

TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES

Claudio José Barbedo¹
Júlio Marcos Filho²

Recebido em 17/03/98. Aceito em 8/06/98

RESUMO – (Tolerância à dessecação em sementes). São apresentadas algumas considerações sobre a tolerância das sementes à dessecação, analisando-se os principais trabalhos desenvolvidos com sementes ortodoxas e recalcitrantes. São levantados aspectos considerados importantes no entendimento desta tolerância, como as fases de desenvolvimento e de germinação das sementes, a participação do ácido abscísico, do DNA, de RNAs, de proteínas e de açúcares, as propriedades da água, os radicais livres e particularidades das sementes recalcitrantes. São feitas considerações quanto a perspectivas de ação na área.

Palavras-chave – recalcitrante, armazenamento, conservação de sementes

ABSTRACT – (Desiccation tolerance on seeds). Some comments on desiccation tolerance of seeds are presented, with analysis of the main works carried out with orthodox and recalcitrant seeds. It was analysed the aspects that are considered important on this tolerance, as seed developing and germination stages, abscisic acid, DNA, RNAs, proteins, sugars, water properties, free radicals and particularities of recalcitrant seeds. Some action perspectives on this issue are presented.

Key words – recalcitrant, storage, seed conservation

Introdução

Durante o período de formação e maturação das sementes, a água assume papel crucial, atuando inicialmente na expansão e divisão celular e, posteriormente, como veículo para os produtos da fotossíntese que farão parte dos tecidos da semente ou serão armazenados para futura utilização nas fases iniciais da germinação. Assim, até o final do desenvolvimento, o teor de água das sementes permanece elevado, normalmente acima de 30 a 40% do peso úmido. Ao final da maturação, dois tipos de comportamento podem ser observados quanto ao teor de água das sementes: no primeiro, verificado na maioria das sementes ortodoxas, há rápida redução no teor de água até valores próximos a 10%, variando em função da espécie, o que torna o ambiente na semente impróprio à germinação

¹ Instituto de Botânica, C. Postal 4005, CEP 01061-970, São Paulo, SP

² ESALQ, USP, Av. Pádua Dias 11, C. Postal 9, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil. Bolsista do CNPq

pela falta de água disponível (quiescência). No segundo, verificado na maioria das sementes recalcitrantes, o teor de água permanece elevado e, uma vez que as sementes nesta fase já estão completamente formadas, inicia-se o processo germinativo, o que algumas vezes ocorre ainda na planta-mãe (viviparidade). As sementes ortodoxas, geralmente, não só toleram a dessecação mas, provavelmente, dependem dela para redirecionar os processos metabólicos do desenvolvimento em direção à germinação. Em contraste, as recalcitrantes não apenas são independentes dessa secagem para adquirir a capacidade germinativa, como ainda apresentam limites de tolerância à dessecação.

Essa diferença no comportamento das sementes pode ser considerada como resultado do processo de seleção natural, em concordância com as condições ambientais em que a espécie se desenvolveu. As sementes ortodoxas, que atualmente correspondem à grande maioria das espécies cultivadas, provavelmente necessitaram, durante seu processo de seleção, atravessar períodos inadequados ao desenvolvimento das plântulas; assim, as sementes que germinaram logo que seu processo de formação e maturação havia sido concluído, produziram plântulas incapazes de sobreviver às condições adversas. Foram selecionadas, desta forma, as plantas cujas sementes germinavam apenas quando as condições do meio fossem favoráveis ao desenvolvimento das plântulas. O baixo teor de água das sementes, neste caso, além de limitar a germinação, foi fundamental para evitar a deterioração das mesmas pelo ataque da micro ou mesofauna.

Por outro lado, o ambiente no qual as sementes recalcitrantes foram selecionadas apresentava, provavelmente, condições para o desenvolvimento das plântulas ao longo de todo o ano. Assim, ou as sementes germinavam logo após sua queda das árvores, ou não sobreviveriam à concorrência com sementes de outras espécies. A perda de água ao final da maturação, neste caso, acrescentaria a dependência por mais um fator externo, ou seja, a presença de água suficiente para iniciar o processo germinativo. Além disso, armazenadas secas no solo, as sementes caminhariam para a deterioração ou para a germinação sob condições desfavoráveis ao desenvolvimento das plântulas. A perpetuação da espécie, desta forma, seria prejudicada.

Que mecanismos estariam envolvidos na tolerância à dessecação e que diferenças bioquímicas ou fisiológicas seriam responsáveis pelas diferenças de comportamento entre os dois tipos de sementes?

A maioria das espécies cultivadas, desde os tempos mais remotos da agricultura, enquadra-se na categoria das ortodoxas e, desta forma, a etapa de secagem ao final do desenvolvimento da semente sempre foi considerada como padrão. A maior tolerância à dessecação destas sementes, em relação às recalcitrantes, foi característica vantajosa e muito bem empregada pelo homem, na produção agrícola. Entretanto, mais recentemente, quando se passou a estudar com maior profundidade os ecossistemas tropicais, principalmente os silvícolas, foi-se verificando que o número de espécies com sementes recalcitrantes era alto.

Nos últimos anos, vários estudos começaram a ser realizados visando comparar a diferença entre o comportamento de sementes recalcitrantes e ortodoxas, principalmente nos aspectos fisiológicos e bioquímicos, incluindo a tolerância à dessecação (Berjak *et al.* 1990; Leprince *et al.* 1993; Ooms *et al.* 1993; Neves 1994; Kermodé 1997).

O estudo da tolerância ou sensibilidade à dessecação, que agora não mais se limita às espécies de sementes recalcitrantes, vem trazendo importantes informações ao melhor conhecimento dos processos biológicos que ocorrem na semente. Nesta revisão, concentram-se e discutem-se informações de literatura, com o intuito de esclarecer aspectos de alguns dos fatores formadores de grupos distintos de sementes quanto à tolerância a dessecação.

Fases de desenvolvimento e germinação e suas relações com a desidratação

Para grande parte das espécies vegetais, o desenvolvimento da semente só é considerado completo após o período de secagem. Sementes de várias espécies permanecem dormentes, se o período de secagem for suprimido.

O desenvolvimento das sementes ortodoxas pode ser dividido em duas fases (Bewley & Black 1985); a fase inicial, quando a secagem é letal, e a fase subsequente, que vai até o final do desenvolvimento da semente, em que a mesma pode ser tolerante à dessecação, ou seja, mantém a capacidade de germinar quando desidratada e reidratada. Três fases são reconhecidas (Jiang & Kermodé 1994), considerando-se o estágio fisiológico de desenvolvimento das sementes. O primeiro estágio corresponde à histodiferenciação, onde o zigoto unicelular sofre sucessivas divisões mitóticas seguidas de diferenciação para formar o eixo embrionário e o(s) cotilédono(s), além do desenvolvimento do endosperma triplóide. Segue-se, então, a fase de expansão celular e deposição de reservas nas células. O estágio final (sementes ortodoxas) corresponde à secagem; há redução do metabolismo, com a passagem do embrião para o estágio metabolicamente inativo ou quiescente. Mesmo nesta forma de divisão, há dois períodos distintos durante o desenvolvimento da semente, quando se considera apenas a secagem: intolerante (primeira fase e parte da segunda) e tolerante (parte da segunda fase e toda a terceira fase) à dessecação.

O conhecimento das fases de intolerância e de resistência à dessecação são fundamentais para o entendimento dos mecanismos controladores dos processos de formação/maturação de sementes e dos processos envolvidos na germinação.

O desenvolvimento da semente e a germinação são estágios fisiológicos distintos no ciclo de vida da planta e mostram diferenças marcantes. O metabolismo durante o desenvolvimento da semente é predominantemente anabólico, com massivo processo de síntese e deposição de reservas de polímeros nos tecidos. Já na germinação, há mobilização destas reservas e são observadas mudanças qualitativas e quantitativas nas enzimas catabólicas. Os produtos deste processo degradativo são utilizados como substrato e fonte de energia para o desenvolvimento das plântulas. Esta distinção entre as duas fases implica na existência de uma chave (*switch*) para efetuar a transição (Jiang & Kermodé 1994).

