



**JEAN MARCEL SOUSA LIRA**

**TOLERÂNCIA CRUZADA EM SEMENTES  
OSMOCONDICIONADAS DE MELÃO  
(*Cucumis melon* L.) E TOMATE (*Lycopersicon  
esculentum* Mill.)**

**LAVRAS-MG**

**2012**

**JEAN MARCEL SOUSA LIRA**

**TOLERÂNCIA CRUZADA EM SEMENTES  
OSMOCONDICIONADAS DE MELÃO (*Cucumis melon* L.) E  
TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em  
Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de  
concentração em Crescimento e  
Desenvolvimento de Plantas, para  
obtenção do título de Mestre.

Dr. Amauri Alves de Alvarenga  
(Orientador)

Dr. Renato Mendes Guimarães  
(Coorientador)

**LAVRAS-MG**

**2012**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Lira, Jean Marcel Sousa.

Tolerância cruzada em sementes osmocondicionadas de melão  
(*Cucumis melon* L.) e tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) / Jean  
Marcel Sousa Lira. – Lavras : UFLA, 2012.

108 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Amauri Alves de Alvarenga.

Bibliografia.

1. Secagem. 2. Viabilidade. 3. Proteínas termoresistentes. 4.  
Estresse. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 581.1

**JEAN MARCEL SOUSA LIRA**

**TOLERÂNCIA CRUZADA EM SEMENTES  
OSMOCONDICIONADAS DE MELÃO (*Cucumis melon* L.) E TOMATE  
(*Lycopersicon esculentum* Mill.)**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em  
Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de  
concentração em Crescimento e  
Desenvolvimento de Plantas, para  
obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2012

Dr. Marcelo Murad Magalhães.....EMBRAPA

Dr. José Márcio Rocha Faria.....UFLA

Dr. Amauri Alves de Alvarenga  
Orientador

Renato Mendes Guimarães  
Coorientador

**LAVRAS-MG**

**2012**

## AGRADECIMENTOS

Ao ser inominável criador das leis que regem o nosso universo.

Aos meus pais que me ensinaram o respeito ao próximo e a honestidade nas palavras.

A minha irmã, que com sua alegria e amor faz do impossível possível.

Aos meus tios e tias que fazem parte da minha criação e convicções.

Aos meus primos.

Ao meu avô e minhas avós exemplos de caráter e elo entre gerações distintas.

Aos amigos de Aracaju, amigos de infância, amigos para o resto da vida

Aos amigos da UFS, grupo restauração e Prof. Dr. Robério Anastácio Ferreira, pela primeira orientação e despertar científico.

Ao professor Dr. Amauri Alves de Alvarenga, pela continuidade na minha orientação e na minha formação quanto cientista e ser humano.

Ao Prof. Luiz Edson pelas disciplinas a mim ministradas.

Ao Tanhan, pelo apoio e amizade incondicionais.

À Lena, Barrinha, Manu, Joel, Evaristo e Odorêncio pelo apoio e amizade.

Ao Cláudio e Andréa por terem me recebido em seu lar de coração aberto.

Aos amigos da Fisiologia Vegetal.

Ao Prof. Dr. Renato Mendes pela coorientação e conversas produtivas.

Ao Pesquisador Dr. Marcelo Murad pela amizade e competência.

Ao Prof. João Paulo pelo apoio e conhecimento transmitido.

À família do laboratório (Sara, Amanda, Túlio, Fabrício, Lara, Tássia) sem vocês nada disso seria possível.

À família da casa, Vinícius, Felipe e Chico, sem a companhia de vocês não teria conseguido.

Aos meus amigos de turma e disciplina (Tânia, Maísa, Leandro e André).

Aos amigos Dázio e Coelho.

Às meninas do Bioberg Tatá, Flavinha e Jú, por me aturarem e me darem abrigo nos momentos difíceis.

A minha amiga, companheira, namorada e mulher Marinês, que divide comigo esta conquista e toda a carga que carregamos juntos ao longo destes dois anos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Fisiologia Vegetal pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

## RESUMO

O presente trabalho foi constituído de dois ensaios nos quais foram discutidos os efeitos da secagem lenta e rápida associada ao estresse térmico (frio e calor), hídrico e aplicação exógena de ABA em sementes osmocondicionadas de melão (*Cucumis melon* L cv. Hales Best Jumbo) e tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Gaucho Melhorado). No primeiro ensaio as sementes de melão foram osmocondicionadas em solução de  $\text{KNO}_3$  (0,35 M), potencial de -1,7 MPa, temperatura a 25°C, no escuro, com aeração constante por um período de seis dias. Após este período, as sementes foram submetidas aos tratamentos sem secagem, secagem lenta, secagem rápida, choque de frio + secagem lenta, choque de frio + secagem rápida, choque de calor + secagem lenta, choque de calor + secagem rápida, PEG + secagem lenta, PEG + secagem rápida, ABA + secagem lenta e ABA + secagem rápida. Para controle utilizou-se as sementes não osmocondicionadas. Os efeitos dos tratamentos sobre percentagem de germinação e plântulas, IVG, IVE, atividade do sistema antioxidante (SOD, CAT e APX), concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e concentração de proteínas termorresistentes foram avaliados. Também foi avaliada a viabilidade das sementes através do teste de envelhecimento acelerado. No segundo ensaio as sementes de tomate foram osmocondicionadas em solução de  $\text{KNO}_3$  (0,30 M), potencial de -1,48 MPa, temperatura a 20°C, no escuro, com aeração constante por um período de sete dias. Após este período, as sementes foram submetidas aos mesmos tratamentos e avaliações das sementes de melão. O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), com três repetições para cada tratamento. As análises estatísticas utilizadas foram teste de Scott-Knott, Correlação de Pearson e Análise de Componentes Principais através do R. As sementes de melão sem secagem e ABA + secagem lenta tiveram redução na percentagem de germinação quando comparados com o controle. Enquanto as sementes do estresse térmico e secagem mantiveram sua viabilidade, a atividade da catalase foi reduzida e a concentração das proteínas termorresistentes foi maior nestas sementes. Já as sementes de tomate no ABA + secagem lenta tiveram redução na percentagem de germinação, enquanto a secagem lenta beneficiou à viabilidade. A atividade da catalase e APX não foi detectada nas sementes de tomate e houve redução das proteínas termorresistentes. Ação de um estresse em conjunto com secagem é benéfica para sementes de melão, mas não surtem efeito nas sementes de tomate.

Palavras-chave: Secagem. Estresse. Viabilidade. Proteínas Termorresistentes.

