

Este protocolo é usado pelo MSBP para comparar a longevidade de sementes de diferentes espécies, mantidas no banco de sementes. O método tem por objetivo gerar uma curva de sobrevivência de uma única semente utilizando um ambiente de envelhecimento cuidadosamente controlado. Sementes são inicialmente reidratadas e envelhecidas utilizando soluções de sais para permitir o ambiente desejado de umidade relativa (UR) dentro de frascos selados. O teste de controle de envelhecimento permite medir a longevidade da coleção, que pode ser comparado com a longevidade conhecida de espécies marcadoras sob as mesmas condições. Apesar do método não permitir uma predição acurada da longevidade entre espécies, a comparação com algumas espécies marcadoras permite seu posicionamento em categorias de longevidade. Este método também pode ser utilizado para investigar os efeitos de fatores como maturidade ou manejo pós-colheita na qualidade da semente.

Preparo das soluções de LiCl

O MSBP utiliza soluções não saturadas de LiCl para controlar a umidade dentro de caixas fechadas eletricamente e seladas.

- Solução de reidratação (47% UR): adicionar 385g de LiCl em 1L de água destilada, transferir para a primeira caixa e manter a 20°C.
- Solução de envelhecimento (60% UR): adicionar 300 g LiCl em 1 L de água destilada, transferir para a segunda caixa elétrica e colocar em forno com ventilação a 45°C, no escuro.
- Verificar a umidade relativa de equilíbrio (eUR) da solução de LiCl uma vez ao mês. Ver Informações Técnicas na Folha 09 e Hay et al (2008) para protocolos de preparo de soluções.

Direita: Caixa elétrica fechada utilizada para experimentos de longevidade comparativa contendo amostras de sementes mantidas acima da solução não saturada de LiCl

Direita: Sementes em placa de petri, prontas para reidratação.

Dicas de Preparo

- Prepare a solução de LiCl pelo menos 24 horas antes do uso.
- Para medir a eUR da solução de LiCl, adicionar alguns mls à câmara de amostra do higrômetro, tendo o cuidado de não contaminar o sensor.
- Regular a medida de eUR da solução do ambiente de envelhecimento é importante, uma vez que a perda de água ocorre ao longo do tempo, devido a evaporação, quando a caixa é aberta. O ambiente de reidratação não necessita de ajustes tão frequentes.
- Experiência do MSB tem mostrado que nas caixas contendo 1 L de solução de envelhecimento, o eUR tem redução de aproximadamente 2% no período de 1 mês. Para ajustar a solução, adicionar 40 ml, aproximadamente, de água destilada na caixa.

Preparo das amostras de sementes

Contar 10 amostras de 50 sementes cada e colocar cada amostra em camada única em frascos de vidro abertos ou placas de tamanho apropriado. Se for preciso descascar as sementes, fazer estes tratamentos antes da reidratação.



Reidratação: 47% RH, 20°C

Os passos de hidratação minimizam a mudança de umidade das sementes quando transferidas para as condições de envelhecimento. Coloque os frascos de vidro ou placas contendo as sementes em suporte, dentro das caixas de reidratação, de forma a manter as amostras de sementes acima da solução de LiCl.

O período de reidratação é de normalmente 14 dias. Entretanto, esse tempo depende do tamanho das sementes, assim, sementes maiores podem requerer mais tempo. Verificar a eUR da semente utilizando um higrômetro para garantir que o equilíbrio foi obtido (ver Folha de Informação Técnica 05).

Requisitos das sementes

- Para testar a longevidade comparativa de coleções conservadas: utilizar somente para grandes coleções, quando cerca de 500 sementes podem ser utilizadas.
- Sementes devem ter alta viabilidade (>85%) e as condições de germinação devem ser conhecidas.



Para sementes pequenas, a leitura da eUR pode ser inacurada uma vez que uma amostra de 50 sementes não será suficiente para preencher a câmara do higrômetro. Para estas espécies, reidratação adicional, com amostras maiores, substitutas, de tamanho similar, para obter o volume grande o suficiente para a correta medida da eUR devem ser utilizadas. Qualquer espécie com tamanho apropriado e permeabilidade semelhante pode ser utilizada. Uma vez reidratadas, transferir as amostras de sementes, nos seus frascos ou placas, para a caixa de envelhecimento.

Envelhecimento: 60% RH, 45°C

Quando as sementes são aquecidas de 20 para 45°C, o eUR é ajustado para 60%. O ambiente de armazenamento criado dentro das caixas garante que as sementes tenham condições de envelhecimento idênticas.

Retire uma amostra de 50 sementes ao acaso após: 1, 2, 5, 9, 20, 30, 50, 75, 100, e 125 dias. Semear cada amostra utilizando condições apropriadas para cada espécie. Conduzir cada teste por pelo menos 42 dias, ou até que seja observado o período de 14 dias sem germinação. Preparar o "teste corte" ao final de cada teste de germinação para confirmar que as sementes não germinadas estão mortas ou se são incompetentes (vazias ou infestadas). Esta é uma parte importante para avaliar a viabilidade das sementes. Excluir sementes incompetentes do cálculo da porcentagem de germinação. Se forem observadas as germinações anormais, não utilizá-las como germinadas.