Esta chave, provavelmente relacionada com a secagem, foi observada em sementes de feijão (Dasgupta & Bewley 1982) e de soja (Rosenberg & Rinne 1989). Estes autores demonstraram o drástico redirecionamento no metabolismo da semente que, quando amadurecida sob desidratação controlada, apresentou paralisação na formação de proteínas de reserva, acompanhada de hidrólise dos polipeptídeos armazenados. As

sementes não submetidas à desidratação controlada continuaram a sintetizar proteínas de reserva. A secagem, então, pode modificar o padrão da síntese protéica, reduzindo a produção de RNAs-m no eixo embrionário, relacionados com a formação de proteínas envolvidas no desenvolvimento da semente, chegando, inclusive, a cessar a produção destes RNAs-m (Bewley & Black 1985). Enquanto isso, a produção de RNAs-m relacionados aos processos germinativos é ativada. Enzimas associadas exclusivamente a processos pós-germinativos têm sua produção induzida pela secagem da semente durante seu processo de desenvolvimento/maturação.

É fundamental, porém, que a dessecação seja controlada; há diferença entre a secagem rápida e a secagem lenta. A secagem lenta de sementes imaturas de soja, por exemplo, resultou em sementes viáveis, com degradação de clorofila e formação de enzimas específicas da germinação, enquanto a secagem rápida resultou em sementes inviáveis, de coloração verde e sem formação das enzimas de germinação (Adams *et al.* 1983).

O comportamento dos embriões imaturos, extraídos das sementes com ou sem subsequente secagem, no início do desenvolvimento, pode ser similar entre si e em relação ao da semente madura. Posteriormente, porém, são verificadas diferenças (Kermode & Bewley 1988). Nas sementes não dessecadas durante o desenvolvimento, o tecido circunscrito ao embrião inibe sua germinação, mantendo o metabolismo de desenvolvimento, enquanto nas sementes dessecadas (natural ou artificialmente) há estímulo para a mudança de fase, do desenvolvimento à germinação, por este mesmo tecido. Em algumas sementes pode-se, até, induzir a germinação de seu eixo embrionário, sem a redução do teor de água, porém não necessariamente ocorrerá o desenvolvimento posterior das plântulas oriundas deste processo. Este desenvolvimento posterior continuaria sendo dependente daquela redução no teor de água (Rosenberg & Rinne 1986). Kermode & Bewley (1985a) já haviam observado, em sementes de mamona, que apenas a partir da metade do ciclo do desenvolvimento as mesmas adquiriram a tolerância à dessecação, ou seja, quando ainda não havia ocorrido a maioria dos eventos (deposição de reservas e secagem natural). Tal tolerância só foi obtida próximo à fase de maturação, o que também foi observado em sementes de feijão-fava, lentilha, grão-de-bico, tremoço-branco, soja e ervilha (Ellis *et al.* 1987). Os autores concluíram, então, que a secagem provavelmente atua nos processos finais de desenvolvimento, preparando a semente para a germinação e para o crescimento da plântula.

Assim, algumas questões importantes estão sendo formuladas com relação aos processos envolvidos na embriogênese e na germinação, merecendo destaque duas grandes áreas de estudo. A primeira investiga quais são os fatores ou reguladores que mantêm o embrião na fase de desenvolvimento, evitando sua germinação. A segunda estuda os fatores que estimulam o início da fase de germinação, em detrimento da continuação do processo de desenvolvimento da semente (Jiang & Kermode 1994). Há, ainda, uma terceira, mais recente, que vem ganhando expressão: em diversas espécies, em nenhum momento do desenvolvimento de suas sementes se verificou tolerância à dessecação. Estas sementes germinam sem necessitar secagem. Apresentam grande dificuldade em sua conservação por não suportarem a redução do teor de água. Estas

sementes foram, inicialmente, separadas em um único grupo, recebendo a denominação de sementes recalcitrantes.

Este comportamento, diferenciado do encontrado em espécies ortodoxas, ocorre em sementes de *Araucaria angustifolia* (Espíndola *et al.* 1994), de *Shorea roxburgii*, de *Hopea odorata*, de *Mangifera indica*, de *Symphonia globulifera* (Corbineau & Côme 1988) e de *Quercus robur* (Gosling 1989). Nesta última, Gosling (1989) verificou que a intolerância à dessecação foi mais pronunciada quando o teor de água era inferior a 40%, indicando o limite crítico, abaixo do qual os danos seriam cada vez maiores para a semente.

É interessante mencionar que a independência de secagem, para a complementação do desenvolvimento da semente, pode ocorrer também em sementes ortodoxas. Em tomate, por exemplo, Berry & Bewley (1991) retiraram sementes imaturas dos frutos (35 dias após a antese) e mantiveram-nas em meio úmido. Estas puderam germinar e formar plântulas normais.

Os trabalhos mais recentes, abordando as interações entre as fases de formação e a dessecação das sementes, apontam para a probabilidade de que esta última seja fator indiretamente ligado à aquisição da capacidade germinativa, porém não insubstituível. Estes trabalhos também mostram a necessidade de intensificação dos estudos tocantes à dependência do período de desidratação, mesmo em sementes ortodoxas. Além disso, será fundamental, nestes estudos, conhecer os produtos e processos bioquímicos envolvidos, identificando-se a essencialidade e a magnitude de participação de cada um deles. Alguns já vêm sendo estudados e serão abordados adiante.

Participação do ácido abscísico (ABA) na formação e na desidratação das sementes

Em algumas espécies é possível, ao embrião em desenvolvimento, adquirir a capacidade germinativa naturalmente, sem requerer etapa final de desidratação. Em outras, porém, este fato é verificado quando embriões imaturos são removidos das sementes em desenvolvimento e colocados em meio de cultura. Os embriões continuam acumulando proteínas e, após breve período de quiescência, podem germinar. A aplicação de ABA nos embriões, nesta fase, impede a germinação e estimula a continuação da síntese protéica, bem como dos demais processos relacionados ao desenvolvimento da semente. O ambiente que o embrião encontra na planta-mãe favorece o seu desenvolvimento, em detrimento da germinação. Assim, é de se supor que fornecimento constante de ABA, ou de outro composto de similar função, mantenha o embrião num metabolismo favorável ao desenvolvimento e acúmulo de reservas, impedindo sua germinação (Bewley & Black 1985). Esta ação do ácido abscísico na germinação foi estudada por diversos pesquisadores, como descreveram Paiva & Oliveira (1995). Com a secagem da semente haveria redução no nível de ABA ou diminuição da sensibilidade da semente ao seu efeito, permitindo sua germinação após a reidratação.

Tarquis & Bradford (1992) questionaram a magnitude deste efeito pois observaram, em sementes de alface, que a expressão genética programada para a germinação teve muito mais influência que o efeito da redução nos níveis de ABA. O efeito do ABA, nesse momento, seria exclusivamente de inibição da germinação (Xu *et al.* 1990) ou,

assim como o efeito de estresse hídrico, complementaria a programação genética, estimulando a síntese de proteínas de reserva sempre que a fase de desenvolvimento do embrião e o meio em que se encontra assim o permitam (Xu & Bewley 1994).

Além da inibição na germinação, o ABA também apresentaria relações com a tolerância à dessecação. Iida *et al.* (1992) verificaram que embriões somáticos de cenoura tratados com ABA, dessecados e reidratados, tiveram desenvolvimento normal, enquanto os não tratados não sobreviveram após a dessecação. Porém, o estágio de desenvolvimento dos embriões foi crítico para que o fornecimento de ABA surtisse efeito, assim como a concentração do produto e o tempo de exposição ao mesmo.

Em espécies vivíparas ou em mutantes de espécies não vivíparas, nas quais a semente pode germinar ainda na planta-mãe, verificou-se a presença de apenas 25 a 50% da concentração normal de ABA ou, em outros casos, a mesma concentração, porém com menor sensibilidade do embrião a esta concentração (Bewley & Black 1985). Em sementes de *Avicennia marina*, recalcitrantes, Farrant *et al.* (1993b) observaram que o conteúdo de ABA no embrião, durante a fase de acúmulo de reservas, foi proporcionalmente menor que no das sementes ortodoxas, enquanto vários outros reguladores de crescimento continuaram em níveis normais. Este fato poderia, então, associar a concentração de ABA no embrião com a sensibilidade da semente à dessecação. Entretanto, há casos em que não se constatou relação entre a concentração de ABA, a sensibilidade do embrião a este regulador de crescimento e a aptidão da semente em germinar precocemente. Assim, podem existir outros fatores ou substâncias que estejam envolvidos neste processo (Bewley & Black 1985; Tarquis & Bradford 1992).

