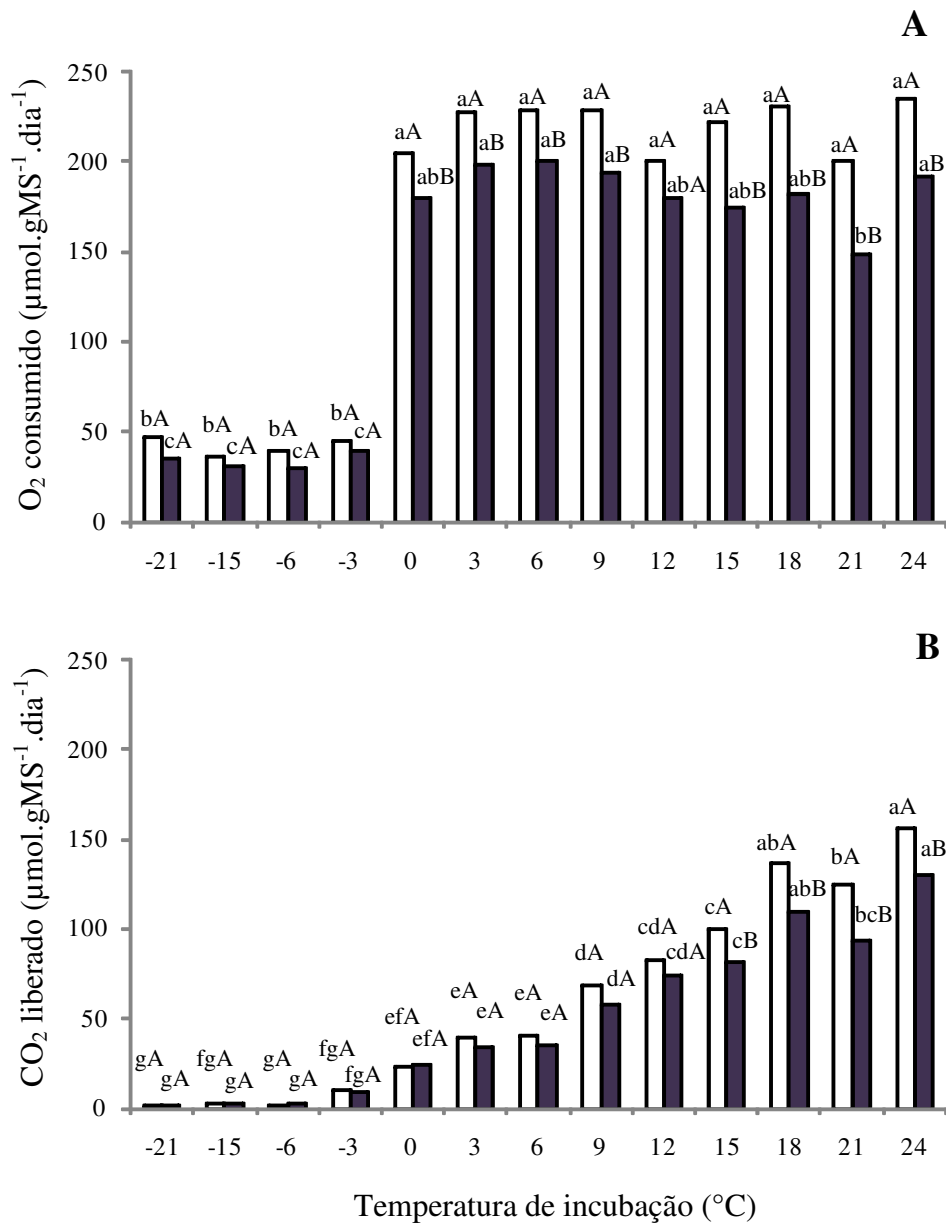


Figura 2. Consumo de O₂ (A) e liberação de CO₂ (B) por embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de dois estádios de maturação (colunas brancas: estágio III; colunas pretas: estágio IV), incubados durante 15 dias em diferentes temperaturas. Valores seguidos pela mesma letra (minúsculas para comparações entre temperaturas, maiúsculas entre estádios de maturação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A produção de CO_2 , que também foi em torno dos $150 \mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ na temperatura mais elevada, foi reduzida para valores inferiores a $30 \mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, abaixo de 0°C , gerando um quociente respiratório (CO_2/O_2) tanto menor quanto menor a temperatura. Dentro de cada temperatura de incubação verifica-se que a produção de CO_2 sempre foi menor do que o consumo de O_2 e, ainda, que sempre foi maior para embriões do estágio III. Essa diferença poderia significar a utilização de lipídios como substrato para a respiração, pois o uso de ácidos graxos saturados e insaturados como substrato inicial para a respiração das sementes necessita maiores quantidades de oxigênio. Contudo, embriões de *Inga vera* apresentam apenas 0,27% de lipídios (Mello *et al.* 2010), quantidades muito baixas para a respiração. Outra possibilidade seria a presença de reações oxidativas que não a respiração, tais como a peroxidação de lipídios e a oxidação de compostos fenólicos com a liberação do radical superóxido e que podem estar envolvidos com a deterioração das sementes (Hendry 1993, McDonald 1999, Bailly 2004, Berjak & Pammenter 2008, Roach *et al.* 2010).

Deve-se destacar também que, na faixa de temperatura comumente utilizada para armazenamento de sementes, entre zero e 9°C , o desequilíbrio do consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono mostra-se mais intensificado para esses embriões podendo, portanto, reduzir o potencial de armazenamento desses embriões, ainda que armazenados em baixa temperatura. De modo geral os resultados do consumo de O_2 e produção de CO_2 de embriões de ingá sugerem presença de reações oxidativas que poderiam estar relacionadas com as dificuldades de conservação dos mesmos. Contudo, ao final do período de incubação não se verificaram diferenças expressivas na capacidade germinativa ou de produção de plântulas normais para embriões incubados nas temperaturas positivas (figura 3). Os valores de germinação permaneceram próximos a 100% (figura 3A) e os de produção de plântulas normais próximos ou superiores a 80% (figura 3B), para ambos os estádios de maturação. A incubação dos embriões para avaliação das taxas respiratórias poderia ser considerada como

armazenamento por 15 dias sob diferentes temperaturas.

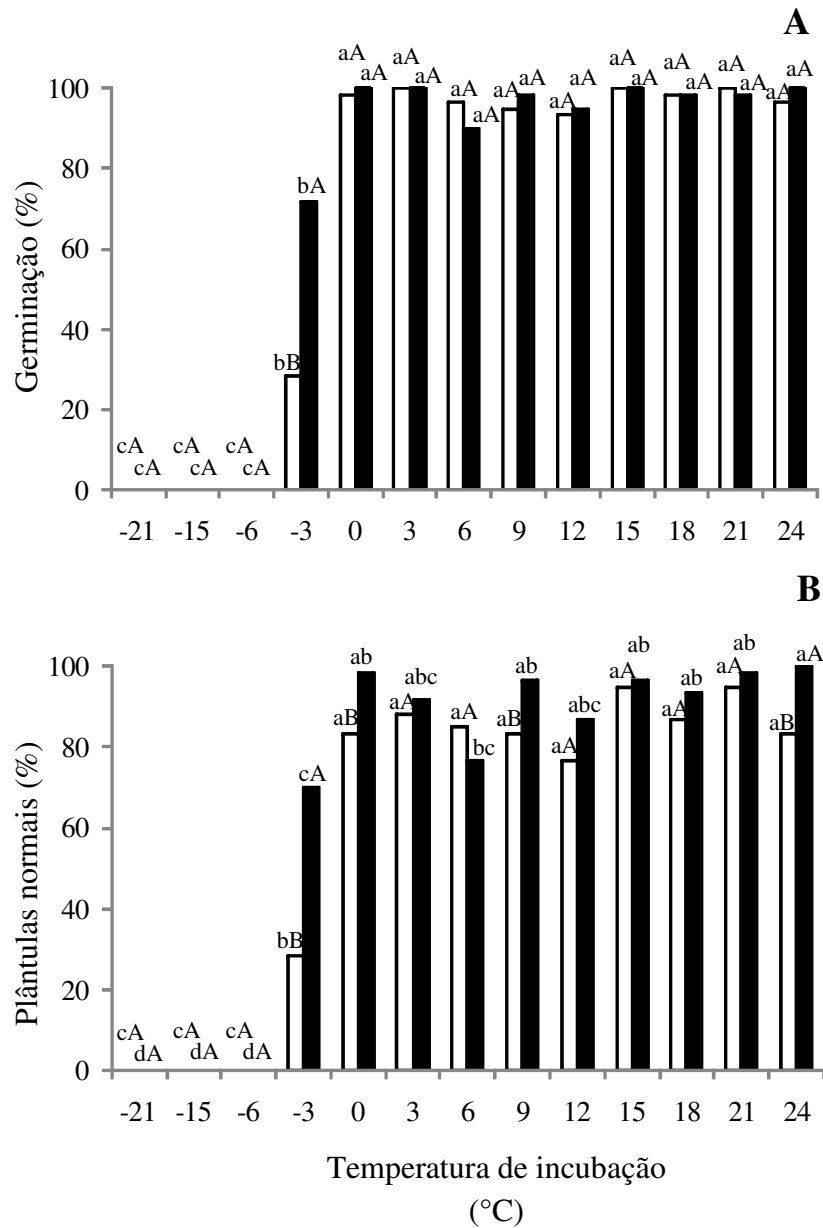


Figura 3. Germinação (A) e produção de plântulas normais (B) por embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de dois estádios de maturação (colunas brancas: estágio III; colunas pretas: estágio IV), incubados durante 15 dias em diferentes temperaturas. Valores seguidos pela mesma letra (minúsculas para comparações entre temperaturas, maiúsculas entre estádios de maturação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Trabalhos prévios demonstraram que, de fato, os embriões de *I. vera* toleram bem os primeiros 15 a 30 dias de armazenamento quando em temperaturas próximas a 5-10°C (Bilia et al. 1999, Barbedo & Cicero 2000, Andréo et al. 2006, Faria 2006). Portanto, o elevado consumo de O₂ provavelmente não está relacionado a reações oxidativas causadoras de deterioração dos embriões de *I. vera*. Os valores de condutividade elétrica (figura 4), sempre baixos para temperaturas positivas de incubação, corroboram essa hipótese.

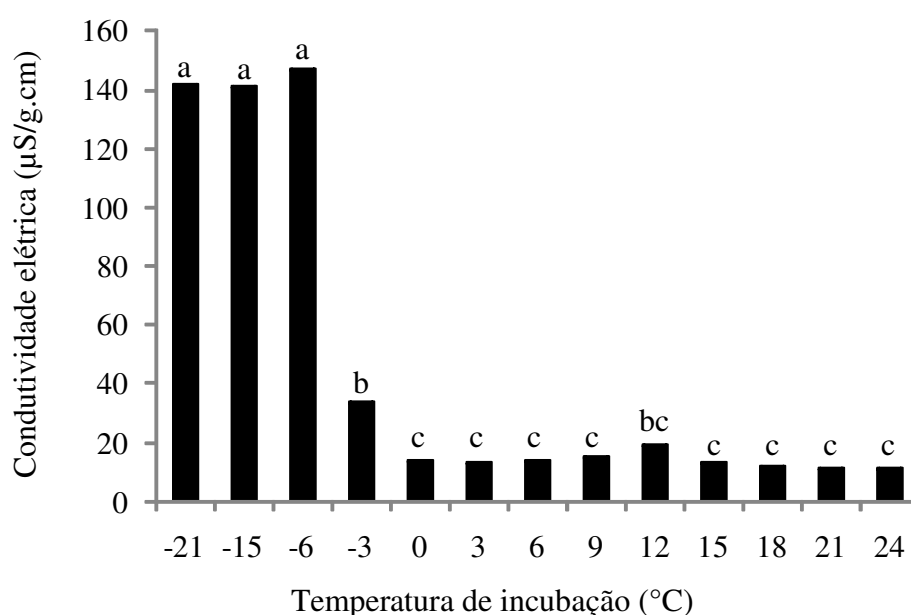


Figura 4. Condutividade elétrica de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* (média dos estádios III e IV) após 15 dias de incubação em diferentes temperaturas. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A condutividade elétrica aumentou consideravelmente (cerca de 7 vezes) quando os embriões foram incubados em temperaturas negativas, demonstrando que houve, provavelmente, congelamento da solução no interior das células com consequente

rompimento das membranas e liberação de solutos para o meio. A condutividade elétrica da solução de embebição avalia a integridade das membranas celulares (Marcos Filho 2005) e, no presente trabalho, seu aumento, com a redução da temperatura de incubação a níveis de congelamento, demonstra que houve danos promovidos a essas membranas, uma vez que os embriões foram incubados com potenciais hídricos superiores a -4 MPa (nível IV de hidratação, segundo Vertucci & Farrant 1995). Nesses níveis, a água torna-se congelável, tanto nas sementes intolerantes à dessecação quanto nas tolerantes, podendo ocasionar danos devido à formação de cristais de gelo nos tecidos e levando à perda da viabilidade (Fonseca & Freire 2003). A principal consequência da formação de cristais de gelo é a ruptura mecânica, tanto da estrutura citoplasmática quanto da membrana celular, pela expansão da água congelada, resultando na desagregação celular (Taiz & Zeiger 2004). Pode ocorrer, ainda, enorme tensão e estresse físico em células vegetais submetidas ao congelamento. Isso porque, durante a transição de fase do líquido extracelular, com a consequente formação de gelo, há dessecação dos tecidos vegetais pela migração da água do interior da célula para o meio extracelular (Guy 2003).

Os elevados valores de condutividade elétrica dos embriões incubados em temperaturas iguais ou inferiores a -6°C , ou seja, superiores a $140\ \mu\text{S.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (figura 4), corresponderiam a embriões com perda de viabilidade pelo armazenamento (Barbedo & Cicero 1998). De fato, pelos resultados do teste de germinação pode-se verificar que a manutenção da viabilidade dos embriões foi influenciada pela temperatura demonstrando a sensibilidade dos embriões, independente do estágio de maturação, incubados abaixo de -3°C (figura 3).

Pode-se notar que os embriões do estágio IV, incubados a -3°C , apresentaram maior capacidade de manutenção da viabilidade, inclusive com mais de 70% dos embriões mantendo a capacidade de desenvolver plântulas normais, enquanto que nos do estágio III

essa capacidade estava presente em menos de 30% dos embriões (figura 3B), reforçando que estes eram mais imaturos que aqueles. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Bonjovani & Barbedo (2008), indicando que embriões mais próximos à maturidade fisiológica apresentam maior tolerância a temperaturas de congelamento. Deve-se lembrar que a identificação da maturidade fisiológica em sementes recalcitrantes, diferentemente das ortodoxas, é bastante complexa e difícil, pois tratam-se de sementes sem uma parada característica de metabolismo entre a formação e a germinação (Barbedo & Marcos Filho 1998).

Taxas respiratórias de embriões com diferentes níveis de hidratação - os embriões dos estádios III e IV, inicialmente com 63,7% e 61,4% de água, respectivamente, atingiram $55\pm 2\%$, $45\pm 3\%$ e $35\pm 3\%$ após as secagens, para ambos os estádios de maturação e permaneceram com valores próximos a esses iniciais após os 15 dias de incubação nas diferentes temperaturas. A maior variação de teor de água, ao final da incubação, ocorreu para embriões secos até 35% e mantidos a 3°C, que atingiram 30% de água. Nos demais tratamentos, o teor de água permaneceu dentro da variação inicial para cada tratamento. O potencial hídrico, por sua vez, apresentou grandes variações dentro de cada nível de secagem, em função da temperatura de incubação mas, semelhantemente ao observado no experimento anterior, sem evidentes tendências (tabela 1).

Uma evidente e esperada tendência de mudança no potencial hídrico dos embriões ocorreu para mudanças no grau de hidratação. Assim, a água presente em embriões com 61-64% de água estava retida a potenciais entre -1,5 e -2,6 MPa e em embriões com 55% de água, retida a potenciais entre -2,1 e -3,9 MPa. Em ambos os casos, verifica-se que os embriões estavam no nível IV de hidratação (entre -1,5 e -4,0 MPa) sem, portanto, água livre, pois esta estaria presente somente no nível V ($< -1,5$ MPa) de hidratação (Vertucci & Farrant

1995). Quando a secagem reduziu o teor de água para valores próximos a 45%, o potencial hídrico dos embriões de ambos os estádios de maturação situou-se entre -2,6 e -6,5 MPa, caracterizando a mudança no nível de hidratação de IV para III (entre -4,0 e -11,0 MPa) nos embriões do estágio IV incubados a -3 °C e nos do estágio III incubados a 3 e -3 °C. Essa mudança é importante pois pode representar modificações no nível de danos celulares (por exemplo, com fusão de lipídios nas membranas), nos sítios de ligação da água (deixando a capilaridade e passando a uma ligação hidrofóbica) (Walters *et al.* 2002 e referências contidas), na atividade dos tecidos (cessando a síntese de proteínas e ácidos nucleicos e intensificando a respiração) e no estado físico da água (deixando de ser uma solução concentrada e passando a uma formação vítrea) (Vertucci & Farrant 1995).

Tabela 1. Potencial hídrico (-MPa) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de dois estádios de maturação (III e IV), submetidos a quatro níveis de secagem e incubados durante 15 dias em diferentes temperaturas.

Temperatura	Teor de água após secagem (%)							
(°C)	61-64%		55%		45%		35%	
Estádio III								
-3	1,5	aCa ¹	3,0	aCa	5,9	aBa	20,4	aAa
3	2,6	aCa	3,4	aCa	6,5	aBa	18,1	bAa
9	1,6	aCa	3,0	aBCa	3,7	bBa	8,2	cAa
15	1,7	aBa	2,8	aBa	2,9	bBa	8,5	cAa
21	1,8	aBa	3,8	aABa	2,9	bABa	4,4	dAa
Estádio IV								
-3	1,9	aCa	2,1	aCa	4,9	aBa	15,5	aAb
3	2,4	aBa	3,9	aBa	3,5	abBb	11,6	bAb
9	2,3	aBa	2,6	aBa	2,6	bBa	5,9	cAb
15	1,9	aBa	3,2	aABa	2,7	abABa	4,6	cdAb
21	2,2	aAa	2,6	aAa	2,6	aAa	2,7	dAb

¹Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas para comparação entre temperaturas, maiúsculas entre teores de água e itálicas entre estádios de maturação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Quando os embriões atingiram 35% de água, o potencial hídrico apresentou as maiores oscilações, variando de -2,7 MPa (embriões do estágio IV incubados a 21 °C) a -20,4 MPa (estádio III, a -3 °C), abrangendo níveis de hidratação IV (entre -1,5 e -4,0 MPa), III (entre -4,0 e -11,0 MPa) e II (entre -11,0 e -150,0 MPa). A mudança no nível de hidratação de III para II, nas temperaturas de 3 e -3 °C, para ambos os estádios de maturação dos embriões, é muito importante por dois motivos principais: primeiro, porque caracteriza a saída completa de água congelável e segundo, porque sugere um efeito semelhante à secagem, talvez com mobilização de água do meio interno celular para o externo. As taxas respiratórias dos embriões submetidos a diferentes níveis de desidratação apresentaram oscilações dependentes da temperatura de incubação e do estágio de maturação e do teor de água final dos embriões (figura 5). Para os embriões mais maduros (estádio IV) com 45% a 61-64% de água, incubados em temperaturas positivas, por exemplo, a liberação de CO₂ foi tanto maior quanto menor o teor de água (figura 5D). Já para os imaturos, nessas mesmas condições, não se verificou tendências evidentes (figura 5C).

De uma maneira geral, a relação entre produção de CO₂ e temperatura de incubação dos embriões dos dois estádios de maturação foi semelhante à observada no experimento anterior, ou seja, diminuição daquela com a redução desta. A redução do teor de água dos embriões não modificou este comportamento e, mesmo no menor nível de hidratação (35%) e na menor temperatura (-3°C) os embriões mantiveram-se metabolicamente ativos. Isso poderia explicar a dificuldade na manutenção da viabilidade de sementes de *Inga vera* mesmo quando armazenados hidratados e sob baixas temperaturas. Nessas condições, embora sem danos por secagem e em temperaturas muito abaixo da ótima para a germinação, o metabolismo das sementes conduziria a uma condição de estresse hídrico, pois a continuidade desse metabolismo, simulando uma condição de germinação muito lenta, culminaria com a falta de suficiente água livre para os processos de divisão e expansão celular, conforme

previsto por Pammenter et al. (1994).

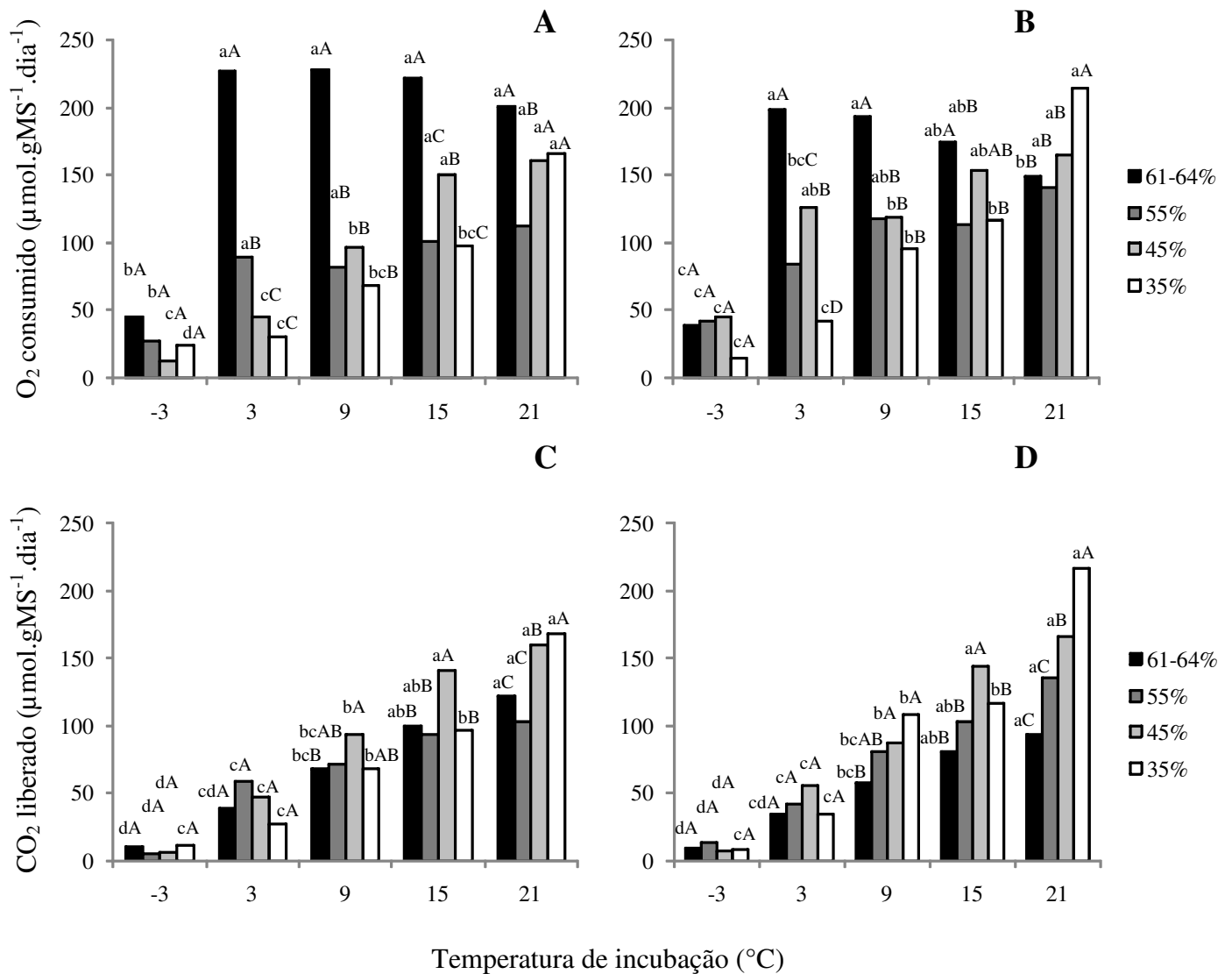


Figura 5. Consumo de O_2 (A e B) e liberação de CO_2 (C e D) por embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de dois estádios de maturação (A e C: estágio III; B e D: estágio IV), submetidos a quatro níveis de secagem (61-64%, 55%, 45% e 35% de água) e incubados durante 15 dias em diferentes temperaturas. Valores seguidos pela mesma letra (minúsculas para comparações entre temperaturas, maiúsculas entre teores de água) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Em relação ao consumo de O_2 , a secagem dos embriões modificou o padrão observado no experimento anterior, ou seja, o comportamento aproximou-se mais do observado para

liberação de CO₂, diminuindo tal consumo à medida que a temperatura foi reduzida (figura 5 A e B). Exceto para embriões do estágio IV, incubados a 21°C e os de ambos os estádios, incubados a -3°C, a redução do teor de água de 61-64% para 55% reduziu de forma expressiva o consumo de O₂. Maiores reduções no teor de água resultaram em resposta variáveis, dependentes do teor de água, do estágio de maturação e da temperatura de incubação. Curiosamente, a redução do teor de água para valores próximos a 55% foi a única que ainda permitiu a manutenção da viabilidade e da capacidade de produção de plântulas normais dos embriões (figura 6). Maiores remoções de água decorreram em perda praticamente completa da capacidade germinativa dos embriões em qualquer temperatura de incubação.