## ABSTRACT

Were evaluated effects of slow and fast drying associated with thermal stress (cold and heat), water and exogenous application of ABA in primed seeds of melon (*Cucumis melon* L cv. Hales Best Jumbo) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Gaucho Improved ). This work consists of two tests. In the first, melon seeds were primed in a solution of KNO<sub>3</sub> (0.35 M), potential of -1.7 MPa, temperature 25 ° C in the dark, with constant aeration for a period of six days. After the seeds were treated without drying, slow drying, fast drying, cold shock + slow drying, cold shock + fast drying, heat shock + slow drying, heat shock + fast drying, PEG slow + drying, PEG + fast drying, ABA + slow drying and ABA + fast drying. To use the control unprimed seeds. The effects of treatments on germination and seedling, IVG, IVE, activity of the antioxidant system (SOD, CAT and APX), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and concentration of heat-resistant proteins were evaluated. We also evaluated the viability of the seeds through the accelerated aging test. In the second trial were primed tomato seeds in a solution of KNO<sub>3</sub> (0.30 M), potential of -1.48 MPa, the temperature at 20 ° C in the dark, with constant aeration for a period of seven days. After the seeds were subjected to the same treatments and evaluations which melon seeds. The completely randomized design (CRD) with three replicates for each treatment. The statistical analyzes were Scott-Knott test, Pearson Correlation and Principal Component Analysis by R. Melon seeds without drying and slow drying + ABA had a reduction in germination percentage when compared with control. While the seeds of heat stress and drying retained their viability. Catalase activity was reduced and the heat-resistant protein concentration was higher in these seeds. The seeds of tomatoes ABA + slow drying had reduced the percentage of germination, while slow drying benefited viability. Catalase and APX activity was not detected in tomato seeds, with a reduction of heat-resistant protein. Action in conjunction with a stress is beneficial to dry melon seeds, but have no effect on tomato seeds.

Keywords: Drying. Stress. Viability. Heat-resistant proteins.



## SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral.....	10
1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
	Condicionamento Osmótico .....	14
	Tolerância à dessecação .....	16
	Proteínas Termorresistentes .....	17
	Sistema antioxidante .....	19
	Tolerância Cruzada .....	20
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	22
	REFERÊNCIAS .....	23
	CAPÍTULO 2 Tolerância cruzada em sementes osmocondicionadas de <i>Cucumis melon</i> L. ....	30
1	INTRODUÇÃO.....	33
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.1	Locais de realização dos experimentos.....	35
2.2	Material utilizado .....	35
2.3	Condicionamento osmótico .....	35
2.4	Secagem das sementes osmoticamente condicionadas.....	36
2.5	Choque Térmico .....	36
2.6	Manutenção do osmocondicionamento.....	37
2.7	ABA.....	37
2.8	Atividade do sistema antioxidante .....	37
2.9	Proteínas Termorresistentes .....	40
2.10	Curva de Embebição .....	41
2.11	Teste de Germinação .....	41
2.12	Envelhecimento Acelerado.....	42
2.13	Delineamento experimental e Análise estatística.....	43
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	63
5	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS .....	65
	CAPÍTULO 3 Tolerância cruzada em sementes osmocondicionadas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. ....	71
1	INTRODUÇÃO.....	74
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	76
2.1	Locais de realização dos Experimentos .....	76
2.2	Material utilizado .....	76
2.3	Condicionamento osmótico .....	76
2.4	Secagem das sementes osmoticamente condicionadas .....	76

2.5	Choque Térmico .....	77
2.6	Manutenção do osmocondicionamento.....	78
2.7	ABA.....	78
2.8	Atividade do sistema antioxidante .....	78
2.9	Proteínas Termorresistentes .....	81
2.10	Curva de Embebição .....	82
2.11	Teste de Germinação .....	82
2.12	Envelhecimento Acelerado .....	83
2.13	Delineamento experimental e Análise estatística.....	83
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	85
4	CONCLUSÃO.....	102
	REFERÊNCIAS .....	103

**CAPÍTULO 1 Introdução Geral**

## 1 INTRODUÇÃO

As sementes constituem a principal via de reprodução sexuada nas plantas vasculares (LINKIES et al., 2010), além de ser um produto de grande interesse comercial, utilizado como alimento no mundo inteiro.

De acordo com a Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas (2010) a venda de sementes no mundo atinge valores entre US\$ 35 a 36 bilhões e os países que concentram os maiores mercados são: Estados Unidos, China, Brasil, Japão e França. Desse total, o segmento de sementes de hortaliças representa no momento entre US\$ 3 a 3,5 bilhões de dólares, ou seja, acerca de 10% do valor do mercado mundial de sementes. Com relação ao Brasil, as vendas de sementes de hortaliças giram em torno de R\$300 milhões de reais, sendo esse valor referente aos preços pagos pelos produtores ao adquirem as sementes. Além disso, a área de cultivo das espécies propagadas por sementes é da ordem de 500 a 550 mil hectares.

Em decorrência dos altos valores envolvidos no comércio de sementes, o aumento de investimentos em pesquisas para gerar tecnologias que melhorem a sua qualidade e, conseqüentemente, aumente a produtividade agrícola é uma realidade no cenário global. Em virtude disso, muitos tratamentos vêm sendo utilizados em sementes visando aumentar a produtividade.

Dentre os diversos tratamentos em que as sementes podem ser submetidas, encontra-se o condicionamento osmótico (seed priming, osmoconditioning, osmopriming, osmotic priming), que permite um aumento na capacidade de revigoração das sementes, uniformização da emergência em campo e favorecimento da germinação em condições adversas (SANTOS et al., 2008; ROUHI et al., 2011).

O condicionamento osmótico consiste de uma hidratação controlada das sementes, o suficiente para promover a mobilização de reservas e síntese de materiais requeridos para germinação, sem permitir o alongamento celular, conseqüentemente, à emissão da radícula (BLACK; BEWLEY, 2000). Por meio dessa técnica, obtém-se uma redução no tempo compreendido entre a semeadura e germinação, e no intervalo de tempo entre a primeira e a última semente germinada num mesmo lote, o que traz grande benefício para o agricultor (NASCIMENTO; ARAGÃO, 2002). Todavia, sementes submetidas a essa técnica podem apresentar redução na longevidade e, conseqüentemente, menor tempo de armazenamento (POWELL, et al., 2000). Hoeskstra et al., (1994); Fessel et al., (2002) acreditam que a redução deve-se ao consumo das reservas e, sobretudo, a perda parcial da tolerância à dessecação.

A tolerância à dessecação é responsável pelo estágio final de desenvolvimento da semente, mantendo as estruturas e metabolismo, mesmo com baixo conteúdo de água, possibilitando as sementes de serem armazenadas (LEPRINCE; BUITINK, 2010).

