

CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO DA DORMÊNCIA EM SEMENTES

*Victor José Mendes Cardoso*¹

¹ Departamento de Botânica, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Caixa Postal: 199. Rio Claro, São Paulo, Brasil. CEP: 13506-900.
E-mail: victorjc@rc.unesp.br

RESUMO

Embora conhecido há muito tempo, o fenômeno da dormência em sementes ainda desafia os pesquisadores pela sua complexidade e múltiplos mecanismos envolvidos. Sistemas mais atuais de classificação de dormência sistematizam os conhecimentos até agora adquiridos, criando uma linguagem comum entre os pesquisadores e construindo uma base conceitual que os auxilie na correta interpretação dos resultados, permitindo ainda uma melhor contextualização de suas pesquisas nos aspectos gerais da dormência em sementes. A presente revisão – longe de ser completa ou exaustiva – busca apenas apresentar o panorama atual relativo aos conceitos e classificações da dormência, constituindo um ponto de referência para novas pesquisas e investigações sobre o tema.

Palavras-chave: Unidades de dispersão, germinação, quiescência, definição.

ABSTRACT

CONCEPTS AND CLASSIFICATION SYSTEMS IN SEED DORMANCY. Despite being known to science for quite a long time, the phenomenon of seed dormancy still baffles the scientific community for the multiple complex underlying mechanisms. The current classification systems of seed dormancy attempt to condense all that is known about the phenomenon in an attempt to generate a conceptual database that would enable facilitated interpretation of upcoming information and allow for a better contextuation of research in this field. The present paper is a preliminary overview of the current panorama of concepts and classification systems of seed dormancy that intends to serve as a standpoint for future research in this field.

Keywords: Dispersal units, germination, quiescence, definitions.

RESUMEN

CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN DE LA DORMANCIA EN SEMILLAS. Aunque conocido hace mucho tiempo, el fenómeno de la dormancia en semillas aun desafía a los investigadores por la complejidad y múltiples mecanismos que envuelve. Sistemas más actuales de clasificación de la dormancia sistematizan los conocimientos hasta ahora adquiridos, creando un lenguaje común entre los investigadores y construyendo una base conceptual que los auxilie en la correcta interpretación de los resultados, permitiendo también una mejor contextualización de sus investigaciones en los aspectos generales de la dormancia en semillas. Esta revisión – lejos de ser completa o exhaustiva – busca únicamente presentar el panorama actual relacionado con los conceptos y clasificaciones de la dormancia, constituyéndose en punto de referencia para nuevas investigaciones y avances sobre el tema.

Palabras clave: Unidades de dispersión, germinación, quiescencia, definición.

INTRODUÇÃO

Como destaca Labouriau (1983), a noção de dormência é muito antiga, vindo desde quando o homem percebeu que certas sementes recém-colhidas

e aparentemente maduras e viáveis não germinavam quando plantadas. Embora o conhecimento empírico do fenômeno da dormência remonte de muitos séculos atrás, estudos sistemáticos usando uma abordagem científica começaram praticamente

apenas nas primeiras décadas do século XX. Após os trabalhos pioneiros voltados principalmente para a indução da germinação de sementes dormentes, passou-se também à organização dos conhecimentos acumulados visando a conceituação de dormência, de modo que o fenômeno pudesse ser corretamente descrito em uma linguagem padronizada. Nas últimas décadas, inúmeros trabalhos e revisões (Vegis 1964, Bewley & Black 1994, Hilhorst 1995, Vleeshouwers *et al.* 1995, Foley 2001, Koorneef *et al.* 2002, Baskin & Baskin 2004, Finch-Savage & Leubner-Metzger 2006, Baskin & Baskin 2008, Finkelstein *et al.* 2008) têm procurado elucidar o fenômeno da dormência e criar uma terminologia cada vez mais adequada para descrevê-lo, face ao contínuo incremento de novas informações. Esta pequena revisão tem como objetivo traçar um panorama atual sobre os conceitos de dormência em sementes, sem se aprofundar nos mecanismos e processos moleculares envolvidos. A proposta é divulgar cada vez mais entre biólogos, ecólogos e todos aqueles que estudam germinação de sementes uma terminologia que lhes permitam descrever adequadamente em seus trabalhos as respostas das sementes e, ao mesmo tempo, analisar criticamente os métodos empregados, propondo eventualmente modificações e aperfeiçoamentos nos sistemas mais usados de classificação da dormência.

GERMINAÇÃO, QUIESCÊNCIA E DORMÊNCIA

Antes de tratar da dormência, deve-se primeiramente definir germinação. Particularmente no caso das sementes denominadas ‘ortodoxas’, essas são liberadas da planta mãe num estágio de desenvolvimento no qual seu metabolismo encontra-se em níveis praticamente imperceptíveis. Labouriau (1983) utilizou os termos criptobiose e, posteriormente, hipobiose para designar esse estágio – situado entre o fim da maturação e o início da germinação – caracterizado, entre outros aspectos, pela suspensão temporária do crescimento do embrião. Nesse sentido, a germinação representa a retomada do crescimento do embrião quando a semente desligada da planta encontra condições adequadas ou favoráveis no ambiente, principalmente quanto à água, oxigênio, temperatura e, em alguns casos, luz. Tal suspensão do crescimento embrionário não ocorre no caso da viviparidade. Além disso,

existem sementes que são liberadas da planta com o embrião indiferenciado ou subdesenvolvido e, nesse caso, a retomada de seu crescimento na semente livre não implica imediatamente em germinação. Tomando-se ainda como referência as sementes ‘ortodoxas’, a germinação começa com a embebição, mas seu início é caracterizado principalmente pela reativação do metabolismo respiratório, intensa mobilização de metabólitos, enfraquecimento dos tecidos de envoltório do embrião (como, por exemplo, em sementes de tabaco) e, finalmente, o crescimento do embrião com o conseqüente rompimento dos envoltórios da semente (Castro & Hilhorst 2004). Sementes consideradas ‘recalcitrantes’ representam um caso à parte, permanecendo metabolicamente ativas quando maduras e, em alguns casos, com um conteúdo de água suficiente para entrar em processo germinativo imediatamente após a dispersão (Berjak & Pammenter, 2000). Os critérios para se definir exatamente o final da germinação, ou seja, quando uma semente pode ser considerada germinada, variam de autor para autor, mas na maioria dos casos opta-se pelo chamado ‘critério biológico ou botânico’ que considera germinada a semente na qual uma parte do embrião (em geral a radícula) emergiu através dos envoltórios (Labouriau 1983). A aplicação desse critério de germinação faz com que exista, em muitos casos, um razoável intervalo entre as primeiras evidências de crescimento do eixo embrionário e a protrusão da radícula (Cohn 1996). Em sementes de *Nicotiana*, por exemplo, a germinação ocorre em duas etapas, sendo a primeira a ruptura da testa; e a segunda a ruptura do endosperma (Finch-Savage & Leubner-Metzger 2006); enquanto que em diásporos de *Oryza sativa*, mesmo com a remoção das estruturas de cobertura (lema e palea), observa-se um atraso entre a rachadura do pericarpo – primeiro sinal do crescimento do embrião – e a emergência da radícula (Cohn 1996). De qualquer modo, por mais arbitrário que pareça, no momento em que o embrião traspasa a última camada dos envoltórios cria-se, do ponto de vista fisiológico, uma situação totalmente nova para semente, com uma inflexão positiva na curva de embebição e um forte aumento na velocidade de consumo de oxigênio (Labouriau 1983).