A redução do teor de água para 55% aparentemente também modificou a sensibilidade dos embriões a baixas temperaturas, uma vez que abaixo de 15°C, para ambos os estádios de maturação, houve redução tanto da germinabilidade (figura 6, A e B) quanto da produção de plântulas normais (figura 6, C e D). Pequenas diferenças nos valores de germinação e de produção de plântulas normais, principalmente nas temperaturas de 9 e 3°C, sugerem que os embriões do estágio IV eram mais tolerantes tanto à secagem quanto às baixas temperaturas do que os do estágio III, confirmando conclusões de Bonjovani & Barbedo (2008). Segundo estes autores, apenas embriões maduros de *Inga vera* poderiam suportar temperaturas negativas de armazenamento. Contudo, diferentemente do reportado por esse autores, uma pequena redução no teor inicial de água não apenas foi desnecessária para o armazenamento em temperaturas sub-zero como, ainda, chegou a ser prejudicial, conforme demonstrado na figura 6. Portanto, a relação entre a sensibilidade às baixas temperaturas, o teor de água e o grau de maturidade dos embriões parece ser complexa e bastante delicada, ou seja, pequenas alterações no estágio de maturação e no teor de água parecem resultar em grandes modificações na sensibilidade dos embriões às baixas temperaturas. Além disso, as alterações

nos valores de germinabilidade e de produção de plântulas normais foram acompanhados de similares modificações nos valores de condutividade elétrica (tabela 2). Portanto, a perda da viabilidade dos embriões decorrentes da relação entre estágio de maturação, teor de água e temperatura do ambiente parece estar relacionada com alterações nas membranas, que evidentemente perdem a capacidade de controle da entrada e saída de solutos.

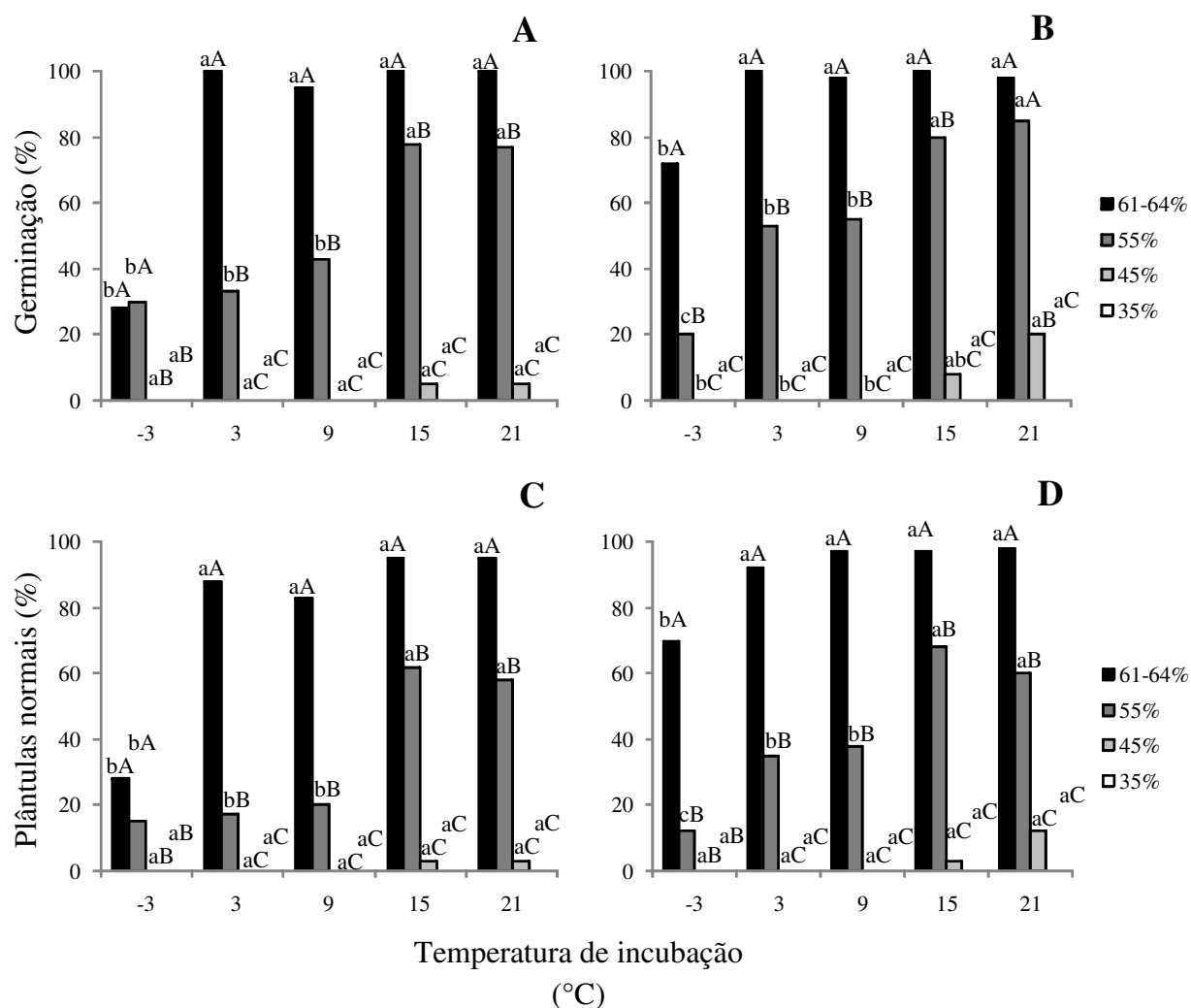


Figura 6. Germinação (A e B) e desenvolvimento de plântulas normais (C e D) por embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de dois estádios de maturação (A e C: estágio III; B e D: estágio IV), submetidos a quatro níveis de secagem (61-64%, 55%, 45% e 35% de água) e incubados durante 15 dias em diferentes temperaturas. Valores seguidos pela mesma letra (minúsculas para comparações entre temperaturas, maiúsculas entre teores de água) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 2. Condutividade elétrica ($\mu\text{S.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de dois estádios de maturação (III e IV), submetidos a quatro níveis de secagem e incubados durante 15 dias em diferentes temperaturas.

Temperatura	Teor de água após secagem (%)							
(°C)	61-64%		55%		45%		35%	
Estádio III								
-3	40,5	aCa ¹	72,9	aBCb	87,3	dBb	217,3	bAa
3	12,8	aDa	67,2	aCa	115,5	cdBa	236,5	abAa
9	15,1	aDa	63,7	aCa	191,0	aBa	276,6	aAa
15	15,6	aCa	42,6	aCa	166,5	abBa	256,7	abAa
21	11,8	aCa	31,4	aCa	130,1	bcBa	236,8	abAa
Estádio IV								
-3	26,8	aBa	104,5	aAa	138,9	aAa	142,5	cAb
3	13,8	aCa	71,1	abBa	107,5	aABa	139,6	cAb
9	15,0	aDa	59,8	bcCa	130,3	aBb	194,7	bAb
15	11,4	aCa	23,3	cCa	120,6	aBb	245,4	aAa
21	10,6	aBa	23,8	cBa	49,7	bcBb	176,7	bcAb

¹Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas para comparação entre temperaturas, maiúsculas entre teores de água e itálicas entre estádios de maturação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Taxas respiratórias de embriões após aplicação de ABA e PEG - A incubação dos embriões em soluções de PEG e de ABA pouco alterou os valores de teor de água e de potencial hídrico. Diferentemente do esperado, ou seja, que houvesse migração de água dos embriões para as soluções, os embriões de ambos os estádios de maturação permaneceram com o mesmo potencial hídrico ou até mesmo tiveram aumentos nesses valores, permanecendo esta condição mesmo após a incubação dos embriões nas diferentes temperaturas (tabela 3). Contudo, mesmo não apresentando alterações no teor de água ou no potencial hídrico, os efeitos desses tratamentos puderam se sentidos nas taxas de trocas gasosas e nos valores de germinação.

Tabela 3. Potencial hídrico (-MPa) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de dois estádios de maturação (III e IV), submetidos a pré-tratamentos com solução de ABA (10^{-4} M) ou de PEG (-2,5 MPa) e incubados durante 15 dias em diferentes temperaturas.

Temperatura	Pré-tratamentos		
(°C)	Controle	ABA	PEG
-3	1,7 bA ¹	1,8 abA	2,1 bA
3	2,5 aAB	2,1 aB	2,6 aA
9	1,9 bA	1,4 bcB	1,5 cAB
15	1,8 bA	1,5 abcA	1,9 bcA
21	2,0 abA	1,2 cB	1,7 bcAB
Maturação			
Estádio III	1,8 bB	1,6 aB	2,1 aA
Estádio IV	2,1 aA	1,6 aB	1,8 bB

¹Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas para comparação nas colunas, maiúsculas nas linhas)

não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

O estresse hídrico promovido pela solução de PEG foi suave, porém existente, pois praticamente não alterou o consumo de O₂, alterou muito pouco a liberação de CO₂, aumentando-a nas temperaturas mais elevadas (figura 7), mas resultou em reduções nas porcentagens de germinação após incubação dos embriões em temperaturas mais baixas (figura 8, A e B). Os principais efeitos desse estresse, contudo, foram verificados na produção de plântulas normais dos embriões incubados em temperaturas baixas, que apresentaram expressivas reduções (figura 8, C e D).

O tratamento com ABA, por sua vez, alterou substancialmente o comportamento respiratório dos embriões. Os principais efeitos desse tratamento parecem ter ocorrido nos embriões incubados nas temperaturas mais elevadas. Os embriões não tratados (controle), conforme descrito anteriormente, apresentaram grandes diferenças entre as taxas de consumo de O₂ e de liberação de CO₂, com valores de QR inferiores a 0,5, indicando a existência de processos oxidativos outros que não propriamente a respiração.

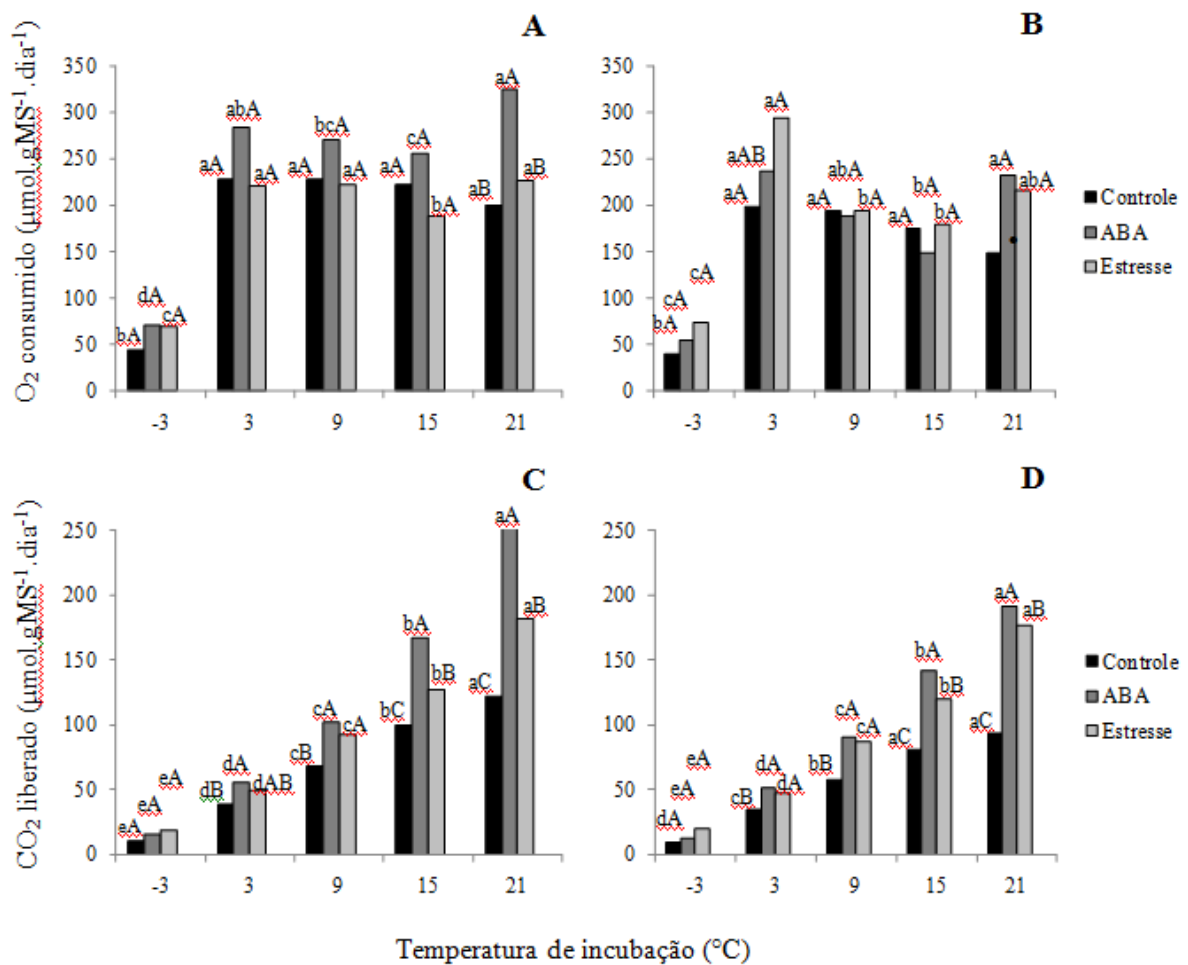


Figura 7. Consumo de O₂ (A e B) e liberação de CO₂ (C e D) por embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de dois estádios de maturação (A e C: estágio III; B e D: estágio IV), submetidos a pré-tratamento com solução de ABA (10⁻⁴M) ou de PEG (-2,5 MPa, denominado estresse) e incubados durante 15 dias em diferentes temperaturas. Valores seguidos pela mesma letra (minúsculas para comparações entre temperaturas, maiúsculas entre pré-tratamentos) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Quando esses embriões foram previamente tratados com solução de ABA e incubados a 15 e 21°C, embora o consumo de O₂ tenha até se elevado um pouco, a liberação de CO₂ teve aumentos muito maiores (figura 7), aproximando os valores de O₂ e de CO₂ e resultando em valores de QR mais próximos dos esperados para respiração. Portanto, aparentemente a

aplicação de ABA levou os embriões a condições mais equilibradas do uso do O₂. Contudo, esse melhor equilíbrio não se traduziu em melhor conservação dos embriões do estágio III, uma vez que o ABA causou grande inibição da germinação e do desenvolvimento de plântulas normais (figura 8, A e C).

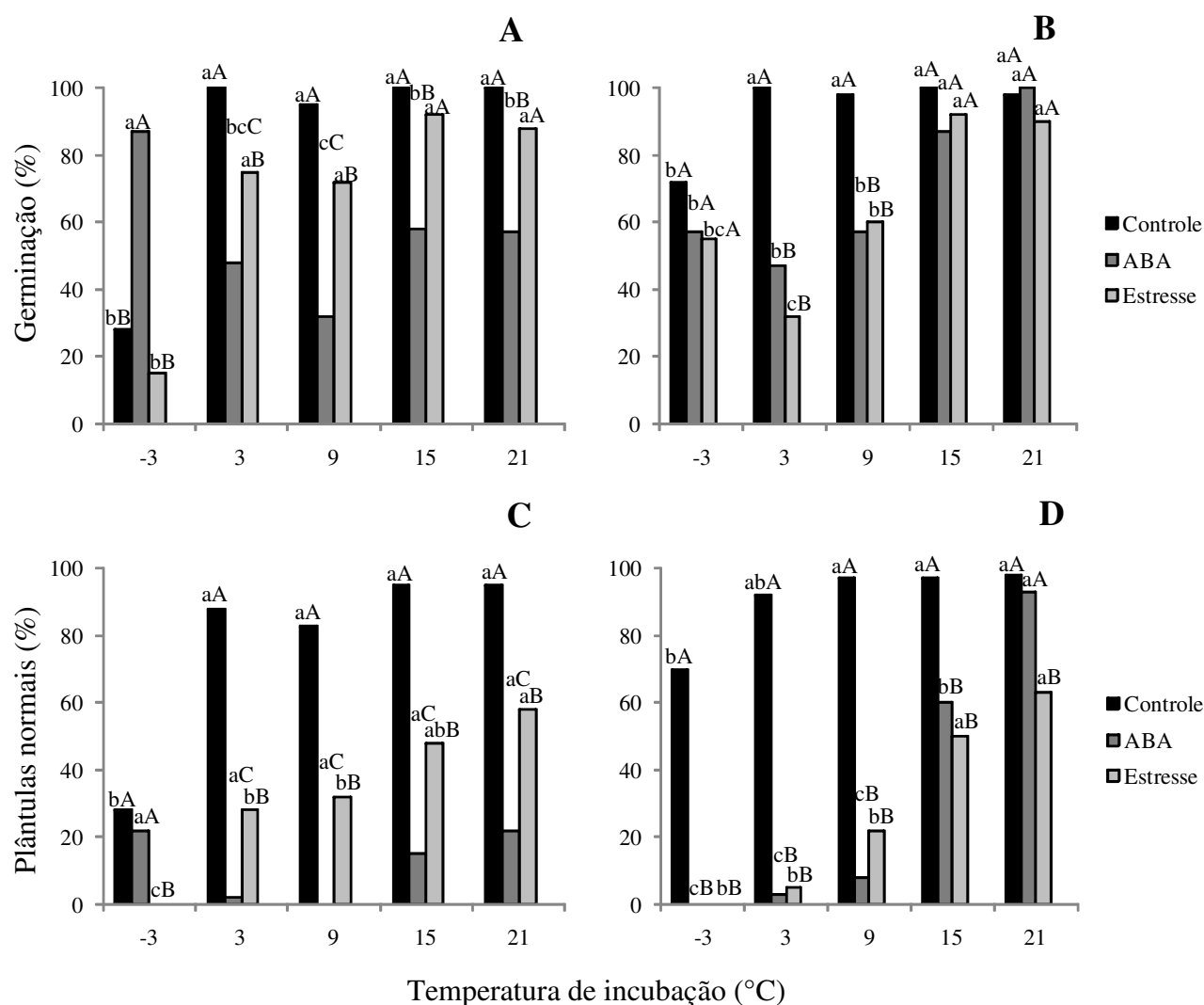


Figura 8. Germinação (A e B) e produção de plântulas normais (C e D) por embriões de *Inga vera ssp. affinis* de dois estádios de maturação (A e C: estágio III; B e D: estágio IV), submetidos a pré-tratamento com solução de ABA (10^{-4} M) ou de PEG (-2,5 MPa, denominado estresse) e incubados durante 15 dias em diferentes temperaturas. Valores seguidos pela mesma letra (minúsculas para comparações entre temperaturas, maiúsculas entre pré-tratamentos) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Em temperaturas mais baixas o ABA não alterou significativamente as taxas de consumo de O₂ e de liberação de CO₂ (figura 7), mas decorreu em forte inibição da germinação e do desenvolvimento de plântulas normais (figura 8). Os tratamentos de PEG e ABA não resultaram em perda da capacidade germinativa ou danos aos embriões uma vez que praticamente não alteraram a condutividade elétrica (tabela 4). Mesmo quando houve aumento da condutividade elétrica, principalmente após incubação dos embriões em temperaturas mais baixas, os valores permaneceram dentro da faixa considerada por Barbedo & Cicero (1998) como sendo correspondente a embriões viáveis e germináveis.

Tabela 4. Condutividade elétrica ($\mu\text{S} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de dois estádios de maturação (III e IV), submetidos a pré-tratamentos com solução de ABA (10^{-4}M) ou de PEG (-2,5 MPa) e incubados durante 15 dias em diferentes temperaturas.

Temperatura	Pré-tratamentos		
(°C)	Controle	ABA	PEG
Estádio III			
-3	40,5 aABa ¹	47,4 aAa	30,6 aBb
3	12,8 bBa	25,2 bABb	36,8 aAb
9	15,1 bAa	26,3 bAa	22,2 abAa
15	15,6 bAa	21,7 bAa	13,1 bAa
21	11,8 bAa	20,3 bAa	13,6 bAa
Estádio IV			
-3	26,8 aBb	47,4 aAa	52,3 bAa
3	13,8 aCa	45,0 aBa	86,9 aAa
9	15,0 aBa	27,1 bABa	31,5 cAa
15	11,4 aAa	12,1 bcAa	13,1 dAa
21	10,6 aAa	10,2 cAa	19,1 cdAa

¹Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas para comparação entre temperaturas, maiúsculas entre pré-tratamentos e itálicas entre estádios de maturação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Pelos resultados obtidos no presente trabalho verifica-se que os processos envolvidos na perda da viabilidade das sementes de *Inga vera*, quando armazenadas úmidas e em baixas temperaturas, são complexos. Essa deve ser a razão pela qual se verificam resultados conflitantes na literatura que, muitas vezes, empregam as mesmas técnicas de conservação mas não atingem os mesmos resultados. Nos experimentos deste trabalho ficou evidenciada a participação de reações oxidativas, incluindo-se a respiração, na perda da capacidade germinativa e da própria conservação dessas sementes. Ficou evidenciada, também, a influência do grau de maturidade das sementes, do seu nível de hidratação e da temperatura sobre essas reações oxidativas. Contudo, curiosamente as respostas obtidas para a perda da viabilidade e para as alterações nas taxas de consumo de O₂ por embriões de *I. vera* não correspondem às esperadas para tecidos vegetais, ou mesmo para essas sementes face aos resultados obtidos em outros trabalhos (Bilia et al. 1999, Barbedo & Cicero 2000, Bilia et al. 2003, Andréo et al. 2006, Faria 2006, Bonjovani & Barbedo 2008) e merecem estudos mais detalhados.

