



LARISSA CARVALHO VILELA

**ANÁLISE FISIOLÓGICA DE EMBRIÕES DE
Inga vera Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D.
Pennington ARMAZENADOS EM MEIO
OSMÓTICO**

LAVRAS - MG

2018

LARISSA CARVALHO VILELA

**ANÁLISE FISIOLÓGICA DE EMBRIÕES DE *Inga vera* Willd. Subsp.
affinis (DC.) T. D. Pennington ARMAZENADOS EM MEIO OSMÓTICO**

Dissertação apresentada Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Florestal,
área de concentração Ciências Florestais,
para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. José Márcio Rocha Faria

Coorientador

Prof. Dr. Anderson Cleiton José

**LAVRAS - MG
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Vilela, Larissa Carvalho.

Análise fisiológica de embriões de *Ingaveira* Willd. subsp.
affinis (DC.) T. D. Pennington armazenados em meio osmótico /
Larissa Carvalho Vilela. - 2018.

63 p. : il.

Orientador(a): José Marcio Rocha Faria.

Coorientador(a): Anderson Cleiton José.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Armazenamento de sementes. 2. Recalcitrante. 3. Pólen. I.
Rocha Faria, José Marcio. II. José, Anderson Cleiton. III. Título.

LARISSA CARVALHO VILELA

**ANÁLISE FISIOLÓGICA DE EMBRIÕES DE *Inga vera* Willd. Subsp.
affinis (DC.) T. D. Pennington ARMAZENADOS
EM MEIO OSMÓTICO**

**PHYSIOLOGICAL ANALYSIS OF *Inga vera* Willd. Subsp. *affinis* (DC.) T.
D. Pennington EMBRYOS STORED
IN OSMOTIC MEDIUM**

Dissertação apresentada Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Florestal,
área de concentração Ciências Florestais,
para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 14 de março de 2018.

Prof. Dr. Jose Marcio Rocha Faria - UFLA

Prof. Dr. Anderson Cleiton José - UFLA

Prof. Dr. Ailton Gonçalves Rodrigues Junior - UFMG

Prof. Dr. José Márcio Rocha Faria
Orientador

**LAVRAS - MG
2018**

RESUMO

Dentre as particularidades de sementes, a recalcitrância pode ser compreendida como uma característica que faz com que a semente não possa ser armazenada e não perca seu conteúdo de água sem que haja prejuízos à sua viabilidade. Essa característica, ainda é pouco conhecida pelo grande número de espécies florestais e diferentes níveis de recalcitrância. Merece ser aprofundada e despertar interesses para estudos que visam estabelecer formas de reduzir a recalcitrância ou ao menos prolongar o armazenamento dessas sementes. Verifica-se que a tolerância à dessecação é controlada por vários genes, que podem ser expressos ou não, em diferentes partes da planta. Dessa forma, objetivou-se com este trabalho armazenar sementes de *Inga vera*, que apresentam comportamento recalcitrante, em três condições distintas, sendo elas câmara fria e polietileno glicol nos potenciais -1,6 MPa e -2,4MPa, por até 330 dias. Visando compreender a tolerância à dessecação entre diferentes partes da planta, os grãos de pólen da espécie foram contabilizados, classificados quanto à tolerância à dessecação e avaliados quanto à presença de pollenkit e amido. O armazenamento em meio osmótico controla a mobilização de água dentro das sementes, de forma que seu metabolismo seja reduzido e o consumo de suas reservas desacelerado. O estudo foi conduzido no Laboratório de Sementes Florestais da Universidade Federal de Lavras – UFLA, com embriões de *Inga vera* coletados em matrizes localizadas em Lavras – MG e Ribeirão Vermelho – MG. Foi possível concluir que os embriões de *Inga vera* podem ser armazenados com sucesso, em solução de polietileno glicol, no potencial de -1,6 MPa, por até 140 dias, sem que haja queda no seu percentual germinativo. As sementes de *Inga vera* foram classificadas como amiláceas, com resultados condizentes entre queda de germinação e queda no conteúdo de reservas. Os grãos de pólen da espécie foram classificados como ortodoxos e sem presença de pollenkit. Dessa forma, observa-se que a espécie *Inga vera* apresenta grãos de pólen tolerantes à dessecação e sementes recalcitrantes, podendo este fato estar relacionado à época de dispersão dessas estruturas, sugerindo que estudos posteriores sejam realizados, a fim de se compreender os estímulos que podem vir a induzir que as sementes expressem genes relacionados à tolerância e a semente possa ser seca e armazenada por períodos ainda mais longos.

Palavras-chave: Recalcitrância. Pólen. Armazenamento. Solução osmótica.

ABSTRACT

Among the peculiarities of seeds, the recalcitrance can be understood as a characteristic that makes the seed can not be stored and can not lose its water content without loss of viability. This phenomenon, which has not yet been studied mainly in forest seeds due to the large number of species and the different shing ways of reducing recalcitrance or at least prolonging the storage of these seeds. In addition, it is known that desiccation tolerance is controlled by several genes, which may or may not levels of recalcitrance among them, deserves to be deepened and arouses interest for studies that aim at establi be expressed, in different parts of the plant. In this way, the objective of this work was to store *Inga vera* seeds, which have a recalcitrant behavior, in three different conditions, being cold chamber and polyethylene glycol in potentials - 1.6 MPa and -2.4 MPa. In addition, the pollen grains of the species were counted, classified for desiccation tolerance and evaluated for the presence of pollenkit and starch. The osmotic storage controls the mobilization of water inside the seeds, so that their metabolism is reduced and the consumption of their reserves decelerated. The study was conducted at the Forest Seeds Laboratory located at Federal University of Lavras – UFLA, with *Inga vera* embryos collected in Lavras - MG and Ribeirão Vermelho - MG. It was possible to conclude that *Inga vera* embryos can be successfully stored in polyethylene glycol solution at -1.6 MPa potential for up to 140 days without any decrease in their germinative percentage. The *Inga vera* seeds were classified as amylaceous, with results consistent between reduction of germination and reduction in the contents of reserves. The pollen grains of the species were classified as orthodox and without pollenkit. Thus, it is observed that the species *Inga vera* presents genes of desiccation tolerance, being these expressed in the pollen grains, but not in the seeds, being able to be related to the time of dispersion of these structures, suggesting that further studies should be carried out in order to understand the stimuli that may induce the seeds expressing such genes and seed can be dried and stored for even longer periods.

Keywords: Recalcitrance. Pollen. Storage. Osmotic solution.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** (a) Semente de Inga vera revestida por sarcotesta; (b) Sementes de Inga vera após remoção da sarcotesta; (c) Embriões de Inga vera após remoção da sarcotesta e tegumento..... 13
- Figura 2** (a, b) Flores de Inga vera (c) inflorescência racemosa Inga vera..... 15
- Figura 3** (a)(b) Sementes consideradas germinadas; (c) Plântulas normais, desenvolvimento de parte aérea e sistema radicular; (d) Plântulas anormais, com desenvolvimento desigual entre sistema radicular e parte aérea. 27
- Figura 4** Embriões de Inga vera armazenados em solução de polietileno glicol..... 28
- Figura 5** (a) Embrião recém-colhido; (b) Embrião após 60 dias armazenado em Câmara Fria (c) Embrião após 60 dias armazenado em PEG -1,6 MPa (d) Embrião armazenado por 90 dias em PEG -1,6MPa (e) Embrião armazenado por 90 dias em Câmara Fria (f) Embrião armazenado por 140 dias em PEG -1,6 MPa (g) Embrião armazenados por 140 dias em PEG -2,4 MPa (h) Embrião armazenado por 140 dias em Câmara Fria (i) Embrião armazenado por 200 dias em PEG -1,6. 35
- Figura 6** Germinação de embriões de *Inga vera*, ao longo do tempo, considerando como germinada a semente em que em pelo menos um dos embriões houve protrusão radicular. 36
- Figura 7** Número de plântulas totais, ao longo do tempo, considerando a emergência de parte aérea ou sistema radicular dos embriões..... 38
- Figura 8** Número de plântulas normais, ao longo do tempo, considerando como plântulas normais aquelas em que a parte aérea e sistema radicular apresentavam mesma proporção 39
- Figura 9** Umidade ao longo do tempo 41
- Figura 10** (a) Imagem eixo embrionário semente recém-colhida, corante Lugol evidenciando grande quantidade de amido; (b) Imagem eixo embrionário semente armazenada por 280 dias em PEG -1,6 MPa, corante Lugol evidenciando o consumo de amido. 43

Figura 11 Políades de *Inga vera*. (a) Pólens viáveis quando submetidos ao teste de Alexandre. (b) Pólens inviáveis submetidos ao teste de Alexandre. (c) Pólens em óleo de imersão. (d) Pólens em meio aquoso. (e) Pólens submetidos ao teste com Lugol . (f) Pólens submetidos ao teste Sudan III. (Barras 50 µm)..... 49

LISTA DE TABELA

Tabela 1 Tabela de correlação de Spearman..... 42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Caracterização da espécie	12
2.1.1	Morfologia floral	13
2.2	Tolerância à dessecação em sementes	15
2.3	Classificação quanto à tolerância à dessecação e ao armazenamento ...	16
2.4	Armazenamento em meio osmótico	19
2.5	Pólen	19
2.5.1	Pollenkitt	23
2.5.2	Amido	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
	Experimento 1- Armazenamento de embriões em meio osmótico	25
3.1	Obtenção do material vegetal	25
3.2	Determinação do conteúdo de água (CA)	25
3.3	Testes de germinação	26
3.4	Armazenamento convencional	27
3.4.1	Armazenamento em solução de polietileno glicol	28
3.5	Microscopia ótica	28
3.6	Análise de dados	29
	Experimento 2- Pólen	30
3.7	Obtenção do material	30
3.8	Caracterização dos grãos de pólen	30
3.9	Viabilidade polínica	31
3.10	Contagem de grãos de pólen	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
	Armazenamento de embriões em meio osmótico	33
4.1	Pólen	44
	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

A conservação de espécies florestais pode ser realizada de duas maneiras, *in situ* ou *ex situ*. A primeira forma compreende a conservação dos indivíduos, em seu próprio habitat, feita normalmente por meio de Unidades de Conservação. Já a conservação *ex situ* é realizada fora do habitat natural, comumente por meio do armazenamento de sementes. No entanto nem todas as espécies produzem sementes que toleram o armazenamento, em função de suas características fisiológicas.

As sementes podem ser classificadas, de acordo com sua tolerância à dessecação e ao armazenamento em ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias. Sementes ortodoxas toleram a secagem em baixos valores de umidade e podem ser armazenadas em baixas temperaturas, mantendo-se viáveis por longos períodos. As sementes recalcitrantes não toleram a secagem e o armazenamento em baixas temperaturas e são dispersas com um alto teor de água. Já as intermediárias toleram secagem até valores próximos a 10%, mas não mantêm sua viabilidade por longos períodos quando armazenadas em baixas temperaturas.

Além da conservação das sementes em bancos de germoplasma, partes vegetativas e grãos de pólen, também, podem ser armazenados para programas de melhoramento genético (YATES; SPARKS, 1990). Para o sucesso da conservação dos grãos de pólen, é necessário que eles sejam secos, mantidos sob baixas temperaturas e, em alguns casos, devem ser mantidos em condições ambientais de ausência de oxigênio, a fim de se reduzir a respiração e o metabolismo (AKIHAMA; OMURA; KOZAKI, 1979), tornando-os inativos (SNYDER; CLAUSEN, 1974).

A tolerância à dessecação, presente em sementes ortodoxas, também, é um fenômeno presente nos grãos de pólen de algumas espécies e, assim como

acontece em sementes, existem espécies que produzem pólen tolerante à dessecação e espécies que produzem pólen não tolerante à dessecação. Se em sementes este fenômeno ainda tem muito a ser estudado, em pólen, os conhecimentos são ainda mais escassos (FRANÇA, 2010). Existem espécies que apresentam semente recalcitrante e pólen ortodoxo (exemplo: *Cocos nucifera* L. - Arecaceae), semente recalcitrante e pólen recalcitrante (*Mangifera indica* L. - Anacardiaceae), semente ortodoxa e pólen ortodoxo (*Ricinus communis* L. - Euphorbiaceae) e semente ortodoxa e pólen recalcitrante (*Bauhinia forficata* Link - Fabaceae) (FRANCHI, 2011), mas a classificação do pólen da maioria das espécies florestais quanto à tolerância à dessecação ainda é desconhecida.

Diversas espécies que produzem sementes com comportamento recalcitrante apresentam importância tanto econômica quanto ambiental, mas apresentam restrições para seu uso, já que não podem ser armazenadas por longos períodos e o início da produção das mudas deve ser, então, imediata à coleta. Dessa forma, estudos que visam prolongar o tempo de armazenamento de sementes recalcitrantes se fazem necessários, visto que tal comportamento é comum dentre as espécies florestais.