O ABA pode ter, também, efeitos indiretos na resistência à dessecação, como simular o efeito de estresse hídrico nas sementes, produzindo RNAs-m e proteínas que normalmente são sintetizados quando a planta é submetida a esta condição (Mundy & Chua 1988). Koornneef *et al.* (1989), em estudos com aplicação de ABA em mutantes de *Arabidopsis thaliana*, concluíram que a resposta genética ao ABA, no tocante à regulação da perda de água e à dormência, é complexa e necessita de estudos específicos para cada caso.

O ABA, além de poder induzir a tolerância à dessecação das sementes, pode influenciar no conteúdo de carboidratos solúveis e na produção de proteínas ligadas à dessecação, relacionados com os processos de dessecação (Bartels *et al.* 1988; Tetteroo *et al.* 1994). Em sementes recém-germinadas também se verifica a ação do ABA: duas proteínas, que podem estar relacionadas com a tolerância à dessecação, foram detectadas após a incubação de sementes de pepino em papel de filtro saturado com solução de ABA 10^{-3} M (Bruggink & Toorn 1995).

Assim, ficam evidentes a importância e a participação do ácido abscísico na formação das sementes atuando, direta ou indiretamente, na prevenção da germinação precoce, na síntese de proteínas e carboidratos e na tolerância à dessecação. Entretanto, ainda não está evidenciada sua essencialidade, bem como as formas específicas de sua atuação, as concentrações, os momentos de maior influência no desenvolvimento, bem como sua participação na aquisição da tolerância à dessecação das sementes.

DNA, RNAs-m e proteínas associados à dessecação

A síntese protéica é um aspecto importante estudado na dessecação das sementes, bem como nos processos de desenvolvimento e germinação.

Osborne & Boubriak (1994) verificaram que apenas o DNA das células de embriões tolerantes à dessecação mantinham sua integridade durante a secagem. Porém, o controle da produção de proteínas, ora voltadas ao desenvolvimento da semente, ora à germinação e ao crescimento da plântula, é feito por RNAs-m. Em sementes de feijão e de mamona, a desidratação paralizou a produção de RNAs-m voltados ao desenvolvimento da semente, ao mesmo tempo em que os RNAs-m residuais eram degradados; enquanto isso, eram produzidos RNAs-m associados com a germinação e com o crescimento das plântulas. A dessecação poderia ser pequena, mas era necessária. Sementes retiradas prematuramente da planta-mãe e mantidas em meio úmido, por poucos dias, apresentaram desidratação suave, mas adquiriram a capacidade germinativa, enquanto as colocadas imediatamente na água não germinaram (Bewley *et al.* 1989).

Em sementes de milho, há série de proteínas encontradas apenas nas fases do desenvolvimento em que o embrião é tolerante à dessecação. Nos estádios em que a germinação precoce é evidente, o embrião pode ainda ser intolerante à dessecação. A tolerância nestas sementes apareceu aos 20-25 dias após a polinização, ou seja, depois que as sementes adquiriram a capacidade germinativa (Bochicchio *et al.* 1988). Rosenberg & Rinne (1988) observaram, em sementes de soja, que existem proteínas específicas da fase de desidratação. Quando submetidas à secagem controlada, sementes imaturas amadureceram precocemente, com nova síntese e acúmulo de diversos polipeptídeos não detectados nas sementes que não sofreram secagem. Assim, sementes que não atingiram fase de desenvolvimento que permitisse a formação de proteínas e RNAs-m relacionados com a maturação puderam ter essa formação induzida pela desidratação controlada após a colheita. Estas proteínas são análogas às LEA (Late Embryogenesis-Abundant) proteínas observadas em sementes de algodão por Galau *et al.* (1986).

Em sementes de *Ranunculus sceleratus*, houve modificações qualitativas e quantitativas nas LEA proteínas, conforme o estágio de maturação e o grau e duração do estresse hídrico (Wechsberg *et al.* 1994); em sementes de *Avicennia marina*, intolerantes à dessecação, não se constataram tais modificações (Farrant *et al.* 1992a, b).

Proteínas específicas da fase de desenvolvimento das sementes ou específicas da fase de germinação e desenvolvimento de plântulas ocorrem no endosperma de sementes de mamona e podem ser solúveis (Kermode & Bewley 1985b) ou insolúveis (Kermode *et al.* 1985); podem ocorrer, também, nos cotilédones (Kermode & Bewley 1986). A transição da fase de desenvolvimento para a fase de germinação, concluída pela dessecação prematura, é espelhada por mudança no padrão de síntese de proteínas solúveis ou insolúveis dentro do tecido endospermático de reserva, após subsequente reidratação. A síntese de proteínas solúveis, características da fase de desenvolvimento, cessou após cinco horas de embebição, dando lugar à síntese de proteínas ligadas exclusivamente à germinação e ao desenvolvimento de plântulas. A secagem apresenta, então, função importante no redirecionamento do metabolismo de desenvolvimento de sementes para o de germinação. Também foi pré-requisito para a indução de enzimas

hidrolíticas essenciais à fase pós-germinativa, ou seja, para o desenvolvimento das plântulas. O mesmo comportamento foi verificado para proteínas insolúveis, com a diferença de que estas só são formadas após a reidratação das sementes desseçadas ou após a embebição das sementes maduras (Kermode & Bewley 1985b; Kermode *et al.* 1985). Em cotilédones de sementes de mamona, as proteínas solúveis e insolúveis apresentaram o mesmo comportamento das existentes ou formadas nos tecidos endospermáticos. A dessecação induziu a formação de enzimas envolvidas na quebra de proteínas de reserva e na utilização de lipídios (Kermode & Bewley 1986).

As proteínas específicas da maturação, que podem estar envolvidas com a tolerância à dessecação, também são observadas em sementes de cevada (Bartels *et al.* 1988) que, apesar de serem capazes de germinar aos oito dias após a polinização, são intolerantes à dessecação. A intolerância à desidratação só ocorre após alguns dias. Pelo menos de 25 a 30 proteínas são produzidas ou têm seus níveis aumentado durante o período que leva à tolerância à dessecação, podendo estar envolvidas neste processo.

Entretanto, não só as proteínas ligadas à dessecação podem ser responsáveis pela tolerância à secagem das sementes. Bradford & Chandler (1992), trabalhando com sementes de *Zizania palustris* e *Oriza sativa*, concluíram que a ausência de proteínas ligadas à dessecação, bem como a incapacidade em acumular ABA, aparentemente não são as responsáveis pela intolerância à dessecação. Blackman *et al.* (1991) também colocaram em dúvida a hipótese da dependência exclusiva a um grupo de proteínas acumuladas nas fases finais da embriogênese (LEA proteínas) para a proteção das sementes maduras dos danos por dessecação pois, em sementes de soja, encontraram proteínas distintas das conhecidas e que foram resistentes à coagulação pelo calor. O nível destas proteínas apresentou correlação positiva com a tolerância à dessecação, o que levaria a concluir pela essencialidade destas proteínas na tolerância à dessecação. Porém, embriões extraídos de sementes imaturas tiveram tal tolerância induzida prematuramente pela secagem lenta, enquanto sementes mantidas em umidade elevada, pelo mesmo período, não adquiriram esta tolerância, embora em ambos os casos tenha havido formação das LEA proteínas. Assim, os autores concluíram que, apesar de contribuírem, tais proteínas podem não ser suficientes para induzir a tolerância à dessecação. Esta última análise foi obtida também por Blackman *et al.* (1992), que trabalharam com embriões imaturos de sementes de soja desseçados ou mantidos em elevada umidade relativa. Os primeiros suportaram a secagem e germinaram, enquanto os últimos não conseguiram germinar após a dessecação e reidratação. Em ambos os casos, novamente, houve formação de LEA proteínas.

Elucidando mais ainda a questão, Gee *et al.* (1994) observaram diferenças na tolerância à dessecação entre espécies do gênero *Acer*: duas foram intolerantes à dessecação e duas foram tolerantes. As quatro espécies possuem proteínas ligadas à dessecação, o que levou os autores a concluir que as LEA proteínas não são suficientes para induzir, isoladamente, a tolerância à dessecação, apesar de terem atuação importante neste processo.

É interessante observar que, se não são as principais responsáveis pela aquisição de tolerância à desidratação em sementes, as LEA proteínas devem ter participação fundamental no processo. Em todos os materiais avaliados nas pesquisas mencionadas,

tais proteínas estavam presentes quando houve tolerância à dessecação, adquirida naturalmente ou sob condições controladas.