Algumas importantes conclusões, porém, podem ser tiradas dos resultados obtidos: 1) uma pequena redução no teor de água, por secagem direta ou pela utilização de soluções osmóticas, de sementes recém-colhidas pode melhorar a sua tolerância tanto à dessecação quanto às baixas temperaturas, mas depende do grau de maturidade dessas sementes. O aumento nessas tolerâncias, contudo, não necessariamente se reflete em melhora na capacidade de conservação da viabilidade durante o armazenamento; 2) a redução da temperatura de armazenamento, até níveis que não permitam o congelamento dos tecidos, é realmente eficiente na redução do metabolismo, diminuindo as taxas respiratórias das sementes e ampliando o seu potencial de armazenamento. Contudo, essa mesma redução da temperatura promove outros processos que não a respiração, ainda não identificadas; 3) tratamentos de estresse induzido têm potencial para reduzir esses processos mas podem,

simultaneamente, aumentar as taxas respiratórias e prejudicar a capacidade germinativa dessas sementes e, portanto, devem ser estudados mais detalhadamente.

Agradecimentos - Os autores agradecem à Fapesp (Proc. 2005/04139-7) e CNPq ((Processos: 481484/2007-8 e 477.640/2009) pelo apoio financeiro ao projeto; à Secretaria de Educação do Estado de São Paulo/Projeto Bolsa-Mestrado, pela bolsa concedida a M.R. Bonjovani; ao CNPq, pela bolsa de produtividade em pesquisa concedida a C.J. Barbedo; à CCR AutoBAN, pela permissão e apóio nas coletas de sementes.

Referências Bibliográficas

- ANDRÉO, Y., NAKAGAWA, J. & BARBEDO, C.J. 2006. Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Will. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington). Revista Brasileira de Botânica 29:309-318.
- BAILLY, C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Science Research 14:93–107.
- BARBEDO, C.J. & CICERO, S.M. 2000. Effects of initial quality, low temperature and ABA on the storage of seeds of *Inga uruguensis*, a tropical species with recalcitrant seeds. Seed Science and Technology 28:793-808.
- BARBEDO, C.J. & MARCOS FILHO, J. 1998. Tolerância à dessecação em sementes. Acta Botanica Brasilica 12:145-164.
- BARBEDO, C.J., CICERO, S.M. 1998. Utilização do teste de condutividade elétrica para previsão do potencial germinativo de sementes de ingá. Scientia Agricola. 55:249-259.
- BERJAK, P. & PAMMENTER, N.W. 2008. From Avicennia to Zizania: Seed Recalcitrance in Perspective. Annals of Botany 101:213-228.
- BILIA, D.A.C. & BARBEDO, C.J. 1997. Estudos de germinação e armazenamento de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. Científica 25:379-391.

- BILIA, D.A.C., BARBEDO, C.J., CICERO, S.M. & MARCOS FILHO, J. 2003. Ingá: uma espécie importante para recomposição vegetal em florestas ripárias, com sementes interessantes para a ciência. *Informativo ABRATES* 13:26-30.
- BILIA, D.A.C., MARCOS FILHO, J. & NOVENBRE A.D.C.L. 1999. Desiccation tolerance and seed storability of *Inga uruguensis* Hook. et Arn. *Seed Science and Technology* 27:77-89.
- BONJOVANI, M.R. 2007. Armazenamento de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington (Leguminosae) sob baixa temperatura. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, 89p.
- BONJOVANI, M.R. & BARBEDO, C.J. 2008. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. toleram temperatura sub-zero. *Revista Brasileira de Botânica*. 31:345-356.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2009. Regras para análise de sementes, Brasília, 395p.
- CAPRONI, E. 2007. Eletrólitos sólidos cerâmicos a base de oxido de zircônio para a detecção de oxigênio. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 74p.
- CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4.ed. Funep, Jaboticabal, 588p.
- CASTRO, R.D., BRADFORD, K.J. & HILHORST, H.W.M. 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. *In* Germinação: do básico ao aplicado (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre, p.51-67.

- DAHAL, P., KIM, N.S. & BRADFORD, K.J. 1996. Respiration and germination rates of tomato seeds at suboptimal temperatures and reduced water potentials. *Jornal of Experimental Botany* 47: 941-947.
- FARIA, J.M.R. 2006. Desiccation tolerance and sensitivity in *Medicago truncatula* and *Inga vera* seeds. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 143p.
- FELTRE, R. 1982. Química geral. 2.ed. Moderna, 364p.
- FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F (orgs.). 2004. Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre, 323p.
- FONSECA, S.C.L. & FREIRE, H.B. 2003. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. *Bragantia* 62:297-303.
- GUY, C.L. 2003. Freezing tolerance of plants: current understanding and selected emerging concepts. *Canadian Journal of Botany* 81:1216-1223.
- HENDRY, G.A.F. 1993. Oxygen, free radical processes and seed longevity. *Seed Science Research* 3:141-153.
- ISTA. 1985. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology*, 13:356-513.
- JOLY, A.B. 1993. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. 11. ed. Ed. Nacional, São Paulo, 778.
- KADER, A.A. & SALTVEIT, M.E. 2002. Respiration and gas exchange. In: J.A. Bartz, J.K. Brecht & J. Weichmann. *Postharvest physiology and pathology of vegetables*. Marcel Dekker, New York, pp.7-29

- LAMARCA, E.V. 2009. Taxas respiratórias e velocidade de deterioração de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. em função de variações hídricas e térmicas. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica de São Paulo, 98p.
- MARCOS FILHO, J. 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Fealq, Piracicaba, 495p.
- MARENCO, R.A. & LOPES, N.F. 2007. Fisiologia vegetal fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral, Editora Universidade Federal de Viçosa, 469p.
- MCDONALD, M. 1999. Seed quality assessment. Seed Science Research 8:265-275.
- MELLO, J.I.O., BARBEDO, C.J., SALATINO, A., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 2010. Reserve carbohydrates and lipids from the seeds of four tropical tree species with different sensitivity to desiccation. Brazilian Archives of Biology and Technology, 53:889-899.
- MICHEL, B.E. & KAUFMANN, M.R. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. Plant Physiology 51:914-916.
- PAGNOTTA, S.E. & BRUNI, F. 2006. The glassy state of water: a 'stop and go' device for biological processes. In: Pollack, G.H., Cameron, I.L., Wheatley, D.N. Water and the cell. Springer, Dordrecht. p. 93-112.
- PAMMENTER, N.W. & BERJAK, P. 2000. Aspects recalcitrant seed physiology. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 12:56-69.
- PAMMENTER, N.W., BERJAK, P., FARRANT, J.M., SMITH, M.T. & ROSS, G. 1994. Why do stored hydrated recalcitrant seeds die? Seed Science Research. 4:187-191.
- POLLACK, G.H., CAMERON, I.L., WHEATLEY, D.N. 2006. Water and the cell. Springer, Dordrecht, 354p.

- ROACH, T., BECKETT, R.P., MINIBAYEVA, F.V., COLVILLE, L. & WHITAKER, C. 2010. Extracellular superoxide production, viability and redox poise in response to desiccation in recalcitrant *Castanea sativa* seeds. *Plant, Cell and Environment*. 33:59–75.
- SANTANA, D.G. & RANAL, M. 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. Ed. Universidade de Brasília, Brasília, 248p.
- STEIL, M.C., FONSECA, F.C., FRANÇA, Y.V., REY, J.F.Q., MUCCILLO, E.N.S. & MUCCILLO, R. 2002. Montagem, calibração e testes de um sistema de medidas elétricas em função da temperatura e da pressão parcial de oxigênio. *Cerâmica* 48:146-152.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. Fisiologia vegetal. 3.ed. Artmed, Porto Alegre, 719p.
- VERTUCCI, C.W. & FARRANT, J.M. 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. *In* Seed development and germination (J. Kigel & G. Galili, eds.). Marcel Dekker Inc., New York, p.237-271.
- WALTERS, C. 2000. Levels of recalcitrance in seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia* 12(especial): 7-21.
- WALTERS, C., FARRANT, J.M., PAMMENTER, N.W. & BERJAK, P. 2002. Desiccation Stress and Damage. *In* Desiccation and survival in plants: drying without dying (M. Black & H.W. Pritchard, eds.). CABI Publishing, New York, p.149-184.
- WALTERS, C., RAO, N.K. & HU, X. 1998. Optimizing seed water content to improve longevity in *ex situ* genebanks. *Seed Science Research*, 8:15-22.

4. Capítulo II

INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE ABA E ESTRESSE HÍDRICO NA RESPIRAÇÃO DE EMBRIÕES DE *INGA VERA* SSP. *AFFINIS* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE

Marcio Roberto Bonjovani¹, Claudio José Barbedo²

¹Doutorando do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Instituto de
Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

²Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Sementes, São Paulo, SP.

INFLUENCE OF APPLICATION OF ABA AND WATER STRESS IN THE BREATH OF EMBRYOS *INGA VERA* SSP. *AFFINIS* UNDER DIFFERENT CONDITIONS OF STRESS

Abstract: The high metabolism of recalcitrant seeds of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington is one of the main factors that hinder the conservation of physiological viability of those seeds. The main technique for preservation of seeds during storage is to reduce its metabolism by removing the water. However, recalcitrant seeds are desiccation intolerant. The storage capacity is increased for many species, where the reduction in water content in seeds is associated with decrease in temperature. However, there are species that do not tolerate temperature decrease to levels of freezing. Due to lack of information on the respiratory metabolism of these seeds in different conditions of stress this study aim to determine respiration rates of embryos with different levels of hydration and at different temperatures after application of abscisic acid and osmotic stress. The results allowed to observe the presence of oxidative reactions than those of breath due to high consumption of O₂, and that changes in moisture levels and incubation temperature as well as the application of abscisic acid and osmotic stress promoted changes in oxidative metabolism. However there is still need for further work to identify the source of oxidation.

Key words - ABA, osmotic stress, respiratory metabolism, recalcitrant seeds.

INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE ABA E ESTRESSE HÍDRICO NA RESPIRAÇÃO DE EMBRIÕES DE *INGA VERA* SSP. *AFFINIS* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE

Resumo: O elevado metabolismo das sementes recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington, é um dos principais fatores que dificultam conservar a viabilidade fisiológica dessas sementes. A principal técnica de conservação de sementes durante o armazenamento é a redução do seu metabolismo por meio da remoção da água. Porém as sementes recalcitrantes são intolerantes a dessecação. A capacidade de armazenamento é ampliada para muitas espécies, quando a redução do teor de água das sementes está associada à diminuição de temperatura do ambiente. Contudo, há espécies que não toleram grande redução da temperatura principalmente o congelamento. Devido à falta de informações sobre o metabolismo respiratório dessas sementes em diferentes condições de estresse o presente trabalho teve como objetivo verificar as taxas respiratórias desses embriões com diferentes níveis de hidratação e em diferentes temperaturas após aplicação de ácido abscísico e estresse osmótico. Os resultados possibilitaram observar a presença de reações oxidativas que não as da respiração, devido ao consumo elevado de O₂, e que as alterações nos níveis de hidratação e temperatura de incubação assim como a aplicação de ácido abscísico e estresse osmótico promoveram alterações nesse metabolismo oxidativo. Contudo ainda há necessidade de novos trabalhos para identificar a origem dessa oxidação.

Palavras-chave – ABA, estresse osmótico, metabolismo respiratório, sementes recalcitrantes.

Introdução

Durante o desenvolvimento da maioria das sementes recalcitrantes não há declínio no conteúdo de água e consequentemente apresentam atividade metabólica intensa de modo que passam quase que diretamente da fase de desenvolvimento para a de germinação sem exibir período evidente de latência (Barbedo & Marcos Filho 1998, Castro *et al.* 2004, Pammenter & Berjak 2000), verificando-se, inclusive, viviparidade (germinação das sementes dentro do próprio fruto) em algumas delas (Oliveira & Beltrati 1992, Pritchard *et al.* 1995, Bilia & Barbedo 1997). Como as alterações metabólicas associadas à germinação continuam durante o armazenamento, as sementes tornam-se cada vez mais sensíveis a dessecação; mesmo quando armazenadas em ambiente úmido, perdem rapidamente a viabilidade, havendo necessidade de absorção de quantidade adicional de água para completar o processo de germinação (Marcos Filho 2005). Segundo Pammenter *et al.* (1994) a perda da viabilidade das sementes recalcitrantes é consequência dos danos ligados ao metabolismo germinativo, que simulando uma condição de germinação muito lenta, culminaria com a falta de água livre suficiente para os processos de divisão e expansão celular.

A manutenção dessa intensa atividade requer, provavelmente, elevadas taxas respiratórias e grande consumo de reservas. Durante o período no qual as sementes mantêm intensa atividade, mas não completam a germinação, o metabolismo pode ser desordenado, com consumo de reservas e liberação de radicais livres, ambas as atividades prejudicando a conservação da viabilidade das sementes durante o armazenamento e, conseqüentemente, favorecendo sua rápida deterioração (Barbedo & Marcos Filho 1998, Ferreira & Borghetti 2004, Andréo *et al.* 2006).

A principal técnica de conservação de sementes durante o armazenamento é a redução do seu metabolismo por meio da remoção da água. Porém, sementes de várias espécies nativas apresentam um limite letal de umidade, abaixo do qual há perda total de viabilidade, apresentando grande dificuldade em sua conservação (Kohama *et al.* 2006). Portanto, métodos alternativos para o armazenamento dessas sementes devem obrigatoriamente considerar a redução do metabolismo (Andréo *et al.* 2006). Uma opção promissora para o controle do metabolismo é a regulação da mobilização da água na semente. Embriões de *Inga vera* mantidos em substratos com soluções de PEG a -2,4 MPa a 10°C apresentaram germinação superior a 80% aos 90 dias, enquanto os armazenados em substrato umedecido com água pura (0 MPa), na mesma temperatura, apresentaram germinação inferior a 60% (Andréo *et al.* 2006).

O ácido abscísico atua como repressor natural que mantém o estado embriogênico do embrião em desenvolvimento, ele bloqueia a reversão do metabolismo para a germinação, ou seja, inibe a germinação durante a maturação, (Taiz & Zeiger 2004, Marcos Filho 2005, Berjak & Pammenter 2008). Estudos realizados por Barbedo & Cicero (2000) mostraram que sementes de qualidade elevada de *Inga uruguensis*, quando armazenadas hidratadas e embebidas em solução de ácido abscísico 10^{-4} M em câmara fria, podem apresentar germinação superior a 80% após 40 dias.

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

A tolerância à dessecação vem sendo estudada, mas, até o presente momento, as pesquisas não apontam para o sucesso na utilização da secagem como forma de armazenar sementes recalcitrantes por períodos prolongados (Barbedo & Marcos Filho 1998). Bilia *et al.* (1998), estudando os limites de tolerância à dessecação das sementes de *Inga uruguensis*, conseguiram armazenar as sementes em sacos de polietileno a 10°C por até 60 dias após a colheita, mantendo a qualidade fisiológica, desde que seja reduzido o teor de água até níveis de 50%. Porém segundo Roach *et al.* (2010), a dessecação perturba o metabolismo de sementes recalcitrantes gerando a formação de espécies reativas de oxigênio.

Diante do exposto, considerando-se a ausência de informações sobre o metabolismo respiratório de sementes recalcitrantes, o presente trabalho teve por objetivo analisar a taxa respiratória dos embriões de *Inga vera* em diferentes estádios de maturação, com diferentes graus de hidratação e os efeitos da aplicação de ácido abscísico e de estresse osmótico nessas taxas respiratórias sob diferentes temperaturas.

Material e Métodos

Coleta dos frutos e extração das sementes - Os frutos de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington, foram coletados no meses de janeiro e dezembro de 2010 e janeiro de 2011 a partir de 10 matrizes plantadas na Rodovia dos Bandeirantes, Jundiaí, SP (23°04,914' S, 47°01,436' W). Após a coleta os frutos foram levados ao Laboratório de Sementes, do Instituto de Botânica, em São Paulo, SP (23°37' S, 46°32' W), onde foram abertos

manualmente. As sementes foram removidas manualmente, agrupadas em dois estádios de maturação (Estádios III e IV, segundo Bonjovani & Barbedo 2008), na primeira coleta e em três estádios (segundo Bonjovani & Barbedo 2008), na segunda e, em seguida, tiveram sua sarcotesta removida, obtendo-se os embriões excisados utilizados nos experimentos. O material foi armazenado em sacos plásticos, em câmara tipo BOD ajustada para temperatura constante de 6°C, sem luz, por até sete dias, período este necessário para que todo o lote coletado fosse beneficiado.

Determinações físicas e fisiológicas - Os embriões foram caracterizados, inicialmente, quanto ao teor de água, conteúdo de massa seca, potencial hídrico, condutividade elétrica da solução de embebição, germinação e capacidade de produção de plântulas normais. O teor de água e o conteúdo de massa seca foram determinados gravimetricamente, pelo método de estufa a 103°C por 17 horas (Ista 1985), com três repetições de 10 embriões, sendo os resultados apresentados em porcentagem, em base úmida, para teor de água e em mg.semente⁻¹, para massa seca (Brasil 2009).

O potencial hídrico foi medido por meio de potenciômetro WP4 (Decagon Devices, Inc., Pullman, EUA), basendo-se na temperatura do ponto de orvalho do ar em equilíbrio com a amostra examinada, com três repetições de três embriões. Para aferição do potencial hídrico real dos embriões e do potencial registrado pelo potenciômetro, amostras forma incubadas em soluções de polietileno glicol 6000 com diferentes potenciais osmóticos, segundo Michel & Kaufmamm (1973), até peso constante, sendo então avaliadas no potenciômetro.

A condutividade elétrica foi determinada por meio de condutivímetro digital de bancada MA150 (Marconi, Piracicaba, Brasil), com três repetições de 10 embriões. Para tanto, amostras de sementes foram acondicionadas em copos plásticos descartáveis de 300 mL, contendo 75 mL de água deionizada, incubados por 24 horas em câmara tipo BOD ajustada para temperatura constante de 20°C, sem luz (Barbedo & Cicero 1998).

O teste de germinação e de produção de plântulas normais foi conduzido em rolo de papel para germinação, com duas folhas para a base e outra para cobertura, pré-umedecidas na proporção de duas vezes e meia o peso do papel (Brasil 2009), com três repetições de 20 embriões, colocados em germinadores Marconi tipo MA400 (Marconi, Piracicaba, Brasil), com circulação interna de água, regulados para a temperatura constante de 25 °C e luz constante (Bilia & Barbedo 1997). As avaliações foram realizadas a cada dois dias, durante 14 dias, sendo registrados os embriões germinados (protrusão de raiz primária com, no mínimo, 1 cm) e os que mantiveram a capacidade de produzir as plântulas normais (plântulas com sistema radicular e eofilos desenvolvidos e sem defeitos aparentes). Como a espécie produz

sementes poliembriônicas, os embriões contidos em cada semente foram mantidos juntos em todas as avaliações. Mesmo quando houve protrusão de mais de uma raiz primária ou surgimento de mais de uma plântula por embrião, apenas uma raiz e/ou plântula por embrião foram registradas (Bilia & Barbedo 1997).

Incubação de embriões e avaliação de taxas respiratórias - As taxas respiratórias e a presença de outras reações oxidativas foram estimadas pela avaliação do consumo de oxigênio (O_2) e da produção de dióxido de carbono (CO_2) de embriões incubados em frascos herméticos, segundo metodologia descrita por Lamarca (2009). Para tanto, amostras do ar dos frascos foram tomadas e analisadas em analisador Modelo 6600 (Illinois Instruments, Inc., Johnsbury, EUA). A análise de O_2 foi baseada em sensor potenciométrico, com eletrólito sólido cerâmico na forma de tubo à base de óxido de zircônio (ZrO_2), onde interna e externamente são depositados dois eletrodos. O zircônio possui a habilidade de conduzir íons de oxigênio em temperaturas superiores a $650^\circ C$. A medida é dada mediante a diferença de potencial da pressão parcial do oxigênio entre os dois eletrodos (Steil *et al.* 2002, Caproni 2007). A análise de CO_2 foi realizada em sensor de infravermelho, baseando-se na absorção, pelo CO_2 , de radiação no espectro do vermelho. Os valores foram registrados em porcentagem, em volume, do gás analisado (O_2 ou CO_2) na amostra em relação ao volume total de ar.

Os embriões, necessários para realizar teor de água, conteúdo de massa seca, potencial hídrico, condutividade elétrica da solução de embebição, germinação e capacidade de produção de plântulas normais, após as avaliações da respiração, foram acondicionados em embalagens de vidro de 600ml, hermeticamente fechados, com tampas perfuradas, formando orifícios que foram recobertos por um septo de borracha; por este septo foi inserido o eletrodo do equipamento por onde foi tomada a amostra do ar da embalagem. Antes da introdução dos embriões nas embalagens, foram determinadas as massas frescas e o volume desses embriões. O volume total do ar das embalagens foi determinado segundo o princípio da hidrostática para que se calculasse o volume resultante do ar depois de descontado o volume ocupado pelos embriões.

O fechamento das embalagens e o acondicionamento dos vidros em BODs, em temperaturas pré determinadas, foi determinado como sendo o início do experimento, o tempo zero correspondendo à atmosfera normal (21% de oxigênio e 0,03% de dióxido de carbono). O consumo de O_2 e a produção de CO_2 pelos embriões embalados foram estimados pela diferença entre os valores medidos e os da atmosfera normal. Após cada medida, as embalagens foram abertas por alguns minutos para re-equilíbrio com a atmosfera normal,

sendo, em seguida, novamente fechadas para a continuidade do experimento. Considerando-se a pressão atmosférica local como 0,90 atm (A. B. Pereira, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2007, comunicação pessoal), os valores obtidos em porcentagem de O₂ ou de CO₂ foram convertidos para pressão parcial do gás, segundo a fórmula $p_1/P = v_1\%/V\%$ (Feltre 1985), sendo:

p_1 = pressão parcial do gás (em atm);

P = pressão atmosférica local (0,90 atm);

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

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

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

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

n = número de moles do gás

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

T = temperatura (em Kelvin)

Baseando-se em experimentos prévios da média de consumo diário de O₂ (e de liberação de CO₂) pelos embriões de *Inga vera* (dados não publicados), as avaliações foram realizadas no intervalo de um dia para embriões incubados em temperaturas acima de 0°C e a cada cinco dias para embriões incubados em temperaturas abaixo de 0°C. Os valores obtidos nas avaliações foram somados e divididos pela massa seca total da amostra de embriões e pelo número de dias em que os embriões permaneceram nas embalagens, obtendo-se o valor expresso em micromol por grama de massa seca por dia ($\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$). Foi calculado, também, o quociente respiratório (QR), dividindo-se o valor obtido para produção de CO₂ pelo obtido para consumo de O₂ ($\text{QR} = \text{CO}_2.\text{O}_2^{-1}$), ambos em $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{d}^{-1}$, segundo descrito por Kader & Saltveit (2002).