Uma das espécies que produz sementes com comportamento recalcitrante é *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Pennington. De ocorrência em áreas úmidas, suas sementes são dispersas com alto teor de água e curta longevidade (FARIA et al., 2006), perdendo a viabilidade em menos de 15 dias (BILIA; BARBEDO, 1997; CARVALHO, 2000). A espécie é de grande interesse em trabalhos de recuperação ambiental, paisagismo, na indústria farmacêutica, sendo muito utilizada no tratamento de bronquite, diarreias e sua madeira é empregada para caixotaria e confecção de brinquedos.

Uma alternativa para prolongar a viabilidade de sementes recalcitrantes é armazená-las em soluções osmóticas de potenciais hídricos conhecidos, que prolongam o tempo de armazenamento das sementes, por criar um meio

osmótico em seu entorno evitando a perda ou ganho de água, ou até mesmo a germinação (STEUTER; MOZAFAR; GOODIN, 1981). Uma solução utilizada para tal fim é a de polietileno glicol (PEG 6000) que apresenta alto peso molecular, portanto não penetra na semente, controlando, dessa forma, a mobilização de água dentro delas.

Estudos anteriores indicaram uma boa resposta das sementes de *Inga vera*, quando armazenadas em soluções osmóticas (ANDREO; NAKAGAWA; BARBEDO, 2006) e, por isso, com este trabalho, buscou-se comparar os efeitos do armazenamento convencional em câmara fria e do armazenamento em meio osmótico na longevidade de embriões desta espécie e em suas mudanças fisiológicas.

Além disso, objetiva-se classificar os grãos de pólen da espécie quanto à tolerância à dessecação, observar a presença ou não de amido como substância de reserva e verificar estruturas de adesão como o pollenkit na superfície dos grãos. Tais resultados servirão como subsídio a estudos posteriores, principalmente, no que diz respeito a estudos de expressão gênica, que poderão proporcionar possibilidades para armazenamento de espécies com sementes recalcitrantes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização da espécie

A família Fabaceae, a terceira maior de espermatófitas, ficando antes apenas da Asteraceae e da Orchidaceae, compreende cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies (BARROSO et al., 1991; LEWIS et al., 2005), dentre os quais, 178 gêneros e, aproximadamente, 3.200 espécies ocorrem no território brasileiro (BARROSO et al., 1991). A subfamília Mimosoideae tem em torno de 60 gêneros e 3000 espécies com hábitos variáveis entre árvores, arbustos, ervas e lianas. Os gêneros dessa subfamília com maior diversidade são Acácia, Mimosa e Ingá, o qual compreende cerca de 300 espécies (PENNINGTON, 1997).

Com origem tupi, o nome ingá ou angá quer dizer "que tem semente envolvida". A espécie *Inga vera* apresenta indivíduos com altura média entre 5 e 10 m e 70 cm de diâmetro, podendo atingir até 25 metros de altura quando em seu habitat natural. É uma espécie adaptada a solos úmidos e arenosos, do grupo ecológico das pioneiras (RODRIGUES, 1905).

Distribuída desde o estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, com grande número de indivíduos no estado de São Paulo (LIEBERG, 1990), a espécie *Inga vera* apresenta importância ecológica pela atração da fauna pelos frutos com sarcotesta adocicada (RAGUSA NETTO; FECCHIO, 2006) e na indústria farmacêutica, sendo muito utilizada no tratamento de bronquite, diarreias, atraindo, também, interesse madeireiro pela indústria de brinquedos e caixotaria (CAMPOS; LAURENTI, 1998). A espécie é comumente utilizada em programas de reflorestamento ambiental, principalmente, em áreas de mata ciliar, pelo fato de seus indivíduos apresentarem rápido crescimento e tolerarem solos inundados. Além disso, apresenta associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio (REYNEL; PENNINGTON, 1997).

A floração do *Inga vera* acontece entre os meses de agosto e novembro e a maturação dos frutos entre dezembro e fevereiro (LORENZI, 2000; STEIN, 2007). Seus frutos maduros apresentam cor castanho amarelada, são carnosos, indeiscentes e com comprimento médio de 7cm (3-15cm) (FARIA; VAN LAMMEREN, 2004).

Produz sementes anualmente em grande quantidade, que apresentam rápida germinação e, em geral, apresentam poliembrionia (LORENZI, 1992; OLIVEIRA, 1991). Suas sementes são dispersas com umidade bastante elevada (em média, 60%), são elípticas, de coloração verde e são cobertas por uma sarcotesta branca adocicada, que é de grande atração para a fauna (Figura 1) (FARIA; VAN LAMMEREN, 2004; PENNINGTON, 1997). Muitas vezes, as sementes têm sua germinação iniciada ainda dentro da vagem, fenômeno conhecido como viviparidade (FARIA; VAN LAMMEREN, 2004).

Figura 1 (a) Semente de *Inga vera* revestida por sarcotesta; (b) Sementes de *Inga vera* após remoção da sarcotesta; (c) Embriões de *Inga vera* após remoção da sarcotesta e tegumento.



2.1.1 Morfologia floral

Inga spp., assim como a maioria das espécies da subfamília Mimosoideae, apresenta flores actinomorfas, ou seja, mais de dois planos de

simetria podem ser traçados, ao longo do eixo central, com inflorescência racemosa, que são flores com pedicelo, que apresentam um único eixo e com as flores localizadas em diferentes posições desse ramo principal (BARROS; WEBBER; MACHADO, 2008; ENDRESS, 1994).

O perianto é inconspícuo, não evidente, os filetes são alongados e as anteras de tamanho muito reduzido. O estilete, assim como os filetes, é longo, o ovário apresenta apenas um loco e o estigma, assim como as anteras, apresenta pequenas dimensões (FAEGRI; VAN DER PIJL, 1979).

As características florais estão diretamente relacionadas ao vetor de polinização da espécie, sejam elas ecológicas, fisiológicas ou morfológicas (ENDRESS, 1994; FAEGRI; VAN DER PIJL, 1979; PROCTOR; YEO; LACK, 1996). O gênero pode ser considerado “generalista”, já que sua estrutura não é adaptada a apenas um polinizador, já sendo constatada a presença de morcegos, beija-flores, esfingídeos e abelhas atuando como polinizadores (BARROS; WEBBER; MACHADO, 2008; ENDRESS, 1994; FEINSINGER; COLWELL, 1978; KOPTUR, 1983).

Figura 2 (a, b) Flores de *Inga vera* (c) inflorescência racemosa *Inga vera*



Fonte: ÁRVORES... (2018).

2.2 Tolerância à dessecação em sementes

A tolerância à dessecação pode ser definida como a capacidade de um organismo retornar o seu metabolismo, quando reidratado, após a perda quase total de água (OLIVER; TUBA; MISHLER, 2000). De acordo com o comportamento da semente em relação à dessecação e ao armazenamento, elas podem ser classificadas em ortodoxas, recalcitrantes (ROBERTS, 1973) ou intermediárias (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990).

Estudos anteriores (FINCH-SAVAGE et al., 1992) mostram que sementes recalcitrantes são dispersas, com um teor elevado de água, podendo germinar imediatamente após o desligamento da planta mãe, sem a necessidade de uma fonte externa de água. Já as sementes ortodoxas apresentam o fenômeno de tolerância à dessecação, processo de perda de água ao final do período de maturação, que regula o metabolismo da semente para um processo de germinação e não mais de desenvolvimento como era até este momento. A tolerância à dessecação envolve mudanças hormonais, alterações quantitativas e qualitativas de proteínas e açúcares e ocorre apenas nas sementes com comportamento ortodoxo e, portanto permite que elas permaneçam viáveis quando armazenadas com baixos teores de água (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998; FARRANT; PAMMENTER; BERJAK, 1989; MARTINS; NAKAGAWA; BOVI, 1999).

Já as sementes recalcitrantes não são tolerantes à dessecação, sendo significativamente sensíveis à redução do teor de água. Essa diferença de comportamento entre as sementes ortodoxas e recalcitrantes pode ser entendida como consequência do processo evolutivo da seleção natural (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998). Acredita-se que as espécies com sementes recalcitrantes evoluíram em locais com condições ótimas para a germinação, durante praticamente todo o ano, comumente solos úmidos, assim a germinação ocorria imediatamente após o processo de maturação (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998).

2.3 Classificação quanto à tolerância à dessecação e ao armazenamento

Sementes ortodoxas suportam perder água até valores próximos de 5%, sem que sua viabilidade seja perdida e podem ser armazenadas por longos períodos em baixas temperaturas. Já as recalcitrantes são sensíveis à secagem e

ao armazenamento, podendo perder água em limites variáveis, de acordo com a espécie, não tendo, portanto capacidade de serem armazenadas por longos períodos por apresentarem metabolismo intenso desde a sua formação até o momento pós-colheita em razão do alto teor de água presente nelas (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998; CASTRO; BRADFORD; HILHORST, 2004; FERREIRA; BORGUETTI, 2009; HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001; ROBERTS, 1973). Ellis, Hong e Roberts (1990) propuseram uma classificação intermediária entre ortodoxas e recalcitrantes, abrangendo sementes que podem ser secas até em torno de 10% de umidade, mas não toleram armazenamento em longo prazo.

Após a maturação, todas as sementes apresentam redução de umidade, mas o limite dessa secagem varia entre espécies e, nas sementes recalcitrantes, este limite de secagem é bem restrito (FARRANT et al., 1996). Um problema, ao se trabalhar com sementes recalcitrantes, é o fato de não existir um valor padrão de secagem das sementes, visto que o ponto de perda da viabilidade é muito variável entre as espécies (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990; VIEIRA et al., 2008).

Alguns autores acreditam que a classificação das sementes em ortodoxa, recalcitrante ou intermediária não seja representativa do comportamento das espécies, justificada pela grande diversidade existente e afirmam que existem níveis de recalcitrância (BERJAK; PAMMENTER, 1994; PAMMENTER; BERJAK, 1999; PAMMENTER; NAIDOO; BERJAK, 2003). A classificação de maneira mais precisa é fundamental, para se definir estratégias específicas para a conservação das espécies em bancos de germoplasma (BONJOVANI; BARBEDO, 2008).

Sementes recalcitrantes pelo alto teor de água que apresentam, no momento em que se desligam da planta mãe, podem germinar durante o armazenamento convencional. Além disso, a alta atividade respiratória, em

consequência do intenso metabolismo, pode resultar na redução das reservas da semente e em um desordenamento do metabolismo. Isso pode culminar na geração excessiva de radicais livres que favorecem a deterioração das sementes reduzindo sua viabilidade e a capacidade de armazenamento (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998; FERREIRA; BORGHETTI, 2009).

O grupo ecológico das espécies está diretamente associado ao comportamento das sementes durante o armazenamento. De acordo com a classificação proposta por Swaine e Whitmore (1988), as espécies podem ser divididas em dois grandes grupos ecológicos: pioneiras e clímax. As pioneiras são aquelas espécies que necessitam de luz direta, para que suas sementes germinem, normalmente, produzem sementes dormentes pela impermeabilidade do tegumento e que formam bancos de semente e, por apresentarem normalmente comportamento ortodoxo, podem ser armazenadas por longos períodos de tempo. Para Oliveira Filho et al. (1994), adaptando a classificação anterior, as espécies clímax podem ser subdivididas em duas categorias: as exigentes de luz e as tolerantes à sombra, relacionadas à exigência de luz para o crescimento das plântulas. As espécies deste grupo ecológico se regeneram, principalmente, via banco de plântulas e suas sementes, normalmente, são classificadas como recalcitrantes.

Desde a década de 90, os estudos sobre o comportamento de sementes de espécies nativas, durante o armazenamento, vêm sendo intensificados (DAVIDE et al., 2003; REIS; CUNHA, 1997; VARELA et al., 1998), mas pela grande diversidade de espécies, as informações ainda são escassas e mais estudos são necessários.

2.4 Armazenamento em meio osmótico

Estudos utilizando reguladores de crescimento, como ácido abscísico (ABA), que inibe a germinação, vêm apresentando resultados satisfatórios na redução da atividade metabólica de sementes recalcitrantes das espécies *Eugenia brasiliensis* Lam. e de *Inga vera* (ANDRÉO; NAKAGAWA; BARBEDO, 2006). Além disso, o controle da mobilização de água na semente como ferramenta para regular o metabolismo tem sido estudado, principalmente, em leguminosas (POWELL, 1998), sendo realizado, a partir da embebição em substrato úmido ou a imersão em soluções osmóticas com potencial hídrico conhecido, que permite evitar ou controlar que a semente ou embrião absorva ou perca água (CARVALHO et al., 2000; PAMMANTER et al., 2002).

Pelo fato de ser um polímero de alto peso molecular, inerte, não iônico, que não penetra nas células e, portanto não causa toxidez às sementes, o polietileno glicol (PEG) é um dos produtos mais usados no preparo de soluções osmóticas utilizadas no armazenamento de sementes. As soluções osmóticas são preparadas com potenciais hídricos conhecidos, criando um meio osmótico em volta das sementes, que controla a mobilização de água dentro delas, fazendo com que as sementes atinjam o equilíbrio higroscópico com o meio e, dessa forma, não se tenha ganho ou perda significativos de água, além de evitar que a germinação se inicie durante o armazenamento (STEUTER; MOZAFAR; GOODIN, 1981).