Carboidratos envolvidos na tolerância à dessecação

O estudo de sementes recém-germinadas pode ser utilizado para o entendimento da tolerância à dessecação (Bruggink & Toorn 1995). Uma das primeiras observações sobre a função de alguns açúcares na tolerância de sementes à dessecação foi feita por Koster & Leopold (1988), em sementes de soja, ervilha e milho, em que sacarose e outros oligossacarídeos estiveram constantemente presentes durante o estágio de tolerância à dessecação nas primeiras fases da germinação. Quando os oligossacarídeos deixaram de estar presentes, a tolerância à dessecação não mais se manifestou.

Na raiz primária de sementes de milho em germinação, rafinose e sacarose ocorreram em níveis elevados durante o período de tolerância à dessecação, enquanto glicose e frutose estavam ausentes. À medida que aumentava a intolerância à dessecação, diminuíam os teores de rafinose e sacarose e aumentavam os de glicose e frutose (LePrince *et al.* 1992).

Durante a desidratação de embriões somáticos de cenoura e alfafa, a tolerância à dessecação não acompanhou as modificações ocorridas no conteúdo dos carboidratos solúveis, sugerindo que os oligossacarídeos e dissacarídeos não são fatores determinantes para a anidrobiose. Entretanto, em secagem lenta, a estaquiose e a sacarose aumentaram com a aquisição da tolerância à dessecação, enquanto os monossacarídeos declinaram, reforçando a idéia de que os carboidratos estão envolvidos na anidrobiose (Tetteroo *et al.* 1994). Em sementes de couve-flor ocorreu o mesmo fenômeno, ou seja, aumento de glicose e frutose e redução de sacarose e estaquiose com o avanço do processo germinativo e com a conseqüente perda de tolerância à dessecação das sementes (Hoekstra *et al.* 1994). Os autores concluíram que a estaquiose não foi pré-requisito para a tolerância à dessecação, mas que a sacarose pode ter sido. A glicose e a frutose podem estar envolvidas nos danos provocados pela dessecação.

Por outro lado, os níveis criticamente baixos de carboidratos solúveis específicos, nas sementes de espécies do gênero *Inga*, foram considerados fatores fundamentais para a intolerância à dessecação (Pritchard *et al.* 1995).

Bochicchio *et al.* (1994) levantaram a hipótese de que dois açúcares estariam envolvidos no processo de aquisição da tolerância à dessecação: a sacarose e a rafinose. Gorecki *et al.* (1997a, b) verificaram que o acúmulo de oligossacarídeos da família da rafinose correlacionou-se fortemente com a capacidade de sementes de *Lupinus luteus* germinarem após a dessecação. Obendorf (1997) afirmou que existe um nível crítico desses oligossacarídeos (série rafinósica), abaixo do qual a tolerância à dessecação é comprometida.

A função dos carboidratos no processo de aquisição da tolerância à dessecação provavelmente está ligada à proteção das membranas durante a desidratação. Este fato foi verificado por Chen & Burris (1990) em sementes de milho submetidas a diferentes processos de secagem. Os autores observaram alta correlação entre a tolerância à

secagem e a composição de açúcares solúveis, principalmente sacarose e rafinose, sugerindo que estes açúcares teriam importante papel na estabilidade das membranas durante a secagem e a exposição a altas temperaturas. Segundo Ooms *et al.* (1994), o mesmo efeito desses carboidratos poderia ser obtido com a aplicação de ABA.

Sun *et al.* (1994), analisando a formação do estado vítreo da água (outra hipótese para explicar a tolerância à dessecação, que será discutida mais adiante) em sementes de soja e de carvalho, reforçaram a idéia de que os açúcares são relevantes nas modificações das fases da membrana, para que a mesma possa reter líquidos cristalinos. Blackman *et al.* (1992) corroboram a idéia da função dos açúcares no processo de aquisição de tolerância à dessecação, mostrando que sacarose e estaquiose aumentam em eixos embrionários de sementes de soja submetidas à secagem, enquanto nas que permanecem sob elevada umidade relativa, estes açúcares não apresentam alteração em seus teores.

Sementes recalcitrantes e tolerância à dessecação

Comportamento diferenciado dos descritos até aqui é verificado em sementes recalcitrantes. A classificação destas sementes foi, inicialmente, genérica, avaliando-se apenas a intolerância à dessecação e a baixa longevidade. Atualmente, já se estuda a reclassificação em função de níveis de recalcitrância. Diversos pesquisadores, das mais variadas regiões do mundo, ressaltaram a importância do assunto (Farrant *et al.* 1988; 1993a; Berjak *et al.* 1990; Kermodé 1990; Horbowicz & Obendorf 1994; Neves 1994).

A separação clássica ortodoxas x recalcitrantes passou a ser questionada, procurando-se identificar, com maior consistência, as espécies com sementes recalcitrantes ou os níveis de recalcitrância (Chin *et al.* 1984; Berjak *et al.* 1984; Nautiyal & Purohit 1985a, b, c; Nautiyal *et al.* 1985; Farrant *et al.* 1989; Hong & Ellis 1990); espécies consideradas ortodoxas podem ter diferentes níveis de tolerância à dessecação. Além disso, as sementes podem ser agrupadas por características intermediárias entre as das ortodoxas e as das recalcitrantes (Farrant *et al.* 1997; Sacande *et al.* 1997), tornando-se difícil classificá-las em algum grupo, por apresentarem características de ortodoxas, mas possuírem longevidade muito curta (Pence 1996; Vertucci *et al.* 1996). Porém, classificações à parte, estes estudos vêm contribuindo muito para o entendimento dos processos envolvidos na tolerância à dessecação, dessas sementes, entre outros benefícios.

As diferenças entre estes grupos e, certas vezes, dentro da mesma espécie com sementes desenvolvidas em diferentes condições, têm proporcionado conclusões contraditórias ou, pelo menos, discutíveis. Baseados em dados obtidos em quatro coletas de sementes de *Zizania palustris* (com teores de água de 74,6, 55,2, 37,0 e 26,8%), Probert & Brierley (1989) concluíram que a secagem inviabilizou a germinação das sementes em qualquer época de colheita, que continuaram intolerantes à dessecação mesmo quando armazenadas embebidas a baixas temperaturas. Berjak *et al.* (1994) chegaram a conclusões diferentes de Probert & Brierley (1989). Submeteram as sementes de *Zizania palustris* à secagem sob temperaturas inferiores a 25°C, verificando deterioração ultraestrutural mais severa do que quando a mesma foi realizada a 30°C.

Esta diferença na tolerância à dessecação sob diferentes temperaturas já havia sido mencionada por Kovach & Bradford (1992) que, além disso, inferiram que a intolerância à dessecação das sementes de *Z. palustris*, na verdade, tratava-se de danos ocorridos na membrana não durante a secagem, mas sim no momento da embebição. Vertucci *et al.* (1994) verificaram que embriões imaturos de *Zizania sp.* são mais sensíveis à dessecação que os maduros.

Em sementes de *Clausena lansium* e *Litchi chinensis* (também recalcitrantes), entretanto, Fu *et al.* (1994) verificaram que a tolerância à dessecação aumentou com o decorrer das fases de desenvolvimento. Os autores consideraram, ainda, que os danos causados pela secagem, em sementes recalcitrantes, podem ser atenuados pela excisão do eixo embrionário, seguida por criopreservação.

As diferenças quanto à tolerância à dessecação, entre sementes recalcitrantes, levaram Berjak & Pammenter (1994) a sugerir classificação considerando o grau de sensibilidade à dessecação, a longevidade em armazenamento hidratado e a sensibilidade ao frio ("chilling"). Estas autoras concordam que a aplicação genérica do termo recalcitrante tem causado muitas confusões. Para evitar tal fato é necessário que se comece a descrever diversas informações importantes, como o habitat natural da espécie, a longevidade das sementes em armazenamento sob condições hidratadas, o teor de água crítico, a sensibilidade ao resfriamento, a existência de dormência e a influência da temperatura durante a secagem, entre outras.

Características importantes em sementes recalcitrantes são a capacidade de germinar imediatamente após a separação da planta-mãe (estas sementes, normalmente, continuam hidratadas até o final do desenvolvimento/maturação) e a presença de açúcares solúveis. Sementes de *Quercus robur*, por exemplo, consideradas recalcitrantes, adquirem a capacidade germinativa sem a secagem (Finch-Savage *et al.* 1992). Sementes de *Avicennia marina*, diferentemente das ortodoxas, permanecem hidratadas e metabolicamente ativas após a abscisão da planta-mãe, podendo iniciar a germinação imediatamente após esta abscisão, graças, entre outros fatores, à disponibilidade de oligossacarídeos que são translocados, prontamente, dos órgãos de reserva para o eixo embrionário (Farrant *et al.* 1992a, b).