Por definição, uma semente ‘quiescente’ é aquela que inicia e completa o processo germinativo quando não há insuficiência de fatores exógenos (como água,

calor e oxigênio) ou, numa definição mais exata, é aquela capaz de germinar na maior amplitude possível de fatores do ambiente físico, considerando-se os limites impostos pelo seu genótipo (Baskin & Baskin 2004). Em outras palavras, uma semente quiescente não germina a menos que encontre um conjunto de fatores ambientais não limitante às suas necessidades. Portanto, pode-se considerar quiescente tanto uma semente não hidratada como uma semente hidratada e guardada no congelador, por exemplo. Uma semente 'dormente', por sua vez, não tem capacidade de germinar, num período de tempo especificado, em uma ou mais combinações de condições ambientais nas quais a semente germinaria normalmente se não estivesse com dormência (Baskin & Baskin 2004). Assim, remetendo a um conceito clássico de dormência, a semente dormente não germina em condições ambientais normalmente consideradas favoráveis ou adequadas. Concluiu-se que as sementes dormentes apresentavam algum bloqueio interno à germinação, o qual deve ser superado por intermédio de um processo conhecido como pós-maturação ou quebra de dormência, para que então a semente fique apta a germinar. Assim, enquanto a dormência é causada por um ou mais bloqueios situados na própria semente ou unidade de dispersão, a quiescência é provocada pela ausência ou insuficiência de um ou mais fatores externos necessários à germinação.

Mais do que a simples ausência de germinação, a dormência pode ser considerada uma modalidade de desenvolvimento e, como tal, passível de controle em nível metabólico e genômico (Labouriau 1983). Portanto, tanto a indução como a interrupção da dormência devem estar atreladas a uma seqüência de processos parciais com distintos fatores regulatórios, do mesmo modo que bloqueios à germinação também podem ocorrer ao longo de uma seqüência de processos. Isso desafia os pesquisadores a estabelecerem critérios para distinguir processos de quebra de dormência daqueles da germinação, ou seja, estabelecer um limite entre o fim da dormência e o começo da germinação. A maior parte dos estudos concentra-se na identificação de genes expressos diferencialmente em sementes dormentes e não dormentes, tendo sido identificados genes cuja expressão é correlacionada a estados de dormência. Entretanto, muitos destes genes parecem não ser necessários para a dormência, enquanto que outros não são expressos em sementes (Finkelstein *et*

al. 2008). Estudos recentes também sugerem que a regulação da dormência ocorre em múltiplos níveis, tais como translação e estabilidade de proteínas; além disso, transições entre diferentes níveis ou estados de dormência envolvem mudanças na expressão gênica mesmo em sementes não hidratadas em processo de pós-maturação (Finkelstein *et al.* 2008). De qualquer modo, em termos práticos, para a maioria dos pesquisadores a germinação visível (critério botânico) continua sendo a indicação mais simples da quebra da dormência, embora tal critério seja uma evidência *a posteriori*, não indicando quando a semente mudou de nível de dormência ou passou de dormente a quiescente. O uso de variáveis bioquímicas como indicadores de mudanças temporais na transição entre dormência e quiescência é válido desde que as variações sejam acompanhadas concomitantemente em um lote de sementes dormentes e não dormentes, aplicando-se tratamentos de quebra de dormência às primeiras (Cohn 1996). Como podemos perceber, não é fácil distinguir os processos de quebra de dormência e indução da germinação. É relativamente comum, principalmente em pesquisas com espécies nativas, experimentos de germinação em que as sementes são deixadas por muitas semanas nas incubadoras até que todas elas – ou, pelo menos, a maioria – esteja germinada. Nesses casos, em geral o surgimento de plântulas vai ocorrendo gradualmente ou de maneira irregular, o que leva o pesquisador à indecisão sobre quando encerrar o ensaio. Sugere-se que os experimentos de germinação não devam ultrapassar quatro semanas, sendo que, após esse período, as sementes vivas que eventualmente não tiverem germinado podem ser consideradas dormentes (Baskin & Baskin 1998). Embora tal critério talvez não possa ser generalizado, é importante para o pesquisador ter em mente que, em experimentos longos, processos de quebra de dormência e indução da germinação podem ocorrer ao mesmo tempo, criando-se um elemento a mais de dificuldade para a interpretação dos resultados do efeito de diferentes fatores ambientais sobre a germinação.

CLASSIFICAÇÃO DA DORMÊNCIA COM BASE NA ORIGEM

A dormência ainda é um dos menos conhecidos aspectos da biologia de sementes, particularmente

devido ao fato de estar relacionada, não a uma, mas sim a múltiplas causas (Finkelstein *et al.* 2008). A dormência pode ser classificada com base na origem, localização e nos mecanismos envolvidos. Reconhecendo-se o caráter indutivo da dormência, ou seja, ela surge (é induzida) em uma determinada etapa do desenvolvimento e em um determinado espectro de condições ambientais, essa pode ser inicialmente classificada em: a) primária, que se instala durante o desenvolvimento da semente na planta-mãe e; b) secundária, que se estabelece na semente após sua liberação.