2.5 Pólen

Além da conservação das sementes em bancos de germoplasma, partes vegetativas e grãos de pólen, também, podem ser armazenados para programas de melhoramento genético (YATES; SPARKS, 1990). O tempo de

armazenamento, assim como em sementes, depende de características intrínsecas do pólen (que varia entre as espécies), como tolerância à dessecação, grau de umidade e, ainda, da temperatura de armazenamento. Pólen de algumas espécies apresentam melhor armazenabilidade quando na ausência de oxigênio (AKIHAMA; OMURA; KOZAKI, 1979). Sprague e Johnson (1977) afirmam, em seus trabalhos que, quando armazenados com teor de água entre 8 e 10%, os grãos serão longevos, independentemente do método de armazenamento. A secagem diminui o risco de formação de cristais intracelulares que se formam abaixo de 0°, que podem causar lesões às membranas e, ainda, romper tecidos das células, comprometendo a viabilidade dos grãos (BARNABÁS; RAJKI, 1976; POLITO; LUZA, 1988).

No entanto a quantidade de água que pode ser removida dos grãos, sem que eles percam a viabilidade, varia de acordo com a espécie e a secagem, ainda, é pouco elucidada na literatura; alguns desses trabalhos não detalharam a metodologia e o teor de água residual dos grãos de pólen (AKIHAMA; OMURA; KOZAKI, 1978; FERREIRA; BORGHETTI, 2009; MCGUIRE, 1952). A secagem deve ser um procedimento cauteloso, cuja temperatura não deve exceder 28°C e, caso a água de constituição seja removida, a germinação fica comprometida. Algumas das poucas técnicas de secagem de grãos de pólen já estudadas são o uso de substâncias higroscópicas como sílica gel, a liofilização e o uso de cloreto de sódio (AHLGREN; AHLGREN, 1978; AKIHAMA; OMURA; KOZAKI, 1978; FERREIRA et al., 2007; MCGUIRE, 1952).

Assim como ocorre em sementes ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias, os grãos de pólen, também, têm comportamento variável em relação à dessecação. Dessa forma, algumas espécies podem não tolerar a desidratação e, assim, ter a capacidade de armazenamento reduzida, quando comparada a espécies que produzem grãos de pólen ortodoxos.

A maioria das gimnospermas apresenta tanto grãos de pólen quanto sementes ortodoxas (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007; CACCAVARI, 2003; DEL ZOPPO; GALLESCHI; SAVIOZZI, 1998; DICKIE; PRITCHARD, 2002; FAEGRI; VAN DER PIJL, 1979; FARRANT; PAMMENTER; BERJAK, 1989; FOUNTAIN; HOLDSWORTH; OUTRED, 1989; SOUSA; HATTEMER, 2003; YAO et al., 2004). Já nas angiospermas a tolerância à dessecação é pouco relacionada à taxonomia, mesmo algumas famílias apresentando indivíduos características semelhantes (HONG; LININGTON; ELLIS, 1996), sendo mais fortemente relacionada a condições ambientais em que as plantas se desenvolvem (FRANCHI, 2011).

A ortodoxia e a recalcitrância oferecem as mesmas vantagens e desvantagens adaptativas ao pólen e às sementes, refletindo diretamente no seu tempo de maturação e germinação. Uma das principais diferenças entre o pólen e a semente é o tempo de sobrevivência, após a dispersão. Enquanto a semente recalcitrante pode sobreviver por dias, o pólen recalcitrante só sobrevive algumas horas, já o pólen ortodoxo pode permanecer viável por alguns dias e as sementes por vários anos (FRANCHI, 2011; FRANCHI; NEPI; PACINI, 2002; NEPI; FRANCHI; PACINI, 2001).

As sementes podem ter umidade diferente entre suas partes e até mesmo entre diferentes partes do embrião, enquanto o pólen tem umidade uniforme entre suas partes, justamente por ter tamanho e número de células reduzidos (CONNOR; SOWA, 2004; EVERED; MAJAEVADIA; THOMPSON, 2007). O hábito da planta, a densidade populacional e o clima afetam diretamente a dispersão do pólen e a eficiência da reprodução da espécie, além disso, essas condições interferem também nas estratégias dos grãos para reduzir os danos durante a dispersão (FRANCHI, 2011).

Os mecanismos de tolerância à dessecação podem ser diferentes entre as sementes e o pólen, principalmente, por diferenças nas dimensões das duas

estruturas. Assim como nas sementes, estudos já identificaram LEA proteínas, nos grãos de pólen de algumas espécies, como *Typha latifolia* L. Supõe-se que estas proteínas atuem junto com açúcares no citoplasma, conferindo-lhe maior estabilidade (FRANCHI, 2011; WOLKERS et al., 2001) Além disso, outra semelhança é que o sistema antioxidante, também, é ativo no pólen e nas sementes (ALMARAZ-ABARCA et al., 2007; FRANK et al., 2009; MOORE et al., 2009; OHTA et al, 2007).

Deve-se lembrar, ainda, que diversos mecanismos estão envolvidos na tolerância à dessecação, para que estes órgãos e estruturas sejam mantidos viáveis e que esses mecanismos podem estar ausentes ou mesmo atuando de forma ineficaz nas espécies que produzem sementes ou grãos de pólen com comportamento recalcitrante. Ressalta-se, também, que a tolerância à dessecação não é controlada apenas por um mecanismo, mas, sim, por um conjunto desses processos que, se atuassem isoladamente, provavelmente, não proporcionariam tal resistência àquele órgão ou estrutura. Quando esses mecanismos não estão presentes, como ocorre nas sementes e pólen recalcitrantes, essas estruturas devem ser dispersas de uma forma mais rápida e eficiente para que se mantenham vivas (FRANCHI, 2011).

Entre a maturação e a germinação, tanto o pólen quanto a semente passam por processos de apresentação e dispersão. O termo apresentação é mais comumente utilizado para pólen (PACINI; FRANCHI, 2000; PACINI; HESSE, 2004), nessa etapa, os grãos podem experimentar ganho ou perda de água que são permitidos por propriedades da parede e do citoplasma dos grãos de pólen, essa capacidade de resistir a mudanças de volume é conhecida como harmomegata (PACINI, 1990; WODEHOUSE, 1935), e foi identificada apenas nos grãos tolerantes à dessecação (GUARNIERI et al., 2006; LISCI; TANDA; PACINI, 1994) . Em resposta a essas mudanças, nas condições ambientais, os carboidratos trabalham se transformando e evitando que haja variações

descontroladas, nos teores de água, convertendo-se de uma forma para outra, evitando, assim, a absorção ou perda descontrolada de água dos grãos. Já os grãos que não toleram a perda de água, se dispersos em ambientes secos, perdem sua umidade rapidamente e morrem por não terem harmomegatia (FRANCHI, 2011; FRANCHI et al., 2007; NEPI; PACINI, 1993).

Apesar da tolerância à dessecação ser entendida como um mecanismo evolutivo (PAMMENTER; BERJAK, 2000), a ocorrência de órgãos na mesma planta com diferentes graus de tolerância à perda de água ainda deve ser estudada por ser difícil de se compreender. É mais frequente que se encontrem espécies com sementes e pólen ortodoxos, já que os órgãos intolerantes são mais susceptíveis ao fracasso na reprodução por sobreviverem por períodos muito curtos, dependendo de adaptações mais particulares de dispersores e polinizadores (FRANCHI, 2011).

Franchi (2011), em seus estudos, levanta algumas hipóteses para entender por que podem ocorrer espécies com sementes e pólen com tolerância à dessecação em diferentes graus; algumas delas justificam que espécies que ocorrem, em ambientes com condições favoráveis à germinação, na época de dispersão das sementes e ambientes mais hostis, na época de dispersão dos grãos de pólen, ou o inverso, podem ter comportamentos diferentes; outras espécies podem ter se adaptado por terem florescimento noturno adaptadas a condições ambientais mais áridas como as Cactaceae, dentre outras.

2.5.1 Pollenkitt

Pollenkitt é o material adesivo mais comum presente nos grãos de pólen das Angiospermas. Pode ser descrito como uma mistura hidrofóbica que contém lipídios saturados e insaturados, carotenoides, proteínas e carboidratos (DOBSON,

1988; HESSE, 1993; LUNAU, 1995; PARKINSON; PACINI, 1995; SANTOS; MARIATH, 2003; WEBER, 1996; WIERMANN; GUBATZ, 1992).

Pollenkitt é uma estrutura com as mais diversas funções e trabalhos anteriores identificaram-na em quase todas as angiospermas zoófilas já estudadas, mas não em gimnospermas (HESSE 1978, 1979, 1981). Dentre suas funções, destacam-se manter o pólen na antera até a dispersão; facilitar a dispersão do pólen; proteger o pólen da radiação ultravioleta; proteger protoplastos de pólen de fungos e bactérias; tornar o pólen atraente para os animais; tornar o pólen visível aos olhos dos insetos; permitir a adesão aos corpos de insetos; facilitar a adesão ao estigma; facilitar a reidratação do pólen; reduzir a perda de água dos grãos de pólen (PACINI, 2005). Espécies que não apresentam pollenkitt, em seus grãos, são mais vulneráveis à perda de água, e a viabilidade pode ser perdida em poucas horas, como é o caso das Poaceae (FRANCHI; FRANCHI; CORTI, 1997).

Além disso, a presença da estrutura do pollenkitt está diretamente relacionada a espécies entomófilas e, nesses indivíduos, esta estrutura se localiza na exina, já, em espécies anemófilas, ocorre normalmente em cavidades internas da exina.

2.5.2 Amido

A importância do amido como substância de reserva nos grãos de pólen é bastante relacionada à manutenção da viabilidade dos grãos, já que esta substância se converte em glicose, frutose, sacarose e pectinas, que, além de auxiliarem na germinação do tubo polínico, aumentam a resistência dos grãos em ambientes desfavoráveis (RODRIGUEZ-GUARCIA; RANI-ALAOUI; FERNANDEZ, 2003; PACINI; GUARNIERI; NEPI, 2006). Os carboidratos contribuem com o balanço hídrico dos grãos de modo que, no momento de dispersão, os grãos sofram menores impactos pelo meio externo (DETTKE; SANTOS, 2011; PACINI, 1996; PACINI; GUARNIERI; NEPI, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

- **Experimento 1** - Armazenamento de embriões em meio osmótico

3.1 Obtenção do material vegetal

A coleta dos frutos maduros foi realizada na cidade de Ribeirão Vermelho, MG, em área localizada a 21°11'31.56"S e 45°03'36.95"O, elevação 780m. Após a coleta, os frutos foram levados ao Laboratório de Sementes Florestais da Universidade Federal de Lavras, onde foi realizado o beneficiamento manual das sementes, de acordo com Oliveira e Beltrati (1992), consistindo em sua retirada das vagens e, posteriormente, a remoção da sarcotesta. Durante a retirada da sarcotesta, o tegumento também foi removido, restando o embrião.

3.2 Determinação do conteúdo de água (CA)

Para determinação do conteúdo de água dos embriões, foi utilizado o método de estufa 105±3°C por 24 horas, utilizando os embriões inteiros, conforme recomendação das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Após a pesagem dos embriões secos em estufa, foi utilizada a equação abaixo para determinar o seu conteúdo de água.

$$CA(\%) = \frac{100(P - p)}{P - t}$$

Onde em:

P = peso inicial (peso do recipiente e sua tampa mais o peso dos embriões úmidos);

p = peso final (peso do recipiente e sua tampa mais o peso dos embriões secos);

t = tara (peso do recipiente e sua tampa).

3.3 Testes de germinação

Os testes de germinação foram feitos com embriões recém-colhidos e, posteriormente, em um prazo determinado de 30 dias com amostras dos embriões armazenados tanto em câmara fria como em solução de PEG, nos dois potenciais osmóticos, até quando se contabilizou germinação. O prazo de 30 dias entre os testes, previamente definido, foi alterado nas contagens que se fizeram necessárias; quando a contagem de germinação de um ponto se mantinha próxima ao ponto anterior, o prazo foi prorrogado. Os testes foram realizados com embriões armazenados por até 330 dias, para a condição de armazenamento, em que a germinação dos embriões se manteve.

Os testes foram realizados em 4 repetições de 25 embriões, para cada tratamento, em rolo de papel germitest umedecido, mantido em câmara do tipo B.O.D. a $30\pm 1^\circ\text{C}$, luz constante (modificado de ANDREO; NAKAGAWA; BARBEDO, 2006). No caso de sementes poliembriônicas, os embriões provenientes da mesma semente foram mantidos juntos em todas as contagens. Para se contabilizar a germinação, a semente foi considerada germinada quando em pelo menos um dos seus embriões houve protrusão radicular.

Foram consideradas como plântulas normais aquelas cuja parte aérea e o sistema radicular cresceram de forma proporcional. Para a contagem de plântulas totais, contabilizou-se a emergência de apenas radícula, apenas parte aérea, embriões cujo crescimento de radícula e parte aérea não foram

proporcionais e as plântulas normais. Os testes tiveram duração de 14 dias (ANDREO; NAKAGAWA; BARBEDO, 2006).