Taxas respiratórias de embriões em diferentes níveis de hidratação após aplicação de ácido abscísico e estresse osmótico - embriões foram submetidos a dois tratamentos de estresse, um por regulador vegetal e outro por solução osmótica. Para esta última, baseando-se em resultados de Bonjovani (2007), uma solução de polietileno glicol 6000 (PEG) com potencial osmótico de -2,5 MPa, ligeiramente mais negativo que o potencial hídrico dos embriões, foi preparada calculando-se a quantidade de PEG segundo fórmula descrita por Michel &

Kaufmann (1973). Para o efeito de estresse por regulador vegetal (ácido abscísico - ABA), preparou-se solução de 10^{-4} M, baseando-se em resultados de Barbedo & Cicero (2000). Os embriões foram incubados em ambas as soluções utilizando-se bandejas plásticas (36,5 x 26 x 7 cm) com tampa, opacas, com duas folhas de papel de germinação no fundo. Os embriões, cobertos por uma terceira folha de papel de germinação, permaneceram submersos nas soluções de PEG e sobre uma lâmina de solução de ABA (Bonjovani 2007) por 24 horas, em câmaras tipo BOD, com temperatura constante regulada para $6 \pm 1^\circ\text{C}$. Ao final da incubação, os embriões foram lavados em água corrente, tiveram o excesso superficial de água removido em papel filtro e, em seguida, foram acondicionados nas embalagens de vidro, como descrito acima e incubados a -2, 2, 5, 10 e 15°C , para avaliações das taxas respiratórias. Ao final da aplicação de ABA, do estresse osmótico e da incubação para as avaliações das taxas respiratórias, os embriões foram novamente avaliados física e fisiologicamente, conforme descrito anteriormente.

Após a aplicação de ABA e PEG os embriões foram submetidos a três níveis de hidratação. Os embriões obtidos, separados por estágio de maturação, com e sem a aplicação de ABA e PEG, após retirada amostra controle (sem secagem), foram submetidos a dois níveis de secagem, em estufa a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ com circulação de ar forçada (Bilia *et al.* 1998), denominadas 1ª e 2ª secagem, procurando-se levar os embriões aos teores de água, respectivamente, a 55% e 45% (base úmida) o que demandou período inferior a 48 horas. Para tanto, amostras de embriões foram retiradas periodicamente e avaliadas quanto a sua massa, até que atingissem valores próximos aos desejados, utilizando a equação descrita por Hong & Ellis (1996). Ao final de cada nível de secagem e da incubação para as avaliações das taxas respiratórias, os embriões foram novamente avaliados quanto às suas qualidades físicas e fisiológicas, conforme descrito anteriormente.

Taxas respiratórias de embriões em dois níveis de hidratação após aplicação de ácido abscísico e estresse osmótico por 24 e 48 horas – embriões foram submetidos a dois tratamentos de estresse, um por regulador vegetal e outro por solução osmótica. Para esta última, baseando-se em resultados de Bonjovani (2007), uma solução de polietileno glicol 6000 (PEG) com potencial osmótico de -2,5 MPa, ligeiramente mais negativo que o potencial hídrico dos embriões, foi preparada calculando-se a quantidade de PEG segundo fórmula descrita por Michel & Kaufmann (1973). Para o efeito de estresse por regulador vegetal (ácido abscísico - ABA), preparou-se solução de 10^{-4} M, baseando-se em resultados de

Barbedo & Cicero (2000). Os embriões foram incubados em ambas as soluções utilizando-se bandejas plásticas (36,5 x 26 x 7 cm) com tampa, opacas, com duas folhas de papel de germinação no fundo. Os embriões, cobertos por uma terceira folha de papel de germinação, permaneceram submersos nas soluções (Bonjovani, 2007) por 24 e 48 horas, em câmaras tipo BOD, com temperatura constante regulada para $6 \pm 1^\circ\text{C}$. Ao final da incubação, os embriões foram lavados em água corrente, tiveram o excesso superficial de água removido em papel filtro e, em seguida, foram acondicionados nas embalagens de vidro, como descrito acima e incubados a -2, 2, 5, 10 e 15°C , para avaliações das taxas respiratórias. Ao final da aplicação de ABA, do estresse osmótico e da incubação para as avaliações das taxas respiratórias, os embriões foram novamente avaliados física e fisiologicamente, conforme descrito anteriormente.

Após a aplicação de ABA e PEG os embriões foram submetidos a dois níveis de hidratação. Os embriões obtidos, separados por estágio de maturação, com e sem a aplicação de ABA e PEG, após retirada amostra controle (sem secagem), foram submetidos a um nível de secagem, em estufa a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ com circulação de ar forçada (Bilia *et al.* 1998), denominada com secagem, procurando-se levar os embriões ao teor de água a 55% (base úmida) o que demandou período inferior a 24 horas. Para tanto, amostras de embriões foram retiradas periodicamente e avaliadas quanto a sua massa, até que atingissem valor próximo ao desejado, utilizando a equação descrita por Hong & Ellis (1996). Ao final da secagem e da incubação para as avaliações das taxas respiratórias, os embriões foram novamente avaliados quanto à sua qualidade fisiológica, conforme descrito anteriormente.

Delineamento experimental e análise estatística dos dados – no primeiro experimento para análise das taxas respiratórias de embriões em diferentes níveis de hidratação após aplicação de ABA e PEG o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições, em esquema fatorial 3 x 3 x 5 (pré-tratamentos x secagens x temperaturas de incubação), para cada estágio de maturação. No segundo experimento para análise das taxas respiratórias de embriões em dois níveis de hidratação após aplicação de ácido abscísico e estresse osmótico por 24 e 48 horas o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições, em esquema fatorial 5 x 2 x 5 (pré-tratamentos x secagens x temperaturas de incubação), para cada estágio de maturação. Os resultados obtidos foram analisados pelo teste F e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (Santana & Ranal 2004).

Resultados e Discussão

Taxas respiratórias de embriões em diferentes níveis de hidratação após aplicação de ácido abscísico e estresse osmótico - embriões de *I. vera* classificados como III e IV apresentaram inicialmente 66,5% e 63,1% de água (tabela 1), e 0,23 e 0,34 g.semente⁻¹ de massa seca, respectivamente o que pode indicar dois diferentes estádios de maturação, pois segundo Figliolia & Kageyama (1994), as sementes de *Inga uruguensis* (sinonímia da espécie utilizada no presente trabalho) tendem a perder umidade à medida que amadurecem.

Tabela 1. Teor de água (%) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de dois estádios de maturação (III e IV), submetidos a pré-tratamentos com solução de ABA (10⁻⁴M) ou de PEG (-2,5 MPa) e submetidos a três níveis de hidratação (sem secagem: 65±2%; 1ª secagem: 53±2%; 2ª secagem: 45±2%). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas para comparação entre pré-tratamentos, maiúsculas entre os níveis de hidratação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Pré-tratamentos	Secagens							
	Sem secagem		1ª secagem		2ª secagem			
Controle	66,5	a A	53,1	a B	46,0	a C		
ABA	65,1	ab A	53,4	a B	46,5	a C		
PEG	62,9	b A	54,2	a B	45,3	a C		
Maturação								
Estádio III	66,5	a A	53,7	a B	46,1	a C		
Estádio IV	63,1	b A	53,5	a B	45,8	a C		
Coeficiente de variação (%) 3,2								

Estes teores de água dos embriões corresponderam a água retida com tensões próximas a -1MPa (tabela 2). Nessa faixa de potencial hídrico, a água é classificada como tipo 5 (Vertucci 1993), ou seja, apresenta características de uma solução diluída e não se liga às macromoléculas (Marcos Filho 2005). É interessante ressaltar que, nesse nível de hidratação e de disponibilidade de água, os embriões podem até mesmo germinar (Vertucci & Farrant 1995, Castro *et al.* 2004, Marcos Filho 2005).

Tabela 2. Potencial hídrico (-MPa) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de dois estádios de maturação (III e IV), submetidos a pré-tratamentos com solução de ABA (10^{-4} M) ou de PEG (-2,5 MPa) e submetidos a três níveis de hidratação (sem secagem: $65\pm 2\%$; 1ª secagem: $53\pm 2\%$; 2ª secagem: $45\pm 2\%$). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas para comparação entre pré-tratamentos, maiúsculas entre os níveis de hidratação, itálicas entre estádios de maturação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

	Sem secagem				1ª secagem				2ª secagem			
Pré-tratamentos	Estádio III											
Controle	0,8	a	C	A	3,8	a	B	A	5,5	a	A	A
ABA	1,3	a	C	A	3,2	a	B	A	4,7	b	A	A
PEG	1,4	a	C	A	3,4	a	B	A	4,3	b	A	A
	Estádio IV											
Controle	1,0	a	C	A	2,8	b	B	B	4,9	a	A	B
ABA	1,2	a	C	A	3,4	ab	B	A	4,8	a	A	A
PEG	1,4	a	C	A	3,7	a	B	A	4,8	a	A	A
Coeficiente de variação (%) 10,2												

A incubação dos embriões em ABA pouco alterou o teor de água e o potencial hídrico, porém, a incubação em PEG (-2,5MPa), promoveu uma leve redução no teor de água de 66,5% para 62,9%, indicando que houve saída de água (tabelas 1 e 2). Como os embriões apresentavam, inicialmente, aproximadamente -1MPa, seria esperado que a maior movimentação de água ocorresse justamente do potencial menos negativo para o mais negativo, pois, segundo Taiz & Zeiger (2004), a água se move do meio com maior potencial para o de menor. Curiosamente, porém, o potencial hídrico dos embriões não entraram em equilíbrio com a solução de PEG, sugerindo algum mecanismo de controle de saída de água.

Após as secagens os embriões dos estádios III e IV, apresentaram teores de água próximo de 53,6% e 46% e potenciais hídricos de cerca de -3MPa e -5MPa, respectivamente para a 1ª e 2ª secagens (tabelas 1 e 2). As secagens proporcionaram modificações nas propriedades da água, chegando ao tipo 3, ou seja, retida com tensões de -4 a -11MPa (Vertucci 1993). A partir desse nível de hidratação há alteração na atividade fisiológica, a respiração é intensificada e há favorecimento a danos oxidativos (Marcos Filho 2005).

A condutividade elétrica dos embriões do estágio III aumentou com as secagens (tabela 3), demonstrando os danos promovidos às membranas devido à dessecação, pois a condutividade elétrica da solução de embebição avalia a integridade das membranas celulares

(Marcos Filho 2005). Esses resultados coincidem com os obtidos por Bilia *et al.* (1998), que avaliou os efeitos das secagem sobre a viabilidade dos embriões de *I. vera*. A elevada diferença no valor da condutividade elétrica, dos embriões do estágio III, após as secagens, reforça a hipótese de que esses embriões são mais imaturos, pois o sistema de membranas atinge a máxima organização durante a fase final do acúmulo de matéria seca (Marcos Filho 2005).

Apesar dos embriões incubados em ABA não apresentarem alterações significativas no conteúdo de água, após o período de incubação, os efeitos desse tratamento puderam ser observados com os resultados da condutividade elétrica (tabela 3), benefício também observado após a incubação dos embriões em PEG. Contudo, ao final dos períodos de incubação em ABA e PEG e após as secagens não se verificaram diferenças expressivas na capacidade germinativa ou de produção de plântulas normais (tabela 4).

Tabela 3. Condutividade elétrica ($\mu\text{S.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de dois estádios de maturação (III e IV), submetidos a pré-tratamentos com solução de ABA (10^{-4}M) ou de PEG (-2,5 MPa) e submetidos a três níveis de hidratação (sem secagem: $65\pm 2\%$; 1ª secagem: $53\pm 2\%$; 2ª secagem: $45\pm 2\%$). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas para comparação entre pré-tratamentos, maiúsculas entre os níveis de hidratação, itálicas entre estádios de maturação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

	Sem secagem				1ª secagem				2ª secagem			
Pré-tratamentos	Estádio III											
Controle	19,1	a	C	A	61,1	a	B	A	106,4	a	A	A
ABA	12,9	a	B	A	27,7	b	B	A	46,6	c	A	A
PEG	15,3	a	B	A	25,7	b	B	A	66,6	b	A	A
	Estádio IV											
Controle	10,3	a	A	A	25,4	a	A	B	26,8	a	A	B
ABA	10,6	a	B	A	15,2	a	AB	A	29,5	a	B	B
PEG	9,5	a	B	A	13,4	a	B	A	33,2	a	A	B
Coeficiente de variação (%)	29,3											

Tabela 4. Germinação (%) e plântulas normais (%) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* de dois estádios de maturação (média dos dois estádios), submetidos a pré-tratamentos com solução de ABA (10^{-4} M) ou de PEG (-2,5 MPa) e submetidos a três níveis de hidratação (sem secagem: $65 \pm 2\%$; 1ª secagem: $53 \pm 2\%$; 2ª secagem: $45 \pm 2\%$). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas para comparação entre pré-tratamentos e maiúsculas entre os níveis de hidratação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Pré-tratamentos	Secagens								
	Sem secagem			1ª secagem			2ª secagem		
<i>Germinação (%)</i>									
Controle	93,3	a	A	86,7	b	A	94,2	ab	A
ABA	95,8	a	A	97,5	a	A	87,5	b	B
PEG	100,0	a	A	97,5	a	A	97,5	a	A
Coeficiente de variação (%) 6,2									
<i>Plântulas normais (%)</i>									
ABA	93,3	a	A	93,3	a	A	78,3	b	B
PEG	97,5	a	A	93,3	a	A	90,8	a	A
Coeficiente de variação (%) 8,1									

De modo geral, as variações na taxa respiratória com as modificações na temperatura foram semelhantes para os embriões de ambos os estádios de maturação. A variação na temperatura do ambiente pode afetar o metabolismo da planta, pois a temperatura determina a velocidade das reações enzimáticas, afetando as taxas respiratórias (Taiz & Zeiger 2004, Marengo & Lopes 2007). À medida que se diminuiu a temperatura, como era de se esperar, houve correspondente redução também para o consumo de O_2 e para a produção de CO_2 desses embriões (tabelas 5 a 8). As taxas respiratórias dos embriões de *Inga vera* da amostra controle indicam o elevado metabolismo destes, atingindo o valor de $66 \mu\text{mol } CO_2 \cdot \text{gMS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (tabela 6), mesmo quando a 5°C , temperatura de câmara fria, considerada favorável para a conservação destes embriões (Bilia & Barbedo 1997; Bilia *et al.* 1998; Andréo *et al.* 2006; Faria 2006; Bonjovani & Barbedo 2008). Mesmo na menor temperatura (-2°C) os embriões mantiveram-se metabolicamente ativos. De modo geral, observa-se que a produção de CO_2 , pelos embriões, aumentou de modo gradativo, proporcional a elevação da temperatura (tabelas 5 e 8). Contudo, a variação no consumo de O_2 , na faixa das temperaturas favoráveis para conservação destes embriões (2 e 5°C), não foi semelhante à liberação de CO_2 , resultando em valores de QR entre 0,2 e 0,4. No metabolismo respiratório é importante a

relação entre CO_2 liberado e O_2 consumido (CO_2/O_2) denominada quociente respiratório (QR). Esta relação varia em função do tipo do substrato que é oxidado (Marcos Filho 2005, Marengo & Lopes 2007). Esse elevado consumo de O_2 seria justificado pelo uso de ácidos graxos saturados e insaturados como substrato inicial para a respiração das sementes, necessitando maiores quantidades de oxigênio. Porém os embriões de *Inga vera* apresentam apenas 0,27% de lipídios (Mello *et al.* 2010), o que inviabilizariam esse consumo para a respiração. O elevado consumo de O_2 , sem equivalente liberação de CO_2 , poderia significar a presença de outras reações que não a respiração, tais como a peroxidação de lipídios e a oxidação de compostos fenólicos com a liberação do radical superóxido e que podem estar envolvidos com a deterioração das sementes (Hendry 1993, Bailly 2004, Marcos Filho 2005, Berjak & Pammenter 2008, Berjak *et al.* 2011).

Tabela 8. Produção de dióxido de carbono ($\mu\text{molCO}_2.\text{gMS}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* do estágio IV, submetidos a pré-tratamentos com solução de ABA (10^{-4}M) ou de PEG (-2,5 MPa), submetidos a três níveis de hidratação (sem secagem: $65\pm 2\%$; 1ª secagem: $53\pm 2\%$; 2ª secagem: $45\pm 2\%$) e incubados durante 15 dias a -2°C e 10 dias nas demais temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas para comparação entre temperaturas, maiúsculas entre pré-tratamentos e itálico entre os níveis de hidratação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Temperatura (°C)	Pré-tratamentos											
	Controle				ABA				Estresse			
	Sem secagem											
-2	25,4	d	A	AB	28,6	d	A	A	21,3	d	A	A
2	31,2	d	AB	A	40,8	d	A	A	28,5	d	B	A
5	52,8	c	B	A	69,9	c	A	A	45,9	c	B	A
10	116,6	b	A	A	112,7	b	A	A	97,5	b	B	AB
15	151,3	a	A	A	153,5	a	A	A	130,4	a	B	B
	1ª secagem											
-2	29,7	d	A	A	26,3	d	AB	A	18,3	c	B	A
2	34,8	d	AB	A	42,2	c	A	A	28,0	c	B	A
5	52,1	c	B	A	64,7	b	A	A	46,3	b	B	A
10	87,5	b	B	B	105,1	a	A	A	90,3	a	B	B
15	113,8	a	A	C	113,2	a	A	B	96,4	a	B	C
	2ª secagem											
-2	16,9	e	A	B	23,6	d	A	A	14,2	e	A	A
2	30,7	d	B	A	45,9	c	A	A	30,5	d	B	A
5	50,9	c	B	A	71,1	b	A	A	54,4	c	B	A
10	90,6	b	B	B	106,4	a	A	A	107,8	b	A	A
15	137,9	a	B	B	118,2	a	C	B	154,5	a	A	A
Coeficiente de variação (%) 8,4												

Após o primeiro nível de secagem, observa-se que o consumo de O_2 e a produção de CO_2 , se aproximaram, assumindo um comportamento mais próximo do esperado (valores de QR entre 0,8 e 1,0). Essa menor taxa de oxidação poderia explicar os resultados observados por Bilia *et al.* (1998), pelos quais se verificou que a desidratação parcial das sementes até atingirem teor de água próximo a 50% favorece sua conservação.

Comparando-se os valores da segunda secagem com os da primeira secagem, observa-se, em geral, a intensificação da liberação de dióxido de carbono, independente do pré-tratamento e do estágio de maturação, elevando o valor de QR até 2,1. Segundo Marcos Filho (2005), quando o QR é superior a 1,0 está ocorrendo fermentação (anaerobiose).

Tabela 14. Plântulas normais (%) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* do estágio IV, submetidos a pré-tratamentos com solução de ABA (10^{-4} M) ou de PEG (-2,5 MPa), submetidos a três níveis de hidratação (sem secagem: $65\pm 2\%$; 1ª secagem: $53\pm 2\%$; 2ª secagem: $45\pm 2\%$) e incubados durante 15 dias a -2°C e 10 dias nas demais temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas para comparação entre temperaturas, maiúsculas entre pré-tratamentos e itálico entre os níveis de hidratação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Temperatura (°C)	Pré-tratamentos											
	Controle				ABA				Estresse			
	Sem secagem											
-2	80,0	a	A	A	83,3	a	A	A	86,7	a	A	A
2	93,3	a	A	A	85,0	a	A	A	93,3	a	A	A
5	91,7	a	A	A	91,7	a	A	A	93,3	a	A	A
10	85,0	a	A	A	91,7	a	A	A	90,0	a	A	A
15	98,3	a	A	A	95,0	a	A	A	88,3	a	A	A
1ª secagem												
-2	90,0	a	A	A	61,7	b	B	B	81,7	a	A	A
2	93,3	a	A	A	68,3	ab	B	A	90,0	a	A	A
5	86,7	a	A	A	70,0	ab	A	B	85,0	a	A	A
10	83,3	a	A	A	80,0	ab	A	A	80,0	a	A	A
15	91,7	a	A	A	85,0	a	A	A	95,0	a	A	A
2ª secagem												
-2	55,0	a	A	B	8,3	b	B	C	38,3	a	A	B
2	43,3	a	A	B	11,7	b	B	B	43,3	a	A	B
5	46,7	a	A	B	13,3	b	B	C	25,0	a	B	B
10	43,3	a	A	B	20,0	b	B	B	26,7	a	AB	B
15	11,7	b	B	B	46,7	a	A	B	30,0	a	A	B
Coeficiente de variação (%) 13,5												

Taxas respiratórias de embriões em dois níveis de hidratação após aplicação de ácido abscísico e estresse osmótico por 24 e 48 horas - os embriões de *I. vera* colhidos em três épocas diferentes, com aproximadamente 15 dias de intervalo entre as colheitas, apesar de visualmente distintos, apresentaram inicialmente 65,6%, 64,1% e 60,9% de água e 0,24, 0,29 e 0,28 g.semente⁻¹ de massa seca, respectivamente. Considerando o teor de água e conteúdo de matéria seca como índice de maturação aparentemente temos dois estádios de maturação devido à proximidade dos teores de água e matéria seca dos embriões das duas primeiras coletas, porém, analisando os testes de condutividade elétrica e capacidade de produção de plântulas normais, observam-se dois materiais distintos, com respostas diferentes a condições

de estresse, como descrito a diante. Considerando a classificação de Bonjovani e Barbedo (2008), as duas primeiras colheitas estariam próximas ao estágio III. Diante do exposto considerou-se a primeira colheita como estágio I (65,6%), a segunda como estágio II (64,1) e a terceira como estágio III (60,9%).

O elevado teor de água inicial dos embriões (60,9% a 65,6%), correspondem a água retida com tensões de aproximadamente -1,5 MPa, indicando que, por ocasião da colheita, tinham ainda água livre, ou seja, água do tipo 5, retida em potencial de 0 a -1,5 MPa (Vertucci 1993). As características deste tipo de água correspondem a soluções diluídas, não se ligando às macromoléculas e sendo suficiente para germinação (Vertucci & Farrant 1995, Castro *et al.* 2004, Marcos Filho 2005).

Considerando a incubação nas soluções de ácido abscísico, observou-se, nos três estádios de maturação, sutil acréscimo no teor de água, passando de 63,2% para 65,6% e 66,3%, respectivamente para os embriões incubados por 24 e 48 horas, o que sugere absorção da solução. Esse teor de água dos embriões correspondeu a água retida com tensões próximas a -1MPa, ainda água tipo 5.

A incubação em PEG (-2MPa), por 24 e 48 horas, promoveu a migração da água dos embriões, que apresentavam inicialmente água retida com tensões de -1,5MPa, para a solução e conseqüentemente promoveu alterações nos níveis de hidratação dos embriões. A maior movimentação da água foi observada nos embriões que permaneceram incubados por 48 horas, registrando teor de água de 60,9%. Ambos os períodos de incubação em PEG levaram os embriões a um potencial mais negativo e água retida com tensões de -2MPa, correspondente às características de solução concentrada, ocupando espaços intercapilares entre as macromoléculas e não interagindo com sua superfície, ou seja, água tipo 4. Este tipo de água inclui os graus de hidratação favoráveis ao armazenamento de várias espécies de sementes recalcitrantes (Vertucci 1993, Marcos Filho 2005).