Especificação de equipamentos

Descrição	Modelo/Produto	Fornecedor
Potes para sementes	<ul style="list-style-type: none"> • Frascos de 2 ml Wheaton-style - VGA-220-012C • Frascos de 5 ml Wheaton-style -VGA-220-121U • Placas de Petri 60 x 12 mm - PDS-100-011U 	Fisher Scientific Ltd: www.fisher.co.uk
Caixas seláveis	Caixa com fechamento elétrico Cubo 0 (IP67): 300 x 300 x 132 mm <ul style="list-style-type: none"> • Base ABS - OABP303010B • Tampa transparente- OPCT303003L 	Ensto UK Ltd: www.ensto.com
Suporte para manter as sementes acima da solução de LiCl dentro da caixa	Fisherbrand incubation tray in polypropylene blue: 250mm x 240 mm - FB55681	Fisher Scientific Ltd: www.fisher.co.uk
Incubadora	LEEC KIF Compact	Jencons-PLS: www.jencons.co.uk
Higrômetro de laboratório	Sensor HC2-AW com interface USB, conectado a um laptop/PC com software HW4-E. Variação: 0 to 100% RH, -40 to 85 °C.	Rotronic Instruments (UK) Ltd: www.rotrotron.com
Software para análise estatística	<ul style="list-style-type: none"> • Genstat versão 12.1 • Versão original 8 	VSN International: www.vsn.co.uk Origin Lab: www.originlab.com

Nota: os equipamentos acima citados são utilizados pelo Projeto Millenium Seed Bank e foram cuidadosamente escolhidos utilizando nossos anos de experiência. A lista de fornecedores é somente um guia e não representa apoio do Royal Botanic Garden Kew ou da Embrapa. As instruções dos fabricantes devem ser seguidas quando for utilizado qualquer equipamento relacionado nesta publicação informativa.

Análise e interpretação

Para gerar a curva de sobrevivência, utilizar a viabilidade das sementes (porcentagem de germinação) contra o período de envelhecimento (dias). A análise é geralmente feita utilizando a análise de Probit (um tipo de análise de regressão) para adequar a equação de viabilidade (Ellis & Roberts, 1980):

$$v = Ki - p/\sigma$$

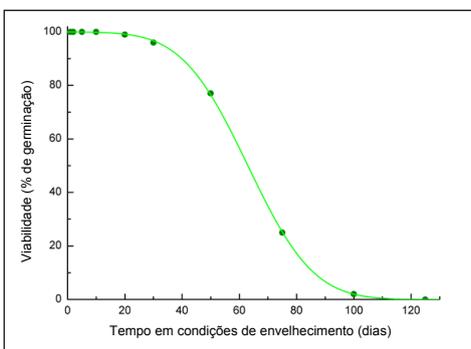
em que v é a viabilidade (em probits) da coleção após p dias em ambiente de envelhecimento. Ki é o intercepto de y e a medida da viabilidade inicial das sementes (em probits) e o (sigma) é o tempo para a viabilidade declinar de 1 probit.

O tempo para a viabilidade declinar em 50% (p₅₀) pode ser analisado pela curva de sobrevivência ou calculado utilizando a equação:

$$p_{50} = Ki \times \sigma$$

Os valores p₅₀ são usados para classificar espécies, permitindo comparações de longevidade entre espécies e com espécies marcadoras selecionadas.

Abaixo: Gráfico típico de sobrevivência de sementes.



Dicas práticas

- Iniciar o experimento de longevidade comparativa às quartas-feiras o que permitirá a retiradas de amostras nos dias da semana.
- Utilizar frascos de vidro ou placas de Petri em vez de plásticos, permitindo minimizar a eletricidade estática.
- Utilizar duas espécies marcadoras, com conhecida constante de viabilidade; as utilizadas no MSB, são *Ranunculus sceleratus* (pouco longeva) e *Brassica napus* (longeva). A longevidade das espécies teste são comparadas com estas.
- A programação de amostragem é feita para espécies com longevidade desconhecida. Ajustar a programação de forma adequada para cada espécie. Por exemplo, pode ser aumentado o intervalo de amostragem durante o teste, se os dados de germinação indicarem que as sementes estão mostrando poucos sinais de perda de viabilidade.

Leitura recomendada

Ellis R.H. and Roberts E.H. (1980). Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany* 45: 13-30.

Liu, K., Eastwood, R.J., Flynn, S., Turner, R.M. and Stuppy, W.H. (2008). Seed Information Database (release 7.1, May 2008) [http://www.kew.org /data /sid](http://www.kew.org/data/sid)

Hay F.R., Adams J., Manger K. and Probert R. (2008). The use of non-saturated lithium chloride solutions for experimental control of seed water content. *Seed Science and Technology* 36: 737-746.

Probert R.J., Daws M.I. and Hay F.R. (2009) Ecological correlates of ex situ seed longevity: a comparative study on 195 species. *Annals of Botany* 104: 57-69.