Figura 3 (a)(b) Sementes consideradas germinadas; (c) Plântulas normais, desenvolvimento de parte aérea e sistema radicular; (d) Plântulas anormais, com desenvolvimento desigual entre sistema radicular e parte aérea.



3.4 Armazenamento convencional

Os embriões foram armazenados e acondicionados em sacos plásticos selados em câmara fria. A temperatura de armazenamento ficou entre 5 e 8°C e, a cada 30 dias, foram retiradas amostras para serem submetidas a testes de umidade e de germinação.

3.4.1 Armazenamento em solução de polietileno glicol

Os embriões foram dispostos em bandejas contendo solução de polietileno glicol (PEG 6000), nos potenciais osmóticos de -1,6 e -2,4 MPa, baseando-se em Andreo, Nakagawa e Barbedo (2006), cujo trabalho definiu curvas de hidratação, buscando-se encontrar o ponto de equilíbrio higroscópico entre os embriões e o meio. Os embriões foram levemente imersos na solução, visando permitir trocas gasosas do embrião com o meio externo à solução (Figura 3).

As bandejas foram cobertas com filme de PVC visando reduzir a perda de água por evaporação e a consequente mudança no potencial osmótico da solução. A solução foi renovada todas as vezes em que se notou mudança em sua cor ou aspecto. O armazenamento foi realizado em câmaras do tipo B.O.D., com temperatura de $10 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro (ANDREO; NAKAGAWA; BARBEDO, 2006; BARBEDO; CICERO, 2000; BILIA; MARCOS FILHO; NOVENBRE, 1999).

Figura 4 Embriões de *Inga vera* armazenados em solução de polietileno glicol



3.5 Microscopia ótica

Foram retiradas amostras de eixos embrionários das três condições de armazenamento, nos mesmos prazos em que se retiraram amostras para testes de

germinação. Estes eixos embrionários, utilizados para microscopia eletrônica, foram armazenados em Karnovsky até o momento da análise.

Para observação em microscópio, realizaram-se cortes à mão livre com auxílio de lâmina de barbear nos eixos embrionários provenientes dos pontos: embrião recém-colhido, embrião armazenado há 90 dias nos três tratamentos e embrião armazenado há 280 dias no potencial de -1,6 Mpa, visto que, nos demais tratamentos, os embriões já se encontravam mortos. Para visualizar a estrutura desejada, utilizou-se o corante Lugol para corar o amido (KRAUS; ARDUIN, 1997). O procedimento para coloração, concentração do reagente, preparo das lâminas seguiu o proposto por Ventrella (2013). Os cortes foram observados e fotografados em microscópio Olympus CX41 acoplado com câmera digital Belcam DIV-3000.

3.6 Análise de dados

As análises estatísticas foram realizadas, por meio do software estatístico R for Windows (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013), e os gráficos foram gerados utilizando o programa SigmaPlot. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial duplo com um tratamento adicional 3 (Câmara fria, PEG -1,6 MPa, PEG -2,4 MPa) x 9 (0, 30, 60, 90, 140, 200 e 260, 300 e 330 dias). Os dados foram analisados, por meio de Modelos Lineares Generalizados (GLM), seguindo-se a família Binomial e, quando observado efeito significativo dos tratamentos pelo teste de Chisq, as médias foram comparadas pelo teste LSD a 5% de probabilidade.

Foi feita, ainda, análise de correlação de Spearman, usando os dados de germinação, plântulas normais e plântulas totais, correlacionando-os com o tempo de armazenamento, condição de armazenamento e umidade.

➤ Experimento 2- Pólen

3.7 Obtenção do material

A coleta das flores foi realizada em árvores localizadas no campus da Universidade Federal de Lavras, na cidade de Lavras, MG. Para o teste de caracterização dos grãos de pólen, as flores foram coletadas em antese. Para a realização dos testes de viabilidade e contagem do número de grãos de pólen por antera e por flor, as flores foram coletadas em pré-antese. Após a coleta, as flores foram levadas ao Laboratório de Sementes Florestais da Universidade Federal de Lavras, onde foi realizada a montagem das lâminas para observação em microscópio.

3.8 Caracterização dos grãos de pólen

Os grãos de pólen foram caracterizados em relação ao seu status hídrico e à presença de amido e pollenkitt. Para isso, eles foram removidos de flores em antese, sendo imediatamente submetidos a testes em óleo de imersão, água, Lugol (DAFNI, 1992) e Sudan III (BAKER; BAKER, 1979), respectivamente e montados em lâminas e lamínulas para observação em microscópio de luz. Todas as imagens foram registradas com capturador BEL acoplado ao microscópio óptico.

Para o experimento de avaliação em relação ao status hídrico, os grãos de pólen foram observados, primeiramente, em lâmina contendo óleo de imersão, a fim de serem analisados com o formato e aspecto do momento de dispersão. Posteriormente, montou-se uma lâmina com grãos de pólen e água, para avaliar se os grãos embebem quando submetidos em meio aquoso. Esse teste permite concluir se os grãos são classificados como ortodoxos ou

recalcitrantes; quando os grãos mantêm seu formato semelhante tanto em água quanto em óleo, infere-se que eles sejam recalcitrantes, por serem dispersos com teor elevado de água; quando se observam mudanças nas dimensões e formato dos grãos observados em lâmina com água, em relação àqueles em óleo, pode-se concluir que os grãos foram dispersos com teor baixo de água, portanto embeberam água da lâmina e são classificados como ortodoxos.

3.9 Viabilidade polínica

Nesse experimento, as anteras completamente formadas de diferentes flores foram coletadas e, posteriormente, fixadas em Carnoy (3:1) álcool e ácido acético glacial, sendo a solução substituída duas vezes em intervalos de 15 minutos e, em seguida, congeladas. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e coloração com corante de Alexander (ALEXANDER, 1980). Para as análises, foram considerados viáveis os grãos de pólen nos quais todo o protoplasma apresentou coloração roxa e inviáveis aqueles corados de verde.

Para este estudo, foram avaliadas cinco lâminas, sendo contado o número total de grãos de pólen viáveis e inviáveis e o resultado final expresso em porcentagem média de viabilidade.

3.10 Contagem de grãos de pólen

Para este experimento, foi realizada a contagem do número de anteras por flor de diferentes flores de *Inga vera*, sendo, posteriormente, calculada a média do número de anteras por flor. Em seguida, foram selecionadas 400 anteras de forma aleatória e armazenadas em quatro tubos Eppendorf, com 100 anteras cada. Os tubos permaneceram destampados à temperatura controlada (27 °C), por 24 horas

na ausência de luz, para ocorrência da deiscência das anteras e, assim, a liberação dos grãos de pólen (RAMOS et al., 2008).

Posteriormente à secagem, foi acrescida aos tubos uma solução de 1.000 μL de ácido láctico. Após 24 horas, uma amostra de 10 μL de cada Eppendorf foi colocada em uma lâmina de leitura (Neubauer). Para a contagem do número de grãos de pólen, foi utilizado um microscópio óptico (objetiva de 100 x 10). Esse experimento foi conduzido com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por quatro leituras na lâmina de Neubauer.

A quantidade de grãos de pólen por antera foi calculada, multiplicando-se a média do número de grãos de pólen de cada amostra pelo volume do ácido láctico da solução (1.000 μL) e dividindo este valor pelo produto entre o volume de ácido láctico da amostra (10 μL) e o número de anteras de cada tubo (100). O número de grãos de pólen por flor foi calculado pela multiplicação da estimativa do número médio de grãos de pólen por antera pelo número médio de anteras por flor (ZAMBON et al., 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

➤ Armazenamento de embriões em meio osmótico

Os embriões recém-colhidos apresentavam coloração esverdeada (Figura 5-a) e umidade de 64%. Nesse ponto, alcançaram 100% de germinação e, em razão da poliembrionia, as 100 sementes de cada repetição produziram, em média, 225 plântulas, das quais 178 normais.

Pode-se observar na Figura 4 que até os 30 dias de armazenamento não houve diferença significativa na germinação dos embriões armazenados em câmara fria (93% de germinação) e os armazenados em PEG a $-1,6\text{MPa}$ (99% de germinação) e a $-2,4\text{MPa}$ (98% de germinação). Aos 60 dias, os embriões armazenados em câmara fria perderam a cor esverdeada que apresentavam, no início dos trabalhos e ficaram escurecidos (Figura 5-b). A germinação neste ponto foi de apenas 14%, apresentando diferença significativa dos tratamentos de armazenamento em PEG, em que a germinação se encontrava em torno de 99% (Figura 6). Aos 90 dias, a germinação dos embriões armazenados em câmara fria foi reduzida a zero. A germinação dos embriões armazenados em PEG começou a diferir estatisticamente com um percentual germinativo de 92% no potencial de $-1,6\text{MPa}$ e 80% no de $-2,4\text{MPa}$.

Aos 140 dias, apenas a germinação dos embriões armazenados em PEG $-1,6\text{MPa}$ se matinha igual àqueles recém-colhidos. Após 200 dias de armazenamento, os embriões armazenados em câmara fria e em PEG, no potencial de $-2,4$, já estavam mortos e os embriões armazenados em PEG, no potencial de $-1,6\text{Mpa}$, ainda apresentavam 88% das sementes germinadas, mas já apresentavam escurecimento dos menores embriões (Figura 5-i) e se diferiam dos recém-colhidos. Aos 260 dias de armazenamento, os embriões armazenados em PEG a $-1,6\text{MPa}$ alcançaram 45% de germinação e já diferiam

estatisticamente dos recém-colhidos, portanto as sementes podem ser armazenadas em PEG -1,6 MPa por até 140 dias sem que haja queda na sua germinação. Aos 300 dias de armazenamento, apenas os embriões armazenados em PEG -1,6 MPa permaneciam vivos, a germinação era de 24%, mostrando queda significativa no percentual germinativo da espécie. Aos 330 dias de armazenamento, todos os embriões já se encontravam mortos.

Figura 5 (a) Embrião recém-colhido; (b) Embrião após 60 dias armazenado em Câmara Fria (c) Embrião após 60 dias armazenado em PEG -1,6 MPa (d) Embrião armazenado por 90 dias em PEG -1,6MPa (e) Embrião armazenado por 90 dias em Câmara Fria (f) Embrião armazenado por 140 dias em PEG -1,6 MPa (g) Embrião armazenados por 140 dias em PEG -2,4 MPa (h) Embrião armazenado por 140 dias em Câmara Fria (i) Embrião armazenado por 200 dias em PEG -1,6.

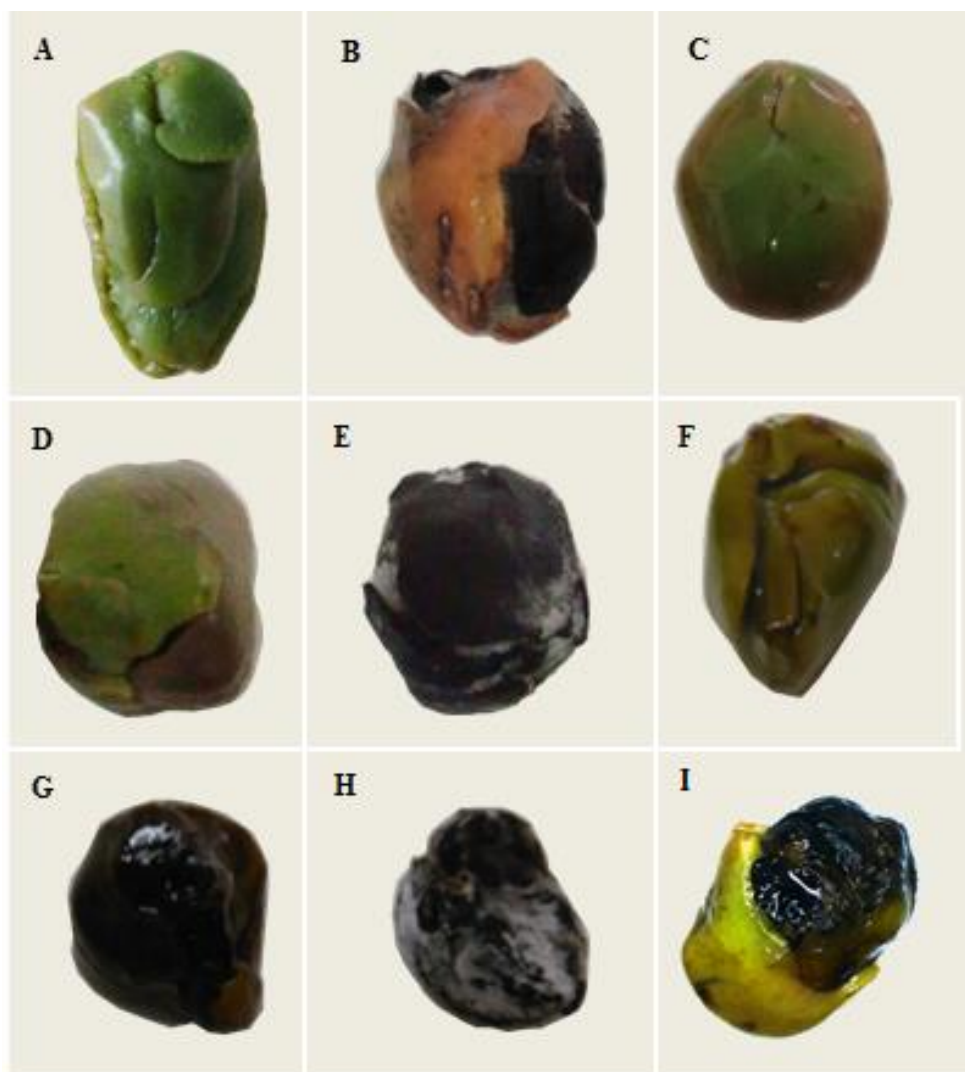
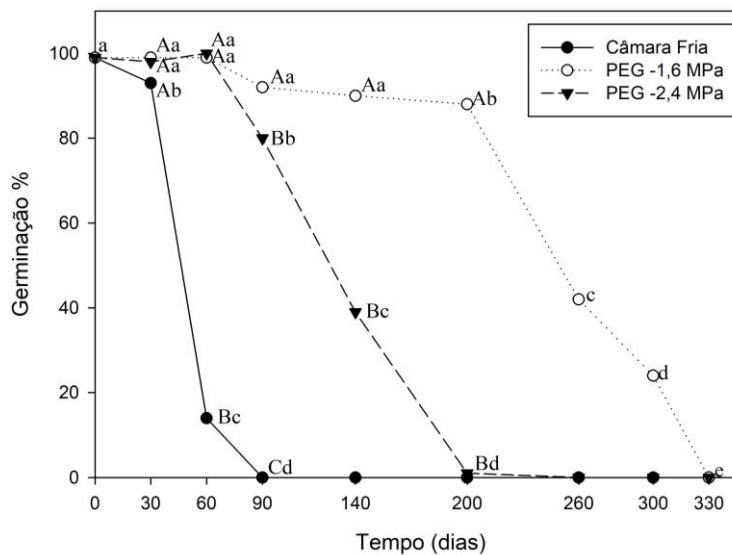