Além dos aspectos já comentados, podem existir outros fatores envolvidos na tolerância à dessecação de sementes, conforme observaram Finch-Savage & Blake (1994). Estes autores não verificaram relação entre intolerância à dessecação e concentrações de ABA, para sementes de *Quercus robur*, nem entre esta intolerância e a presença de proteínas de dessecação (LEA proteínas) ou açúcares solúveis, descritos para sementes ortodoxas como responsáveis pela resistência à dessecação. Além disso, os autores observaram grande semelhança entre o desenvolvimento das sementes desta espécie, considerada como recalcitrante (ou intolerante à dessecação), e o de outras consideradas ortodoxas. Still *et al.* (1994) chegaram a conclusões discordantes de diversos trabalhos citados até aqui quanto à relação entre tolerância à dessecação e níveis de ABA, de açúcares solúveis e de proteínas de dessecação. Estes autores não encontraram evidências da relação entre estes compostos e a tolerância à dessecação em sementes de *Zizania palustris*. As sementes desta espécie, segundo os autores, foram mais sensíveis à dessecação que as de *Oryza sativa*. Entretanto, o acúmulo de

ABA nas sementes de *Z. palustris* foi duas vezes maior que nas sementes de *O. sativa*, não apresentando relação com o acúmulo de proteínas de dessecação. Sementes de *Z. palustris*, ainda, acumularam cerca de duas vezes mais sacarose que as de arroz, ficando os oligossacarídeos a 1/10 do máximo acúmulo de sacarose. Por fim, os níveis de LEA proteínas foram semelhantes entre as sementes das duas espécies, além de que o maior acúmulo destas proteínas ocorreu após muitas sementes terem iniciado a aquisição de tolerância à dessecação. Os autores concluíram que a sensibilidade à dessecação, em sementes de *Z. palustris*, não é função da ausência destes fatores.

Steadman *et al.* (1996), porém, verificaram que existem grandes variações na concentração de açúcares entre diferentes tecidos de sementes intolerantes à dessecação (recalcitrantes). Estes autores observaram que existe forte correlação entre a relação sacarose/oligossacarídeos derivados de sacarose, chegando a classificar as sementes conforme o resultado desta relação.

A síntese destas informações (Finch-Savage *et al.* 1992; Kovach & Bradford 1992; Finch-Savage & Blake 1994; Fu *et al.* 1994; Still *et al.* 1994; Vertucci *et al.* 1994) sugere nível de interferência das variáveis não diretamente estudadas quanto à tolerância à dessecação, impossibilitando atribuir-se a um ou mais dos fatores estudados as diferenças entre sementes ortodoxas e recalcitrantes. Estas informações ressaltam a dificuldade no agrupamento de espécies dentro de uma destas categorias.

Mais consistente é a consideração feita por Finch-Savage (1992), referindo-se ao teor de água crítico, ou seja, aquele abaixo do qual a semente não suporta a secagem. Este teor de água crítico seria o atingido após a perda de toda a água celular livre e explicaria a grande diferença na tolerância à dessecação entre as espécies. Este valor foi estudado em *Zizania* spp. (Vertucci *et al.* 1995), em *Inga uruguensis* (Bilia 1997), em *Araucaria angustifolia* (Eira *et al.* 1994), em *Euterpe oleracea* (Araújo *et al.* 1994), em seringueira (Pereira 1980; Cicero *et al.* 1986; Garcia & Vieira 1994), em *Virola surinamensis* (Cunha *et al.* 1992) e em *Phoenix loureiri* (Araújo & Barbosa 1992). Os valores do teor de água crítico, nestas espécies, foram de 15 a 38%, mostrando que esta característica é muito variável de espécie para espécie. Este fato já havia sido observado por Roberts (1973), que mencionou a variação do teor de água crítico, para sementes recalcitrantes, entre 12 e 31%.

É provável, porém, que a conservação de sementes recalcitrantes por longo período, não seja alcançada com processos similares aos utilizados para as ortodoxas, mormente a secagem. Sem a possibilidade, atualmente, de secagem para essas sementes, os pesquisadores, principalmente no Brasil, onde ocorre número elevado de espécies com sementes recalcitrantes, têm buscado formas alternativas de armazenamento, como a manutenção do elevado teor de água das sementes pelo seu acondicionamento em embalagens herméticas e/ou sob baixas temperaturas (Cicero *et al.* 1986; Pence 1996; Ferraz & Sampaio 1996; Barbedo 1997; Bilia 1997). Contudo, tal armazenamento frequentemente conduz, além da deterioração pelo próprio metabolismo da semente, a problemas com microrganismos causadores de processos deteriorativos (Motle *et al.* 1997), favorecidos pela umidade.

A conservação das sementes recalcitrantes poderia ser obtida com métodos que visassem a paralisação ou a limitação, ao máximo possível, do crescimento do eixo

embrionário, mantendo-se a semente com fornecimento de água suficiente para evitar sua desidratação abaixo do teor de água crítico. Este procedimento foi realizado em sementes de *Melicococcus bijugatus* e *Eugenia brasiliensis* (Goldbach 1979), e em *Inga uruguensis* (Barbedo 1997), empregando o ácido abscísico como inibidor da germinação.

Outros fatores ligados à dessecação

Propriedades da água

A habilidade que as sementes de diversas espécies apresentam em sobreviver à dessecação é resultado de adaptações que previnem a destruição celular durante a perda de água. Quando uma célula não tolerante à dessecação se desidrata, muitos eventos ocorrem: a) os solutos ficam mais concentrados, possivelmente aumentando a taxa de reações químicas destrutivas; b) alguns solutos podem cristalizar, modificando a resistência iônica e o pH da solução intracelular; c) as proteínas começam a desnaturar-se, muitas irreversivelmente; e d) as membranas começam a romper-se, levando à perda da compartimentalização (Koster 1991). A presença de grande quantidade de açúcares solúveis dentro de uma célula pode prevenir estes efeitos danosos da dessecação, formando ligações de hidrogênio e, assim, substituindo a água na manutenção das estruturas hidrofílicas em sua orientação quando hidratada (Crowe *et al.* 1988, apud Koster 1991).

Koster (1991) verificou que a habilidade das células em tolerar a dessecação pode, em parte, depender da habilidade em vitrificar (*glassy state*) à temperatura ambiente. Também mostrou que a vitrificação depende de mais de um tipo de açúcar (principalmente a relação sacarose/rafinose), para que não ocorra a cristalização. Então, segundo o autor, a combinação dos açúcares presentes em células tolerantes à dessecação pode permitir a formação do estado vítreo em temperaturas superiores a 0°C, enquanto a combinação presente em células de sementes sensíveis à dessecação só permitiria a formação do estado vítreo em temperaturas abaixo de 0°C.

Willians & Leopold (1989) demonstraram que a temperatura para a formação desse estado vítreo também depende do conteúdo de água do embrião. Afirmaram que o estado vítreo, em função de sua alta viscosidade, protelaria a cristalização de solutos e a total desidratação. A inibição da mobilidade molecular, portanto, restringiria a desnaturação e as reações bioquímicas. A existência do estado vítreo em sementes de milho, segundo os autores, sugere importante função deste estado, de mobilidade molecular restrita, na sobrevivência de sementes desseçadas.

Em sementes de *Landolphia kirkii*, consideradas recalcitrantes, Berjak *et al.* (1992) observaram maior tolerância à dessecação nas imaturas, coincidindo com a fase em que a água não congelável estava em seu menor teor, além de apresentar a mais alta entalpia de fusão desta água. Nesta mesma espécie, Pammenter *et al.* (1991) não observaram diferenças no conteúdo de água congelável das sementes antes e após a desidratação, sendo aquele conteúdo similar ao de sementes tolerantes à dessecação. Concluíram que o conteúdo de água não congelável, isoladamente, não é um fator importante para a sensibilidade à dessecação. Entretanto, quando esta água foi retirada por meio de secagem rápida, houve danos ao embrião, o que não ocorre em sementes tolerantes à dessecação.