Existem alguns mecanismos fisiológicos, metabólicos e expressão de genes relacionados com a aquisição da tolerância à dessecação em sementes, que vêm sendo estudados (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001). Entre os mecanismos estão o aumento no conteúdo de oligossacarídeos e proteínas termorresistentes ou protetoras, para manutenção da estrutura da bicamada lipídica da membrana celular; aumento na atividade enzimática do sistema antioxidante, para combater a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs); alteração no padrão da expressão gênica gerando acúmulo de mRNA ligados a síntese de late embryogenesis abundant (LEAs) e dos genes *RAB* e *Em*; e estabilização do citoplasma (vitriificação), que previne os processos de degradação molecular graças a diminuição na velocidade das reações químicas

em virtude do aumento da viscosidade (LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993).

Todavia, as sementes no estágio de maturidade seca, que tiveram o processo de germinação iniciado podem recuperar a capacidade de tolerar a perda de altos conteúdos de água sem perder a viabilidade? De acordo com Bruggink; Ooms; Toorn (1999); Buitink et al.(2003); Lin et al. (2005) a secagem (rápida ou lenta), a baixa temperatura, a alta temperatura e o déficit hídrico podem ajudar na reindução da tolerância à dessecação. Contudo, estudos relacionados aos mecanismos envolvidos no processo de tolerância à dessecação podem auxiliar a solucionar ou amenizar a redução da longevidade causada pela técnica de condicionamento osmótico.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **Condicionamento Osmótico**

Os trabalhos de Heydecker, Higgins e Gulliver (1973) são pioneiros no desenvolvimento da técnica de condicionamento osmótico, que visa na sementeira, permitir uma emergência mais rápida e uniforme da radícula.

O princípio da técnica consiste em manter as sementes em contato com uma solução de  $\text{KNO}_3$  ou  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , PEG, Manitol, dentre outras (COSTA; VILLELA, 2006; JANMOHAMMADI; DEZFULI; SHARIFZADEH, 2008; FAROOQ et al., 2010; ARIN et al., 2011), dando início à absorção de água até parar de absorver, uma vez que a semente atinge o equilíbrio com o potencial osmótico da solução (SANTOS et al., 2008).

O potencial osmótico pode ser ajustado ao nível que permite a semente, desde que seja aerado, iniciar todo o processo preparatório essencial para a germinação, evitando, dessa forma, o alongamento celular e, conseqüentemente, a emergência da radícula, mesmo após semanas de contato entre a semente e a solução osmótica (HEYDECKER; HIGGINS; TURNER, 1975). Todavia, uma vez removida à solução osmótica, as sementes podem ser transferidas para locais onde possam germinar ou serem secas, até atingirem o seu conteúdo de água original, seguindo posteriormente para o armazenamento (NASCIMENTO; WEST, 2000; BIRUEL et al., 2007).

A utilização do condicionamento osmótico tem gerado diversos benefícios aos produtores, pois está associada a ganhos na germinação das sementes através do aumento do vigor, ou seja, o uso dessa técnica promove um melhor desempenho na germinação em condições adversas como baixas

temperaturas, altas temperaturas, deficiência hídrica e salinidade (MOHAMMADI; AMIRI, 2010; TAVILI et al., 2011). Além disso, o condicionamento osmótico permite uma padronização no tempo de germinação das sementes refletindo em lotes mais uniformes e na melhora da qualidade de sementes com baixo vigor (JAHANGIR et al., 2009; HANEGAVE et al., 2011).

As alterações sub-celulares que ocorrem nas sementes submetidas ao osmocondicionamento são: o aumento na síntese de proteínas relacionadas à mobilização de reservas o que possibilita maior disponibilidade nutricional para o momento de protrusão da radícula; aumento da expressão de genes; síntese “de novo” de mRNA relacionados com processo germinativo; reparo do DNA, avanço do ciclo celular da fase G1 para a fase G2 e maior produção de ATP (VARIER; VARI; DADLANI, 2010).

O uso do condicionamento osmótico promove muitos benefícios, como os citados acima, no entanto pode reduzir a longevidade das sementes diminuindo o tempo de armazenamento devido ao elevado conteúdo de água nas mesmas (MORADI; YOUNESI, 2009). Diante disso, a redução do conteúdo de água das sementes osmocondicionadas tem sido uma alternativa para possível armazenamento, porém, uma vez seca as sementes podem perder os benefícios adquiridos (aumento na porcentagem de germinação, de plântulas e aumento de vigor), até mesmo a viabilidade comprometendo a germinação causando prejuízos ao produtor.

Para solucionar a perda da longevidade em decorrência do condicionamento osmótico, várias técnicas de re-indução à tolerância à dessecação vem sendo testadas e estudos sob os mecanismos que agem no processo vem sendo feitos, pois se acredita que a perda da tolerância à dessecação impede as sementes de voltarem ao conteúdo de água de origem.



### **Tolerância à dessecação**

A tolerância à dessecação é a capacidade que as sementes têm de perder elevado conteúdo de água (~90%) sem reduzir a capacidade de germinar após reidratação (LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993). Essa propriedade foi essencial na evolução das sementes, pois permitiu que as mesmas pudessem ser armazenadas, disseminadas e sobrevivessem as condições adversas do ambiente (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006).

Na natureza existem dois grupos distintos de sementes em relação à capacidade de perda de água: as ortodoxas e as recalcitrantes. As sementes ortodoxas, que toleram grandes perdas no conteúdo de água, sem perder a viabilidade, ou seja, possui tolerância à dessecação. Enquanto as sementes recalcitrantes mantêm alto conteúdo de água até completar seu desenvolvimento, não possuindo tolerância à dessecação.

A tolerância à dessecação é antagônica a germinação, uma vez que, a primeira ocorre devido à retirada da água, enquanto a outra necessita da entrada da mesma para acontecer. Todavia, a capacidade de germinação de uma semente está diretamente relacionada a tolerância à dessecação, sendo que, a habilidade de germinar de uma semente pode ser adquirida concomitantemente, ou antes, do processo de tolerância à dessecação (ANGELOVICI et al., 2010).

Diversos processos celulares estão envolvidos na tolerância à dessecação, dos quais os que têm sido mais estudados são: o acúmulo de dissacarídeos e oligossacarídeos (BAILLY et al., 2001), síntese de proteínas de reserva, síntese das proteínas LEA's e HSPs, (WEHMEYER; VIERLING, 2000; WISE; TUNNACLIFFE, 2004) ativação do sistema antioxidante (BAILLY, 2004) e mudanças na estrutura física da célula (HOEKSTRA et al., 1997). A interação entre esses processos, aliada ao conhecimento da espécie de interesse

podem elucidar a busca na reindução da tolerância à dessecação em sementes osmocondicionadas.

Uma vez condicionada osmoticamente a semente tem uma perda na tolerância à dessecação o que passa a ser um empecilho no armazenamento da mesma, uma vez que, o alto conteúdo de água é prejudicial à longevidade das sementes. Todavia a retirada desse conteúdo em sementes não tolerantes causa danos à estrutura da membrana, fazendo com que a semente perca sua integridade e semi-permeabilidade, deixando-a disfuncional, conseqüentemente, provocando vazamento do conteúdo citoplasmático. Além disso, a composição da membrana passa a ter um aumento de ácidos graxos livres em relação aos fosfolipídeos (FARNSWORTH, 2000).