Figura 6 Germinação de embriões de *Inga vera*, ao longo do tempo, considerando como germinada a semente em que em pelo menos um dos embriões houve protrusão radicular.



1 - Médias seguidas da mesma letra maiúscula no mesmo tempo não diferem significativamente entre si pelo teste de Fisher (LSD), ao nível de 5% de probabilidade.

2- Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma condição de armazenamento não diferem significativamente entre si pelo teste de Fisher (LSD), ao nível de 5% de probabilidade.

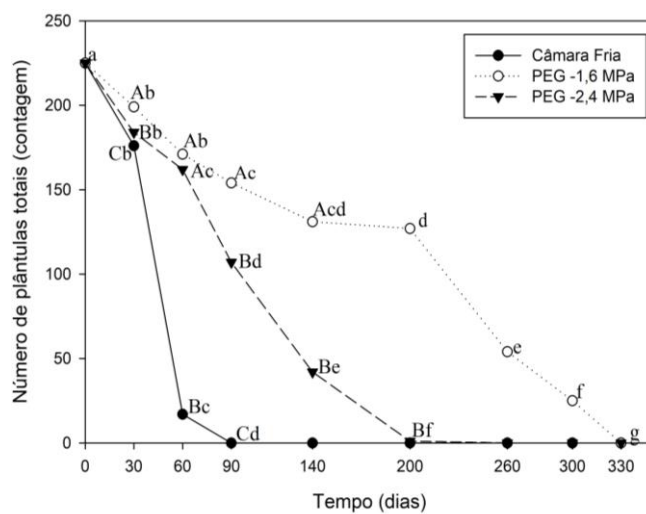
Considerou-se como plântula total a emergência de parte aérea ou radícula dos embriões, mesmo que se tenha formado plântula anormal. Analisando-se o número de plântulas totais, aos 30 dias, verificou-se que todos os tratamentos se diferiam dos embriões recém-colhidos (Figura 7), mas o armazenamento em PEG -1,6 MPa se mantinha com maior número de plantas comparado aos outros dois tratamentos. Aos 60 dias, o armazenamento em câmara fria passou a diferir estatisticamente do armazenamento em PEG, em ambos os potenciais, sendo esses os que apresentavam maior número de plântulas totais. A partir dos 90 dias, todos os tratamentos diferiam entre si, mas o armazenamento em PEG, no potencial de -1,6 Mpa, mostrou-se melhor que os

demais, concordando com os resultados de germinação. Aos 260 dias, os embriões armazenados em câmara fria e em PEG -2,4 MPa já se encontravam mortos, portanto os testes foram conduzidos apenas com os embriões armazenados em PEG -1,6 MPa cujo número de plântulas totais era de 54.

As três formas de armazenamento interferiram, negativamente, no número de plântulas totais de *Inga vera*, já que, desde os 30 dias de armazenamento, nenhuma das condições estudadas permitiu que o número de plântulas fosse igual estatisticamente àqueles embriões recém-colhidos.

Foram consideradas como plântulas normais aquelas em que houve protrusão radicular e desenvolvimento da parte aérea em tamanhos proporcionais. Nos embriões recém-colhidos, contabilizavam-se 178 plântulas normais. Para as análises estatísticas, o número de plântulas normais foi calculado com base no número de plântulas totais. Aos 30 dias, já se pôde observar que, assim como ocorreu com o número de plântulas totais, nas três formas de armazenamento, o tempo alterou significativamente o número de plântulas normais, mas, quando analisando o efeito dos tratamentos, o PEG no potencial de -1,6 MPa se mantinha superior às demais formas de armazenamento. Aos 60 dias, o armazenamento em PEG -2,4 MPa se mostrou melhor que as outras formas de armazenamento, mas, a partir dos 90 dias, o potencial de -1,6 MPa se mostrou superior aos demais. Aos 140 dias, apenas os embriões armazenados em PEG, em ambos os potenciais, mantinham-se vivos; aos 260 dias, apenas os embriões armazenados no potencial de -1,6 MPa sobreviviam e o número de plântulas normais era de 35. Aos 300 dias, o número de plântulas normais era 19 e, aos 330, todos os embriões já estavam mortos.

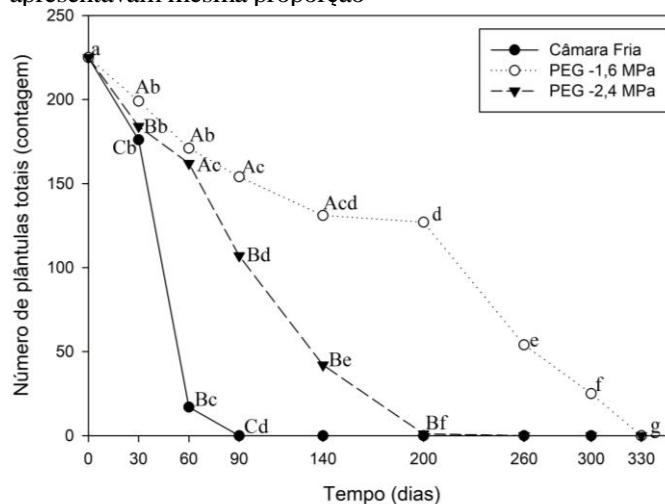
Figura 7 Número de plântulas totais, ao longo do tempo, considerando a emergência de parte aérea ou sistema radicular dos embriões.



1 - Médias seguidas da mesma letra maiúscula no mesmo tempo não diferem significativamente entre si pelo teste de Fisher (LSD), ao nível de 5% de probabilidade.

2- Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma condição de armazenamento não diferem significativamente entre si pelo teste de Fisher (LSD), ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 8 Número de plântulas normais, ao longo do tempo, considerando como plântulas normais aquelas em que a parte aérea e sistema radicular apresentavam mesma proporção



1 - Médias seguidas da mesma letra maiúscula no mesmo tempo não diferem significativamente entre si pelo teste de Fisher (LSD), ao nível de 5% de probabilidade.

2- Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma condição de armazenamento não diferem significativamente entre si pelo teste de Fisher (LSD), ao nível de 5% de probabilidade.

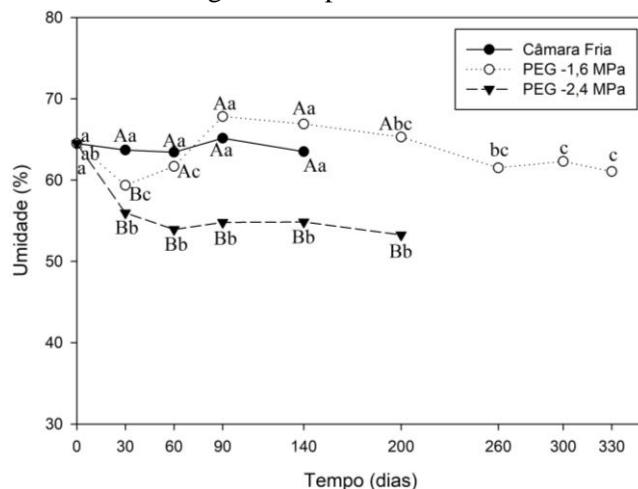
A umidade dos embriões recém-colhidos era de 64%; observou-se que, aos 30 dias, a umidade dos embriões armazenados em câmara fria (63,7%) se encontrava muito próxima da inicial, enquanto os embriões armazenados em solução osmótica se diferiam estatisticamente da câmara fria e das sementes recém-colhidas (Figura 9). Essa queda inicial de umidade nos embriões armazenados em solução, provavelmente, deve-se ao fato de que, para entrar em equilíbrio higroscópico com o meio, a semente precisou perder um pouco do seu conteúdo de água, mas a perda de água não atingiu níveis críticos para a espécie a ponto de comprometer a sua viabilidade. Já os embriões armazenados, em embalagem plástica, permaneceram com umidade igual à inicial, durante 140 dias e podem não ter apresentado queda na umidade, porque este tipo de

embalagem permite a manutenção da taxa respiratória das sementes, mesmo em ambiente com baixa umidade relativa, já que não exerce nenhuma influência na mobilização de água dentro das sementes e permite que o seu metabolismo continue acelerado, resultando em morte precoce dos embriões armazenados (GARCIA, 2014).

Aos 30 dias, já se observava um resultado satisfatório do armazenamento em solução de PEG, pois os embriões não embeberam água como acontece em armazenamentos, utilizando água disponível para evitar o estresse hídrico (PAMMENTER et al., 1994), já que a embebição inicia o processo germinativo da semente, acelera o metabolismo, o consumo de reservas e, conseqüentemente, reduz o tempo de armazenamento das sementes. O controle da mobilização de água dentro da semente visa à redução da atividade metabólica, para que a qualidade fisiológica das sementes seja mantida por mais tempo e desacelere o processo de deterioração (ANDREO; NAKAGAWA; BARBEDO, 2006; CARDOSO; BINOTTI; CARDOSO, 2012).

Até os 90 dias de armazenamento, os embriões armazenados em câmara fria e em PEG -1,6 MPa mantinham sua umidade iguais estatisticamente àqueles recém-colhidos, mas o potencial de -2,4MPa continuava diferente dos demais (Figura 9). Aos 140 dias, apenas os embriões armazenados, no potencial de -2,4 Mpa, apresentaram queda na umidade, enquanto os outros dois tratamentos se mantinham com umidade superior.

Figura 9 Umidade ao longo do tempo



1 - Médias seguidas da mesma letra maiúscula no mesmo tempo não diferem significativamente entre si pelo teste de Fisher (LSD), ao nível de 5% de probabilidade.

2- Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma condição de armazenamento não diferem significativamente entre si pelo teste de Fisher (LSD), ao nível de 5% de probabilidade.

A perda de água em sementes recalcitrantes implica diretamente a perda da sua viabilidade, já que favorece processos como a desnaturação de proteínas, altera a atividade de enzimas como a peroxidase e, além disso, causa danos ao sistema de membranas (NAUTIYAL; PUROHIT, 1985). Caccere et al. (2013), em seus trabalhos com a espécie *Inga vera*, concluíram que a proporção de polissacarídeos que atuam como plastificantes de parede celular é significativamente menor em sementes recalcitrantes do que naquelas tolerantes à dessecação, portanto, quando secas, estas sementes sofrem danos mecânicos decorrentes da perda de água (BONJOVANI; BARBEDO, 2008).

Células de sementes recém-colhidas, quando observadas microscopicamente por Faria et al. (2006), apresentavam polissomos, mitocôndrias, amiloplastos, núcleo esférico com nucléolo denso e heterocromatina disposta periféricamente indicando sua viabilidade e que o

metabolismo estava ativo. Já aquelas células dos embriões armazenados em PEG apresentaram alterações severas, na estrutura celular como dobramento da parede celular, fragmentação do citoplasma e núcleos não mais redondos, mas com estrutura amorfa.