As alterações no teor de água e no potencial hídrico desses embriões, decorrentes da secagem, segundo a análise de variância, não foram influenciadas pelos pré-tratamentos. Após a secagem, os embriões apresentaram, em média, 54% de água, correspondendo a água retida com tensões de cerca de -3,0MPa, ou seja água tipo 4. Segundo Marcos Filho (2005), vários eventos fisiológicos e bioquímicos ocorrem nas sementes, em função de seu grau de hidratação; nas recalcitrantes, a maior parte desses processos ocorre quando as sementes apresentam predomínio das águas tipos 3 e 4.

Não se observaram mudanças significativas na capacidade de germinar e de produzir plântulas normais dos embriões após os tratamentos com ABA e PEG, exceto para os embriões incubados em PEG por 48 horas (tabela 16). Esses resultados corroboram com os obtidos por Bonjovani (2007) em que após a secagem, os embriões demonstraram comportamento diferenciado. Diversos autores consideram que o máximo acúmulo de matéria seca nas sementes caracteriza o ponto de maturidade fisiológica (Carvalho & Nakagawa 2000, Marcos Filho 2005, Mai-Hong *et al.* 2006). No caso das sementes em estudo, que não apresentam a clássica dessecação ao final da maturação (Barbedo & Marcos Filho 1998), poderia-se supor, portanto, que os embriões do estágio III já teriam condições de iniciar o processo de germinação, tendo suficiente maturidade e água disponível. Essa informação concorda com a hipótese de Faria (2006) de que essas sementes não têm comportamento típico, aproximando-se mais ao comportamento de plântulas em crescimento. A máxima qualidade fisiológica das sementes de *Inga vera* subsp. *affinis*, dessa forma, ocorreria bem antes de sua dispersão.

Os embriões acondicionados em diferentes temperaturas, para avaliar o consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono, apresentavam inicialmente o mesmo nível de hidratação. Ao final do período de incubação, observaram-se pequenas alterações no teor de água entre os pré-tratamentos, que variou entre 64% a 68%, para os embriões incubados em ABA e entre 61% e 63% os embriões que foram submetidos ao estresse osmótico. Considerando os níveis de hidratação o teor de água variou entre 63% e 64%, para os embriões sem secagem e entre 54% e 58% após a secagem.

De modo geral, o potencial hídrico exibido pelos embriões demonstrou comportamento análogo ao período que antecedeu a incubação para análise do consumo de O_2 e liberação de CO_2 . Após a secagem, os embriões apresentaram, água retida com tensões entre -2,0 a -4,0 MPa.

As variações na taxa respiratória com as modificações na temperatura foram semelhantes para os embriões, nos três estádios de maturação, considerando os pré-tratamentos e a secagem. À medida que se diminuiu a temperatura, houve correspondente redução também para o consumo de O_2 e a liberação de CO_2 (Tabelas 17 a 22).

Estádio I															
Temperatura (°C)	Controle			ABA 24h			ABA 48h			Estres 24h			Estres 48h		
Sem Secagem															
-2	36,3	e	B	35,9	d	B	28,2	e	A	26,3	e	A	26,6	e	A
2	117,6	d	A	68,9	c	B	76,6	d	B	66,3	d	B	80,5	d	A
5	144,6	c	A	90,9	b	B	93,3	c	B	96,1	c	A	107,5	c	B
10	189,9	b	A	136,3	a	B	141,1	b	B	137,7	b	A	151,4	b	B
15	237,4	a	A	150,7	a	B	157,8	a	B	164,9	a	A	179,8	a	A
Temperatura (°C)	Com Secagem														
-2	75,2	e	A	54,2	d	A	33,7	e	A	31,1	e	A	33,2	e	A
2	107,0	d	A	145,2	c	A	88,9	d	A	87,1	d	A	78,8	d	A
5	143,3	c	A	152,7	c	A	128,2	c	A	105,4	c	A	119,7	c	A
10	188,6	b	A	176,7	b	A	177,3	b	A	144,3	b	A	163,2	b	A
15	231,3	a	A	219,1	a	A	194,6	a	A	172,7	a	A	181,4	a	A
Coeficiente de variação (%) 5,7															

Estádio II															
Temperatura (°C)	Controle			ABA 24h			ABA 48h			Estres 24h			Estres 48h		
Sem Secagem															
-2	32,0	e	A	34,6	e	B	31,2	e	A	25,8	e	A	23,7	e	A
2	92,9	d	A	63,9	d	B	85,3	d	A	56,1	d	B	70,3	d	A
5	113,3	c	A	87,3	c	B	102,0	c	A	73,1	c	B	86,8	c	A
10	145,1	b	A	118,2	b	B	142,3	b	A	105,9	b	B	121,6	b	A
15	177,1	a	A	139,3	a	B	170,0	a	A	124,4	a	B	138,2	a	A
Com Secagem															
-2	38,0	e	B	44,8	d	A	20,4	d	B	31,8	d	A	17,3	e	A
2	63,9	d	B	121,8	c	A	61,3	c	B	88,8	c	A	50,4	d	B
5	87,8	c	B	127,7	c	A	89,3	b	B	99,9	c	A	82,5	c	A
10	129,9	b	B	167,9	b	A	120,8	a	B	138,2	b	A	111,1	b	B
15	163,0	a	B	208,9	a	A	122,4	a	B	166,8	a	A	132,6	a	A
Coeficiente de variação (%) 6,3															

Estádio III															
Temperatura (°C)	Controle			ABA 24h			ABA 48h			Estres 24h			Estres 48h		
Sem Secagem															
-2	47,6	e	A	37,1	c	A	38,7	d	A	36,0	d	A	42,3	e	A
2	139,3	d	A	103,0	b	A	93,7	c	B	114,1	c	B	141,9	d	A
5	162,3	c	A	120,3	b	A	108,4	c	B	135,0	c	B	163,4	c	A
10	211,3	b	A	182,2	a	B	166,7	b	B	176,5	b	B	188,0	b	A
15	241,2	a	B	190,2	a	B	198,9	a	B	211,6	a	B	210,4	a	B
Temperatura (°C)	Com Secagem														
-2	47,6	d	A	38,8	e	A	52,9	d	A	48,6	d	A	48,0	d	A
2	118,6	c	B	80,2	d	B	141,6	c	A	164,1	c	A	137,7	c	A
5	125,4	c	B	115,7	c	A	157,7	c	A	167,3	c	A	148,2	c	B
10	209,2	b	A	199,4	b	A	232,5	b	A	206,4	b	A	192,6	b	A
15	274,7	a	A	228,3	a	A	284,3	a	A	271,6	a	A	255,3	a	A
Coeficiente de variação (%) 6,3															

Tabela 22. Liberação de dióxido de carbono ($\mu\text{molCO}_2.\text{gMS}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* do estágio III, pré- tratados, em dois níveis de hidratação (Sem secagem: $63\pm 3\%$; Com secagem: $53\pm 1\%$) e incubados durante 15 dias a -2°C e 10 dias nas demais temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas entre temperaturas e itálico entre os níveis de hidratação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Estádio III						
Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Sem Secagem			Com Secagem		
-2	22,0	e	B	31,0	e	A
2	47,8	d	B	67,2	d	A
5	70,2	c	B	97,5	c	A
10	146,0	b	B	184,3	b	A
15	198,6	a	B	261,0	a	A
Coeficiente de variação (%) 10,0						

Considerando o consumo de O_2 e a liberação de CO_2 a 15°C , temperatura na qual Bonjovani (2007), observou tolerância térmica de embriões de *I. vera* para a germinação, nota-se, para o estágio III, a equivalência entre o consumo de O_2 e a produção de CO_2 e que diferem dos estádios I e II, pois apresentaram elevado consumo de O_2 (figura 1A). O desequilíbrio nesse consumo, com valores de QR inferiores a 0,5, indicam a existência de processos oxidativos que não propriamente a respiração. Tais processos poderiam ser, por exemplo, a peroxidação de lipídios e a oxidação de compostos fenólicos, com a liberação do radical superóxido e que podem estar envolvidos com a deterioração das sementes (Hendry 1993, Bailly, 2004, Marcos Filho 2005, Berjak & Pammenter 2008, Berjak *et al.* 2011). Nos embriões que foram previamente tratados com ácido abscísico por 24 horas, observa-se a equiparação do consumo de O_2 com a produção do CO_2 , além do decréscimo dessas taxas (figura 1 B). Deve-se destacar que a aplicação de estresse hídrico proporcionou efeito semelhante nesses embriões (figura 1C) e que o aumento do período de incubação, dos embriões nas soluções de ABA e PEG, não proporcionou nenhum ganho nessas taxas (figura 1 D e E). Com a aplicação da secagem, de modo geral, observa-se o aumento do consumo de O_2 e principalmente da liberação de CO_2 , promovendo a equiparação dessas taxas e

aproximando-as do esperado para respiração. Segundo Marengo & Lopes (2007), a exposição súbita de plantas sensíveis a estresse hídrico aumenta a respiração pela demanda de energia. Deve-se destacar que os embriões do estágio II pré-tratados com soluções de ABA e PEG por 48 horas, além da equiparação no consumo de O_2 e liberação de CO_2 , apresentaram reduções nessas taxas (figura 2 A a E).

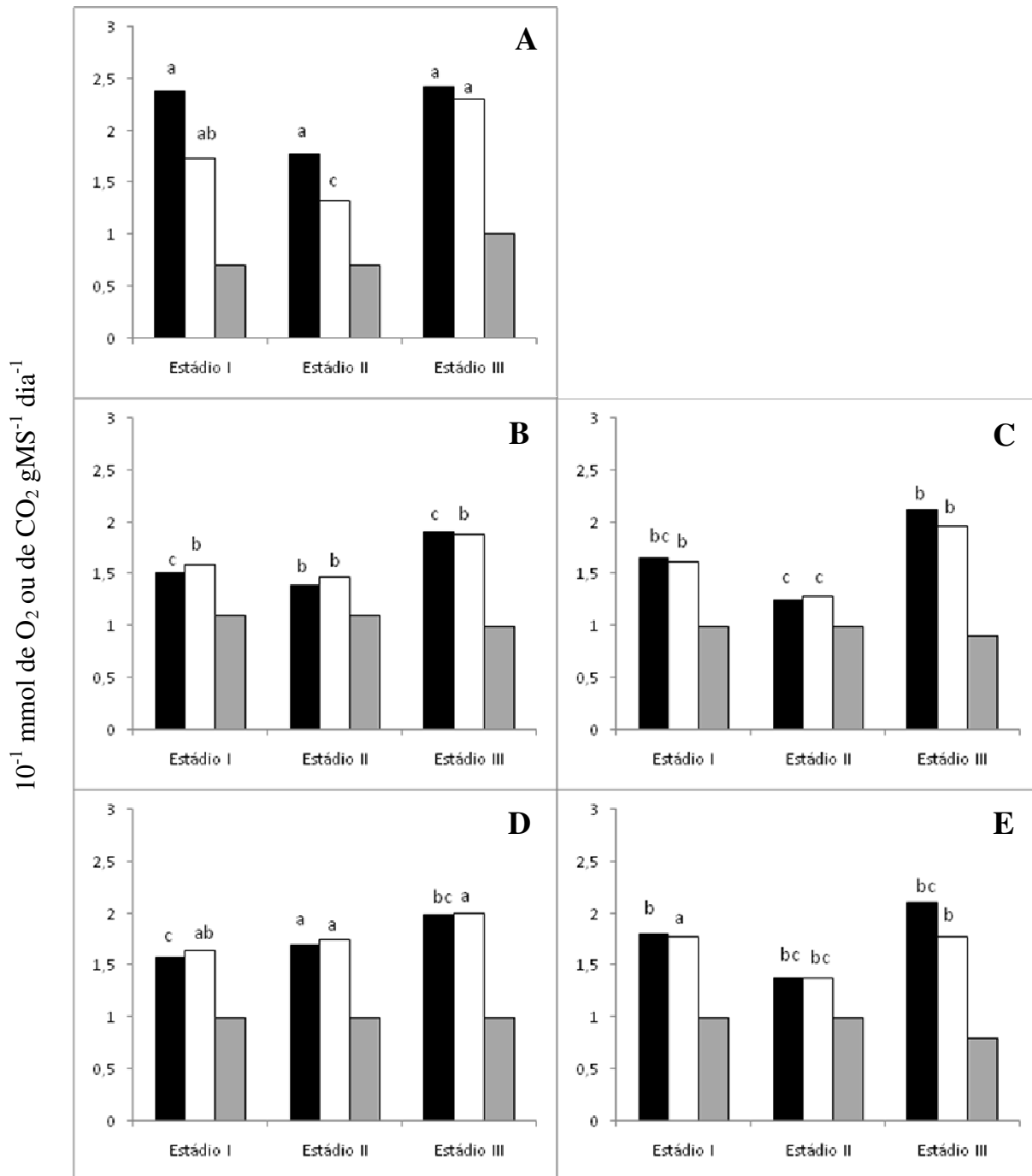


Figura 1. Consumo de O_2 (colunas pretas), liberação de CO_2 (colunas brancas) e quociente respiratório - QR (CO_2/O_2 , colunas em cinza), de embriões de *Inga vera* de três estádios de maturação, sem tratamento prévio (A) ou embebidos em solução de ABA $10^{-4}M$ por 24 h (B) e por 48 h (D) ou de PEG a -2,5 MPa por 24 h (C) e por 48 h (E), incubadas a $15^\circ C$. Valores seguidos pela mesma letra (dentro de pré-tratamentos) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

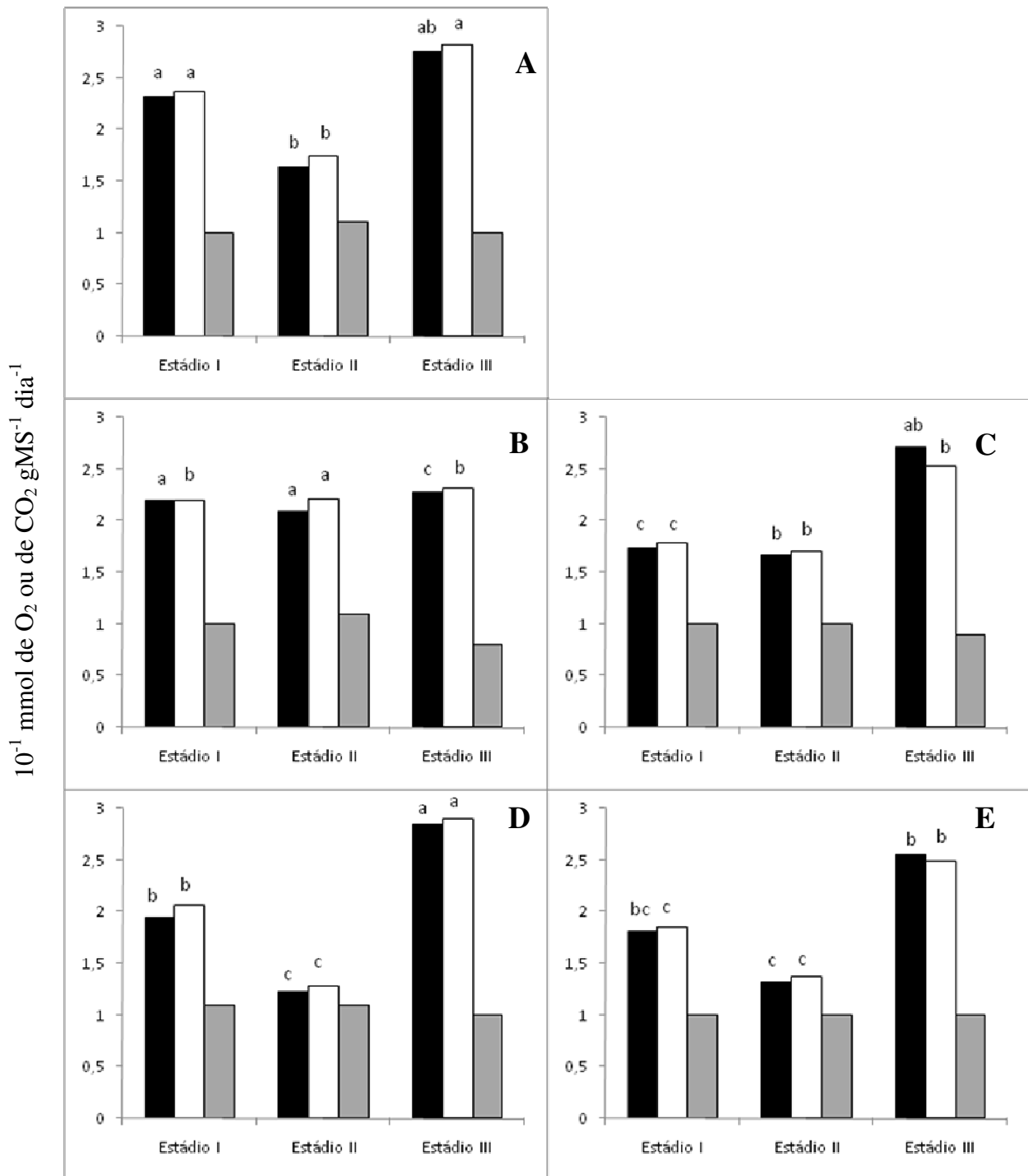


Figura 2. Consumo de O_2 (colunas pretas), liberação de CO_2 (colunas brancas) e quociente respiratório - QR (CO_2/O_2 , colunas em cinza), de embriões de *Inga vera* de três estádios de maturação, submetidos a secagem, sem tratamento prévio (A) ou embebidos em solução de ABA 10^{-4} M por 24 h (B) e por 48 h (D) ou de PEG a -2,5 MPa por 24 h (C) e por 48 h (E), incubadas a 15°C. Valores seguidos pela mesma letra (dentro de pré-tratamentos) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A incubação a 10°C dos embriões sem pré-tratamento, dos três estádios de maturação, também decorreu em consumo mais intenso de oxigênio (figura 3 A). Nota-se, novamente que os embriões dos estádios I e II, pré-tratados com ABA e PEG apresentaram decréscimo no consumo de oxigênio, equiparando a produção de dióxido de carbono (figura 3 B e C) e que o aumento do período de incubação não proporcionou nenhum ganho nessas taxas (figura 3 D e E).

Deve-se destacar o maior consumo de O₂ e liberação de CO₂ nos embriões do estágio III (figura 3). Tal fato pode ser explicado por que, no desenvolvimento das sementes recalcitrantes, não se verifica a desidratação tão acentuada pré-maturidade, de modo que passam quase que diretamente da fase de desenvolvimento para a de germinação. Contudo, tem sido sugerido que, próximo a maturidade, o metabolismo das sementes dessas espécies torna-se menos sensível aos níveis de ABA (Marcos Filho 2005). Além disso, sementes recalcitrantes são metabolicamente ativas e devido o alto grau de hidratação podem até mesmo germinar. Porém, sem o suporte adicional de água necessário para a germinação, acaba numa condição de estresse hídrico (Pammenter *et al.* 1994), que culminaria com prejuízos às sementes colhidas distantes do ponto de maturidade fisiológica. Após o processo de secagem, os embriões, sem tratamento prévio, dos três estádios, equipararam seu consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono (figura 4 A), concordando com os resultados obtidos por Bilia *et al.* (1998), que a desidratação parcial das sementes até atingirem teor de água próximo a 50% favorece sua conservação. Nota-se, também, que se comparado com os embriões que não foram submetidos à secagem essa equiparação se deu devido à intensificação da produção de dióxido de carbono (Figuras 3A e 4A).

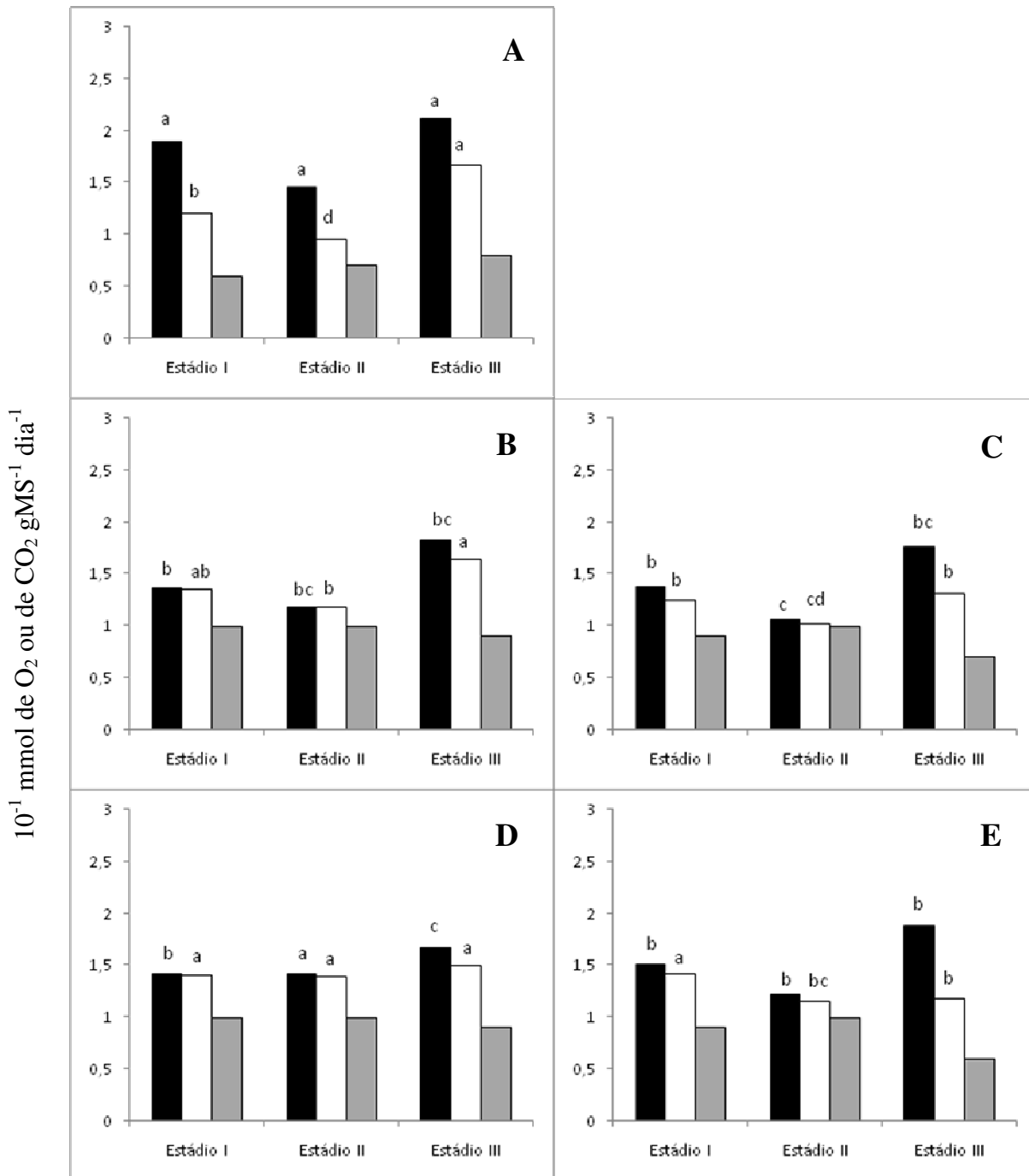


Figura 3. Consumo de O_2 (colunas pretas), liberação de CO_2 (colunas brancas) e quociente respiratório - QR (CO_2/O_2 , colunas em cinza), de embriões de *Inga vera* de três estádios de maturação, sem tratamento prévio (A) ou embebidos em solução de ABA $10^{-4}M$ por 24 h (B) e por 48 h (D) ou de PEG a -2,5 MPa por 24 h (C) e por 48 h (E), incubadas a $10^\circ C$. Valores seguidos pela mesma letra (dentro de pré-tratamentos) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