Algumas estratégias vêm sendo utilizadas para obtenção da reindução da tolerância à dessecação por meio da secagem lenta e rápida (LIN et al., 2005), déficit hídrico, baixas e altas temperaturas (SABEHAT; LURIE; WEISS, 1998) e aplicação exógena de ABA.

A manutenção da viabilidade em escassez de água torna este fenômeno natural como um dos mais importantes e interessantes a serem estudados, pois através do entendimento dos mecanismos (peças do quebra-cabeça) e do sinergismo entre eles obter-se-ão resultados.

### **Proteínas Termorresistentes**

Nas sementes que possuem tolerância à dessecação a ação de grupos de proteínas, que estão envolvidas na manutenção da hidratação e conservação das estruturas celulares, é essencial para manter a viabilidade das sementes.

Os dois principais grupos de proteínas relacionados à tolerância à dessecação são as: Late Embryogenesis Abundant (LEAs) e Heat Shock Proteins

(HSPs) que estão presentes naturalmente no processo de maturação das sementes (OLIVER; TUBA; MISHLER, 2000).

As LEAs são proteínas hidrofílicas que apresentam aumento da sua concentração na fase de maturação da semente concomitante ao processo de tolerância à dessecação. Existem sete grupos de LEAs com propriedades características divididas de acordo com a sequência de aminoácidos que formam a proteína e as propriedades físico-químicas que elas possuem. Dessas, as LEAs proteínas do grupo 1, preferencialmente, acumulam-se durante o desenvolvimento do embrião em sementes secas (VICENT; GRUBER; DELSENY, 2001). Outros fatores que podem induzir a síntese destas proteínas são alta osmolaridade, altas temperaturas e condições hiper-oxidantes (STACY; AALEN, 1998). Além disso, vários dos genes que comandam a síntese deste grupo de proteínas são responsivos ao ácido abscísico (ABA) e déficit hídrico (VICENT et al., 2000).

O outro grupo de proteínas que está relacionado à tolerância à dessecação são as HSPs presentes em diversos organismos (mamíferos, protozoários, plantas, etc.), mas nos vegetais apenas um grupo as possui, são as chamadas small Heat Shock Proteínas (smHSPs). Estas por sua vez, são as proteínas HSPs com peso entre 17 a 30 kDa e possuem seis classes, sendo elas: as codificadas no citosol (classe I e II), no cloroplasto, no retículo endoplasmático, na mitocôndria e uma sexta classe presente com único cDNA em plantas de soja (DEROCHER; VIERLING, 1994).

As smHSPs agem como proteínas chaperonas prevenindo a termo agregação providenciando uma superfície de ligação para os substratos desnaturados, prevenindo o aumento da concentração destas moléculas e impedindo assim a agregação entre elas. Além disso, durante estresse provocado

por elevadas temperaturas estas proteínas recuperam outras proteínas protegendo-as de uma desnaturação irreversível (WAHID et al., 2007).

Em virtude disso, a confirmação da presença e a identificação das proteínas termorresistentes são importantes para sementes no processo de tolerância à dessecação.

### **Sistema antioxidante**

A redução do conteúdo de água nas sementes é um fator de estresse para estes organismos e aumenta a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) causando danos em organelas que podem afetar a viabilidade da semente (KRANNER; BIRTIC, 2005).

Os EROs são subprodutos do metabolismo aeróbico e podem causar danos a célula. Estes compostos podem ser radicais livres (radical superóxido –  $O_2^-$ , radical hidroxila –  $OH^-$ , radical peridroxil -  $HO_2^-$  e radical alcóxi –  $RO^-$ ) e não-radicais (peróxido de hidrogênio –  $H_2O_2$  e oxigênio singlete -  $^1O_2$ ) que em desequilíbrio com a ação do sistema antioxidante causam danos as proteínas, lipídeos, carboidratos, ácido nucléico e DNA levando a peroxidação lipídica, consequentemente, morte celular (GILL; TUTEJA, 2010).

A ação do sistema antioxidante em sementes secas é essencial na manutenção da viabilidade devido à limpeza dos EROs que evitam danos a estrutura celular em função da retirada da água. Através de enzimas (sistema antioxidante enzimático) e de moléculas de baixo peso molecular (sistema antioxidante não-enzimático) as sementes tolerantes à dessecação são viáveis, mesmo com conteúdo de água reduzido (BAILLY, 2004).

O sistema antioxidante enzimático pode ter sua ação reduzida em sementes secas devido à menor atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Peroxidase do Ascorbato (APX) (REUZEAU;

CAVALIE, 1995; CHEN; ARORA, 2011), enquanto o sistema antioxidante não-enzimático teria um papel fundamental devido à ação da Glutathione (GSH) que é convertido a Glutathione dissulfeto (GSSG) e logo é removido da célula restabelecendo o potencial redox intracelular (KRANNER; BIRTIC, 2005).

Nas sementes com conteúdo de água reduzido observa-se menor concentração de peróxido de hidrogênio e formação de MDA, no entanto quando armazenadas estas concentrações aumentam e as sementes sofrem severa peroxidação lipídica conferindo perda da viabilidade (KIBINZA et al., 2006).

A peroxidação lipídica causa danos às sementes através da retirada de um átomo de hidrogênio da cadeia poli-insaturada de ácidos graxos culminando na desestruturação da membrana anulando sua funcionalidade (GILL; TUTEJA, 2010). Enquanto o peróxido de hidrogênio é um composto moderadamente ativo, com uma longa meia vida e em elevadas concentrações pode causar o estresse oxidativo e a inativação de enzimas, mas podem ser utilizados como tratamento contra estresse (BHATTACHARJEE, 2005; WAHID et al., 2007). Em virtude disso, o conhecimento da ação do sistema antioxidante no processo de tolerância à dessecação das sementes traz benefícios nos métodos de secagem das sementes osmocondicionadas para posterior armazenamento.

### **Tolerância Cruzada**

Nas sementes as mudanças fisiológicas que ocorrem devido a condições extremamente desfavoráveis que não, necessariamente, representam risco de morte, mas induzirão a uma resposta de alarme são consideradas como estresse.

O estresse age como um fator positivo quando ativam as redes de mecanismos fisiológicos e metabólicos para a defesa, através de moléculas conhecidas como “conectores”. Em sementes estes conectores podem ser

espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e hormônios vegetais (ORACZ et al., 2009).