Correlacionando as variáveis avaliadas: germinação, número de plântulas totais e número de plântulas normais com os parâmetros que variaram, de acordo com a forma de armazenamento (Tabela 1), observou-se que o tempo é o parâmetro que mais influenciou na taxa de germinação (-63%), no número de plântulas totais (-72%) e no número de plântulas normais (-68%), de modo que quanto maior o tempo de armazenamento mais se reduziram a germinação e o número de plântulas formadas.

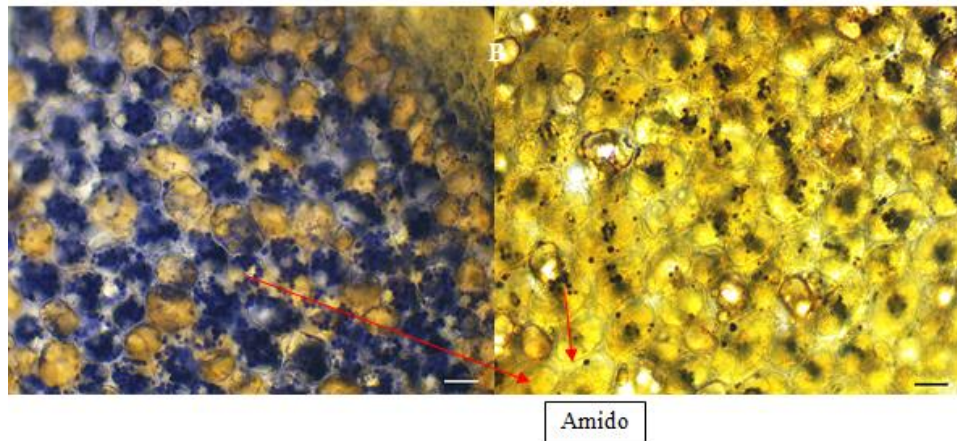
Tabela 1 Tabela de correlação de Spearman

	Armazenamento	Umidade	Tempo
Germinação	37% 0.003458791	33% 0.01074869	-63% 6.834350e-08
Plântulas totais	31% 0.01674203	36% 0.00495391	-72% 1.100293e-10
Plântulas normais	39% 0.002043363	31% 0.01432169	-68% 1.920594e-09

A partir das imagens de microscopia (Figura 10), observou-se que os embriões recém-colhidos apresentam grande concentração de grãos de amido, sendo considerada como uma semente amilácea. Conforme os dias de armazenamento foram aumentando, observou-se queda na concentração de amido nos embriões, assim como observado por Faria et al. (2006), em seus trabalhos que, também, determinaram que a abundância de grãos de amido reduzia, conforme o tempo de armazenamento aumentava para as sementes de *Inga vera*, e a queda da viabilidade das sementes estava relacionada diretamente à queda na concentração de amido.

O esgotamento das reservas da semente pode ser considerado como uma das possíveis causas de perda de viabilidade de sementes recalcitrantes, visto que elas se mantêm metabolicamente ativas, durante o armazenamento, resultando neste consumo das reservas (PAMMENTER et al., 1994).

Figura 10 (a) Imagem eixo embrionário semente recém-colhida, corante Lugol evidenciando grande quantidade de amido; (b) Imagem eixo embrionário semente armazenada por 280 dias em PEG -1,6 MPa, corante Lugol evidenciando o consumo de amido.



Andréo, Nakagawa e Barbedo (2006), buscando identificar o potencial em que as sementes entram em equilíbrio higroscópico com a solução, concluíram que os melhores potenciais foram de -1,6 e -2,4 MPa, utilizando papel umedecido com solução de PEG e submetendo os testes de germinação à temperatura de 30°C no escuro; aos 90 dias, as sementes contabilizavam cerca de 75% de germinação, resultados estes que corroboram com os obtidos neste trabalho no qual se observou que o armazenamento dos embriões, em soluções com potencial osmótico, pode adiar a deterioração das sementes por reduzir ou atrasar o consumo das suas reservas.

Os resultados obtidos indicam o armazenamento em PEG a $-1,6$ MPa como uma alternativa satisfatória para a conservação da viabilidade de embriões de *Inga vera* por até 200 dias, mantendo a germinação acima de 90%. Como a maturação dos frutos acontece de dezembro a fevereiro (LORENZI, 2000; STEIN, 2007) e o ciclo de produção de mudas é de quatro a seis meses (DAVIDE, 2008), estas ficam em condições de plantio em um período desfavorável para o plantio (abril a agosto), devendo portanto permanecer no viveiro até a época de plantio ideal (dezembro e janeiro), aumentando seu custo e perdendo qualidade. Uma estratégia interessante é, portanto armazenar os embriões até junho-agosto (dependendo do mês de coleta das sementes), utilizando-os em seguida para a produção de mudas, que estariam em condições de ir a campo no período favorável. Portanto, o armazenamento de embriões de *Inga vera* por um período de 200 dias, ainda que não seja significativo em termos de conservação de germoplasma, é importante com relação a um ajuste de cronograma de semeadura no viveiro, evitando que as mudas permaneçam no viveiro após atingirem a necessária qualidade para o plantio. Assim, o custo de produção dessas mudas seria reduzido e a perda de sua qualidade, evitada.

4.1 Pólen

Durante a avaliação da contagem dos grãos, foi observado que os grãos de pólen de *Inga vera*, no momento de sua apresentação, são agrupados em políades (Figura 14-a). Tal resultado corrobora com o observado por Buriel, Santos e Alves (2010) em trabalho sobre dispersão polínica de Mimosoidae na Caatinga. Neste trabalho, os autores afirmam que políades plano circulares, com oito grãos centrais, quatro em cada plano, margeados por uma crista circular composta por oito grãos de pólen são um caráter taxonômico distintivo para *Inga vera*. Bettiol Neto (2009), em seus trabalhos com espécies de

Annona, relata que o fato dos grãos de pólen serem dispersos em conjunto pode ter implicação biológica, pois, como nesses agrupamentos o pólen torna-se mais pesado e pegajoso, podem ter relação com polinizadores específicos, os quais, em espécies de *Annona*, são principalmente besouros. Estudos mostram que, mesmo apresentando características florais adaptadas à polinização por esfingídeos, a espécie *Inga vera* recebe visitas de morcegos durante a estação seca, fato que é menos comum do que esfingídeos visitando flores quiropterófilas (HABER; FRANKIE, 1989). Estes resultados corroboram com o observado por Cruz Neto (2007), ao concluir que as flores de *Inga vera*, assim como as de *I. striata* e *I. ingoides*, apresentam polinização quiropterófila.

Além disso, o arranjo dos grãos de pólen em políades promove maior eficiência na fertilização floral, quando depositados em estigmas florais compatíveis, além de apresentar maior potencial de fecundação de todos os óvulos necessários para a formação de um fruto (BETTIOL NETO, 2009).

Nos experimentos de quantificação de grãos de pólen e viabilidade polínica, observou-se que a espécie apresentou, em média, 52 grãos de pólen por antera e 4160 grãos de pólen por flor. Avaliando-se a viabilidade polínica, a média encontrada foi de 66% (Figuras 14-a e 14-b). Esses resultados divergem dos encontrados por Cruz Neto (2007), em trabalho com fenologia, biologia reprodutiva e incidência de visitantes florais de diferentes espécies de Ingá, quando foram encontrados para *Inga vera* um total de 21.560 grãos de pólen por flor com 94% de viabilidade.

Essa diferença na quantidade e na viabilidade polínica é esperada entre diferentes indivíduos da mesma espécie e entre o mesmo indivíduo de um ano para o outro, uma vez que a viabilidade polínica vai estar relacionada com uma série de fatores como genética e condições nutricionais da planta, além de

fatores ambientais como temperatura e umidade (FRANCHI et al., 2011; SHARMA et al., 1991; SONG; CHEN; TANG, 2014).

Em lâmina contendo óleo de imersão (Figura 14-c), os grãos de pólen exibem formato subesferoidal, sendo ligeiramente alongados no eixo polar. Quando observados em lâmina histológica contendo água, os pólenes (Figura 14-d) apresentaram formato arredondado. Baseado nesses resultados, os grãos de pólen de *Inga vera*, no momento de sua dispersão, são classificados como ortodoxos, visto que os grãos embeberam quando colocados em lâmina contendo água. Assim como ocorre em sementes, aqueles grãos de pólen dispersos com teor de água elevado tendem a ser classificados como recalcitrantes; quando acontece o contrário, ou seja, os grãos são dispersos com teor reduzido de água, são classificados como ortodoxos. O observado nas lâminas permite concluir que os grãos foram dispersos com baixo teor de água, dado que, quando submetidos à observação microscópica em lâmina contendo óleo, apresentavam aparência murcha, sem turgor; quando submetidos à observação em lâmina contendo água, os grãos apresentaram formato arredondado, embeberam água, indicando que foram dispersos com baixo conteúdo de água. Assim como nas sementes, os grãos de pólen ortodoxos se encontram em estado quiescente, o que os torna mais tolerantes a mudanças ambientais, e seu menor conteúdo de água prolonga seu tempo de viabilidade (COSTA, 2011).

O teste com lugol (Figura 14-e) não evidenciou o amido como fonte de reserva de carboidratos. O amido como fonte de reserva, no momento da dispersão dos grãos de pólen, converte-se em glicose, frutose, sacarose e pectinas que auxiliam na germinação do tubo polínico (PACINI; GUARNIERI; NEPI, 2006; RODRIGUEZ-GUARCIA; RANI-ALAOUI; FERNANDEZ, 2003). O acúmulo de amido na fase de maturação do grão de pólen faz com que a sua transformação em outros carboidratos modifique a

pressão de turgor do grão de pólen, permitindo, assim, que ele tenha maior resistência quando submetido a condições ambientais desfavoráveis (ROHLFS, 2013). Os carboidratos contribuem com o balanço hídrico dos grãos de modo que, no momento de dispersão, os grãos sofram menores impactos pelo meio externo (DETTKE; SANTOS, 2011; PACINI, 1996; PACINI; GUARNIERI; NEPI, 2006).

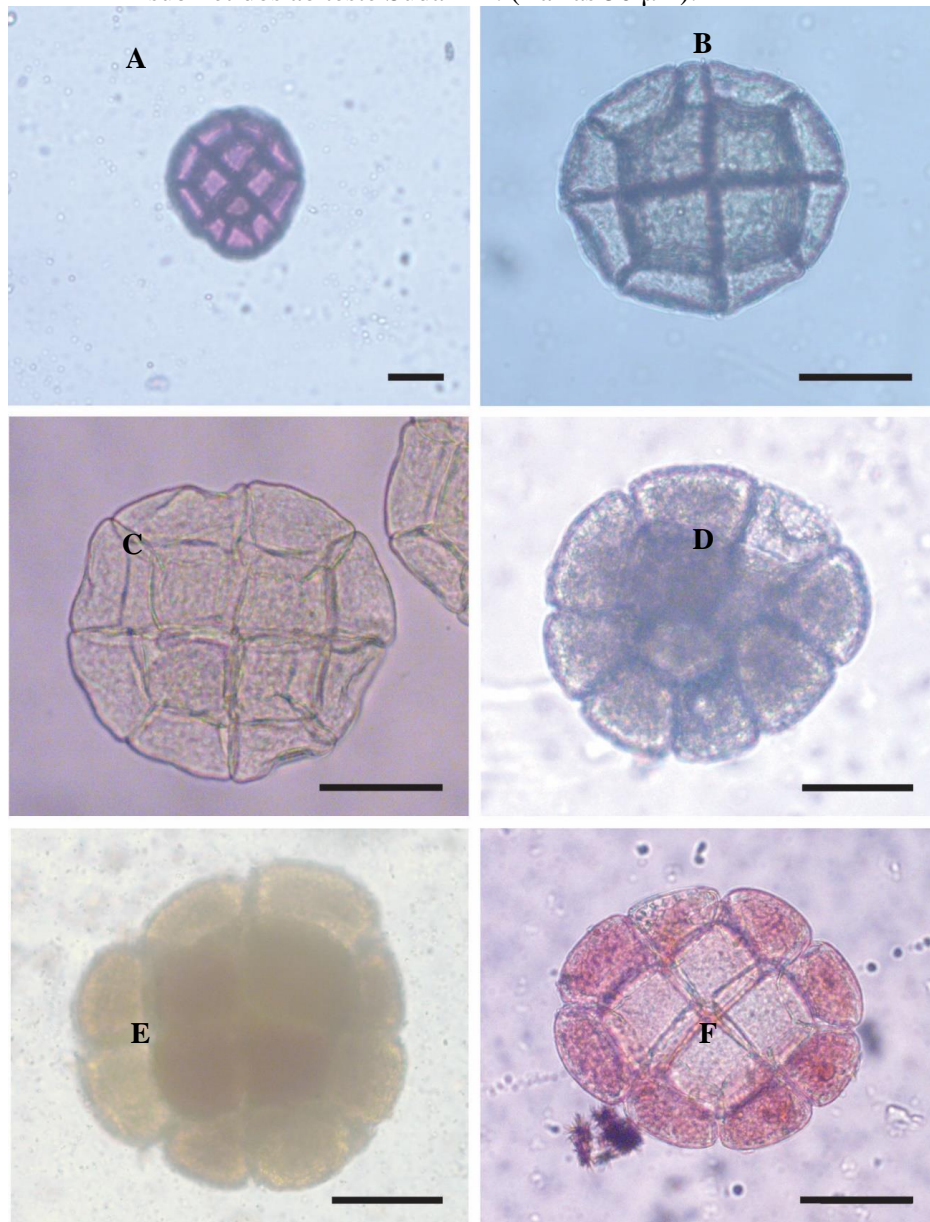
Além disso, estudos mostram que, em espécies com pólen parcialmente desidratado, os carboidratos possuem papel na manutenção da viabilidade dos grãos de pólen, quando submetidos a condições ambientais adversas, pois eles são capazes de manter seu conteúdo de água por meio da mobilização das suas reservas de carboidratos (GUARNIERI et al., 2006). Já aqueles grãos que são parcialmente hidratados e que contêm baixos teores de carboidratos, principalmente sacarose, não conseguem controlar a perda de água, pois a sua capacidade de transformação de carboidratos é menor, ou seja, a pressão de turgor é mais baixa, os grãos perdem água e viabilidade (FRANCHI; NEPI; PACINI, 2002; NEPI; FRANCHI; PACINI, 2001).