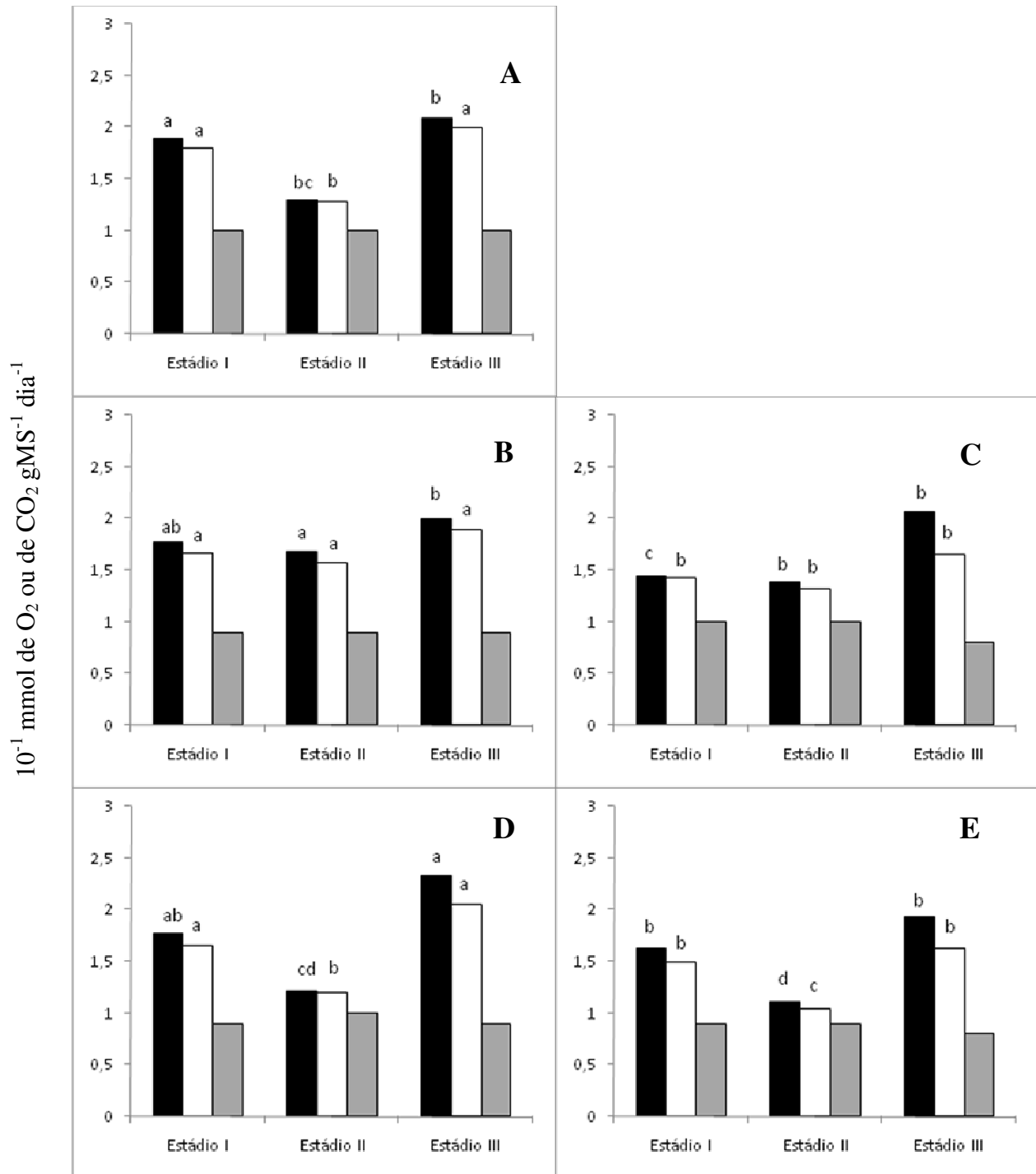


Figura 4. Consumo de O_2 (colunas pretas), liberação de CO_2 (colunas brancas) e quociente respiratório - QR (CO_2/O_2 , colunas em cinza), de embriões de *Inga vera* de três estádios de maturação, submetidos a secagem, sem tratamento prévio (A) ou embebidos em solução de ABA 10^{-4} M por 24 h (B) e por 48 h (D) ou de PEG a -2,5 MPa por 24 h (C) e por 48 h (E), incubadas a 10°C. Valores seguidos pela mesma letra (dentro de pré-tratamentos) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A 5°C, destaca-se a ampliação do consumo de oxigênio para todos os embriões que não foram tratados previamente (figura 5 A). Observa-se, nos embriões dos estádios I e II pré-tratados, redução na taxa de consumo de O₂. Para os embriões do estágio III nota-se um decréscimo, no consumo de O₂, apenas para os embriões tratados com ABA (figura 5 B a E). A secagem elevou a produção de CO₂ aproximando-a do consumo de oxigênio nos embriões, sem tratamento prévio, principalmente dos estádios I e II (figura 6 A). Destaca-se que o consumo de O₂ e produção de CO₂, adquiridos com tratamento de ABA por 48 horas e PEG por 24 e 48 horas, no estágio II, se assemelham aos atingidos para os embriões não tratados (controle) (figuras 6A, 6C, 6D e 6E). A secagem pouco alterou o comportamento oxidativo dos embriões do estágio III, incubados a 5°C (figura 6).

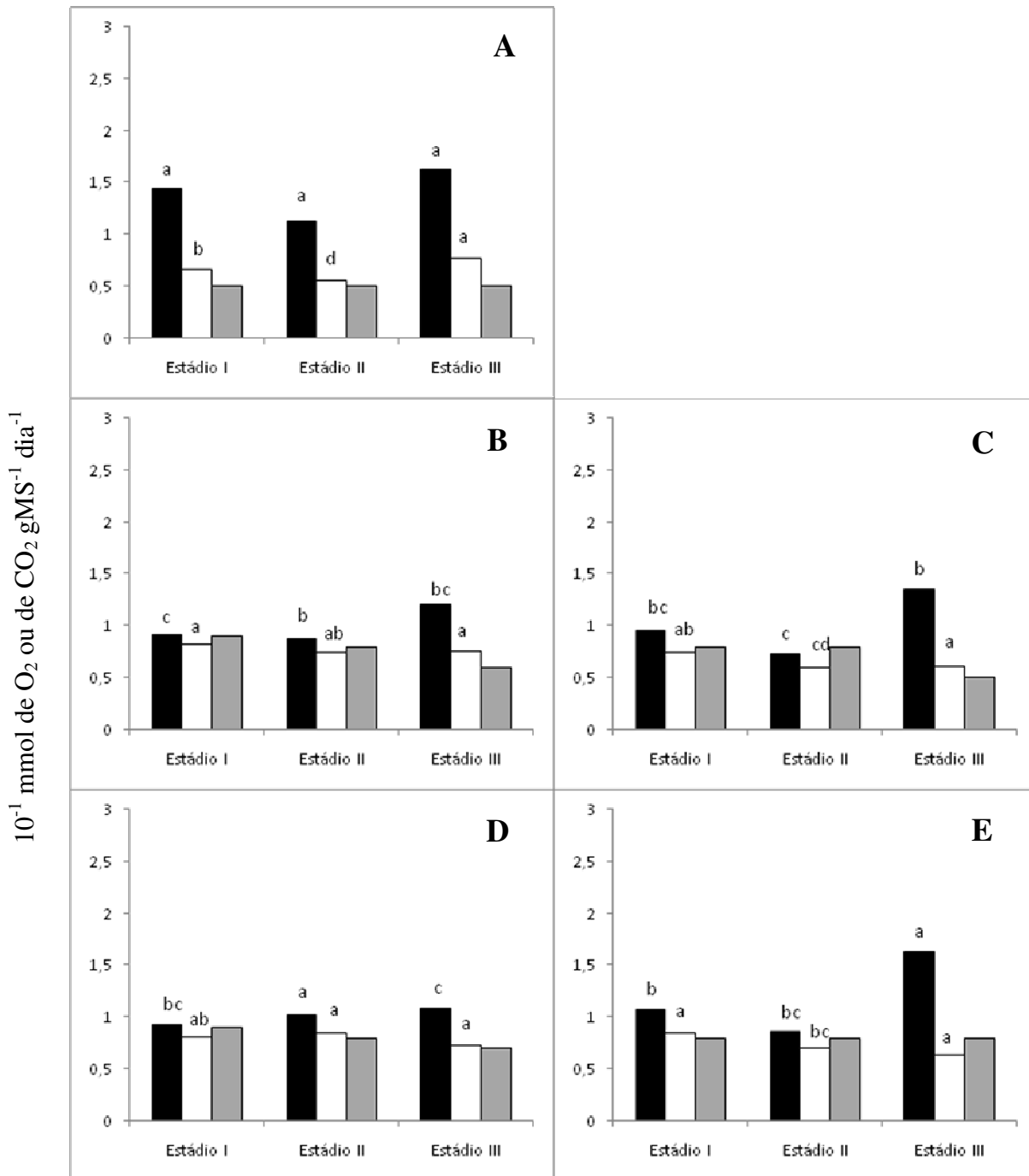


Figura 5. Consumo de O_2 (colunas pretas), liberação de CO_2 (colunas brancas) e quociente respiratório - QR (CO_2/O_2 , colunas em cinza), de embriões de *Inga vera* de três estádios de maturação, sem tratamento prévio (A) ou embebidos em solução de ABA 10^{-4} M por 24 h (B) e por 48 h (D) ou de PEG a -2,5 MPa por 24 h (C) e por 48 h (E), incubadas a 5°C. Valores seguidos pela mesma letra (dentro de pré-tratamentos) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

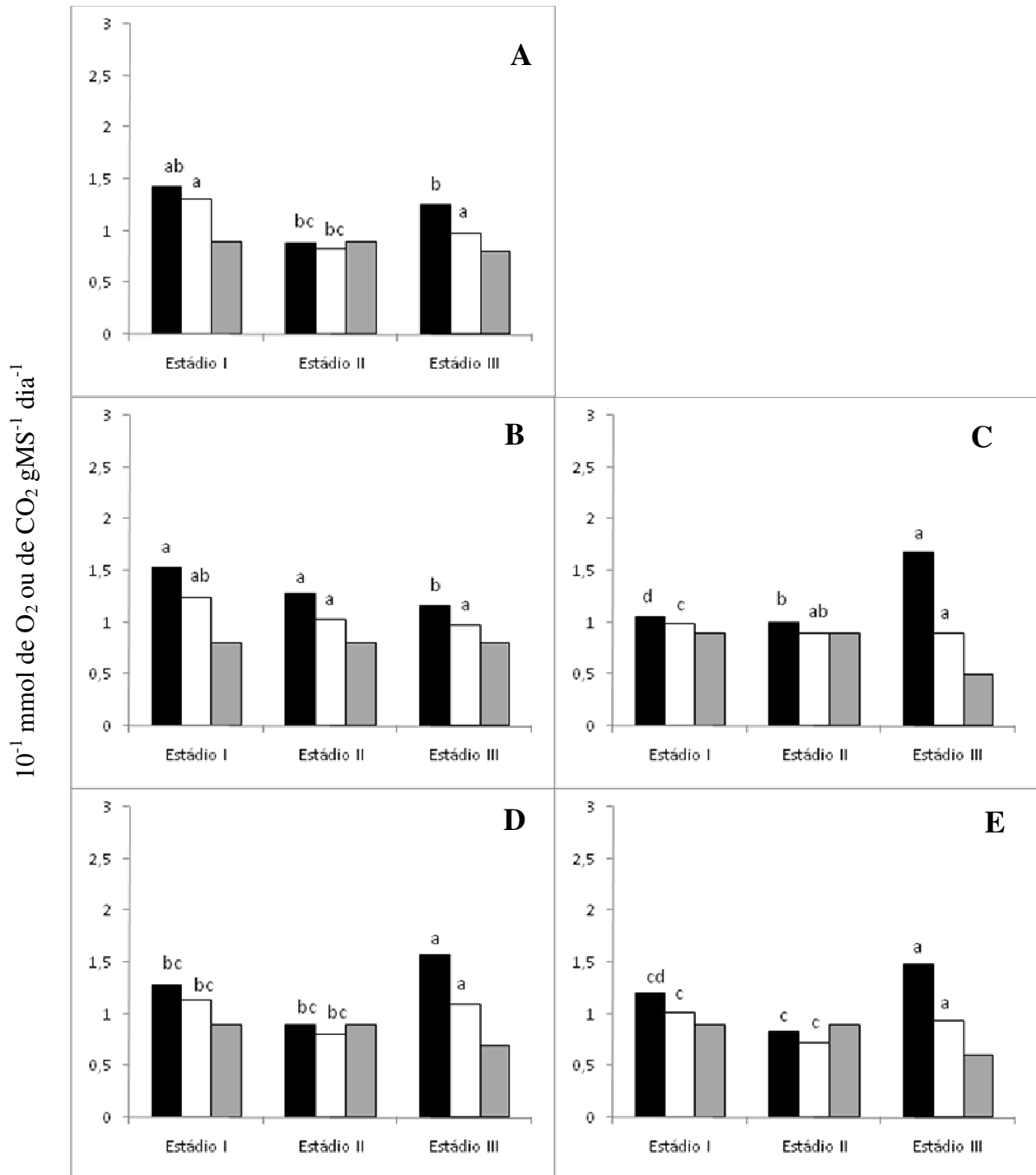


Figura 6. Consumo de O_2 (colunas pretas), liberação de CO_2 (colunas brancas) e quociente respiratório - QR (CO_2/O_2 , colunas em cinza), de embriões de *Inga vera* de três estádios de maturação, submetidos a secagem, sem tratamento prévio (A) ou embebidos em solução de ABA 10^{-4} M por 24 h (B) e por 48 h (D) ou de PEG a -2,5 MPa por 24 h (C) e por 48 h (E), incubadas a 5°C. Valores seguidos pela mesma letra (dentro de pré-tratamentos) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Os embriões, dos três estádios de maturação, incubados a 2°C que não receberam tratamento prévio, apresentaram elevado consumo de oxigênio (figura 7 A). Igualmente, esse consumo elevado também se manifestou nos embriões pré-tratados do estádio III (figura 7 B a E). Nota-se, ainda nos embriões dos estádios I e II, pré-tratados, tendência a um aumento do consumo de O₂ (figura 7 B a E). Considerando o processo de secagem observa-se a elevação da produção de CO₂, aproximando-a do consumo de oxigênio nos embriões não tratados, dos estádios I e II (figura 8 A). Exceto para os embriões tratados com ABA por 24 horas, os embriões do estádio III mantiveram o elevado consumo de O₂. Observa-se, ainda, que os embriões submetidos a secagem, não tratados, do estádio II, apresentaram comportamento semelhante aos tratados com ABA e PEG por 48 (figura 8).

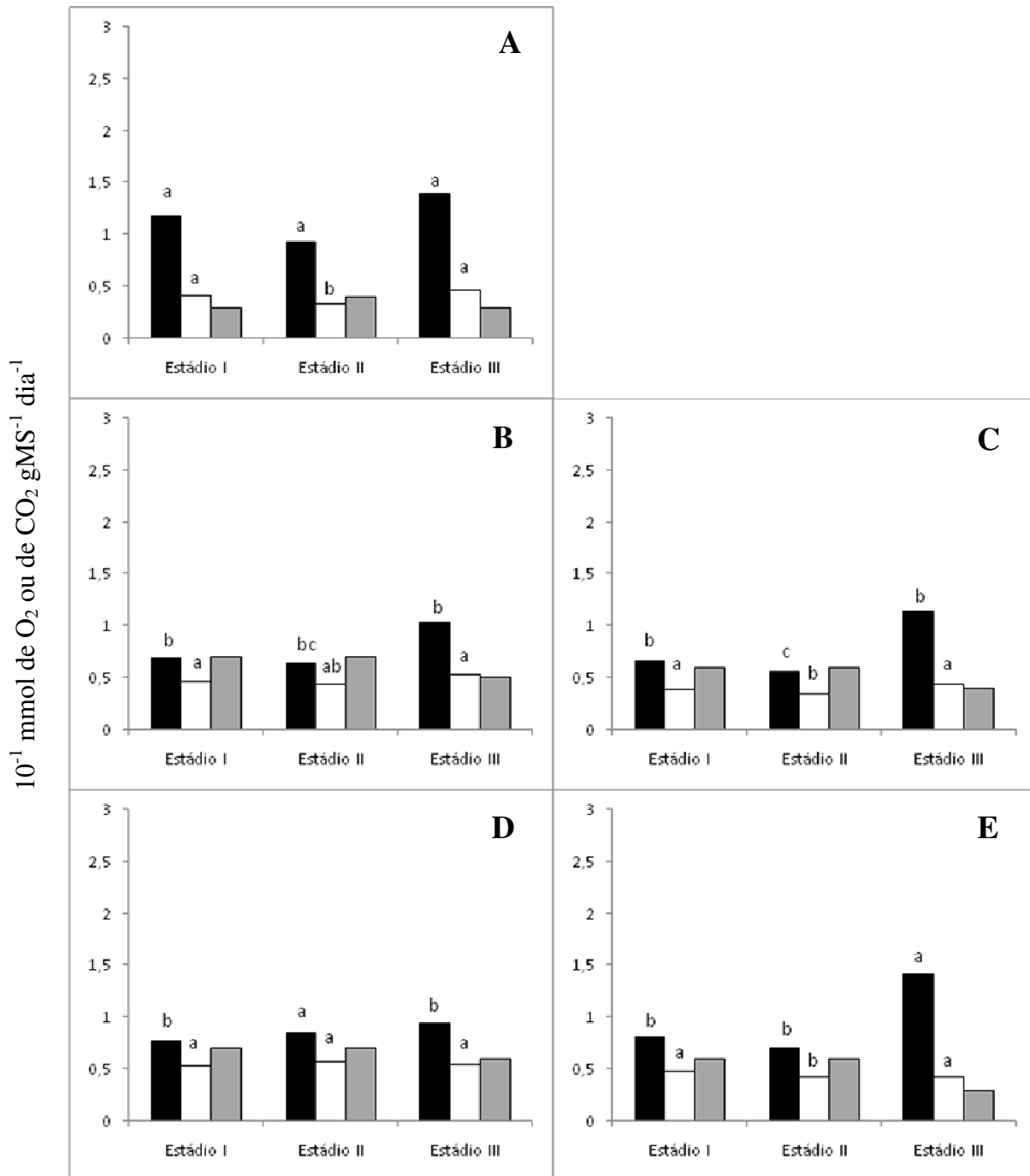


Figura 7. Consumo de O_2 (colunas pretas), liberação de CO_2 (colunas brancas) e quociente respiratório - QR (CO_2/O_2 , colunas em cinza), de embriões de *Inga vera* de três estádios de maturação, sem tratamento prévio (A) ou embebidos em solução de ABA 10^{-4} M por 24 h (B) e por 48 h (D) ou de PEG a -2,5 MPa por 24 h (C) e por 48 h (E), incubadas a 2°C. Valores seguidos pela mesma letra (dentro de pré-tratamentos) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

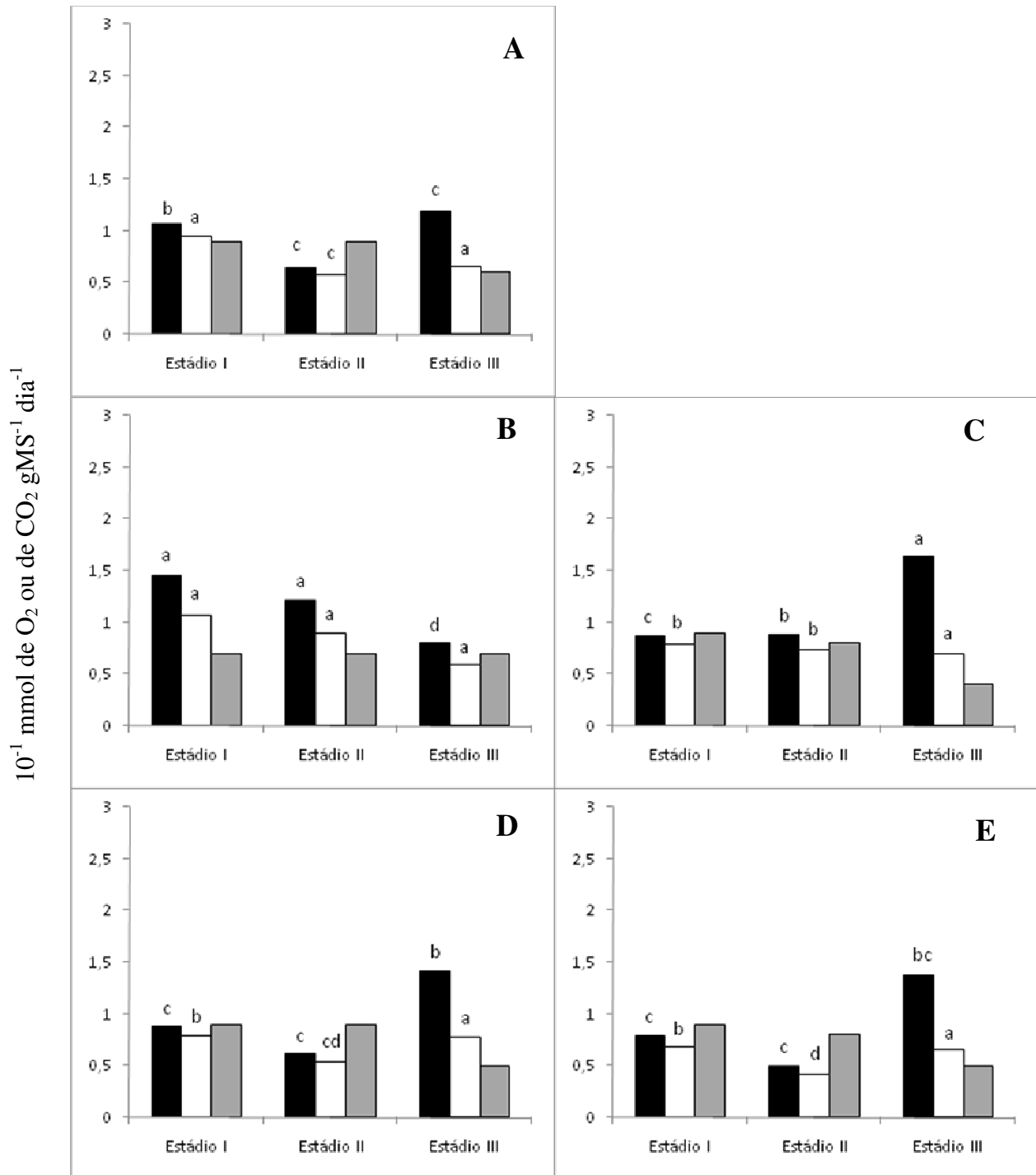


Figura 8. Consumo de O_2 (colunas pretas), liberação de CO_2 (colunas brancas) e quociente respiratório - QR (CO_2/O_2 , colunas em cinza), de embriões de *Inga vera* de três estádios de maturação, submetidos a secagem, sem tratamento prévio (A) ou embebidos em solução de ABA 10^{-4} M por 24 h (B) e por 48 h (D) ou de PEG a -2,5 MPa por 24 h (C) e por 48 h (E), incubadas a 2°C. Valores seguidos pela mesma letra (dentro de pré-tratamentos) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

De modo geral, a -2°C houve uma padronização para o consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono, independente de tratamento prévio dos embriões. Deve-se destacar ainda, maior consumo de oxigênio para os embriões do estágio III que os demais (figura 9). Considerando o processo de secagem observa-se a elevação da produção de dióxido de carbono aproximando-a do consumo de oxigênio nos embriões dos estágios I e II, sem tratamento prévio (figura 10).