DORMÊNCIA PRIMÁRIA

A dormência primária é própria de uma semente madura, com tegumento permeável à água, sendo induzida pelo Acido Abscísico (ABA) durante a fase de maturação (Finch-Savage & Leubner-Metzger 2006). Tal caracterização exclui, portanto, sementes com dormência causada por tegumentos impermeáveis, bem como aqueles casos relacionados à imaturidade do embrião, do rol da dormência primária. Por outro lado, estudos mostram que sementes que desenvolvem tegumentos impermeáveis à água são capazes de embeber e germinar quando coletadas no ponto de maturidade fisiológica, antes do início da fase de dessecação ao final da maturação; assim, a impermeabilidade dos tegumentos se desenvolve durante a fase rápida de desidratação, estabelecendo-se na semente com o conteúdo de água variando de 2 a 21% (Baskin & Baskin 1998). Dependendo da espécie, a dormência primária pode se instalar já nas fases iniciais do desenvolvimento, como em *Avena fatua*, ou ao final do período de maturação, como em *Sida spinosa*, onde mudanças no tegumento parecem ser as responsáveis pelo estabelecimento da dormência (Bewley & Black 1994). Também Labouriau (1983) relata o caso de sementes de *Chenopodium amaranticolor*, onde a espessura do tegumento – e, por conseguinte, a capacidade de hidratação da semente – pode variar dependendo do comprimento do dia durante a fase de maturação. Quanto às sementes que são liberadas com o embrião ainda subdesenvolvido, no caso de *Heracleum sphondylium*, a fase de crescimento intra-seminal do embrião na semente dispersa requer condições ambientais específicas (Labouriau 1983),

o que não deixa de ser um processo de quebra de dormência. Assim, a dormência primária não deve envolver apenas mecanismos fisiológicos (como aqueles controlados pelo ABA), podendo-se incluir nessa categoria as sementes com dormência física e morfológica (ver definições abaixo).

DORMÊNCIA SECUNDÁRIA

Quanto à dormência secundária, essa pode ser induzida após a dispersão em sementes com dormência fisiológica não profunda, estando freqüentemente associada aos ciclos de dormência em bancos de sementes no solo (Fenner & Thompson 2005, Finch-Savage & Leubner-Metzger 2006). Assim, uma vez que a semente dispersa perca a dormência primária, provavelmente em decorrência de flutuações ambientais específicas, a dormência secundária pode imediatamente se estabelecer conforme as condições do meio operacional da semente. Por outro lado, a visão normalmente veiculada de que a dormência secundária ocorre se as condições ambientais não forem favoráveis à germinação talvez transmita a idéia de uma relação direta, causa-efeito, entre dormência (= não germinação) e ambiente físico. Na verdade, a dormência fisiológica pode ser induzida por fatores externos, mas trata-se de um processo intrínseco da semente, ou seja, não diretamente dependente das condições ambientais, como no caso da quiescência. De todo modo, a dormência secundária não se instalaria em sementes liberadas da planta-mãe já em estado quiescente, ou seja, sementes quiescentes não seriam capazes de mudar de estado de dormência. Entretanto, esse ainda é um assunto controverso, já que alguns autores (Simpson 1990) reportam que a dormência secundária pode ser estabelecida apenas em sementes geneticamente capazes de apresentar dormência primária, e outros (Khan 1994) mostram que sementes não dormentes ao final da maturação podem ser induzidas à dormência por inibidores da biossíntese de giberelinas. Labouriau, por sua vez, explica que a dormência secundária ocorre “quando as sementes maduras quiescentes são mantidas durante algum tempo em condições que não permitem a germinação” (Labouriau 1983). Entretanto, esse autor cita como exemplo duas espécies cujas sementes são fotoblásticas, ou seja, apresentam uma modalidade de dormência primária. Aparentemente,

em circunstâncias naturais, a instalação da dormência secundária é mais freqüente em sementes com algum tipo de dormência primária.

CLASSIFICAÇÃO DA DORMÊNCIA COM BASE NOS MECANISMOS

Quanto aos mecanismos de dormência, Bewley & Black (1982) reconheceram basicamente dois tipos: a) dormência do embrião e; b) dormência imposta pelos envoltórios (ou de cobertura). No primeiro tipo estariam incluídos os casos de inibição metabólica e imaturidade do embrião, enquanto que o segundo tipo incluiria os casos de impermeabilidade dos tegumentos, presença de inibidores e restrição mecânica, entre outros. Um sistema mais abrangente foi proposto pela pesquisadora russa Marianna G. Nikolaeva (Baskin & Baskin 1998), que dividiu a dormência do embrião (chamada por ela de endógena), em fisiológica, morfológica e morfofisiológica, e a dormência imposta pelos envoltórios (ou exógena),

em física, química e mecânica. A partir do sistema de Nikolaeva, Baskin & Baskin (2004) propuseram um sistema semelhante, com divisão da dormência em classes, níveis e tipos, sem incluir a dormência química (Tabela 1).

DORMÊNCIA FISIOLÓGICA

A dormência fisiológica (DF) é regulada basicamente em níveis metabólico e gênico. Essa classe é dividida em três níveis – profundo, intermediário e não profundo – sendo a DF profunda caracterizada pela incapacidade do embrião isolado em produzir uma plântula normal, enquanto que nos níveis intermediário e não profundo, a excisão do embrião é suficiente para fazê-lo desenvolver-se e produzir uma plântula normal. Portanto, na DF operam diferentes mecanismos associados tanto ao embrião como também aos tecidos e estruturas adjacentes, tais como o tegumento e o endosperma. As diferenças entre os níveis intermediários e não profundo

Tabela I. Sistema de classificação da dormência, baseada em Baskin & Baskin (2004), incluindo origem (se primária (P), ou secundária, (S)) e localização primária dos agentes controladores ou responsáveis pela dormência (se embrionária (E), ou extra embrionária (C)).

Table I. A classification system for seed dormancy based on Baskin & Baskin (2004), including sources of the dormancy (if primary (P) or secondary (S)) and main location of the mitigating agents responsible for the state of dormancy (if embryonary (E) or extra embryonary (C)).

Classe de dormência	Nível	Tipo	Origem	Localização
Fisiológica	Profunda	-	P	E
	Intermediária	-	P	E/C
	Não profunda	1, 2, 3, 4, 5	P/S	E/C
Morfológica	-	-	P	E
Morfo-fisiológica	Profunda	Simples; complexa	P	E
	Intermediária	Simples; complexa	P	E/C
	Não profunda	Simples; complexa	P/S	E/C
Física	-	-	P	C
Física + fisiológica	Não profunda	-	P/S	E/C
Química	-	-	P (?)	C

referem-se basicamente aos tratamentos necessários para se quebrar a dormência. A DF intermediária, por exemplo, requer um período de estratificação a frio de 2 a 3 meses, podendo chegar a 6 meses em algumas espécies; enquanto que na DF não profunda, períodos relativamente curtos de estratificação (variando de 5 a 90 dias dependendo da espécie) podem ser suficientes para a quebra da dormência. Além disso, em algumas espécies a DF não profunda pode ser interrompida com exposição a temperaturas mais elevadas (≥ 15 °C) do que aquelas empregadas normalmente na estratificação a frio (4 - 6 °C) (Baskin & Baskin 1998). A DF não profunda também pode ser dividida em tipos (Tabela 1). Nos tipos 1, 2 e 3, à medida que as sementes vão se tornando menos dormentes, a faixa térmica na qual elas são capazes de germinar aumenta gradativamente de temperaturas baixas para mais elevadas (tipo 1), de temperaturas elevadas para baixas (tipo 2), ou de temperaturas medianas para ambos os extremos (tipo 3) (Baskin & Baskin 2004).