A maioria das espécies de angiospermas têm seus grãos de pólen dispersos com baixo conteúdo de amido. Os tipos de reserva se relacionam com a ecologia das espécies, principalmente com os tipos de polinizadores, podendo relacionar espécies com grãos de amido menores ou ausentes normalmente à polinização entomófila (BAKER; BAKER, 1979).

O teste com Sudan III (Figura 14-f) não confirmou presença de pollenkitt na estrutura externa dos grãos de pólen. A estrutura do pollenkitt está diretamente relacionada a espécies entomófilas e, nesses indivíduos, esta estrutura se localiza na exina, já em espécies anemófilas ocorre normalmente em cavidades internas da exina. Diversas famílias vegetais podem ser polinizadas por insetos e pelo vento, simultaneamente ou em sequência e, nessas espécies, o pollenkitt apresenta características intermediárias às duas

formas de polinização como é o caso de *Fagopyrum* (HESSE, 1979), *Galanthus* (HESSE, 1981) e *Castanea* (HESSE, 1978). O gênero *Ingá* apresenta estrutura que favorece a polinização por um espectro amplo de animais já sendo constatada a presença de morcegos, beija-flores, esfingídeos e abelhas atuando como polinizadores (ARROYO, 1981; BARROS; WEBBER; MACHADO, 2008; ENDRESS, 1994; FEINSINGER; COLWELL, 1978; KOPTUR, 1983).

Figura 11 Políades de *Inga vera*. (a) Pólen viáveis quando submetidos ao teste de Alexandre. (b) Pólen inviáveis submetidos ao teste de Alexandre. (c) Pólen em óleo de imersão. (d) Pólen em meio aquoso. (e) Pólen submetidos ao teste com Lugol. (f) Pólen submetidos ao teste Sudan III. (Barras 50 μm).



De forma geral, podem existir espécies com diferentes níveis de tolerância à dessecação em pólen e semente, porque o seu comportamento funciona de maneira independente. A recalcitrância é geneticamente regulada e pode ocorrer por influência da época de dispersão dessas estruturas reprodutivas, já que ambientes quentes e úmidos favorecem a recalcitrância (FRANCHI; NEPI; PACINI, 2002; TWEDDLE et al., 2003), até mesmo por propiciarem condições favoráveis ao estabelecimento, o ambiente acelera os processos reprodutivos, fazendo com que, após a apresentação e dispersão, as estruturas fiquem expostas por períodos curtos, diminuindo o risco a estas adversidades (FRANCHI, 2011).

A ocorrência de grãos de pólen ortodoxos e sementes recalcitrantes na espécie *Ingá vera* pode ser entendida como uma das hipóteses citadas acima, já que a floração da espécie ocorre em época seca (CRUZ NETO, 2007), exigindo que os grãos tenham desenvolvido estratégias importantes à sua sobrevivência, já a dispersão das sementes, a maturação dos frutos ocorrem na estação chuvosa (CRUZ NETO, 2007), dessa forma, proporcionam condições ideais à germinação, logo após a dispersão das sementes, não necessitando que estas sementes atuem seus genes de tolerância à dessecação, por não terem que enfrentar períodos com condições ambientais desfavoráveis ao seu estabelecimento.

5 CONCLUSÕES

O uso de soluções com potencial osmótico conhecido para o armazenamento de sementes recalcitrantes vem apresentando resultados satisfatórios no controle do início da germinação e do consumo de reservas da semente atrasando seu processo de deterioração. O melhor potencial osmótico, para se armazenar sementes de *Inga vera*, é de -1,6 Mpa, em que as sementes podem ser armazenadas por até 200 dias, sem que haja alteração na sua umidade e a germinação seja mantida em torno de 90%. Este, por enquanto, é o registro de maior período de armazenamento de embriões de *Inga vera*.

Os grãos de pólen da espécie *Inga vera* são dispersos em políades, têm dispersão entomófila e quiropterófila, apresentam cerca de 4160 grãos de pólen por flor e o comportamento dos grãos é ortodoxo. Dessa forma, com este estudo, pode-se concluir que a espécie apresenta genes de tolerância à dessecação, mas que não se expressam nas sementes e, sim, em outras estruturas da planta como os grãos de pólen. Sugere-se que estudos posteriores sejam realizados, a fim de se compreender os estímulos que podem vir a induzir que as sementes expressem tais genes e a semente possa ser seca e armazenada por períodos ainda mais longos.

REFERÊNCIAS

- AHLGREN, C. E.; AHLGREN, I. F. Viability and Fertility of Vacuum Dried Pollen of 5-Needle Pine Species. **Forest Science**, Bethesda, v. 24, n. 1, p. 100-102, 1978.
- AKIHAMA, T.; OMURA, M.; KOZAKI, I. Further investigation of freezer-drying for deciduous fruit tree pollen. In: AKIHAMA, T.; NAKAJIMA, K. (Ed.). **Long term preservation of favorable germplasm in arboreal crops**. Fujimoto: Fruit tree research station, 1978. p. 1-7.
- AKIHAMA, T.; OMURA, M.; KOSAKI, I. Long-term of fruit tree pollen and its application in breeding. **Tropical Agriculture Research**, Tokyo, v. 13, n. 4, p. 238-241, 1979.
- ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, Baltimore, v. 55, p. 13-18, 1980.
- ALMARAZ-ABARCA, N. et al. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, p. 119-124, 2007.
- ANDRÉO, Y.; NAKAGAWA, J.; BARBEDO, C. J. Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) TD Pennington). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 309-318, 2006.
- ARROYO, K. Breeding systems and pollination biology. In: _____. **Advances in legume systematics**. Chicago: University of Chicago, 1981. v. 2, p. 723-769.
- ÁRVORES de Lavras. Disponível em:
<<https://www.facebook.com/groups/396628420393665>>. Acesso em: 7 fev. 2018.
- BAKER, H. G.; BAKER, I. Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. **American Journal of Botany**, Washington, v. 66, p. 591-600, 1979.
- BARBEDO, C. J.; CICERO, S. M. 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**, Zurich, v. 28, p. 793-808, 2000.
- BARBEDO, C. J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 12, n. 2, p. 145-164, 1998.
- BARNABÁS, B.; RAJKI, E. Storage of maize (*Zea mays* L.) pollen at -196 °C in liquid nitrogen. **Euphytica**, Wageningen, v. 25, p. 747-752, 1976.
- BARROS, E. C. O.; WEBBER, A. C.; MACHADO, I. C. **Fenologia da floração, polinização e sistema reprodutivo de duas espécies simpátricas de Inga na Amazônia Central**. 2008. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2008.
- BARROSO, G. M. et al. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. Viçosa, MG: UFV, 1991. 377 p.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Recalcitrance is not an all-or-nothing situation. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 2, p. 263-264, 1994.
- BETTIOL NETO, J. E. et al. Viabilidade e conservação de pólen de três anonas comerciais. **Bragantia**, Campinas, v. 68, p. 825-837, 2009.
- BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J. Estudos de germinação e armazenamento de sementes de *Inga uruguensis*. **Hook. et Arn. Científica**, Campinas, v. 25, p. 379-391, 1997.
- BILIA, D. A. C.; MARCOS FILHO, J.; NOVEMBRE, A. D. C. L. Desiccation tolerance and seed storability of *Inga uruguensis* (Hook. et Arn.). **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 27, n. 1, p. 77-89, 1999.
- BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, London, v. 99, p. 580-591, 2007.
- BONJOVANI, M. R.; BARBEDO, C. J. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. toleram temperatura sub-zero. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 2, abr./jun. 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009.

- BURIL, M. T.; SANTOS, F. A. R.; ALVES, S. Diversidade polínica das Mimosoideae (Leguminosae) ocorrentes em uma área de caatinga, Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, n. 24, v. 1, p. 53-64, 2010.
- CACCAVARI, M. A. Dispersion del polen en *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales: nueva serie**, Buenos Aires, v. 5, p. 135–138, 2003.
- CACCERE, R. S. P. et al. Metabolic and structural changes during early maturation of *Inga vera* seeds are consistent with the lack of a desiccation phase. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 170, n. 9, p. 791-800, 2013.
- CAMPOS, J. C.; LAURENTI, M. Comportamento do ingá (*Inga uruguensis*), em diversas fases de desenvolvimento em mata nativa. **Revista da Universidade de Alfenas**, Alfenas, v. 4, p. 3-6, 1998.
- CARDOSO, R. B.; BINOTTI, F. F. S.; CARDOSO, E. D. Potencial fisiológico de sementes de crambe em função de embalagens e armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, p. 272-278, 2012.
- CARVALHO, L. F. et al. Condicionamento osmótico de sementes de sorgo. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, p. 185-192, 2000.
- CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 149-162.
- CONNOR, K. F.; SOWA, S. The physiology and biochemistry of desiccating white oak and cherrybark oak acorns. In: CONNOR K. F. (Ed.). **Proceedings of the 12th biennial southern silvicultural research conference**. Asherville: USDA, 2004. p. 473–477.
- COSTA, M. F. B. **Interação pólen-pistilo em espécies neotropicais de *Indigofera L.* (Leguminosae, Papilionoidea) sob enfoque morfológico**. 2011. 59 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.
- CRUZ NETO, O. **Fenologia, biologia reprodutiva e eficiência dos visitantes florais de espécies simpátricas de *Inga* (Leguminosae-Mimosoideae) em remanescente de floresta atlântica no Nordeste do Brasil**. 2007. 76 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach**. New York: University, 1992.

DAVIDE, A. C. et al. Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais pertencentes à família Lauraceae quanto à capacidade de armazenamento. **Cerne**, Lavras, v. 9, n. 1 p. 29-35, 2003.

DAVIDE, A. C. **Produção de sementes e mudas de espécies florestais**. Lavras: UFLA, 2008.

DEL ZOPPO, M.; GALLESCHI, L.; SAVIOZZI, F. Long-term storage of *Araucaria bidwillii* Hook. seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 26, p. 267–270, 1998.

DETTKE, G. A.; SANTOS, R. P. Morfologia externa, anatomia e histoquímica da antera e grãos de pólen de Passifloraceae do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, p. 1-4, 2011.

DICKIE, J. B.; PRITCHARD, H. W. **Systematic and evolutionary aspects of desiccation tolerance in seeds**. Desiccation and survival in plants: drying without dying. Wallingford: CAB International, 2002. p. 239-259.

DOBSON, H. E. M. Survey of pollen and pollenkitt lipids: chemical cues to flower visitors? **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 75, p. 170–182, 1988.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 9, p. 1167-1174, 1990.

ENDRESS, P. K. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge: Cambridge University, 1994.

ENDRESS, R.; ENDRESS, R. **Plant cell biotechnology**. Berlin: Springer-Verlag, 1994.

EVERED, C.; MAJAEVADIA, B.; THOMPSON, D. S. Cell wall water content has a direct effect on extensibility in growing hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 3361–3371, 2007.

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. **The principles of pollination ecology**. 3rd ed. Oxford: Pergamon, 1979.

FARIA, J. M. et al. Physiological and cytological aspects of *Inga vera* subsp. *affinis* embryos during storage. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 503-513, 2006.

FARIA, J. M. R.; VAN LAMMEREN, A. A. M. H. W. M. Desiccation sensitivity and cell cycle aspects in seeds of *Inga vera* subsp. *affinis*. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, n. 2, p. 165-178, 2004.

FARRANT, J. M. et al. Presence of dehydrin-like proteins and levels of abscisic acid in recalcitrant (desiccation sensitive) seeds may be related to habitat. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 6, n. 4, p. 175-182, 1996.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Germination associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds - a study of three unrelated species. **Planta**, Berlin, v. 178, p. 189-198, 1989.

FEINSINGER, P.; COLWELL, R. K. Community organization among neotropical nectar-feeding birds. **American Zoologist**, Thsoud, v. 18, n. 4, p. 779-795, 1978.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2009.