Segundo Genoud e Métraux (1999) tolerância cruzada é a resistência de uma semente a um tipo de estresse que resulta na aquisição de resistência da mesma semente a outro tipo de estresse. Nesse caso, o estresse inicial deixaria a semente em estado de “alerta” preparando-a para as condições adversas, porém sem causar a exaustão e/ou danos irreversíveis a semente. A retirada do estresse e a imposição a outro estresse podem levar a resistência ao estresse aplicado posteriormente, já que, a semente em estado de “alerta” passará ao estado de “resistência” (KRANNER et al., 2010).

As sementes com conteúdo de água de 7% percebem os sinais ambientais da mesma forma que as sementes dormentes, neste caso os estímulos são os mesmo para a quebra de dormência fazendo com que sementes secas possuam vias de sinalização operantes (FINCH-SAVAGE et al., 2007).

Nas sementes tolerantes à dessecação, a retirada da água é o primeiro estresse severo no qual as mesmas têm que passar, no entanto, a secagem no estágio de maturação da semente é caracterizada como um “eustress” resultando em sementes quiescentes que podem sobreviver em condições adversas. Desde que a tolerância à dessecação é perdida, a semente torna-se vulnerável a dessecação e a baixas temperaturas que podem causar “distress” (GUSTA; GAO; BENNING, 2006).

Diante disso, a tentativa de se induzir um estresse menos severo na semente para que a mesma atinja o estado de “alerta”, e com isso tenha uma maior rapidez em ativar os mecanismos de defesa, pode ser uma alternativa contra à dessecação em sementes que foram condicionadas osmoticamente.

### **3 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

A tolerância cruzada pode ser usada em sementes osmocondicionadas com intuito de manter a viabilidade após secagem. Os mecanismos e conectores que agem neste processo podem esclarecer como é o modo de ação do condicionamento osmótico nas sementes.

## REFERÊNCIAS

ANGELOVICI, R. et al. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 211-218, 2010.

ARIN, L. et al. Effects of different osmotic solutions on onion seed emergence. **African Journal of Agricultural Research**, South African, v. 6, n. 4, p. 986-991, Feb. 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS. **Dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil**. Disponível em: <<http://www.abcsem.com.br/dadosdosegmento.php>>. Acesso em: 18 set. 2010.

BAILLY, C. et al. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 357, p.701-708, Apr. 2001.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, Wallingford, n. 14, p. 93-107, 2004.

BHATTACHARJEE, S. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. **Current Science**, Columbus, v. 89, n. 7, p. 1113-1121, Oct. 2005.

BIRUEL, R. P. et al. Efeitos do condicionamento seguido ou não de secagem em sementes de *Pterogyne nitens* TUL. sob estresse. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 2, p. 119-128, jun. 2007.



BRUGGINK, G. T.; OOMS, J. J. J.; VAN DER TOORN, P. Induction of longevity in primed seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 1, p.49-53, 1999.

BUITINK, J. et al. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 13, p. 273-286, 2003.

CHEN, K.; ARORA, R. Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). **Plant Science**, Limerick, v. 180, p. 212-220, 2011.

COSTA, C. J.; VILLELA, F. A. Condicionamento osmótico de sementes de beterraba. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 21-29, 2006.

DEROCHER, A. E.; VIERLING, E. Developmental control of small heat shock protein expression during pea seed maturation. **The Plant Journal**, Oxford, v. 1, n. 5, p. 93-102, 1994.

FARNSWORTH, E. The ecology and physiology of viviparous and recalcitrant seeds. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Northampton, v. 31, p.107-138, 2000.

FAROOQ, M. et al. Comparative efficacy of surface drying and re-drying seed priming in rice: changes in emergence, seedling growth and associated metabolic events. **Paddy Water Environ**, Faisalabad, n. 8, p. 15-22, 2010.

FESSEL, S. A. Germinação de sementes de alface submetidas a condicionamento osmótico durante o armazenamento. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 1, n. 59, p. 73-77, mar. 2002.

FINCH-SAVAGE, W. E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, Cambridge, n. 171, p. 501-523, 2006.

FINCH-SAVAGE, W. E. et al. Seed dormancy release in *Arabidopsis Cvi* by dry after-ripening, low temperature, nitrate and light shows common quantitative patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing. **The Plant Journal**, Wageningen, v. 51, p. 60-78, 2007.

GENOUD, T.; MÉTRAUX, J. Crosstalk in plant cell signaling: structure and function of the genetic network. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 4, n. 12, p. 503-507, 1999.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Nova Delhi, v. 48, p. 909-930, 2010.

GUSTA, L. V.; GAO, Y.; BENNING, N. T. Freezing and desiccation tolerance of imbibed canola seed. **Physiologia Plantarum**, Saskatchewan, v. 127, p. 237-246, 2006.

HANEGAVE, A. S. et al. Effect of seed priming on seed quality of maize (*Zea mays* L.). **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, Copenhagen, v. 2, n. 24, p. 237-238, 2011.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; GULLIVER, R. L. Accelerated germination by osmotic seed treatment. **Nature**, London, v. 246, p. 42-44, Nov. 1973.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; YVONNE J. Turner: invigoration of seeds? **Seed science and technology**, Zurich, v. 3, p. 881-888, 1975.

HOEKSTRA, F. A. et al. Membrane stabilization in the dry state. **Comparative Biochemistry Physiology**, New York, v. 117, n. 3, p. 335-341, 1997.

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, set. 2001.

JAHANGIR, M. M. et al. Lettuce achene invigoration through osmopriming at supra optimal temperature. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, Faisalabad, v. 1, n. 46, p.1-6, 2009.

JANMOHAMMADI, M.; DEZFULI, P. M.; SHARIFZADEH, F. Seed invigoration techniques to improve germination and early growth of inbred line of maize under salinity and drought stress. **General and Applied Plant Physiology**, Karaj, v. 4, n. 34, p. 215-226, 2008.

KIBINZA, S. et al. Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 128, p. 496-506, 2006.

KRANNER, I.; BIRTIC, S. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. **Integrative and Comparative Biology**, Mclean, v. 45, p. 734-740, 2005.

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, Cambridge, v. 188, p. 673, 2010.

LEPRINCE, O.; BUITINK, J. Desiccation tolerance: from genomics to the field. **Plant Science**, Limerick, v. 179, p. 554-564, 2010.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, p. 231-264, 1993.

LIN, R. H. et al. Slow post-hydration drying improves initial quality but reduces longevity of primed bitter melon seeds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 114-124, Aug. 2005.

LINKIES, A. et al. The evolution of seeds. **New Phytologist**, Cambridge, v. 186, p. 817-831, June 2010.

MOHAMMADI, G. R.; AMIRI, F. The effect of priming on seed performance of canola (*Brassica napus* L.) under drought stress. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, Kermanshah, v. 2, n. 9, p. 202-207, 2010.

MORADI, A.; YOUNESI, O. Effects of osmo- and hydro-priming on seed parameters of grain sorghum (*Sorghum bicolor* L.). **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, Sidney, v. 3, n. 3, p.1696-1700, 2009.