Já em meados da década de 1960, Vegis (1964) relacionava dormência com a capacidade de uma semente germinar em resposta à temperatura. Essa resposta é normalmente balizada pelas chamadas “temperaturas cardeais”, ou seja, as temperaturas mínima (T_b) e máxima (T_c) de germinação (Labouriau 1983). Assim, a germinação ocorrerá desde que a temperatura ambiente (T) esteja entre T_b e T_c , sendo que quanto mais dormente a semente menor a diferença entre T_b e T_c , até a condição de dormência total ou absoluta, quando T_b tende a se igualar a T_c , e a germinação não ocorre em nenhuma situação (Cardoso 2004). Na condição de DF não profunda, os tipos 1, 2 e 3 poderiam ser enquadrados na chamada dormência relativa, onde tratamentos de pós-maturação podem, por exemplo, alargar a “janela” térmica de germinação, mas ainda persistirão temperaturas (ou condições de luz) nas quais a dormência continuará se manifestando. Portanto, na dormência relativa a quebra ocorre gradualmente, o que pode ser aferido por um aumento da resposta germinativa em uma composição mais ampla de fatores ambientais, como a luz e a temperatura (Labouriau 1983). Casos em que a semente necessita de luz para germinar em uma dada temperatura, mas é indiferente à luz em outra, são exemplos de dormência relativa. Em suma, os tipos 1, 2 e 3 situam-se em uma faixa intermediária entre a dormência absoluta e a não-dormência

(quiescência). Já os tipos 4 e 5 não apresentam esse aumento progressivo da faixa térmica; o processo de quebra de dormência simplesmente faz com que sementes do tipo 4 passem a germinar apenas em temperaturas elevadas, enquanto que o tipo 5 germina apenas em temperaturas baixas (Baskin & Baskin 2004). Assim, no caso dos tipos 4 e 5 (ainda pouco estudados), as sementes passariam diretamente da dormência absoluta para um estado de quiescência com um requerimento de temperatura relativamente restrito.

DORMÊNCIA MORFOLÓGICA

A dormência morfológica (DM) manifesta-se em sementes que são liberadas da planta-mãe com embriões diferenciados (cotilédones e eixo hipocótilo-radícula reconhecíveis), mas subdesenvolvidos quanto ao tamanho. Nesse caso, a germinação “visível” (protrusão) é precedida por uma fase de crescimento intra-seminal desencadeada por condições ambientais apropriadas. Baskin & Baskin (2004) afirmam que tais sementes não respondem a tratamentos de quebra de dormência, seguindo apenas seu próprio ritmo de crescimento. É interessante que, quando acompanhada da dormência fisiológica (ver item abaixo), a DM parece apresentar sensibilidade a tratamentos de quebra de dormência. Os casos de sementes dispersas com o embrião indiferenciado deixaram de ser enquadrados como DM pelo fato de seu desenvolvimento (fase de histo-diferenciação) não ter sido completado, sendo portanto consideradas sementes imaturas.

DORMÊNCIA MORFO-FISIOLÓGICA

No caso da dormência morfo-fisiológica (DMF), além do embrião subdesenvolvido, existe um componente fisiológico que requer tratamentos ou condições para quebra de dormência. Dependendo da espécie, o crescimento ou é precedido pela quebra da DF, ou ambos os processos (quebra da DF e crescimento) ocorrem simultaneamente (Baskin & Baskin 1998). As diferenças entre os vários níveis e tipos de DMF estão relacionadas aos métodos utilizados para a quebra da dormência, baseados ou em tratamentos térmicos (estratificação) ou tratamentos com ácido giberélico. Os tratamentos térmicos de

quebra do componente fisiológico da DMF são basicamente quatro: a) estratificação a quente; b) estratificação quente seguida de estratificação fria (quente + fria); c) fria + quente + fria; d) fria. Para o crescimento do embrião podem ser aplicados os tratamentos de estratificação fria ou quente, de acordo com o nível. Dependendo do caso (Baskin & Baskin 1998), o ácido giberélico pode substituir os tratamentos de estratificação quente ou fria.

DORMÊNCIA FÍSICA

A dormência física (FI) é causada por uma ou mais camadas de células impermeáveis à água, situadas no tegumento ou nos envoltórios da semente em geral. Nesses casos, a hidratação e a conseqüente interrupção da dormência estão em muitos casos relacionadas à formação de aberturas em estruturas anatômicas especializadas (por exemplo, o hilo e a lente), localizadas na superfície da semente, ocasionando uma diminuição da resistência à entrada de água no seu interior (Baskin & Baskin 2004). Curvas de embebição de amostras de sementes escarificadas mecanicamente e sementes não escarificadas podem servir como indicadores dessa modalidade de dormência. É provável que, em alguns casos, os tegumentos e envoltórios da semente também possam restringir a difusão de oxigênio, principalmente em temperaturas mais elevadas, as quais tendem a diminuir a solubilidade do oxigênio na água e, portanto, reduzir sua disponibilidade para o embrião. De qualquer modo, é importante para o pesquisador determinar qual a função exata dos tegumentos e/ou envoltórios na germinação do diásporo, antes de se tentar classificar a semente quanto à dormência. Assim, em se tratando de uma dormência de natureza exógena (imposta pelos envoltórios), essa pode estar associada às seguintes causas: a) resistência mecânica ou sinalização molecular restritiva exercida pelos tecidos extra-embriônicos, o que, no caso, pode caracterizar uma DF; b) à impermeabilidade à água, o que indica FI ou; c) à presença de possíveis inibidores químicos nos tecidos extra-seminais.