FERREIRA, C. A. et al. Conservação e determinação da viabilidade de grãos de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, Minas Gerais, v. 26, n. 2, p. 159-173, 2007.

FINCH-SAVAGE, W. E. et al. Seed development in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: water status and endogenous abscisic acid levels. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, p. 671-679, 1992.

FOUNTAIN, D. W.; HOLDSWORTH, J. M.; OUTRED, H. A. The dispersal unit of *Dacrycarpus dacrydioides* (A. Rich.) Laubenfels (Podocarpaceae) and the significance of the fleshy receptacle. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 99, p. 197-207, 1989.

FRANÇA, L. V. et al. Tolerância à dessecação de pólen de berinjela. **Revista brasileira de sementes**, Londrina, v. 32, n.1, p. 53-59, 2010.

FRANCHI, G. G. et al. Another opening, pollen biology and stigma receptivity in the long blooming species, *Parietaria judaica* L. (Urticaceae). **Flora**, London, v. 202, p. 118–127, 2007.

FRANCHI, G. G. et al. Pollen and seed desiccation tolerance in relation to degree of developmental arrest, dispersal, and survival. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 15, p. 5267-5281, 2011.

FRANCHI, G. G.; FRANCHI, P.; CORTI, A. Pompella
Microspectrophotometric evaluation of digestivity of pollen grains. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 50, p. 115-126, 1997.

FRANCHI, G. G.; NEPI, M.; PACINI, E. Partially hydrated pollen: taxonomical distribution, ecological and evolutive significance. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 234, p. 211–227, 2002.

FRANK, G. et al. Transcriptional profiling of maturing tomato (*Solanum lycopersicum* L.) microspores reveals the involvement of heat shock proteins, ROS scavengers, hormones, and sugars in the heat stress response. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p. 3891–3908, 2009.

GARCIA, C. et al. Conservação da viabilidade e vigor de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze durante o armazenamento. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 4, p. 857-867, 2014.

GUARNIERI, M. et al. Ripe pollen carbohydrate changes in *Trachycarpus fortunei*: the effect of relative humidity. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v. 19, n. 3, p.117-124, Sept. 2006.

HABER, W. A.; FRANKIE, G. W. A tropical hawkmoth community: Costa Rican dry forest Sphingidae. **Biotropica**, Washington, v. 21, n. 2, p. 155-172, 1989.

HESSE, M. Entwicklungsgeschichte und Ultrastruktur von Pollenkitt und Exine bei nahe verwandten entomophilen und anemophilen Sippen: Ranunculaceae, Hamamelidaceae, Platanaceae und Fagaceae. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v.130, p. 13–42, 1978.

HESSE, M. Entwicklungsgeschichte und Ultrastruktur von Pollenkitt und Exine bei nahe verwandten entomophilen und anemophilen Angiospermen: Polygonaceae. **Flora**, London, v. 168, p. 558–577, 1979.

HESSE, M. Pollenkitt and viscin threads: their role in cementing pollen grains. **Grana**, Stockholm, v. 20, p. 145–152, 1981.

HESSE, M. Pollenkitt development and composition in *Tilia platyphyllos* (Tiliaceae) analysis by conventional and energy filtering TEM. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 7, p. 39–52, 1993. (Suppl.).

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 431-438, 2001.

HONG, T. D.; LININGTON, S.; ELLIS, R. H. **Seed storage behaviour: a compendium**. Handbook for Genebanks. 4th ed. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996.

KOPTUR, S. Flowering phenology and floral biology of *Inga* (Fabaceae: Mimosoideae). **Systematic Botany**, Kent, v. 8, p. 354-368, 1983.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: Edur, 1997.

LEWIS, G. P. et al. **Legumes of the world**. Kew: The Royal Botanic Gardens, 2005. 577 p.

LIEBERG, S. A. **Tolerância à inundação e aspectos demográficos de *Inga affinis* DC.** 1990. 104 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.

LISCI, M.; TANDA, C.; PACINI, E. Pollination ecophysiology of *Mercurialis annua* L. (Euphorbiaceae), an anemophilous species flowering all year round. **Annals of Botany**, London, v. 74, p. 125–135, 1994.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 373 p.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. 608 p.

LUNAU, K. Notes on the color of pollen. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 198, p. 235–252, 1995.

- MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J.; BOVI, M. L. A. Tolerância à dessecação de sementes de palmito-vermelho (*Euterpe espirosantensis* Fernandes). **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 391-396, 1999.
- McGUIRE, D. C. Storage of tomato pollen. Proceedings of the American Society for **Horticultural Science**, London, v. 60, p. 419-424, 1952.
- MOORE, J. P. et al. Towards a systems-based understanding of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 14, p. 110-117, 2009.
- NAUTIYAL, A. R.; PUROHIT, A. N. Seed viability in sal, 2: Physiological and biochemical aspects of ageing in seeds of *Shorea robusta*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.13, p. 69-76, 1985.
- NEPI, M.; FRANCHI, G. G.; PACINI, E. Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and strategies. **Protoplasma**, New York, v. 216, p. 171-180, 2001.
- NEPI, M.; PACINI, E. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. **Annals of Botany**, London, v. 72, p. 527-536, 1993.
- OHTA, S. et al. Antioxidant hydroxycinnamic acid derivatives isolated from Brazilian bee pollen. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 21, p. 726-732, 2007.
- OLIVEIRA, D. M. T.; BELTRATI, C. M. Morfologia e desenvolvimento das plântulas de *Inga fagifolia* e *I. uruguensis*. **Turrialba**, San José, v. 42, p. 306-331, 1992.
- OLIVEIRA, D. M. T. **Morfologia e desenvolvimento de frutos, sementes e plântulas de *Inga fagifolia* Will. e *Inga uruguensis* Hook. et Arn. (Fabaceae - Mimosoideae)**. 181 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1991.
- OLIVEIRA FILHO, A. T. et al. Effects of soils and topography on the distribution of tree species in a tropical riverine forest in south-eastern Brasil. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 10, n. 4, p. 483-508, 1994.
- OLIVER, M. J.; TUBA, Z.; MISHLER, B. D. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 151, p. 85-100, 2000.

PACINI, E. Harmomegathic characters of Pteridophyta spores and Spermatophyta pollen. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 5, p. 53–69, 1990.

PACINI, E.; FRANCHI, G. G. Types of pollen dispersal units in monocots. In: WILSON, K. L.; MORRISON, D. A. (Ed.). **Monocots: systematics and evolution**. Melbourne: CSIRO, 2000. p. 295–300.

PACINI, E.; GUARNIERI, M.; NEPI, M. Pollen carbohydrates and water content during development, presentation, and dispersal: a short review. **Protoplasma**, New York, v. 228, p. 73-77, 2006.

PACINI, E.; HESSE, M. Cytophysiology of pollen presentation and dispersal. **Flora**, London, v. 199, p. 273–285, 2004.

PACINI, E. Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v. 9, p. 362-366, 1996.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 1, p. 13-37, 1999.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Some thoughts on the evolution and ecology of recalcitrant seeds. **Plant Species Biology**, Kyoto, v. 15, p. 153–156, 2000.

PAMMENTER, N. W. et al. **Experimental aspects of drying and recovery**. Desiccation and survival in plants: drying without dying. Wallingford: CABI, 2002. p. 93-110.

PAMMENTER, N. W. et al. Why do stored hydrated recalcitrant seeds die? **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 2, p. 187-191, 1994.

PAMMENTER, N. W.; NAIDOO, S.; BERJAK, P. Desiccation rate, desiccation response and damage accumulation: can desiccation sensitivity be quantified? In: NICOLÁS, G. et al. (Ed.). **The biology of seeds: recent research advances**. Oxon: CABI, 2003. p. 319-325.

PARKINSON, B.; PACINI, E. A comparison of tapetal structure and function in pteridophytes and angiosperms. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 149, p. 155–185, 1995.

PENNINGTON, T. D. **The Genus Inga. Botany.** Kew: Royal Botanical Garden, 1997. 844 p.

POLITO, V. S.; LUZA, J. G. Low temperature storage of pistachio pollen. **Euphytica**, Wageningen, v. 39, n. 3, p. 265-269, 1988.

POWELL, A. A. Seed improvement by selection and invigoration. **Scientia Agricola**, Campinas, v. 55, p. 126-133, 1998.

PROCTOR, M.; YEO, P.; LACK, A. **The natural history of pollination.** London: Harper Collins, 1996.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing.** Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. v. 55.

RAGUSA NETTO, J.; FECCHIO, A. Plant food resources in diet of a parrot community in a gallery forest of the Southern Pantanal (Brasil). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 66, n. 4, p. 1021-1032, 2006.

RAMOS, J. D. et al. Receptividade do estigma e ajuste de protocolo para germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Interciência**, Caracas, v. 33, n. 1, p. 51-55, 2008.

REIS, A. M. M.; CUNHA, R. Efeito do congelamento sobre a viabilidade de sementes de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. com diferentes conteúdos de umidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 10, p. 1071-1079, 1997.

REYNEL, C.; PENNINGTON, T. D. **El género Inga en el Peru: morfología, distribución y usos.** Kew: Royal Botanic Gardens, 1997. 228 p.

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

RODRIGUES, J. B. **A Botânica, nomenclatura indígena e seringueiras.** Rio de Janeiro: [s. n.], 1905. (Edição comemorativa do sesquicentenário de João Barbosa Rodrigues. Edição Fac – simulada das obras "MBAÉ KAÁ-TAPYIYETÁ ENOYNDAVA E AS HEVEAS" pertencentes à biblioteca do Jardim Botânico do Rio de Janeiro).

RODRIGUEZ-GUARCIA, M. I.; RANI-ALAOUI, M.; FERNANDEZ, M. C. Behavior of storage lipids during development and germination of olive (*Olea europaea* L.) pollen. **Protoplasma**, New York, v. 221, p. 237-244, 2003.

SANTOS, R. P.; MARIATH, J. E. A.; HESSE, M. Pollenkitt formation in *Ilex paraguariensis* A. St. Hill. (Aquifoliaceae). **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 217, p.185–198, 2003.

SHARMA, C. P. et al. Manganese deficiency in maize affects pollen viability. **Plant and Soil**, The Hague, v. 138, p. 139-142, 1991.

SNYDER, E. B.; CLAUSEN, K. E. Pollen handling. **Seeds of woody plants in the United States**, San Francisco, v. 450, p. 75-97, 1974.

SONG, G.; CHEN, Q.; TANG, C. The effects of high-temperature stress on the germination of pollen grains of upland cotton during square development. **Euphytica**, Wageningen, v. 200, p. 175-186, 2014.

SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H. Pollen dispersal and gene flow by pollen in *Araucaria angustifolia*. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 51, p. 309–317, 2003.

SPRAGUE, J. R.; JOHNSON, V. W. Extraction and storage of loblolly pine (*Pinus taeda*) pollen. In: SOUTHERN FOREST TREE IMPROVEMENT CONFERENCE, 14., 1977, Macon. **Proceedings...** Macon: Eastem Tree Seed, 1977. p. 20-27.

STEIN, V. C. et al. Germination in vitro and ex vitro of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) TD Penn. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1702-1708, 2007.

STEUTER, A. A.; MOZAFAR, A.; GOODIN, J. R. Water potential of aqueous polyethylene glycol. **Plant Physiology**, Stuttgart, v. 67, n. 1, p. 64-67, 1981.

SWAINE, M. D.; WHITMORE, T. C. On the definition of ecological species groups in tropical rain forests. **Vegetatio**, Dordrecht, v. 75, p. 8186, 1988.

TWEDDLE, J. C. et al. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 91, p. 294–304, 2003.

VARELA, P. V. et al. Classificação das sementes quanto ao comportamento para fins de armazenamento. In: _____. **Pesquisas florestais para a conservação da floresta e reabilitação de áreas degradadas da Amazônia**. Manaus: INPA, 1998. p. 172-184.

VENTRELLA, M. C. et al. **Métodos histoquímicos aplicados às sementes**. Viçosa, MG: UFV, 2013.

VIEIRA, C. V. et al. Germinação e armazenamento de sementes de camboatã (*Cupania vernalis* Cambess.) – SAPINDACEAE. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 444-449, mar./abr. 2008.

WEBER, M. The existence of a special exine coating in *Geranium robertianum* pollen. **International Journal of Plant Science**, Chicago, v. 157, p. 195–202, 1996.

WIERMANN, R.; GUBATZ, S. Pollen wall and sporopollenin. **International Review of Cytology**, New York, v. 140, p. 35-72, 1992.

WODEHOUSE, R. P. **Pollen grains**. New York: McGraw Hill, 1935.

WOLKERS, W. F. et al. Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1544, p. 196–206, 2001.

YAO, Y. F. et al. The exine ultrastructure of pollen grains in Gnetum (Gnetaceae) from China and its bearing on the relationship with the ANITA Group. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 146, p. 415–425, 2004.

YATES, I. E.; SPARKS, D. Three-year-old pecan pollen retains fertility. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 3, p. 359-363, 1990.

ZAMBON, C. A. et al. Estabelecimento de meio de cultura e quantificação da germinação de grãos de pólen de cultivares de marmelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 2, p. 400-407, 2014.