NASCIMENTO, W. M.; WEST, S. H. Priming and seed orientation affect seed coat adherence and seedling development of muskmelon transplants. **HortScience**, Alexandria, v. 33, p. 847-848, 1998.

NASCIMENTO, W. M.; ARAGÃO, F. A. S. Muskmelon seed priming in relation to seed vigor. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 1, p.114-117, Feb. 2004.

OLIVER, M. J.; TUBA, Z.; MISHLER, B. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 151, p. 85-100, 2000.

ORACZ, K. et al. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. **Plant Physiology**, Washington, v. 150, p. 494-505, May 2009.

POWELL, A. A. et al. The influence of aereated hydration seed treatment on seed longevity as assessed by the viability equations. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 353, p. 2031-2043, Dec. 2000.

REUZEAU, C.; CAVALIE, G. Activities of free radical processing enzymes in dry sunflower seeds. **New Phytologist**, Cambridge, v. 130, p. 59-66, 1995.

ROUHI, H. R. et al. Study of different priming treatments on germination traits of soybean seed lots. **Notulae Scientia Biologicae**, Hamedan, v. 1, n. 3, p. 101-108, 2011.

SANTOS, M. C. A. et al. Condicionamento osmótico de sementes. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 1, n. 2, p.1-6, jun. 2008.

STACY, R. A. P.; AALEN, R. B. Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of Group 1 late-embryogenesis-abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of *Bacillus subtilis*. **Planta**, Berlin, v. 206, n. 3, p. 476-478, 1998.

VARIER, A.; VARI, A. K.; DADLANI, M. The subcellular basis of seed priming. **Current Science**, Columbus, v. 99, n. 4, p. 450-456, 2010.

VICENT, C. M. et al. Differential expression of the Arabidopsis genes coding for EM-like proteins. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 348, p. 1211-1220, July 2000.

VICENT, C. M.; GRUBER, V.; DELSENY, M. The arabidopsis AtEm1 promoter is active in *Brassica napus* L. and is temporally and spatially regulated. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 360, p.1587-1591, July 2001.

WAHID, A. et al. Heat tolerance in plants: an overview. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, n. 61, p. 199-223, 2007a.

WAHID, A. et al. Pretreatment of seed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 164, p. 283-294, 2007b.

WEHMEYER, N.; VIERLING, E. The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. **Plant Physiology**, Washington, v. 122, p.1099-1108, Apr. 2000.

WISE, M. J.; TUNNACLIFFE, A. POPP the question: what do LEA proteins do? **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 9, n. 1, p. 13-17, Jan. 2004

**CAPÍTULO 2 Tolerância cruzada em sementes osmocondicionadas de  
*Cucumis melon* L.**

## RESUMO

Neste trabalho, constituído de dois ensaios, foram estudados os efeitos da secagem lenta e rápida associada ao estresse térmico (frio e calor), hídrico e aplicação exógena de ABA em sementes osmocondicionadas de melão (*Cucumis melon* L cv. Hales Best Jumbo). No primeiro ensaio as sementes de melão foram osmocondicionadas em solução de  $\text{KNO}_3$  (0,35 M), potencial de -1,7 MPa, temperatura à 25°C, no escuro, com aeração constante por um período de seis dias. Após esse período, as sementes foram submetidas aos tratamentos sem secagem, secagem lenta, secagem rápida, choque de frio + secagem lenta, choque de frio + secagem rápida, choque de calor + secagem lenta, choque de calor + secagem rápida, PEG + secagem lenta, PEG + secagem rápida, ABA + secagem lenta e ABA + secagem rápida. Para controle utilizamos as sementes não osmocondicionadas. Os efeitos dos tratamentos sobre porcentagem de germinação e plântulas, IVG, IVE, atividade do sistema antioxidante (SOD, CAT e APX), concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e concentração de proteínas termorresistentes foram avaliados. Também foi avaliada a viabilidade das sementes através do teste de envelhecimento acelerado. O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), com três repetições para cada tratamento. As análises estatísticas utilizadas foram teste de Scott-Knott, Correlação de Pearson e Análise de Componentes Principais através do R. As sementes de melão sem secagem e ABA + secagem lenta tiveram redução na porcentagem de germinação quando comparados ao controle. Enquanto as sementes do estresse térmico e secagem mantiveram sua viabilidade. Atividade da catalase foi reduzida e a concentração das proteínas termorresistentes foi maior nestas sementes. Foi verificado que ação do estresse em conjunto com secagem é benéfica para sementes de melão osmocondicionadas e secas posteriormente.

Palavras-chave: Osmocondicionamento. Choque de frio. Choque de Calor. Proteínas Termorresistentes.



## ABSTRACT

Were evaluated effects of slow and fast drying associated with thermal stress (cold and heat), water and exogenous application of ABA in primed seeds of melon (*Cucumis melon* L cv. Hales Best Jumbo) The study consisted of two experiments. In the first melon seeds were primed in a solution of KNO<sub>3</sub> (0.35 M), potential of -1.7 MPa, temperature 25 ° C in the dark, with constant aeration for a period of six days. After the seeds were treated without drying, slow drying, fast drying, cold shock + slow drying, cold shock + fast drying, heat shock + slow drying, heat shock + fast drying, slow drying PEG +, PEG + fast drying, slow drying and ABA + ABA + fast drying. To use the control unprimed seeds. The effects of treatments on germination and seedling, IVG, IVE, activity of the antioxidant system (SOD, CAT and APX), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and concentration of heat-resistant proteins were evaluated. We also evaluated the viability of the seeds through the accelerated aging test. The completely randomized design (CRD) with three replicates for each treatment. The statistical analyzes were Scott-Knott test, Pearson Correlation and Principal Component Analysis by R. Melon seeds without drying and slow drying + ABA had a reduction in germination percentage when compared with control. While the seeds of heat stress and drying retained their viability. Catalase activity was reduced and the heat-resistant protein concentration was higher in these seeds. It was found that the action of a stress in conjunction with drying is beneficial to melon seeds primed and dried subsequently.

Keywords: priming. Cold shock. Heat Shock. Heat-resistant proteins.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil está se consolidando como uma das economias emergentes no mundo. Em 2010, cerca de 20% do Produto Interno Bruto Brasileiro (PIB), ou seja, aproximadamente oitocentos e setenta e oito bilhões de reais foram provenientes do agronegócio (IBGE, 2011).

A fruticultura com produção de 43, 164 milhões de toneladas e área plantada de 2, 179 milhões de hectares é a terceira maior do mundo (IBGE, 2011), este importante setor no contexto da agricultura nacional exportou 759, 420 toneladas faturando US\$ 609, 612 milhões. Deste total o melão foi o primeiro em exportações com 177.828 toneladas com o faturamento de US\$ 121, 669 milhões (BELING, 2011).