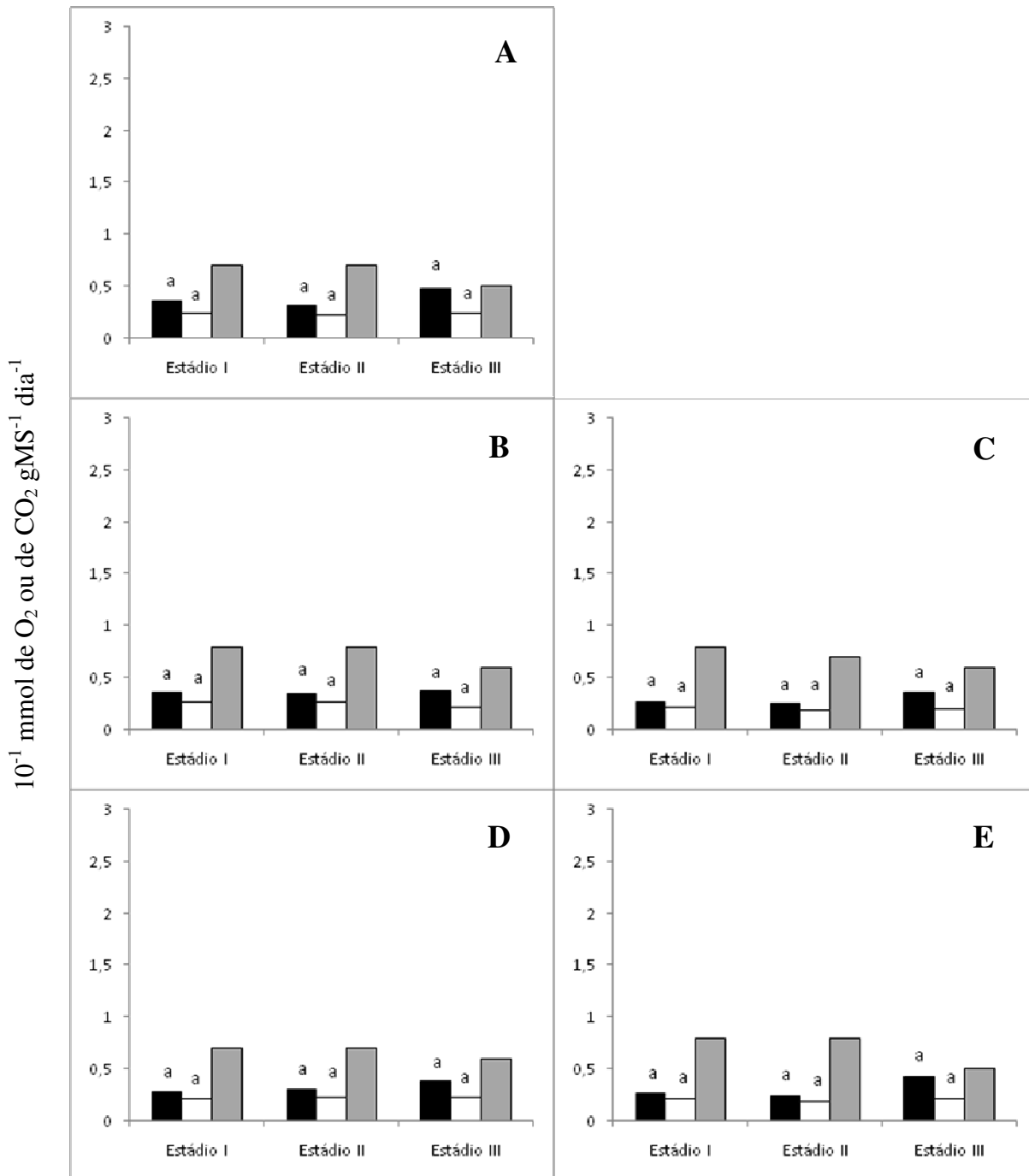


Figura 9. Consumo de O_2 (colunas pretas), liberação de CO_2 (colunas brancas) e quociente respiratório - QR (CO_2/O_2 , colunas em cinza), de embriões de *Inga vera* de três estádios de maturação, sem tratamento prévio (A) ou embebidos em solução de ABA 10^{-4} M por 24 h (B) e por 48 h (D) ou de PEG a -2,5 MPa por 24 h (C) e por 48 h (E), incubadas a $-2^{\circ}C$. Valores seguidos pela mesma letra (dentro de pré-tratamentos) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

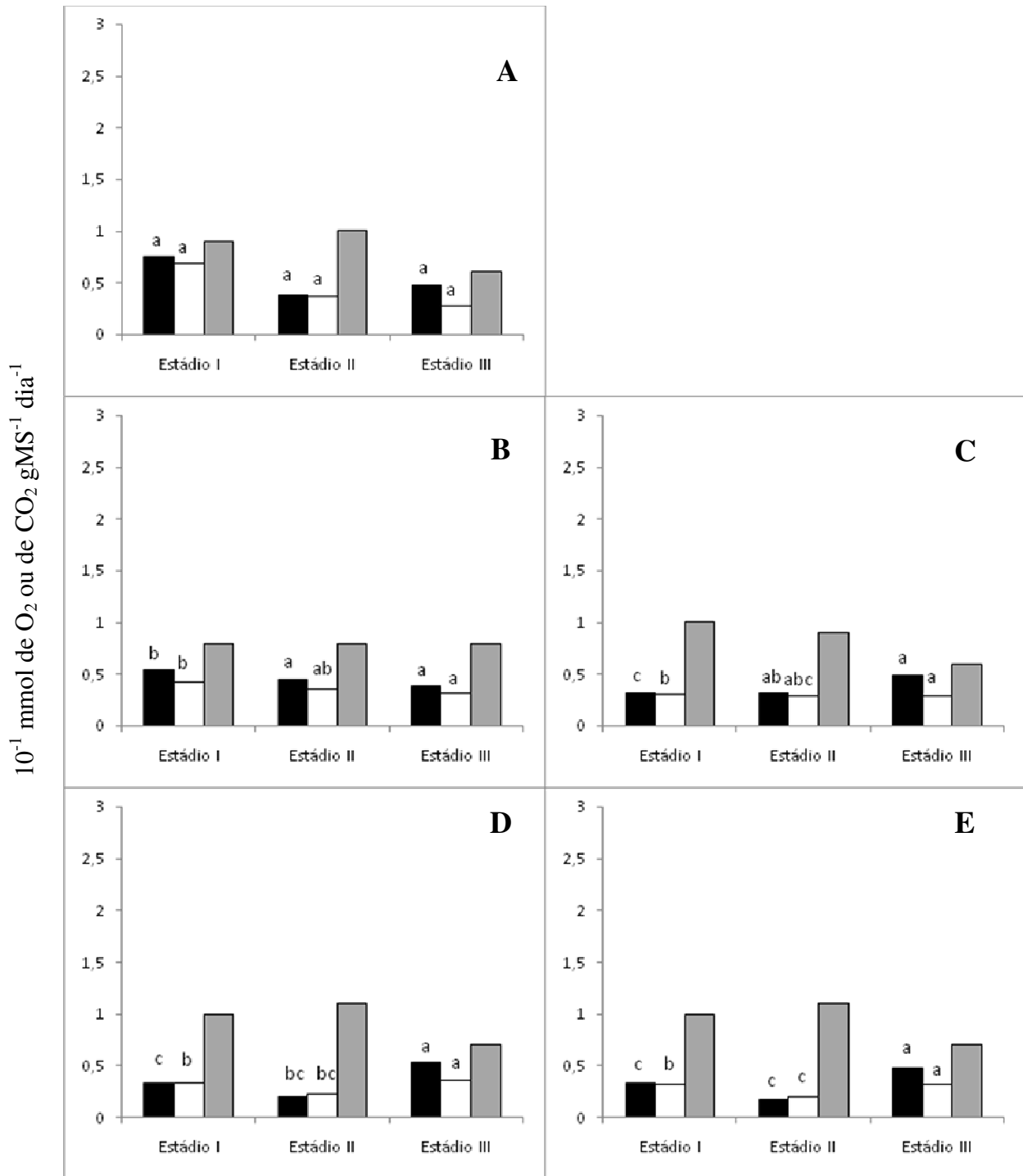


Figura 10. Consumo de O_2 (colunas pretas), liberação de CO_2 (colunas brancas) e quociente respiratório - QR (CO_2/O_2 , colunas em cinza), de embriões de *Inga vera* de três estádios de maturação, submetidos a secagem, sem tratamento prévio (A) ou embebidos em solução de ABA 10^{-4} M por 24 h (B) e por 48 h (D) ou de PEG a -2,5 MPa por 24 h (C) e por 48 h (E), incubadas a 15°C. Valores seguidos pela mesma letra (dentro de pré-tratamentos) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 24. Plântulas normais (%) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* do estágio I submetidos a pré-tratamentos com solução de ABA (10^{-4} M) ou de PEG (-2,5 MPa), por 24 e 48 horas e em dois níveis de hidratação (Sem secagem: $63\pm 3\%$; Com secagem: $53\pm 1\%$) e incubados durante 15 dias a -2°C e 10 dias nas demais temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas entre temperaturas, maiúsculas entre níveis de hidratação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Estádio I						
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Sem Secagem			Com Secagem		
-2	89,0	b	A	41,0	d	B
2	95,0	ab	A	57,0	c	B
5	97,0	a	A	61,0	bc	B
10	94,0	ab	A	68,0	b	B
15	97,0	a	A	77,0	a	B
Coeficiente de variação (%)				9,6		

Tabela 25. Germinação (%) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* do estágio II submetidos a pré-tratamentos com solução de ABA (10^{-4} M) ou de PEG (-2,5 MPa), por 24 e 48 horas e em dois níveis de hidratação (Sem secagem: $63 \pm 3\%$; Com secagem: $53 \pm 1\%$) incubados em diferentes temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas entre pré-tratamentos e maiúsculas entre os níveis de hidratação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Estádio II						
Pré-tratamentos	Sem Secagem			Com Secagem		
Controle	99,0	a	A	94,0	a	B
ABA24h	99,0	a	A	90,0	b	B
ABA48h	100,0	a	A	94,0	a	B
Estresse24h	99,0	a	A	97,0	a	B
Estresse48h	99,0	a	A	96,0	a	B
Coeficiente de variação (%) 4,0						

Tabela 27. Germinação (%) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* do estágio III submetidos a pré-tratamentos com solução de ABA (10^{-4} M) ou de PEG (-2,5 MPa), por 24 e 48 horas e em dois níveis de hidratação (Sem secagem: $63\pm 3\%$; Com secagem: $53\pm 1\%$) e incubados durante 15 dias a -2°C e 10 dias nas demais temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, maiúsculas dentro das linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Estádio III						
Pré-tratamentos	Sem Secagem			Com Secagem		
Controle	85,0	b	A	45,0	c	B
ABA24h	90,0	ab	A	60,0	b	B
ABA48h	93,0	ab	A	47,0	c	B
Estresse24h	92,0	ab	A	63,0	b	B
Estresse48h	94,0	a	A	73,0	a	B
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)						
-2	98,0	a	A	77,0	a	B
2	94,0	ab	A	68,0	b	B
5	89,0	b	A	48,0	c	B
10	77,0	c	A	31,0	d	B
15	97,0	ab	A	62,0	b	B
Coeficiente de variação (%) 11,8						

De modo geral, observa-se, com os resultados obtidos pelo teste de condutividade elétrica da solução, após o período de avaliação da respiração, que os embriões do estágio II, conservaram melhor sua qualidade fisiológica do que os demais. Isso sugere sua proximidade do ponto de maturidade fisiológica, pois, segundo Marcos Filho (2005), o sistema de membranas se organiza gradativamente durante a maturação e que a máxima organização é alcançada próximo da maturidade fisiológica (tabelas 28 a 30).

Tabela 28. Condutividade elétrica ($\mu\text{S.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* do estágio I submetidos a pré-tratamentos com solução de ABA (10^{-4}M) ou de PEG (-2,5 MPa), por 24 e 48 horas e em dois níveis de hidratação (Sem secagem: $63\pm 3\%$; Com secagem: $53\pm 1\%$) e incubados durante 15 dias a -2°C e 10 dias nas demais temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas entre temperaturas, maiúsculas entre pré-tratamentos e itálico entre os níveis de hidratação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Estádio I																				
Temperatura (°C)	Controle				ABA 24h				ABA 48h				Estres 24h				Estres 48h			
	Sem Secagem																			
-2	33,1	a	A	B	25,3	a	A	B	23,0	a	A	B	35,8	a	A	B	31,9	a	A	B
2	36,1	a	A	B	15,3	a	B	B	13,5	a	B	B	14,0	a	B	B	28,3	a	B	B
5	22,2	a	A	B	16,6	a	A	B	15,1	a	A	B	13,4	a	A	B	22,4	a	A	B
10	23,9	a	A	B	13,3	a	A	B	13,9	a	A	B	17,9	a	A	B	18,0	a	A	B
15	18,9	a	A	B	11,2	a	A	B	4,7	a	A	B	13,4	a	A	B	18,1	a	A	A
Temperatura (°C)	Com Secagem																			
-2	74,9	a	A	A	76,4	a	A	A	76,2	a	A	A	70,7	a	A	A	69,5	a	A	A
2	63,9	ab	A	A	64,2	ab	A	A	59,8	a	A	A	68,8	a	A	A	48,5	ab	A	A
5	74,7	a	A	A	67,2	a	AB	A	57,8	a	AB	A	46,4	ab	B	A	43,4	ab	B	A
10	61,3	ab	A	A	55,3	ab	A	A	64,8	a	A	A	40,9	b	A	A	49,2	ab	A	A
15	44,1	b	AB	A	40,1	b	AB	A	50,6	a	A	A	33,9	b	AB	A	23,6	b	B	A
Coeficiente de variação (%) 29,4																				

Tabela 29. Condutividade elétrica ($\mu\text{S.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* do estágio II submetidos a pré-tratamentos com solução de ABA (10^{-4}M) ou de PEG (-2,5 MPa), por 24 e 48 horas e em dois níveis de hidratação (Sem secagem: $63\pm 3\%$; Com secagem: $53\pm 1\%$) e incubados durante 15 dias a -2°C e 10 dias nas demais temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, maiúsculas dentro das linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Estádio II															
Secagens	Controle			ABA24h			ABA48h			Estresse24h			Estresse48h		
Sem Secagem	18,7	b	AB	13,5	b	B	11,9	b	B	17,7	b	AB	24,0	b	A
Com Secagem	56,0	a	AB	60,0	a	A	42,9	a	B	34,7	a	B	36,8	a	B
Temperaturas (°C)															
	-2			2			5			10			15		
	40,8		A	30,3		B	30,8		B	31,3		B	24,6		B
Coeficiente de variação (%) 31,3															

Tabela 30. Condutividade elétrica ($\mu\text{S.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* do estágio III submetidos a pré-tratamentos com solução de ABA (10^{-4}M) ou de PEG (-2,5 MPa), por 24 e 48 horas e em dois níveis de hidratação (Sem secagem: $63\pm 3\%$; Com secagem: $53\pm 1\%$) e incubados durante 15 dias a -2°C e 10 dias nas demais temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas entre temperaturas, maiúsculas entre pré-tratamentos e itálico entre os níveis de hidratação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Estádio III																				
Temperatura (°C)	Controle				ABA 24h				ABA 48h				Estres 24h				Estres 48h			
	Sem Secagem																			
-2	25,9	a	A	B	17,5	a	A	B	15,0	a	A	B	21,3	a	A	B	24,1	a	A	B
2	43,3	a	A	A	16,0	a	A	B	15,5	a	A	B	24,1	a	A	A	24,3	a	A	A
5	28,0	a	A	B	22,5	a	A	B	27,1	a	A	B	21,7	a	A	B	42,8	a	A	A
10	42,8	a	A	B	37,4	a	A	B	25,4	a	A	B	38,2	a	A	B	32,8	a	A	B
15	18,0	a	A	B	17,6	a	A	B	15,2	a	A	B	21,2	a	A	B	24,3	a	A	B
Temperatura (°C)	Com Secagem																			
-2	73,9	b	A	A	49,2	b	AB	A	39,7	c	B	A	58,3	a	AB	A	50,4	a	AB	A
2	56,2	b	A	A	39,9	b	A	A	62,5	c	A	A	44,1	a	A	A	42,0	a	A	A
5	113,0	a	A	A	60,3	b	B	A	111,8	b	A	A	50,1	a	B	A	52,6	a	B	A
10	140,6	a	A	A	96,3	a	B	A	165,9	a	A	A	74,4	a	B	A	74,0	a	B	A
15	58,8	b	B	A	55,2	b	B	A	107,0	b	A	A	59,2	a	B	A	68,8	a	B	A
Coeficiente de variação (%) 30,0																				

Diante do exposto pode se concluir que a escolha do estágio de maturação é decisivo para melhor conservar esses embriões. A sensibilidade desses embriões à dessecação e à redução de temperatura está relacionada diretamente com estágio de maturação. Devido à intensa atividade metabólica desses embriões, observaram-se processos que não o respiratório, que podem ser responsáveis pela dificuldade de sua conservação. O tratamento com ácido abscísico promoveu modificações nesse comportamento, resultado igualmente obtido com a aplicação de estresse osmótico. A dessecação mostrou-se eficiente na redução dos processos não respiratórios, porém, aumentam a taxa respiratória desses embriões. Por fim a redução da temperatura a -2°C diminui os processos respiratórios e não respiratórios, desses embriões.

Agradecimentos - Os autores agradecem à Fapesp (Proc. 2005/04139-7) e CNPq ((Processos: 481484/2007-8 e 477.640/2009) pelo apoio financeiro ao projeto; à Secretaria de Educação do Estado de São Paulo/Projeto Bolsa-Mestrado, pela bolsa concedida a M.R. Bonjovani; ao CNPq, pela bolsa de produtividade em pesquisa concedida a C.J. Barbedo; à CCR AutoBAN, pela permissão e apóio nas coletas de sementes.

Referências Bibliográficas

- ANDRÉO, Y., NAKAGAWA, J. & BARBEDO, C.J. 2006. Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Will. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington). *Revista Brasileira de Botânica* 29:309-318.
- BAILLY, C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* 14:93-107.
- BARBEDO, C.J., CICERO, S.M. 1998. Utilização do teste de condutividade elétrica para previsão do potencial germinativo de sementes de ingá. *Scientia Agricola*. 55:249-259.
- BARBEDO, C.J. & CICERO, S.M. 2000. Effects of initial quality, low temperature and ABA on the storage of seeds of *Inga uruguensis*, a tropical species with recalcitrant seeds. *Seed Science and Technology* 28:793-808.
- BARBEDO, C.J. & MARCOS FILHO, J. 1998. Tolerância à dessecação em sementes. *Acta Botanica Brasilica* 12:145-164.
- BERJAK, P. & PAMMENTER, N.W. 2008. From Avicennia to Zizania: Seed Recalcitrance in Perspective. *Annals of Botany* 101:213-228.
- BERJAK, P., SERSHEN., VARGHESE, B. & PAMMENTER, N.W. 2011. Cathodic amelioration of the adverse effects of oxidative stress accompanying procedures necessary for cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant-seeded species. *Seed Science Research*, 03:187-203.
- BILIA, D.A.C. & BARBEDO, C.J. 1997. Estudos de germinação e armazenamento de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. *Científica* 25:379-391.
- BILIA, D.A.C., MARCOS FILHO, J. & NOVEMBRE A.D.C.L. 1998. Conservação da qualidade fisiológica de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. *Revista Brasileira de Sementes* 20:48-54.

- BONJOVANI, M.R. 2007. Armazenamento de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington (Leguminosae) sob baixa temperatura. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, 89p.
- BONJOVANI, M.R. & BARBEDO, C.J. 2008. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. toleram temperatura sub-zero. Revista Brasileira de Botânica. 31:345-356.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2009. Regras para análise de sementes, Brasília, 395p.
- CAPRONI, E. 2007. Eletrólitos sólidos cerâmicos a base de oxido de zircônio para a detecção de oxigênio. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 74p.
- CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4.ed. Funep, Jaboticabal, 588p.
- CASTRO, R.D., BRADFORD, K.J. & HILHORST, H.W.M. 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In Germinação: do básico ao aplicado (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre, p.51-67.
- FARIA, J.M.R. 2006. Desiccation tolerance and sensitivity in *Medicago truncatula* and *Inga vera* seeds. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 143p.
- FELTRE, R. 1982. Química geral. 2.ed. Moderna, 364p.
- FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F (orgs.). 2004. Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre, 323p.
- FIGLIOLIA, M.B. & KAGEYAMA, P.Y. 1994. Maturação de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. em floresta ripária do rio Moji-Guaçu, Município de Moji-Guaçu. Revista do Instituto Florestal 6:13-52.
- HENDRY, G.A.F. 1993. Oxygen, free radical processes and seed longevity. Seed Science Research 3:141-153.
- HONG, T.D. & ELLIS, R.H. 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. Rome, IPGRI. 62p. (Technical Bulletin, 1).

- ISTA. 1985. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology*, 13:356-513.
- KADER, A.A. & SALTVEIT, M.E. 2002. Respiration and gas exchange. In: J.A. Bartz, J.K. Brecht & J. Weichmann. *Postharvest physiology and pathology of vegetables*. Marcel Dekker, New York, pp.7-29
- KOHAMA, S.; BILIA, D. A. C.; MALUF, A. M. & BARBEDO, C.J. 2006. Secagem de sementes de grumixama (*Eugenia brasiliensis*). *Revista Brasileira de Sementes* 28:01.
- LAMARCA, E.V. 2009. Taxas respiratórias e velocidade de deterioração de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. em função de variações hídricas e térmicas. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica de São Paulo, 98p.
- MAI-HONG, T., HONG, T.D., HIEN, N.T., HAI, H.H., TUNG, T.D., LE-TAM, V.T., NGOC-TAM, B. & ELLIS, R.H. 2006. Seed development, maturation and storage behaviour of *Mimusops elengi* L. *New Forest* 32:9-19.
- MARCOS FILHO, J. 2005. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Fealq, Piracicaba, 495p.
- MARENCO, R.A. & LOPES, N.F. 2007. *Fisiologia vegetal fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral*, Editora Universidade Federal de Viçosa, 469p.
- MELLO, J.I.O., BARBEDO, C.J., SALATINO, A., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 2010. Reserve carbohydrates and lipids from the seeds of four tropical tree species with different sensitivity to desiccation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53:889-899.
- MICHEL, B.E. & KAUFMANN, M.R. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 51:914-916.
- OLIVEIRA, D.M.T. & BELTRATI, C.M. 1992. Morfologia e desenvolvimento das plântulas de *Inga agifolia* e *I. uruguensis*. *Turrialba* 42:306-313.
- PAMMENTER, N.W. & BERJAK, P. 2000. Aspects recalcitrant seed physiology. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12:56-69.
- PAMMENTER, N.W., BERJAK, P., FARRANT, J.M., SMITH, M.T. & ROSS, G. 1994. Why do stored hydrated recalcitrant seeds die? *Seed Science Research*, 4:187-191.