Radicais livres

Os radicais livres apresentam importante função nos danos causados a moléculas de tecidos vegetais e animais, principalmente quando tecidos amadurecidos são submetidos a estresses ambientais ou a envelhecimento artificial. Em sementes, entretanto, as evidências de que estes radicais livres atuam na perda de viabilidade não são plenamente claras. Apesar disso, é muito provável que as sementes não se diferenciem dos demais tecidos vegetais e ou animais e, assim, sofram ação do oxigênio e de seus radicais livres, influenciando sua mortalidade (Hendry 1993).

Evidências da ação de radicais livres em sementes podem ser verificados quanto à intolerância das mesmas à dessecação, após iniciado o período de embebição para a germinação. Em sementes de milho, há evidências de sequência de eventos em que o oxigênio ativado toma função importante, se não causal, no processo de perda da tolerância à dessecação com o avanço da germinação (Leprince *et al.* 1990). Hendry *et al.* (1992) observaram semelhante ação do oxigênio em sementes de *Quercus robur*, não durante a embebição, mas sim ao final da maturação das sementes. Estas sementes são consideradas recalcitrantes e os autores concluíram que decréscimo na proteção enzimática à ação oxidativa sobre o eixo embrionário, associado à diminuição na concentração de alfa-tocoferol (eventos que ocorreram quando a água é perdida), leva à peroxidação lipídica e à formação de radicais livres no eixo embrionário. Estes eventos podem contribuir para a perda de viabilidade nestas sementes recalcitrantes. A tolerância da membrana aos radicais livres está associada à presença e à quantidade de antioxidantes de lipídios solúveis e, portanto, estes antioxidantes podem contribuir para a tolerância à desidratação em tecidos embrionários da semente (Senaratna *et al.* 1985). Os antioxidantes foram detectados em eixos embrionários de sementes de soja embebidas por 6 horas (ainda tolerantes à dessecação) em quantidade muito maior que nas embebidas por 36 horas (já sensíveis à dessecação). A ação dos radicais livres, entretanto, merece mais estudos para que se obtenham conclusões mais consistentes.

Considerações finais

A diferença entre o comportamento das sementes ortodoxas e recalcitrantes, quanto à tolerância à dessecação, é um fato, até aqui, indiscutível. Porém, a identificação dos processos bioquímicos e fisiológicos envolvidos, bem como o nível de participação de cada fator no processo, requerem maior esclarecimento. Há acentuada variação nos resultados, em função de mudanças nos fatores envolvidos (espécie, estágio de desenvolvimento da semente, local de origem da espécie, época de avaliação, condições ambientais durante o desenvolvimento da semente, estado nutricional da planta), o que torna difícil e sujeita a falhas a generalização do fenômeno.

A utilização do termo recalcitrante, inicialmente abrangendo grande número de espécies, consideradas semelhantes entre si, gerou confusão e conflito de resultados. Aparentemente, há mais de um fator envolvido na tolerância ou na sensibilidade à dessecação. Entre estes fatores, estão incluídos: a) o controle de reguladores de crescimento (principalmente o ABA); b) o acúmulo de proteínas ao final da maturação (LEA proteínas); c) o balanço entre açúcares solúveis (principalmente a sacarose, a

rafinose e a estaquiose); d) a presença de radicais livres; e) as características da água na semente. Nenhum deles, isoladamente, foi capaz de elucidar a tolerância ou intolerância à dessecação, em todas as espécies estudadas; porém, todos eles tinham participação no processo. É provável, portanto, que o gradiente de tolerância à dessecação, observado em alguns trabalhos, seja resultado da combinação destes fatores. Porém, com os resultados obtidos até o momento, tal asserção seria ainda carente de base de dados mais sólida.

Nos estudos relativos à conservação de sementes recalcitrantes, Farrant *et al.* (1986) e Pammenter *et al.* (1994) verificaram a possibilidade da ocorrência de estresse hídrico, mesmo quando estas são armazenadas úmidas. Isto porque a semente recalcitrante não cessa o crescimento ao final da sua formação e maturação; no máximo, reduz seu metabolismo a níveis quase imperceptíveis e, talvez, resida neste fato uma das grandes características comuns às espécies com sementes intolerantes à dessecação. Assim, mesmo sob elevados teores de água haveria deficiência hídrica para a fase inicial da germinação, pois a divisão e expansão celular estariam em níveis crescentes. Este fato refletiria um metabolismo tão intenso destas sementes, com tão rápida transição das fases de formação, maturação, embebição, translocação de solutos e retomada de crescimento do eixo embrionário, que não haveria tempo suficiente para o acúmulo das substâncias responsáveis pela tolerância à dessecação, substâncias estas descritas ao longo do presente trabalho.

Mesmo identificando-se, futuramente, todos os fatores envolvidos na tolerância à dessecação, não há garantia de que seria possível submeter sementes recalcitrantes a estes fatores, artificialmente. Esta é uma área muito ampla, ainda, a ser estudada, necessitando muitas informações para sua melhor compreensão.

Referências bibliográficas

- Adams, C. A.; Fjerstad, M. C. & Rinne, R. W. 1983. Characteristics of soybean seed maturation: necessity for slow dehydration. **Crop Science** **23**: 265-267.
- Araújo, E. F.; Silva, R. F. & Araújo, R. F. 1994. Avaliação da qualidade de sementes de açaí armazenadas em diferentes embalagens e ambientes. **Revista Brasileira de Sementes** **16**: 76-79.
- Araújo, E. F. & Barbosa, J. G. 1992. Influência da embalagem e do ambiente de armazenamento na conservação de sementes de palmeira (*Phoenix loureiri* Kunth.). **Revista Brasileira de Sementes** **14**: 61-64.
- Barbedo, C. J. 1997. **Armazenamento de sementes de Inga uruguensis Hook. & Arn.** Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Bartels, D.; Singh, M. & Salamini, F. 1988. Onset of desiccation tolerance during development of the barley embryo. **Planta** **175**: 485-492.
- Berjak, P. & Pammenter, N. W. 1994. Recalcitrant is not an all-or-nothing situation. **Seed Science Research** **4**: 263-264.
- Berjak, P.; Dini, M. & Pammenter, N. W. 1984. Possible mechanisms underlying the differing dehydration responses in recalcitrant and orthodox seeds: desiccation-associated subcellular changes in propagules of *Avicennia marina*. **Seed Science and Technology** **12**: 365-384.
- Berjak, P.; Farrant, J. M.; Mycock, D. J. & Pammenter, N. W. 1990. Recalcitrant (homoiohydrous) seeds: the enigma of their desiccation-sensitivity. **Seed Science and Technology** **18**: 297-310.
- Berjak, P.; Pammenter, N. W. & Vertucci, C. 1992. Homoiohydrous (recalcitrant) seeds: developmental status, desiccation sensitivity and the state of water in axes of *Landolphia kirkii* Dyer. **Planta** **186**: 249-261.