Alguns autores (Labouriau 1983) não reconhecem a FI, uma vez que, a rigor, ela não se enquadra em formulações mais gerais dos conceitos de dormência, particularmente com relação ao seu caráter indutivo. Entretanto, experimentos com sementes de ‘testa dura’

têm mostrado cada vez mais que tanto a formação da barreira à entrada de água como a redução da resistência à embebição são eventos passíveis de controle ativo e sensíveis a fatores ambientais. De maneira semelhante ao que se observa em sementes com DF não profunda, têm sido observadas variações anuais cíclicas da germinabilidade em sementes enterradas de leguminosas com dormência exclusivamente física (Jayasuriya *et al.* 2009). Em tais casos, a quebra da FI ocorre pela formação de uma lacuna ou abertura em determinadas regiões do tegumento. Em sementes de *Dodonaea petiolaris* (Sapindaceae), essa lacuna foi identificada como um pequeno plugue tegumentar adjacente ao hilo e oposto ao ponto de emergência da radícula, o qual pode ser expelido por imersão da semente em água fervente por 2 -5 minutos ou incubação por 24 semanas em substrato úmido a 20/35 °C (Turner *et al.* 2009). Em sementes de *Cuscuta australis* (Convolvulaceae) a própria fissura do hilo funciona como porta de entrada de água na semente (Jayasuriya *et al.* 2008). Os padrões cíclicos de germinação reportados em sementes com FI têm sido explicados em função da variação de sensibilidade a tratamentos potencialmente capazes de quebrar a dormência, sendo que essa variação de sensibilidade é dirigida por fatores ambientais. Dessa forma, sementes com maior sensibilidade requerem tratamentos de quebra de dormência mais suaves e breves, e sementes insensíveis necessitam de tratamentos mais intensos e prolongados (Jayasuriya *et al.* 2009). Diferentemente das sementes com DF não profunda que apresentam variações cíclicas nos níveis de dormência, na FI a transição do estado dormente para o quiescente é de caráter irreversível, ou seja, uma vez que a dormência tenha sido quebrada, ela não pode mais ser restabelecida. Estudos sobre variações cíclicas de germinação são normalmente feitos enterrando-se grupos de sementes, que são periodicamente desenterrados e testados em condições controladas de laboratório (Jayasuriya *et al.* 2009). Em tais casos, recomenda-se que os testes de germinação sejam feitos em pelo menos três temperaturas ou regimes térmicos diferentes; se as sementes germinarem bem apenas numa temperatura (ou numa faixa estreita de temperaturas), isso sugere a variação de dormência (característica da DF), e não de sensibilidade da semente (característica da FI). Além disso, as

sementes desenterradas devem também ser testadas quanto à embebição nas diferentes temperaturas, para serem excluídos eventuais casos de ciclagem de DF. Assim, a DF ocorrerá se as sementes embeberem, mas não germinarem em todas as temperaturas. Por outro lado, se as sementes embeberem e germinarem apenas numa dada condição térmica, não mostrando sinais de embebição nas demais temperaturas, pode-se concluir que está ocorrendo variação de sensibilidade da semente (Jayasuriya *et al.* 2009). Portanto, em leguminosas, quando sementes sensíveis e com tegumentos impermeáveis à água em qualquer temperatura são mantidas sob certas condições de temperatura e umidade, podem surgir aberturas em regiões específicas do tegumento permitindo que a semente germine em uma grande amplitude térmica, tanto em presença quanto em ausência de luz (Baskin & Baskin 2004). Do ponto de vista ecológico, tanto as variações cíclicas de dormência (no caso de DF) quanto a sensibilidade a fatores de quebra de dormência (FI) desempenham o mesmo papel, permitindo que as plântulas recém formadas encontrem condições adequadas ao seu estabelecimento.

A dormência física também pode ocorrer de maneira combinada com a dormência fisiológica, mais com a DF não profunda, de modo que a semente só germina se ambas as dormências tiverem sido quebradas. Em casos onde a quebra da DF envolve a estratificação, por exemplo, a quebra da FI deve ocorrer antes da quebra da DF, já que é necessário que a semente esteja hidratada para a estratificação (Baskin & Baskin 2004).

DORMÊNCIA QUÍMICA

De acordo com a definição originalmente proposta pela Dra. Marianna G. Nikolaeva, a dormência química (DQ) seria causada por inibidores de crescimento presentes no pericarpo. Essa definição foi posteriormente estendida para substâncias produzidas tanto dentro como fora da semente que, translocadas para o embrião, inibiriam seu crescimento (Baskin & Baskin 1998). Aquênios de *Bidens pilosa* (picão-preto), por exemplo, germinam melhor quando submetidos a lavagem com água corrente, sugerindo a presença de inibidores no aquênio. Tais inibidores podem reduzir, via oxidação, a disponibilidade de oxigênio ao embrião (Forsyth & Brown 1982).

Estudos baseados principalmente na técnica de bioensaios têm sugerido a presença de inibidores de germinação tanto em frutos como em sementes, embora seu papel no controle endógeno da germinação da própria semente a partir da qual o inibidor foi extraído raramente fique estabelecido. Do ponto de vista teórico existe uma diferença entre DQ, que é um tipo de dormência relacionada exclusivamente a fatores exógenos ou extra-embriônicos, e a dormência fisiológica, que também pode envolver a presença de inibidores da germinação, como o Ácido Abscísico, no embrião. A maioria das pesquisas que relatam a presença de inibidores químicos nas sementes ou frutos foi realizada com sementes que apresentavam também DF (Baskin & Baskin 1998). Nesse sentido, muitos autores vêm tratando como DF toda dormência provocada por inibidores de crescimento. No caso de frutos carnosos, deve-se primeiramente avaliar o estado de dormência da unidade de germinação (a semente), isolada do fruto; se a inibição da germinação ocorrer apenas devido ao meio desfavorável representado pelo pericarpo, a semente deve ser considerada quiescente (Baskin & Baskin 2004). No caso de frutos secos, esses autores sugerem que a unidade de germinação inclua também o endocarpo (como no caso de Anacardiaceae) ou todo o pericarpo (como no caso de aquênios). Em florestas tropicais, formigas podem atuar como agentes promotores da germinação ao “limparem” sementes dispersas dos restos do fruto (Oliveira *et al.* 1995). Portanto, se o pericarpo efetivamente contiver inibidores químicos da germinação, pode-se discutir sua função como fator de resistência à germinação, e seu papel na distribuição temporal da germinação no ambiente natural, à semelhança das dormências. Nesse caso, o efeito sobre a germinação da remoção do pericarpo (ou da sarcotesta, por exemplo) por formigas seria comparável (em termos de resultado final) ao efeito da perfuração, por algum agente biológico, de um tegumento impermeável à água. Estas questões representam um campo aberto a novas investigações, principalmente no que diz respeito à presença de inibidores químicos no pericarpo, e à ocorrência de outras modalidades de dormência nas sementes.

A Tabela 1 é uma tentativa de sintetizar as diferentes modalidades de dormência aqui mencionadas, classificando-as quanto os mecanismos básicos,

origem (primária ou secundária) e localização (embrião ou envoltórios), sendo que, para efeito de simplificação, os tipos dentro de cada nível foram omitidos.

MAS, AFINAL, O QUE É DORMÊNCIA?