- PRITCHARD, H.W., HAYE, A.J., WRIGHT, W.J. & STEADMAN, K.J. 1995. A comparative study of seed viability in *Inga* species: desiccation tolerance in relation to the physical characteristics and chemical composition of the embryo. *Seed Science & Technology* 23:85-100.
- ROACH, T., BECKETT, R.P., MINIBAYEVA, F.V., COLVILLE, L. & WHITAKER, C. 2010. Extracellular superoxide production, viability and redox poise in response to desiccation in recalcitrant *Castanea sativa* seeds. *Plant, Cell and Environment*. 33:59–75.
- ROBERTS, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science & Technology* 1:499-514.
- SANTANA, D.G. & RANAL, M. 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. Ed. Universidade de Brasília, Brasília, 248p.
- STEIL, M.C., FONSECA, F.C., FRANÇA, Y.V., REY, J.F.Q., MUCCILLO, E.N.S. & MUCCILLO, R. 2002. Montagem, calibração e testes de um sistema de medidas elétricas em função da temperatura e da pressão parcial de oxigênio. *Cerâmica* 48:146-152.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. Fisiologia vegetal. 3.ed. Artmed, Porto Alegre, 719p.
- VERTUCCI, C.W. 1993. Predicting the optimum storage conditions for seeds using thermodynamic principles. *Journal of Seed Technology* 17:41-53.
- VERTUCCI, C.W. & FARRANT, J.M. 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. *In* Seed development and germination (J. Kigel & G. Galili, eds.). Marcel Dekker Inc., New York, p.237-271.
- VILLELA, F. A. & PERES, W. B. 2004. Coleta, beneficiamento e armazenamento. *In* Germinação: do básico ao aplicado (A. G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre, p. 265-281.

5. Considerações Finais

No presente trabalho, foi possível observar que os embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* em diferentes estádios de maturação com diferentes níveis de hidratação apresentam uma elevada taxa respiratória. O mesmo comportamento pode ser observado nos embriões recém colhidos incubados até mesmo nas temperaturas próximas de congelamento e só cessam quando congeladas, provavelmente com a semente morta.

Além da elevada taxa respiratória, observada pela produção de CO₂, nota-se a entrada excessiva de O₂, proveniente de processos não respiratórios. O tratamento com ácido abscísico e estresse hídrico, aparentemente, promoveu modificações nesse comportamento, equiparando o consumo de O₂ e a liberação de CO₂. Talvez esses procedimentos não estejam regulando a respiração, porém reduziu-se o desequilíbrio entre a entrada de O₂ e a liberação de CO₂. Ficou evidente, também, a influência do grau de maturidade fisiológica das sementes sobre esses processos.

Apesar da existência de processos que não a respiração na semente totalmente hidratada, seus efeitos não foram imediatos, pois, não foram observados no período de incubação desses embriões.

Portanto, a dificuldade em conservar a viabilidade fisiológica dessas sementes, provavelmente, se dá devido ao seu elevado metabolismo e dos processos não respiratórios observados. Em vista disso, para conservar sementes com elevado conteúdo de água devem-se conter processos não respiratórios.

6. Conclusões

Os estudos realizados permitem concluir que:

- uma pequena redução no teor de água, por secagem direta ou pela utilização de soluções osmóticas, de sementes recém-colhidas pode melhorar a sua tolerância tanto à dessecação quanto às baixas temperaturas;
- a redução da temperatura de armazenamento, até níveis que não permitam o congelamento dos tecidos, é realmente eficiente na redução do metabolismo, diminuindo as taxas respiratórias das sementes e ampliando o seu potencial de armazenamento. Contudo, mesmo com essa redução da temperatura ocorrem processos não respiratórios ainda não identificados;
- a redução parcial no teor de água, por secagem e tratamentos de estresse induzido têm potencial para reduzir os processos não respiratórios observados mas podem, simultaneamente, aumentar as taxas respiratórias e prejudicar a capacidade germinativa dessas sementes;
- o grau de maturidade dessas sementes influi nos resultados observados.

7. Referências Bibliográficas

- ANDRÉO, Y., NAKAGAWA, J. & BARBEDO, C.J. 2006. Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Will. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington). *Revista Brasileira de Botânica* 29:309-318.
- BAILLY, C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* 14:93-107.
- BARBEDO, C.J. & BILIA, D.A.C. 1997. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de *Inga uruguensis* Hook. & Arn. em função da remoção de sarcotesta. *Informativo ABRATES* 7:54-56.
- BARBEDO, C.J. & CICERO, S.M. 2000. Effects of initial quality, low temperature and ABA on the storage of seeds of *Inga uruguensis*, a tropical species with recalcitrant seeds. *Seed Science and Technology* 28:793-808.
- BARBEDO, C.J. & MARCOS FILHO, J. 1998. Tolerância à dessecação em sementes. *Acta Botanica Brasilica* 12:145-164.
- BERJAK, P. & PAMMENTER, N.W. 2008. From Avicennia to Zizania: Seed Recalcitrance in Perspective. *Annals of Botany* 101:213-228.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1994. *Seeds: physiology of development and germination*. 2.ed. Plenum Press, New York, 445p.
- BILIA, D.A.C. & BARBEDO, C.J. 1997. Estudos de germinação e armazenamento de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. *Científica* 25:379-391.
- BILIA, D.A.C., BARBEDO, C.J., CICERO, S.M. & MARCOS FILHO, J. 2003. Ingá: uma espécie importante para recomposição vegetal em florestas ripárias, com sementes interessantes para a ciência. *Informativo ABRATES* 13:26-30.
- BILIA, D.A.C., MARCOS FILHO, J. & NOVEMBRE A.D.C.L. 1998. Conservação da qualidade fisiológica de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. *Revista Brasileira de Sementes* 20:48-54.
- BLACK, M. & PRICHARD, H.W. 2002. *Disiccation and survival in plants: drying without dying*. CABI Publishing, Wallingford, 412p.

- BONJOVANI, M.R. 2007. Armazenamento de embriões de *Inga vera* ssp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington (Leguminosae) sob baixa temperatura. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, 89p.
- BONJOVANI, M.R. & BARBEDO, C.J. 2008. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. toleram temperatura sub-zero. Revista Brasileira de Botânica. 31:345-356.
- BOTANIC GARDENS CONSERVATION INTERNATIONAL. 2001. Normas internacionais de conservação para jardins botânicos. Conselho Nacional do Meio Ambiente/Rede Brasileira de jardins botânicos/Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro/EMC, Rio de Janeiro, 109p.
- CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4.ed. Funep, Jaboticabal, 588p.
- CARVALHO, P.E.R. 1994. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Embrapa/CNPQ, Brasília, 640p.
- CASTRO, R.D. & HILHORST, H.W.M. 2004. Embebição e reativação do metabolismo, In Germinação: do básico ao aplicado (A. G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre, p.149-162.
- CASTRO, R.D., BRADFORD, K.J. & HILHORST, H.W.M. 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In Germinação: do básico ao aplicado (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre, p.51-67.
- CHIN, H.F., KRISHNAPILLAY, B. & STANWOOD, P.C. 1989. Seed moisture: recalcitrant vs orthodox seeds. In Seed moisture (P.C. Stanwood & M.B.McDonald, eds.). Crop Science Society of America, Madison, p.15-22.
- CUSTÓDIO FILHO, A. & MANTOVANI, W. 1986. Flora fanerogâmica da Reserva Estadual das Fontes do Iperanga. Hoehnea 13:113-140.
- DAHAL, P., KIM, N.S. & BRADFORD, K.J. 1996. Respiration and germination rates of tomato seeds at suboptimal temperatures and reduced water potentials. Journal of Experimental Botany 47: 941-947.

- DURIGAN, G., FIGLIOLIA, M.B., KAWABATA, M., GARRIDO, M.A.O. & BAITELLO, J.B. 1997. Sementes e mudas de árvores tropicais. Páginas & Letras, São Paulo, 65p.
- EIRA, M.T.S. 1996. Classificação de sementes em ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias. *In* Curso Sobre Conservação De Germoplasma Vegetal, Brasília, 1994. IICA-PROCISUR, Montevideo, p. 119-22. (IICA-PROCISUR, Diálogo, 45).
- FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F (orgs.). 2004. Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre, 323p.
- FIGLIOLIA, M.B. & KAGEYAMA, P.Y. 1994. Maturação de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. em floresta ripária do rio Moji-Guaçu, Município de Moji-Guaçu. Revista do Instituto Florestal 6:13-52.
- FONSECA, S.C.L. & FREIRE, H.B. 2003. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. Bragantia 62:297-303.
- FUJIKAWA, S. 1980. Freeze -fracture and etching studies on membrane damage on human erythrocytes caused by formation of intracellular ice. Cryobiology 17:351-362.
- GUY, C.L. 2003. Freezing tolerance of plants: current understanding and selected emerging concepts. Canadian Journal of Botany 81:1216-1223.
- HENDRY, G.A.F.; FINCH-SAVAGE, W.E.; THORPE, P.C.; ATHERTON, N.M.; BUCKLAND, S.M.; NILSSON, K.A. & SEEL, W.A. 1992. Free radical processes and loss of viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. New Phytologist, 122:273-279.
- HONG, T.D. & ELLIS, R.H. 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. Rome, IPGRI. 62p. (Technical Bulletin, 1).
- JOLY, A.B. 1993. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. 11.ed. Ed. Nacional, São Paulo, 778p.
- KERMODE, A.R. & FINCH-SAVAGE, B.E. 2002. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. *In* Desiccation and survival in plants: drying without dying (M. Black & H.W. Pritchard, eds.). CABI Publishing, New York, p.149-184.

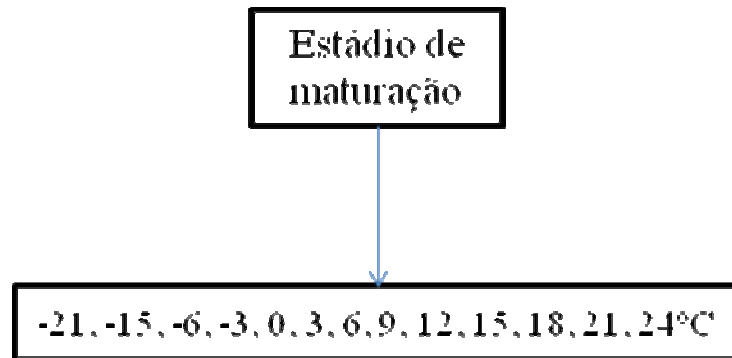
- KOHAMA, S.; BILIA, D. A. C.; MALUF, A. M. & BARBEDO, C.J. 2006. Secagem de sementes de grumixama (*Eugenia brasiliensis*). *Revista Brasileira de Sementes* 28:01.
- LARCHER, W. 2000. *Ecofisiologia vegetal*. Ed. Rima, São Carlos, 531p.
- LORENZI, H. 1992. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Plantarum, Nova Odessa, 352p.
- MARCOS FILHO, J. 2005. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Fealq, Piracicaba, 495p.
- MARENCO, R.A. & LOPES, N.F. 2007. *Fisiologia vegetal fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral*, Editora Universidade Federal de Viçosa, 469p.
- MITTERMEIER, R. A., MYERS, N., GIL, P. R. & MITTERMEIER, C. G. 1999. Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. CEMEX, Sierra Madre, 432p.
- MONTAGNINI, F., FAZERES, A. & VINHA, S.G. 1995. The potentials of 20 indigenous tree species for soil rehabilitation in the Atlantic Forest region of Bahias, Brazil. *Journal of Applied Ecology* 32:841-856.
- OLIVEIRA, D.M.T. & BELTRATI, C.M. 1992. Morfologia e desenvolvimento das plântulas de *Inga agifolia* e *I. uruguensis*. *Turrialba* 42:306-313.
- OLIVEIRA, D.M.T. & BELTRATI, C.M. 1993. Aspectos anatômicos dos frutos e sementes em desenvolvimento de *Inga fagifolia* (Fabaceae: Mimosoideae). *Revista Brasileira de Biologia* 53:625-636.
- PAMMENTER, N.W. & BERJAK, P. 2000. Aspects recalcitrant seed physiology. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 12:56-69.
- PAMMENTER, N.W., BERJAK, P., FARRANT, J.M., SMITH, M.T. & ROSS, G. 1994. Why do stored hydrated recalcitrant seeds die? *Seed Science Reseuuh*. 4:187-191.
- PENNINGTON, T. D. 2000. The genus *Inga*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- PRITCHARD, H.W., HAYE, A.J., WRIGHT, W.J. & STEADMAN, K.J. 1995. A comparative study of seed viability in *Inga* species: desiccation tolerance in relation to the

- physical characteristics and chemical composition of the embryo. *Seed Science & Technology* 23:85-100.
- ROACH, T., BECKETT, R.P., MINIBAYEVA, F.V., COLVILLE, L. & WHITAKER, C. 2010. Extracellular superoxide production, viability and redox poise in response to desiccation in recalcitrant *Castanea sativa* seeds. *Plant, Cell and Environment*. 33:59–75.
- ROBERTS, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science & Technology* 1:499-514.
- ROCHA, Y.T. 2004. Ibirapitanga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) do descobrimento à atualidade. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 398p.
- SANCHOTENE, M.C.C. 1989. Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana. FEPLAN, Porto Alegre, 309p.
- SANTOS, I.R.I. 2001. Criopreservação de germoplasma vegetal. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 20:60-65.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. *Fisiologia vegetal*. 3.ed. Artmed, Porto Alegre, 719p.
- VERTUCCI, C.W. & FARRANT, J.M. 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. *In* Seed development and germination (J. Kigel & G. Galili, eds.). Marcel Dekker Inc., New York, p.237-271.
- VERTUCCI, C.W. 1993. Predicting the optimum storage conditions for seeds using thermodynamic principles. *Journal of Seed Technology* 17:41-53.
- VILLELA, F.A. 1998. Water relations in seed biology. *Scientia Agricola* 55(Especial):98-101.
- VILLELA, F.A.; DONI-FILHO, L. & SERQUEIRA, E.L. 1991. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6000 e da temperatura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 26:1957-1968.
- VILLELA, F.A. & MARCOS FILHO, J. 1998. Estados energéticos e tipos de água na semente. *Revista Brasileira de Sementes* 20:317-321.

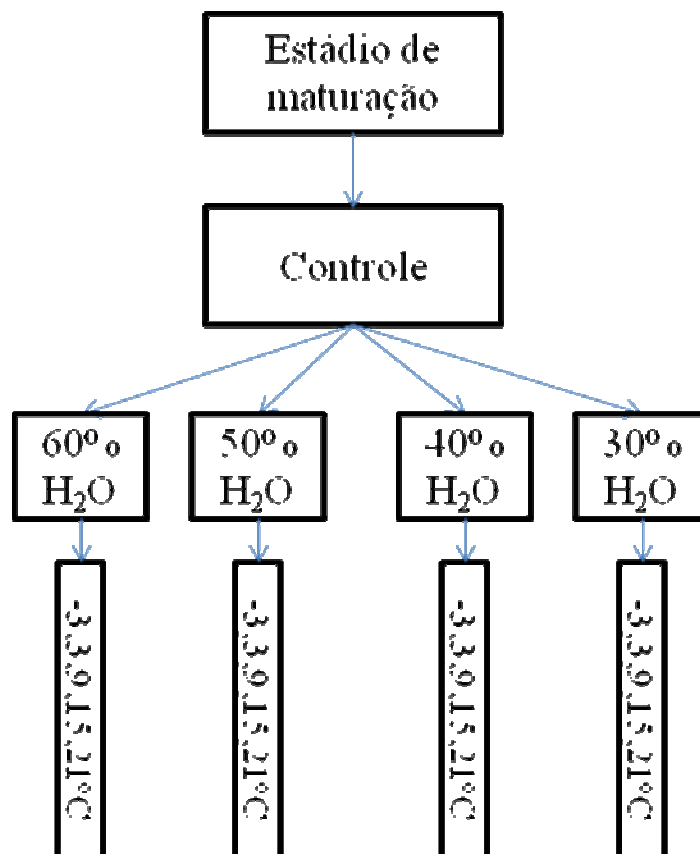
- VILLELA, F. A. & PERES, W. B. 2004. Coleta, beneficiamento e armazenamento. *In* Germinação: do básico ao aplicado (A. G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre, p. 265-281.
- WALTERS, C. 2000. Levels of recalcitrance in seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia* 12(especial): 7-21.
- WALTERS, C., RAO, N.K. & HU, X. 1998. Optimizing seed water content to improve longevity in *ex situ* genebanks. *Seed Science Research* 8:15-22.

8. Anexo

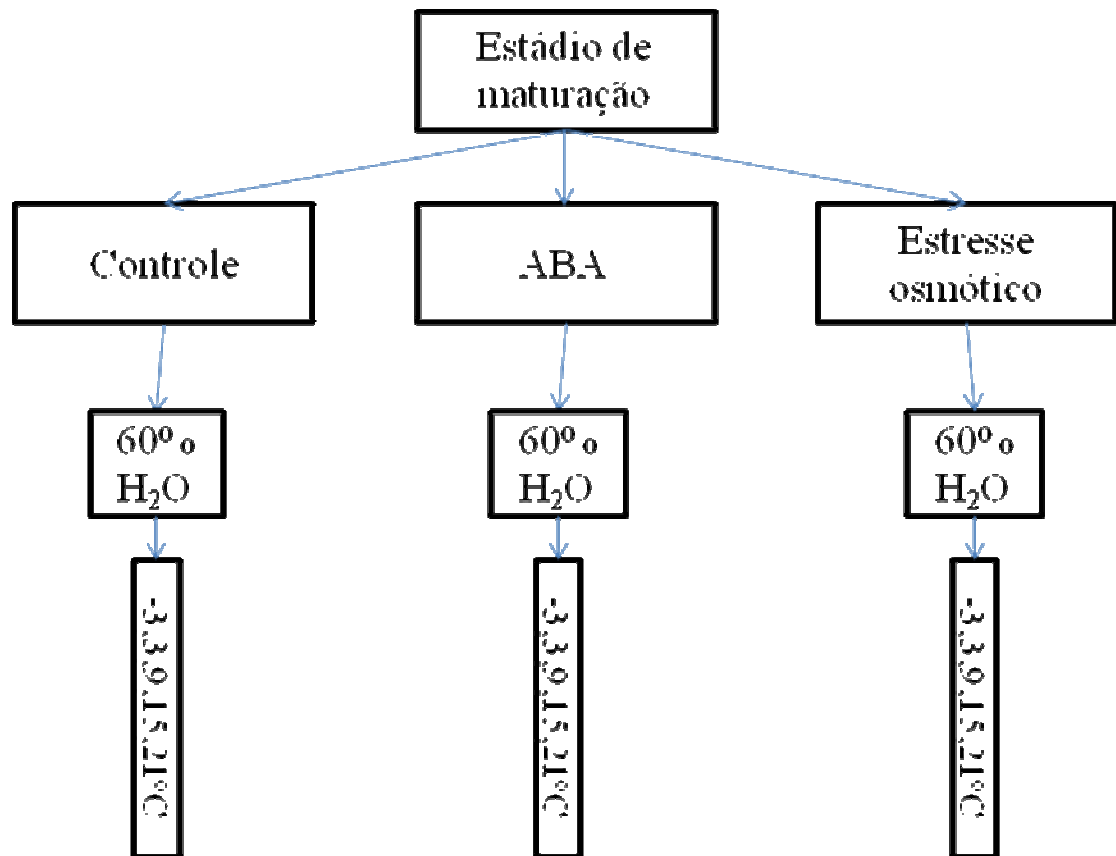
8.1. Fluxograma do experimento: *Taxas respiratórias de embriões sob diferentes temperaturas.*



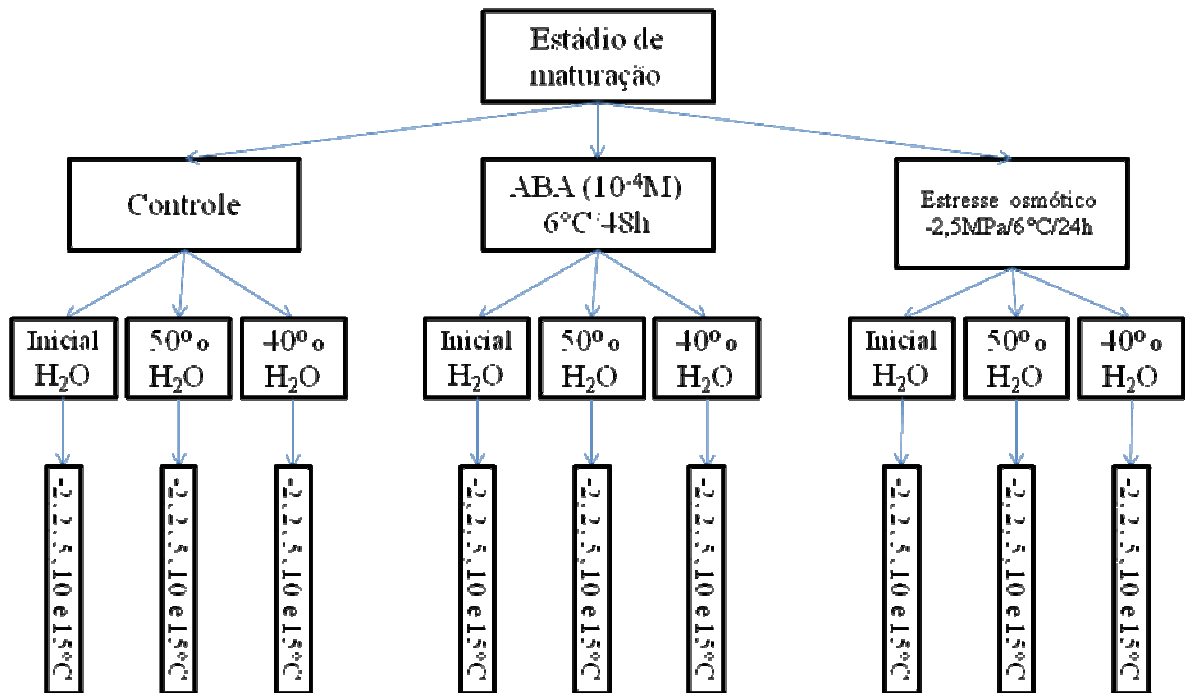
8.2. Fluxograma do experimento: *Taxas respiratórias de embriões com diferentes níveis de hidratação.*



- 8.3. Fluxograma do experimento: *Taxas respiratórias de embriões após aplicação de ácido abscísico e estresse osmótico.*



- 8.4. Fluxograma do experimento: *Taxas respiratórias de embriões em diferentes níveis de hidratação após aplicação de ácido abscísico e estresse osmótico.*



8.5. Fluxograma do experimento: *Taxas respiratórias de embriões em dois níveis de hidratação após aplicação de ácido abscísico e estresse osmótico por 24 e 48 horas.*