- Berjak, P.; Bradford, K. J.; Kovach, D. A. & Pammenter, N. W. 1994. Differential effects of temperature on ultrastructural responses to dehydration in seeds of *Zizania palustris*. **Seed Science Research** 4: 111-121.
- Berry, T. & Bewley, J. D. 1991. Seeds of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) which develop in a fully environment in the fruit switch from a developmental to a germinative mode without a requirement for desiccation. **Planta** 186: 27-34.
- Bewley, J. D. & Black, M. 1985. **Seeds: physiology of development and germination**. Plenum Press, New York.
- Bewley, J. D.; Kermod, A. R. & Misra, S. 1989. Desiccation and minimal drying treatments of seeds of castor bean and *Phaseolus vulgaris* which terminate development and promote germination cause changes in protein and messenger RNA synthesis. **Annals of Botany** 63: 3-17.
- Bília, D. A. C. 1997. **Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Inga uruguensis***. Hook, et Arn. Universidade de São Paulo. Piracicaba.
- Blackman, S. A.; Wettlaufer, S. H.; Obendorf, R. L. & Leopold, A. C. 1991. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology** 96: 868-874.
- Blackman, S. A.; Obendorf, R. L. & Leopold, A. C. 1992. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. **Plant Physiology** 100: 225-230.
- Bochicchio, A.; Vazzana, C.; Raschi, A.; Bartels, D. & Salamini, F. 1988. Effect of desiccation on isolated embryos of maize. Onset of desiccation tolerance during development. **Agronomie** 8: 29-36.
- Bochicchio, A.; Rizzi, E.; Balconi, C.; Vernieri, P. & Vazzana, C. 1994. Sucrose and raffinose contents and acquisition of desiccation tolerance in immature maize embryos. **Seed Science Research** 4: 123-126.
- Bradford, K. J. & Chandler, P. M. 1992. Expression of "dehydrin-like" proteins in embryos and seedlings of *Zizania palustris* and *Oryza sativa* during dehydration. **Plant Physiology** 99: 488-494.
- Buggink, T. & Toorn, P. van der. 1995. Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. **Seed Science Research** 5: 1-4.
- Chen, Y. & Burris, J. S. 1990. Role of carbohydrates in desiccation tolerance and membrane behaviour in maturing maize seed. **Crop Science** 30: 971-975.
- Chin, H. F.; Hor, Y. L. & Mohd Lassim, M. B. 1984. Identification of recalcitrant seeds. **Seed Science and Technology** 12: 429-436.
- Cicero, S. M.; Marcos Filho, J. & Toledo, F. F. 1986. Efeitos do tratamento fungicida e de três ambientes de armazenamento sobre a conservação de sementes de seringueira. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"** 43: 763-787.
- Corbineau, F. & Côme, D. 1988. Storage of recalcitrant seeds of four tropical species. **Seed Science and Technology** 16: 97-103.
- Cunha, R.; Cardoso, M. A.; Santanna, C. A. F. & Pereira, T. S. 1992. Efeito do dessecação sobre a viabilidade de sementes de *Viola surinamensis* (Rol.) Warb. **Revista Brasileira de Sementes** 14: 69-72.
- Dasgupta, J. & Bewley, J. D. 1982. Desiccation of axes of *Phaseolus vulgaris* during development of a switch from a developmental pattern of protein synthesis to a germination pattern. **Plant Physiology** 70: 1224-1227.
- Eira, M. T. S.; Salomão, A. N.; Cunha, R.; Carrara, D. K. & Mello, C. M. C. 1994. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. - Araucariaceae. **Revista Brasileira de Sementes** 16: 71-75.
- Ellis, R. H.; Hong, T. D. & Roberts, E. H. 1987. The development of desiccation-tolerance and maximum seed quality during seed maturation in six grain legumes. **Annals of Botany** 59: 23-29.
- Espindola, L. S.; Noin, M.; Corbineau, F. & Côme, D. 1994. Cellular and metabolic damage induced by desiccation in recalcitrant *Araucaria angustifolia* embryos. **Seed Science Research** 4: 193-201.
- Farrant, J. M.; Pammenter, N. W. & Berjak, P. 1986. The increasing desiccation sensitivity of recalcitrant *Avicennia marina* seeds with storage time. **Physiologia Plantarum** 67: 291-298.

- Farrant, J. M.; Pammenter, N. W. & Berjak, P. 1988. Recalcitrance – a current assesment. **Seed Science and Technology** **16**: 155-166.
- Farrant, J. M.; Pammenter, N. W. & Berjak, P. 1989. Germination-associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds – a study on three unrelated species. **Planta** **178**: 189-198.
- Farrant, J. M.; Berjak, P. & Pammenter, N. W. 1992a. Proteins in development and germination of a desiccation sensitive (recalcitrant) seed species. **Plant Growth Regulation** **11**: 257-265.
- Farrant, J. M.; Pammenter, N. W. & Berjak, P. 1992b. Development of the recalcitrant (homoiohydrous) seeds of *Avicennia marina*: anatomical, ultrastructural and biochemical events associated with development from histodifferentiation to maturation. **Annals of Botany** **70**: 75-86.
- Farrant, J. M.; Pammenter, N. W. & Berjak, P. 1993a. Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation-tolerant types. **Seed Science Research** **3**: 1-13.
- Farrant, J. M.; Berjak, P.; Cutting, J. G. M. & Pammenter, N. W. 1993b. The role of plant growth regulators in the development and germination of the desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina*. **Seed Science Research** **3**: 55-63.
- Farrant, J. M.; Pammenter, N. W.; Berjak, P. & Walters, C. 1997. Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. **Seed Science Research** **7**: 135-144.
- Ferraz, I. D. K. & Sampaio, P. T. B. 1996. Métodos simples de armazenamento das sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* DC. – Meliaceae). **Acta Amazonica** **26**: 137-144.
- Finch-Savage, W. E. 1992. Embryo water status and survival in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: evidence for a critical moisture content. **Journal of Experimental Botany** **43**: 663-669.
- Finch-Savage, W. E. & Blake, P. S. 1994. Indetermined development in desiccation-sensitive seeds of *Quercus robur* L. **Seed Science Research** **4**: 127-133.
- Finch-Savage, W. E.; Clay, H. A.; Blake, P. S. & Browning, G. 1992. Seed development in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: water status and endogenous abscisic acid levels. **Journal of Experimental Botany** **43**: 671-679.
- Fu, J. R.; Jin, J. P.; Peng, Y. F. & Xia, Q. H. 1994. Desiccation tolerance in two species of recalcitrant seeds: *Clausena lansium* (Lour.) and *Litchi chinensis* (Sonn.). **Seed Science Research** **4**: 257-261.
- Galau, G. A.; Hughes, D. W. & Dure, L. 1986. Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) RNAs-m. **Plant Molecular Biology** **7**: 155-170.
- Garcia, A. & Vieira, R. D. 1994. Germinação, armazenamento e tratamento fungicida de sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Revista Brasileira de Sementes** **16**: 128-133.
- Gee, O. H.; Probert, R. J. & Coombe, S. A. 1994. 'Dehydrin-like' proteins and desiccation tolerance in seeds. **Seed Science Research** **4**: 135-141.
- Goldbach, H. 1979. Imbibed storage of *Melicoccus bijugatus* and *Eugenia brasiliensis* (*E. dombeyi*) using abscisic acid as a germination inhibitor. **Seed Science and Technology** **7**: 403-406.
- Gorecki, R. J.; Piotrowicz-Cieslak, L. B. L. & Obendorf, R. L. 1997a. Soluble carbohydrates in desiccation tolerance of yellow lupin seeds during maturation and germination. **Seed Science Research** **7**: 107-115.
- Gorecki, R. J.; Piotrowicz-Cieslak, L. B. L. & Obendorf, R. L. 1997b. Soluble sugars and flatulence-producing oligosaccharides in maturing yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) seeds. **Seed Science Research** **7**: 185-193.
- Gosling, P. G. 1989. The effect of drying *Quercus robur* acorns to differential moisture contents, followed by storage, either with or without imbibition. **Forestry** **62**: 41-50.
- Hendry, G. A. F. 1993. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research** **3**: 141-153.

- Hendry, G. A. F.; Finch-Savage, W. E.; Thorpe, P. C.; Atherton, N. M.; Buckland, S. M.; Nilsson, K. A. & Seel, W. E. 1992. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New Phytologist** **122**: 273-279.
- Hoekstra, F. A.; Haigh, A. M.; Tetteroo, F. A. A. & Roekel, T. van. 1994. Changes in soluble sugars in relation to desiccation tolerance in cauliflower seeds. **Seed Science Research** **4**: 143-147.
- Hong, T. D. & Ellis, R. H. 1990. A comparison of maturation drying, germination, and desiccation tolerance between developing seeds of *Acer pseudoplatanus* L. and *Acer platanoides* L. **New Phytologist** **116**: 589-596.
- Horbowicz, M. & Obendorf, R. L. 1994. Seed desiccation tolerance and storability: dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols - review and survey. **Seed Science Research** **4**: 385-405.
- Iida, Y.; Watabe, K.; Kamada, H. & Harada, H. 1992. Effects of abscisic acid on the induction of desiccation tolerance in carrot somatic embryos. **Journal of Plant Physiology** **140**: 356-360.
- Jiang, L. & Kermode, A. R. 1994. Role of desiccation in the termination of expression of genes for storage proteins. **Seed Science Research** **4**: 149-173.
- Kermode, A. R. 1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. **Critical Reviews in Plant Sciences** **9**: 155-195.
- Kermode, A. R. 1997. Approaches to elucidate the basis of desiccation-tolerance in seeds. **Seed Science Research** **7**: 75-95.
- Kermode, A. R. & Bewley, J. D. 1985a. The role of maturation drying in the transition from seed development to germination. II. Acquisition of desiccation-tolerance and germinability during development of *Ricinus communis* L. seeds. **Journal of Experimental Botany** **36**: 1906-1915.
- Kermode, A. R. & Bewley, J. D. 1985b. The role of maturation drying in the transition from seed development to germination. II. Post-germinative enzyme production and soluble proteins synthetic pattern changes within the endosperm of *Ricinus communis* L. seeds. **Journal of Experimental Botany** **36**: 1916-1927.
- Kermode, A. R. & Bewley, J. D. 1986. The role of maturation drying in the transition from seed development to germination. IV. Protein synthesis and enzyme activity changes within the cotyledons of *Ricinus communis* L. seeds. **Journal of Experimental Botany** **37**: 1887-1898.
- Kermode, A. R. & Bewley, J. D. 1988. The role of maturation drying in the transition from seed development to germination. **Journal of Experimental Botany** **39**: 487-497.
- Kermode, A. R.; Gifford, D. J. & Bewley, J. D. 1985. The role of maturation drying in the transition from seed development to germination. III. Insoluble proteins synthetic pattern changes within the endosperm of *Ricinus communis* L. seeds. **Journal of Experimental Botany** **36**: 1928-1936.
- Koornneef, M.; Hanhart, C. J.; Hilhorst, H. W. M. & Karssen, C. M. 1989. *In vivo* inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology** **90**: 463-469.
- Koster, K. L. 1991. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology** **96**: 302-304.
- Koster, K. L. & Leopold, C. 1988. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology** **88**: 829-832.
- Kovach, D. A. & Bradford, K. J. 1992. Imbibitional damage and desiccation tolerance of wild rice (*Zizania palustris*) seeds. **Journal of Experimental Botany** **43**: 747-757.
- Leprince, O.; Deltour, R.; Thorpe, P. C.; Atherton, N. M. & Hendry, G. A. F. 1990. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist** **116**: 573-580.
- Leprince, O.; Werf, A. van der; Deltour, R. & Lambers, H. 1992. Respiratory pathways in germinating maize radicles correlated with desiccation tolerance and soluble sugars. **Physiologia Plantarum** **85**: 581-588.
- Leprince, O.; Hendry, G. A. F. & McKersie, B. D. 1993. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research** **3**: 231-246.
- Motle, N.; Pammenter, N. W.; Berjak, P. & Frederic, J. C. 1997. Response of the recalcitrant seeds of *Avicennia marina* to hydrated storage: events occurring at the root primordia. **Seed Science Research** **7**: 169-178.