A dormência de sementes é normalmente definida como uma condição negativa, ou seja, um estado em que uma semente viável falha em germinar sob condições ambientais ‘favoráveis’ ou ‘normalmente adequadas’ à germinação (Labouriau 1983, Finkelstein *et al.* 2008). Logicamente, a expressão ‘condições favoráveis’ carrega um componente arbitrário, já que determinada condição (composição de fatores ambientais) pode ser adequada para uma semente e não adequada para outra. Além disso, que fatores (Água? Luz? Temperatura?) devem ser levados em conta para se definir um ambiente ‘favorável’. Em geral, a própria categorização da dormência é baseada nos tratamentos (escarificação, estratificação, fitoreguladores, etc) que liberam a semente desse bloqueio, promovendo a germinação. Assim, a quantificação da dormência é geralmente expressa em termos de incremento da germinação. Atualmente, com as novas tecnologias, mais e mais estudos têm correlacionado a dormência com mudanças na expressão gênica, atividade enzimática e acúmulo de hormônios, o que deve conduzir a uma definição positiva de dormência (Finkelstein *et al.* 2008). Dessa forma, o conceito de dormência ainda aguarda por novas pesquisas para ser refinado ou reestruturado, adequando-se aos novos resultados que mostram uma verdadeira plêiade de mecanismos e processos que levam a semente viva a uma condição metabólica ‘de espera’.

Com base no estado atual dos conhecimentos, algumas definições genéricas de dormência podem ajudar o pesquisador a direcionar, formular hipóteses e discutir de maneira apropriada os resultados de suas pesquisas com sementes. Nesse sentido, destaco três conceitos de dormência que, no meu entender, são complementares. O primeiro é aquele proposto por Labouriau (1983), que considera dormentes as sementes que, “depois de expostas a determinadas condições ambientais, seja durante a maturação, seja após esse processo, apresentam alteração restritiva das condições exigidas para a germinação, efeito esse que

apresenta caráter indutivo e só pode ser removido por tratamentos específicos (ditos de pós-maturação ou de quebra de dormência), também de caráter indutivo e em geral muito diferentes dos tratamentos causadores da dormência” (Labouriau 1983). A segunda definição considera a dormência como uma característica da semente que determina as condições necessárias para a germinação (Vleeshouwers *et al.* 1995). Finalmente, Baskin & Baskin (2004) definem semente dormente como aquela que não tem a capacidade de germinar, em um período de tempo especificado, sob uma dada composição de fatores ambientais que, caso a semente não estivesse dormente, favoreceria sua germinação.

As duas primeiras definições reconhecem a dormência como uma modalidade de desenvolvimento de características próprias, ou seja, trata-se de um ‘estado’ da semente que condiciona a recepção, interpretação e/ou resposta aos sinais de seu ambiente operacional, ou seja, a dormência reflete de certo modo a capacidade da semente de receber sinais do meio. Uma forma de expressar quantitativamente essa comunicação é apresentada por Luiz F.G. Labouriau (Labouriau 1983, Labouriau & Valadares 1976), com base numa teoria matemática da comunicação desenvolvida por Claude E. Shannon. A definição de Labouriau – mais ampla do que a de Vleeshouwers e colaboradores – destaca uma propriedade da dormência que é a indução, ou seja, em algum momento – seja durante a maturação, seja após a dispersão – a dormência se instala na semente, alterando sua capacidade de resposta a fatores ambientais. Em sua definição, voltada basicamente para a modalidade de dormência classificada como ‘fisiológica’, esse autor não incluía os casos de imaturidade do embrião (dormência morfológica) nem os de impermeabilidade dos envoltórios (dormência física), embora a indução também possa ser encontrada na FI. O conceito de Vleeshouwers e colaboradores – apesar de relativamente vago para pesquisadores da área – é mais objetivo e menos exclusivo em relação aos mecanismos de dormência atualmente reconhecidos, e também, como mencionado acima, reconhece a dormência como algo independente do processo de germinação em si. Baskin & Baskin (2004) não conceituam a dormência propriamente dita, mas sua definição de sementes dormentes é de cunho mais prático e experimentalmente útil ao pesquisador, muito embora retorne à clássica

definição negativa da dormência, ou seja, a não germinação em condições teoricamente favoráveis. Além disso, não há um critério sobre o tempo que se deve aguardar para que a semente viva germine, antes desta poder ser considerada dormente. Em relação a isso, Baskin & Baskin (1998) sugerem que os testes tenham a duração de duas semanas, tempo esse que pode ser estendido para até quatro semanas, caso as porcentagens acumuladas de germinação continuem aumentando após 14 dias de incubação. Um critério menos arbitrário, ainda que mais trabalhoso, seria comparar a germinação da semente em diferentes regimes de temperatura e luz, testando-se ao mesmo tempo a influência de possíveis fatores de quebra de dormência, como estratificação, escarificação e fitoreguladores (por exemplo, giberelinas e etileno); eventuais alterações nos padrões de distribuição da germinação poderiam indicar dormência.

Recentemente, alguns modelos têm sido usados na tentativa de descrever a resposta da semente à temperatura e ao potencial de água, identificando os pontos de inflexão com parâmetros endógenos que representam limiares ao início do processo de germinação, permitindo assim ao embrião reconhecer seu ambiente operacional como favorável ou não. Exemplos de tais limiares são a temperatura base

(T_b), a temperatura máxima (T_c) e o potencial de água base (Ψ_b), os quais determinariam a resposta da semente à temperatura (no caso de T_b e T_c) ou à água (no caso de Ψ_b). Em linhas gerais, T_b e T_c indicam, respectivamente, os limites mínimo e máximo de temperatura dentro dos quais uma semente pode germinar, enquanto que Ψ_b representa o valor mínimo de potencial hídrico necessário para que ocorra germinação (Bradford 2002). Tais parâmetros, que podem variar ou não dentro de uma população, seriam determinados por fatores endógenos da semente, funcionando como indicadores da sua sensibilidade aos agentes ambientais ou, em outras palavras, como indicadores do grau de dormência. A quebra da dormência de sementes verdadeiras da batata (*Solanum tuberosum*) por resfriamento, por exemplo, é acompanhada por um decréscimo proporcional do Ψ_b (Bradford 2002). Exemplos como esse sugerem que a perda de dormência (ou sua indução) poderia estar associada a alterações em limiares endógenos de resposta à água (como Ψ_b) e à temperatura (como T_b).

A Figura 1 ilustra, de maneira simplificada, as relações entre dormência, quiescência e germinação. A semente é liberada da planta mãe com um determinado 'pacote' de características,

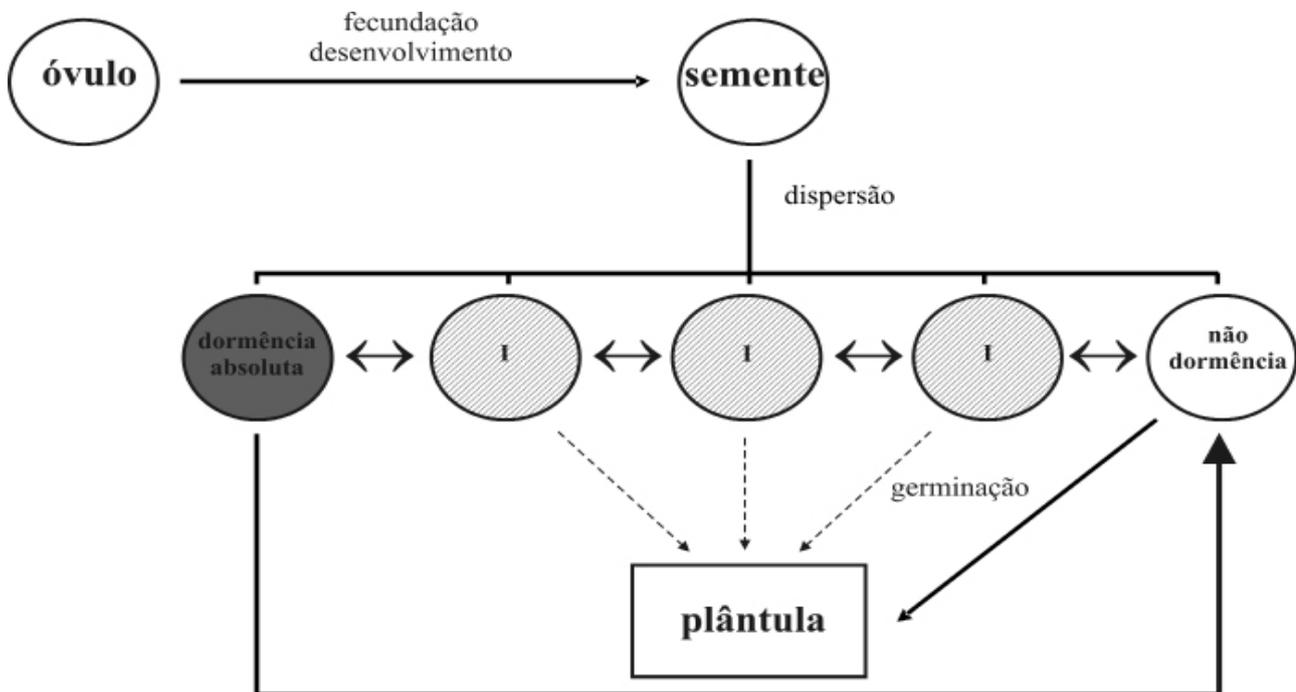


Figura 1. Modelo mostrando as transições de estados de dormência em uma semente dispersa, desde a condição de dormência absoluta (círculo escuro) até a ausência total de dormência (círculo branco). Os três círculos hachurados, representando os estados intermediários (I), são meramente ilustrativos e não indicam um número definido de estados.

Figure 1. Schematic representation of the distinct dormancy states of a given dispersed seed, ranging from absolute dormancy (dark circle) to no dormancy (white circle). The hatched circles represent arbitrary intermediary states (I), thus do not attempt to reflect any definite number of states.

seja de natureza morfológica ou fisiológica, que irá determinar sua capacidade de resposta imediata ao ambiente operacional. Essas respostas podem enquadrar a semente num estado de: a) dormência absoluta, ou seja, a semente não germina qualquer que seja a condição ambiental; b) quiescência (= não dormência), isto é, a semente está apta a germinar na mais ampla combinação possível de fatores ambientais, respeitados os limites impostos por seu genótipo ou; c) dormência relativa (\approx um estado intermediário), no qual a semente pode germinar em uma combinação limitada de fatores do ambiente físico. A transição entre a dormência absoluta e a não dormência seria controlada por fatores internos e externos à semente, podendo ser gradual (via estados intermediários) ou direta. A mudança do estado de não dormência para um estado de dormência representa a chamada dormência secundária. A Figura 1 também indica a relação entre dormência e sensibilidade da semente a fatores de interrupção ou quebra de dormência. Na condição de não dormência a sensibilidade da semente seria máxima (= máxima capacidade resposta), enquanto que dormência absoluta a semente seria 'insensível' (= mínima capacidade de resposta) aos fatores de quebra de dormência.

O conceito de dormência ainda carrega ambigüidades que só serão esclarecidas na medida em que outros critérios, que não apenas a germinação, sejam aplicados em sua definição; atualmente, parece-nos mais fácil reconhecer uma semente dormente do que definir dormência, ou vice-versa, dependendo do pesquisador. Enquanto isso é importante para o pesquisador procurar distinguir processos de pós-maturação ou quebra de dormência do processo de germinação. Como destacam Vleeshouwers *et al.* (1995), costuma-se investigar a dormência armazenando-se sementes em condições que não permitam a germinação, mas que também não comprometam sua viabilidade; periodicamente, amostras dessas sementes são testadas em diferentes condições ambientais e eventuais alterações nos padrões de resposta a tais condições poderão ser atribuídas a mudanças no estado de dormência durante o armazenamento, ou seja, as condições de armazenamento afetariam o grau de dormência. Além de estudos da variação da dormência com o armazenamento, pesquisas que envolvem tratamentos de 'quebra de dormência' devem ser acompanhadas

de cuidadosos testes de germinação – tanto dos tratamentos como do grupo controle – em mais de uma condição ambiental como, por exemplo, em três ou mais regimes de temperaturas controladas. Assim é possível fazer inferências mais positivas sobre eventual variação da dormência e/ou sensibilidade da semente aos fatores testados. De acordo com Vleeshouwers *et al.* (1995), fatores indutores de dormência causariam um estreitamento na amplitude de condições propícias à germinação, ao passo que fatores que não alteram os níveis de exigência da semente a determinadas condições ambientais, mas que são indispensáveis para que a germinação ocorra, são fatores indutores da germinação.

É importante ressaltar que alguns fatores ambientais, como a temperatura e a luz, podem desempenhar um papel duplo, controlando não só variações sazonais na dormência, como também a germinação propriamente dita. A luz, por exemplo, pode modificar a sensibilidade da semente a outros fatores (ou à própria luz), como no caso da semente que, exposta à luz por um período curto, adquire a habilidade de germinar no escuro. Nesse caso, o estímulo luminoso estaria atuando na quebra de dormência. Se, por outro lado, a presença da luz for necessária ao longo de todas as fases da germinação, essa deve ser encarada como um fator ambiental necessário à germinação (da mesma forma que a temperatura e a água). Portanto, a decisão entre quebra de dormência e germinação deve, na medida do possível, ser corroborada por vários experimentos controlados.