- Mundy, J. & Chua, N. 1988. Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. **EMBO Journal** **7**: 2279-2268.
- Nautiyal, A. R. & Purohit, A. N. 1985a. Seed viability in sal. I. Physiological and biochemical aspects of seed development in *Shorea robusta*. **Seed Science and Technology** **13**: 59-68.
- Nautiyal, A. R. & Purohit, A. N. 1985b. Seed viability in sal. II. Physiological and biochemical aspects of ageing in seeds of *Shorea robusta*. **Seed Science and Technology** **13**: 69-76.
- Nautiyal, A. R. & Purohit, A. N. 1985c. Seed viability in sal. III. Membrane disruption in ageing seeds of *Shorea robusta*. **Seed Science and Technology** **13**: 77-82.
- Nautiyal, A. R.; Thpliyal, A. P. & Purohit, A. N. 1985. Seed viability in sal. IV. Protein changes accompanying loss of viability in *Shorea robusta*. **Seed Science and Technology** **13**: 83-86.
- Neves, C. S. V. J. 1994. Sementes recalcitrantes. Revisão de literatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **29**: 1459-1467.
- Obendorf, R. L. 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. **Seed Science Research** **7**: 63-74.
- Ooms, J. J. J.; Léon-Kloosterziel, K. M.; Bartels, D.; Koornneef, M. & Karssen, C. M. 1993. Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology** **102**: 1185-1191.
- Ooms, J. J. J.; Wilmer, J. A. & Karssen, C. M. 1994. Carbohydrates are not the sole factor determining desiccation tolerance in seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum** **90**: 431-436.
- Osborne, D. J. & Boubriak, I. I. 1994. DNA and desiccation tolerance. **Seed Science Research** **4**: 175-185.
- Paiva, R. & Oliveira, P. D. 1995. The role of abscisic acid during seed precocious germination. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** **7**: 175-179.
- Pammenter, N. W.; Vertucci, C. W. & Berjak, P. 1991. Homeohydrous (recalcitrant) seeds: dehydration, the state of water and viability characteristics in *Landolphia kirkii*. **Plant Physiology** **96**: 1093-1098.
- 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.
- Pence, V. C. 1996. Germination, desiccation and cryopreservation of seeds of *Populus deltoides* Bartr. **Seed Science and Technology** **24**: 151-157.
- Pereira, J. P. 1980. Conservação da viabilidade do poder germinativo da semente de seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **15**: 237-244.
- 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 and Technology** **23**: 85-100.
- Probert, R. J. & Brierley, E. R. 1989. Desiccation intolerance in seeds of *Zizania palustris* is not related to developmental age or the duration of post-harvest storage. **Annals of Botany** **64**: 669-674.
- Roberts, E. H. 1973. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology** **1**: 499-514.
- Rosenberg, L. A. & Rinne, R. W. 1986. Moisture loss as a prerequisite for seedling growth in soybean seeds (*Glycine max* [L.] Merr.). **Journal of Experimental Botany** **37**: 1663-1674.
- Rosenberg, L. A. & Rinne, R. W. 1988. Protein synthesis during natural and precocious soybean seed (*Glycine max* [L.] Merr.) maturation. **Plant Physiology** **87**: 474-478.
- Rosenberg, L. A. & Rinne, R. W. 1989. Protein synthesis during rehydration, germination and seedling growth of naturally and precociously matured soybean seeds (*Glycine max*). **Annals of Botany** **64**: 77-86.
- Sacande, M.; Groot, S. P. C.; Hoekstra, F. A.; Castro, R. D. & Bino, R. J. 1997. Cell cycle events in developing neem (*Azadirachta indica*) seeds: are they related to intermediate storage behaviour? **Seed Science Research** **7**: 161-168.
- Senaratna, T.; McKersie, B. D. & Stinson, R. H. 1985. Antioxidant levels in germinating soybean seed axes in relation to free radical and dehydration tolerance. **Plant Physiology** **78**: 168-171.
- Steadman, K. J.; Pritchard, H. W. & Dey, P. M. 1996. Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. **Annals of Botany** **77**: 667-674.

- Still, D. W.; Kovach, D. A. & Bradford, K. J. 1994. Development of desiccation tolerance during embryogenesis in rice (*Oryza sativa*) and wild rice (*Zizania palustris*). **Plant Physiology** **104**: 431-438.
- Sun, W. Q.; Irving, C. & Leopold, A. C. 1994. The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. **Physiologia Plantarum** **90**: 621-628.
- Tarquis, A. M. & Bradford, K. J. 1992. Prehydration and priming treatments that advance germination also increase the rate of deterioration of lettuce seeds. **Journal of Experimental Botany** **43**: 307-317.
- Tetteroo, F. A. A.; Bomal, C.; Hoekstra, F. A. & Karssen, C. M. 1994. Effect of abscisic acid and slow drying on soluble carbohydrate content in developing embryoids of carrot (*Daucus carota* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Seed Science Research** **4**: 203-210.
- Vertucci, C. W.; Crane, J.; Porter, R. A. & Oelke, E. A. 1994. Physical properties of water in *Zizania* embryos in relation to maturity status, water content and temperature. **Seed Science Research** **4**: 211-224.
- Vertucci, C. W.; Crane, J.; Porter, R. A. & Oelke, E. A. 1995. Survival of *Zizania* embryos in relation to water content, temperature and maturity status. **Seed Science Research** **5**: 31-40.
- Vertucci, C.; Crane, J. & Vance, N. C. 1996. Physiological aspects of *Taxus breviflora* seeds in relation to seed storage characteristics. **Physiologia Plantarum** **98**: 1-12.
- Wechsberg, G. E.; Bray, C. M. & Probert, R. J. 1994. Expression of 'dehydrin-like' proteins in orthodox seeds of *Ranunculus sceleratus* during development and water stress. **Seed Science Research** **4**: 241-246.
- Williams, R. J. & Leopold, A. C. 1989. The glassy state in corn embryos. **Plant Physiology** **89**: 977-981.
- Xu, N. & Bewley, J. D. 1994. Desiccation and the switch from development to germination. Alfalfa embryos can synthesize storage proteins after germination if maturation drying is prevented. **Seed Science Research** **4**: 247-255.
- Xu, N.; Coulter, K. M. & Bewley, J. D. 1990. Abscisic acid and osmoticum prevent germination of developing alfalfa embryos, but only osmoticum maintains the synthesis of developmental proteins. **Planta** **182**: 382-390.