Do ponto de vista ecológico, a dormência de sementes é um assunto de interesse, já que esse processo pode estar relacionado ao acúmulo de um banco de sementes persistentes, ainda que dormência e persistência no solo possam não estar diretamente correlacionadas (Thompson *et al.* 2003). Em outras palavras, um banco persistente – que contém sementes viáveis por períodos superiores a doze meses – pode ser constituído tanto por sementes dormentes *stricto sensu* como por sementes quiescentes. Em uma comunidade de sementes vivas incorporadas ao solo deveremos, portanto, encontrar sementes dormentes (dormência primária e/ou secundária) e sementes não-dormentes. Assim, é provável que em estudos de regeneração da vegetação, discussões sobre dormência versus quiescência aparentemente não sejam tão relevantes, considerando-se que ambas

parecem contribuir para a longevidade das sementes no solo.

Concluindo, dentro do quadro atual a dormência ainda é relacionada à capacidade ou potencial da semente de produzir plântulas num prazo considerado razoável ou ideal por aquele que semeou. O referencial ainda depende do pesquisador, mas, com o advento e disseminação de novas técnicas de investigação, novos conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos no controle da dormência em nível molecular serão incorporados, com o conseqüente refinamento dos sistemas de classificação. Assim, as definições de dormência certamente serão embasadas em critérios menos arbitrários, e a comunicação entre os pesquisadores poderá ser facilitada, assim como a comparabilidade dos resultados das pesquisas.

AGRADECIMENTOS: V.J.M.C agradece ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa

REFERÊNCIAS

- BASKIN, C.C. & BASKIN, J.M. 1998. *Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination*. Academic Press, San Diego. 666p.
- BASKIN, C.C. & BASKIN, J.M. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14: 1-16.
- BASKIN, C.C. & BASKIN, J.M. 2008. Some considerations for adoption of Nikolaeva's formula system into seed dormancy classification. *Seed Science Research*, 18: 131-137.
- BERJAK, P. & PAMMENTER, N. 2000. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12 (Edição Especial): 22-55.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1994. *Seeds: Physiology, Development and Germination*, 2 ed. Plenum Press, New York. 445p.
- BRADFORD, K.J. 2002. Applications of hydrothermal time to quantifying and modelling seed germination and dormancy. *Weed Science*, 50: 248-260.
- CARDOSO, V.J.M. 2004. Dormência: estabelecimento do processo. In: A.G.Ferreira & F. Borghetti (orgs). *Germinação: do básico ao aplicado*. Artmed, Porto Alegre. 323p.
- CASTRO, R.D. & HILHORST, H.W.M. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. In: A.G.Ferreira & F. Borghetti (orgs). *Germinação: do básico ao aplicado*. Artmed, Porto Alegre. 323p.
- COHN, M.A. 1996. Operational and philosophical decisions in seed dormancy research. *Seed Science Research*, 6: 147-153.
- FENNER, M. & THOMPSON, K. 2005. *The Ecology of Seeds*. Cambridge University Press, Cambridge. 260p.
- FINCH-SAVAGE, W.E. & LEUBNER-METZGER, G.L. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171: 501-523.
- FINKELSTEIN, R.; REEVES, W.; ARIIZUMI, T. & STEBER, C. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review Plant Biology*, 59: 387-415.
- FOLEY, M.E. 2001. Seed dormancy: an update on terminology, physiological genetics and quantitative trait loci regulating germinability. *Weed Science*, 49: 305-317.
- FORSYTH, C. & BROWN, N.A.C. 1982. Germination of the dimorphic fruit of *Bidens pilosa*. *New Phytologist*, 90: 151-164.
- HILHORST, H.W.M. 1995. A critical update on seed dormancy: I. Primary dormancy. *Seed Science Research*, 5: 61-73.
- JAYASURIYA, K.M.G.; BASKIN, J.M.; GENEVE, R.L.; BASKIN, C.C. & CHIEN, C.T. 2008. Physical Dormancy in Seeds of the Holoparasitic Angiosperm *Cuscuta australis* (Convolvulaceae, Cuscutaceae): Dormancy-breaking Requirements, Anatomy of the Water Gap and Sensitivity Cycling. *Annals of Botany*, 102: 39-48.
- JAYASURIYA, K.M.G.; BASKIN, J.M. & BASKIN, C.C. 2009. Sensitivity cycling and its ecological role in seeds with physical dormancy. *Seed Science Research*, 19: 3-13.
- KHAN, A.A. 1994. Induction of dormancy in nondormant seeds. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 119: 408-413.
- KOORNNEEF, M.; BENTSINK, L. & HILHORST, H.W.M. 2002. Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 33-36.
- LABOURIAU, L.G. & VALADARES, M.B. 1976. On the germination of seeds of *Calotropis procera* Ait. F. *Anais Academia Brasileira Ciências*, 48: 263-284.
- LABOURIAU, L.G. 1983. *A germinação das sementes*. Secretaria Geral da OEA, Washington. 174p.
- OLIVEIRA, P.S.; GALETTI, M.; PEDRONI, F. & MORELLATO, L.P.C. 1995. Seed cleaning by *Mycocarpurus goeldii* ants (Attini) facilitates germination in *Hymenaea courbaril* (Caesalpinaceae). *Biotropica*, 27: 518-522.

SIMPSON, G.M. 1990. *Seed Dormancy in Grasses*. Cambridge University Press, Cambridge. 308p.

THOMPSON, K., CERIANI, R.M.; BAKKER, J.P. & BEKKER, R.M. 2003. Are seed dormancy and persistence in soil related? *Seed Science Research*, 13: 97-100.

TURNER, S.R.; COOK, A.; BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C.; TUCKETT, R.E.; STEADMAN, K.J. & DIXON, K.W. 2009. Identification and characterization of the water gap in the physically dormant seeds of *Dodonaea petiolaris*: a first report for Sapindaceae. *Annals of Botany*, doi:10.1093/aob/mcp171.

VEGIS, A. 1964. Dormancy in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 15: 185-224.

VLEESHOUWERS, L.M.; BOUWMEESTER, H.J. & KARSSSEN, C.M. 1995. Redefining seed dormancy: an attempt to integrate physiology and ecology. *Journal of Ecology*, 83: 1031-1037.

Submetido em 30/09/2009.

Aceito em 09/11/2009.