O melão (*Cucumis melon* L.) é uma oleícola da família das Cucurbitaceae bastante consumida no país e como visto, no mundo. Esta espécie é muito suscetível a fatores ambientais como temperatura e umidade do ar, sendo que, seu crescimento e desenvolvimento são prejudicados em temperaturas abaixo de 13°C e acima de 40°C sendo, portanto, a faixa de temperatura de 25-32°C e a umidade do ar entre 60 e 70% como ideais para seu crescimento e desenvolvimento (GOTO; TIVELLI, 1998).

Existem algumas exigências em relação às questões climáticas e edáficas no cultivo do melão, por isso é importante muitas vezes, submeter as sementes a algum pré-tratamento, pois estas são as geradoras das próximas plantas.

Os efeitos benéficos de técnicas em sementes de melão em relação à melhora na germinação, emergência de plântulas, velocidade de germinação e formação de plântulas, maior viabilidade em condições adversas (elevadas e baixas temperaturas, déficit hídrico, salinidade, entre outros) são conhecidos. Dentre estas técnicas o condicionamento osmótico já é bastante utilizado em sementes de melão e os benefícios são atestados por diversos experimentos. Todavia, o efeito negativo do condicionamento osmótico na redução da capacidade de armazenamento das sementes de melão ainda suscita muitas dúvidas e a necessidade de mais estudos (NASCIMENTO, 2002).

Nascimento e West (2000) utilizaram da secagem e observaram que a temperatura e a duração afetaram o vigor da semente durante o armazenamento. Esses mesmos autores sugeriram melhor entendimento dos efeitos da secagem em sementes de melão osmoticamente condicionadas, principalmente se os objetivos forem obter os benefícios do condicionamento osmótico e manter a qualidade das sementes, especialmente se estas forem preparadas para ser armazenadas.

Em sementes condicionadas osmoticamente a perda da tolerância à dessecação parece ser a principal causa na redução da longevidade. Por isso estudar os mecanismos da tolerância pode ser a chave para solução deste problema.

Em virtude disso, a aplicação da tolerância cruzada na tentativa de obter melhorias na viabilidade em sementes de melão osmocondicionadas e seca é o objetivo deste trabalho.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Locais de realização dos experimentos**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas - LCDP do Departamento de Biologia, setor de Fisiologia Vegetal-SFV e no Laboratório de Análise de Sementes – LAS, Departamento de Agricultura, ambos da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras.

### **2.2 Material utilizado**

Foram utilizadas sementes de melão (*Cucumis melon* L cv. Hales Best Jumbo) produzidas pela FELTRIN Ltda.

### **2.3 Condicionamento osmótico**

As sementes de melão foram condicionadas em solução de  $\text{KNO}_3$ , concentração de 0,35 M, e potencial de -1,7 MPa, temperatura à 25°C, no escuro, com aeração constante por seis dias (NASCIMENTO, 2004; NASCIMENTO, 2005).

## **2.4 Secagem das sementes osmoticamente condicionadas**

Após a retirada das sementes do condicionamento osmótico procedeu-se a lavagem em água corrente, para remoção da substância osmocondicionante e secagem superficial, em folha de papel toalha. Na sequência foram aplicados, aos respectivos tratamentos, secagem rápida, lenta e osmocondicionadas sem secar. O controle foi feito com as sementes secas sem condicionar. Foram utilizadas 21 g de sementes por tratamento, dessas foram retiradas quatro repetições de 50 sementes para variáveis fisiológicas e teste de envelhecimento acelerado, três repetições de 1 g para teste de umidade, três repetições de 0,2 g para cada atividade do sistema antioxidante e 0,1 g para análise das proteínas termorresistentes.

A secagem rápida foi efetuada em cinco caixas de polietileno tipo gerbox, espalhadas dentro de uma estufa de circulação de ar forçada, a 32°C por duas horas até atingir o conteúdo de água inicial (0,05 - 0,07 gH<sub>2</sub>O/g MS).

A secagem lenta foi realizada em uma bandeja plástica (27x35 cm), onde as sementes foram colocadas sobre papel toalha e acondicionadas em uma sala com temperatura de 25°C e umidade relativa de 50% por 24 horas até atingir o conteúdo de água inicial (0,05 - 0,07 gH<sub>2</sub>O/g MS).

O conteúdo de água inicial das sementes foi obtido através da metodologia prescrita nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), pelo método da secagem em estufa a 105±3°C, durante 24 horas, utilizando-se três repetições de 1 grama.

## **2.5 Choque Térmico**

Ao serem retiradas do condicionamento, as sementes passaram por lavagem e secagem em papel toalha, sendo em seguida, colocadas em caixas tipo

gerbox dentro de uma câmara de germinação tipo BOD onde foram submetidas às temperaturas de 1°C (Choque de frio) e 45°C (Choque de calor), ambas por duas horas.

## **2.6 Manutenção do osmocondicionamento**

Após seis dias, as sementes de melão foram transferidas para outra solução com Polietileno glicol, peso molecular 6000 (PEG6000), concentração de 60 mM e potencial osmótico de -1,7 MPa mantidos sob aeração em uma câmara de germinação tipo BOD no escuro a 5°C por três dias (BUITINK et al., 2003, FARIA et al., 2005).

## **2.7 ABA**

Uma solução de ABA + PEG com o potencial osmótico de -1,7 MPa foi utilizada para a submersão das sementes. Para tanto, foi utilizada uma solução estoque de ABA de 100 µM diluída em etanol 0,1% para gerar a solução de ABA na concentração de 10 µM. As sementes que constituíram o tratamento foram incubadas em condição de escuro, a 5°C e aeradas por três dias (VIEIRA, 2008).

## **2.8 Atividade do sistema antioxidante**

As sementes coletadas para extração enzimática foram lavadas em água corrente para completar a remoção das substâncias osmocondicionantes e, em seguida, uma amostra de 0,2 g por repetição foi submersa em nitrogênio líquido e acondicionada em crio tubos. Posteriormente, as sementes foram armazenadas a -80°C até as análises.

O extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 0,2g de sementes, às quais foram adicionados 1,5 mL do tampão de extração contendo: 1,47 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), 15 µL de EDTA 0,1 M (pH 7,0), ácido ascórbico 0,001 M e 12 mg de PVPP. O extrato foi centrifugado a 12000 g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C durante o período das análises. Os sobrenadantes coletados foram utilizados nas análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (BIEMELT et al., 1998).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), conforme proposto por Giannopolitis e Ries (1977), com modificações. Foram adicionados 10 µL do extrato enzimático a 190 µL do meio de incubação composto por: tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 µM, NBT 75 µM e riboflavina 2 µM. A placa de acrílico UV, contendo o meio de incubação mais a amostra, foi iluminada com lâmpada fluorescente de 20 W por 10 minutos. Para o controle, foi utilizado o mesmo meio de reação sem a amostra, que foi mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm em espectrofotômetro de ELISA e o cálculo da enzima foi feito com a seguinte equação: % de inibição =  $(A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$ . Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

A atividade da enzima CAT foi avaliada segundo Havir e McHale (1987), em que uma alíquota de 10 µL do extrato enzimático foi adicionada a 190 µL do meio de incubação contendo 100 µL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e 10 µL de peróxido de hidrogênio 12,5 mM e 80 µL de água destilada incubado a 28°C. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na

absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio através do espectrofotômetro de ELISA. O coeficiente de extinção molar utilizado foi  $36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  corrigido para  $18 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  uma vez que os poços da placa UV possuem 0,5 cm de comprimento.

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos monitorados através do espectrofotômetro de ELISA. Uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foi adicionada a 190  $\mu\text{L}$  de tampão de incubação composto por 100  $\mu\text{L}$  de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 10  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 10 mM, 10  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 2 mM e 70  $\mu\text{L}$  de água destilada (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi  $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  corrigido para  $1,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  uma vez que os poços da placa UV possuem 0,5 cm de comprimento.

A concentração do Peróxido de Hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi determinada através da metodologia descrita por Sinha et al. (2005). Foram maceradas 200 mg de sementes em nitrogênio líquido, acrescido de 20% de PVPP, homogeneizados em 5 mL de TCA 0,1% e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C. Após esse período, foi retirada uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  do extrato, 40  $\mu\text{L}$  de TCA 0,1%, 50  $\mu\text{L}$  de tampão de fosfato de potássio (pH 7,0) 100 mM e 100  $\mu\text{L}$  de iodeto de potássio 1 M. As leituras foram feitas em placas no espectrofotômetro de ELISA a 390 nm. O conteúdo de Peróxido ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi calculado comparando as leituras com as obtidas através de uma curva padrão de Peróxido de Hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

A Peroxidação lipídica determinada pela quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como descrito por Buege e Aust (1978). Foram maceradas 200 mg de sementes em nitrogênio líquido mais 20% de PVPP (polivinilpolipirrolidone) e homogeneizadas em ácido tricloroacético



(TCA) 0,1% (w / v). O homogeneizado foi então centrifugado a 10.000 g por 10 minutos. Dez microlitros do sobrenadante foram adicionados a 190  $\mu$ L do meio de reação (0,5% (w / v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (w / v) de TCA, incubados a 95 ° C por 30 minutos. A reação foi interrompida rapidamente por um resfriamento no gelo e a absorbância medida foi determinada em um espectrofotômetro de ELISA em 535 nm e 600 nm. A concentração do complexo MDA / TBARS foi calculada utilizando a extinção coeficiente de 1,55  $\text{mmol L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Assim como para a atividade da CAT e da APX o coeficiente de extinção molar foi corrigido para 77  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  uma vez que os poços da placa UV possuem 0,5 cm de comprimento.

A quantificação de proteínas nos extratos foi realizada de acordo com a metodologia de Bradford (1976) para a determinação da atividade específica das enzimas.

## **2.9 Proteínas Termorresistentes**

As sementes coletadas para quantificação das proteínas termorresistentes foram lavadas em água corrente para completa remoção das substâncias osmocondicionantes e, em seguida, uma amostra de 0,1 g por repetição foi mergulhada em nitrogênio líquido e acondicionada em crio tubos. Posteriormente, as sementes foram armazenadas a -80°C até o momento das análises.

Para a eletroforese, foram utilizadas duas repetições maceradas em cadinho adicionando-se tampão de extração (Tris Base 50 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M,  $\text{MgCl}_2$  0,005 M, Metil Sulfonil Fluoreto - PMSF 0,001 M,  $\text{H}_2\text{O}$  destilada e acrescentar  $\beta$  mercaptoetanol 0,1%), na proporção de 10 partes de tampão para 1 de amostra. Este tampão é descrito por Alfenas (1998).

As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi separado e incubado em banho-maria a 85°C por 15 minutos. Em seguida centrifugou-se novamente como descrito acima e coletou-se 70 µL do sobrenadante, os quais foram postos em microtubos de 2 mL com um furo na tampa, acrescentando-se 40 µL tampão da amostra (2,5 mL de glicerol, 0,46 g de SDS e 20 mg de azul de Bromofenol. O volume foi completado para 20 mL com tampão de extração) e, em seguida, transferidos para água fervente durante 5 minutos.

Em uma canaleta aplicou-se 10 µL da amostra em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi realizada a 150 v por 4 horas, como descrito por Alfenas (1998). A coloração dos géis foi feita utilizando-se solução de Coomassie Blue 0,05% por 12 horas e solução de ácido cítrico para descoloração.

## **2.10 Curva de Embebição**

A curva de embebição foi determinada através da pesagem inicial de três repetições de 50 sementes para cada espécie. Em seguida, as sementes foram embebidas em água destilada sob luz, na temperatura ideal para a germinação das espécies estudadas, sendo pesadas após 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24 E 48 horas de embebição. Antes de cada pesagem, as sementes foram secas com papel absorvente e posteriormente recolocadas em água destilada. Com os valores das percentagens consecutivas foi calculada a percentagem de ganho de água em relação ao peso inicial das sementes, a fim de se estabelecer a curva de embebição.

## **2.11 Teste de Germinação**

Os testes de germinação foram realizados conforme Brasil (2009), utilizando-se quatro repetições de 50 sementes colocadas em rolo de papel Germitest® umedecido com água destilada, equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco e mantido em câmara de germinação tipo BOD, a temperatura de 25°C. A contagem da germinação foi efetuada diariamente sendo adotada como critério a protrusão radicular, além da contagem de plântulas normais. Com os dados de germinação e formação de plântulas foram obtidos o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e o Índice de Velocidade de Emergência (IVE) através de Maguire (1962).

### **2.12 Envelhecimento Acelerado**

As sementes foram colocadas em uma tela metálica acoplada a uma caixa gerbox contendo 40 mL de água destilada ao fundo. As caixas tampadas foram conduzidas a incubadora BOD, permanecendo a temperatura de 41°C, por 72 horas (MUNIZ et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2008; TORRES et. al., 2009). Em seguida, foram obtidas as variáveis: porcentagem de germinação, porcentagem de plântulas, IVG e IVE. Ao término deste período, foi determinado o grau de umidade através da metodologia prescrita nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), pelo método da secagem em estufa a 105±3°C, durante 24 horas, utilizando-se três repetições de um grama cada e o teste de germinação seguindo a recomendação de Brasil (2009).

### 2.13 Delineamento experimental e Análise estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), com três repetições para cada tratamento. Os tratamentos aplicados foram de acordo com o fluxograma da figura 1.

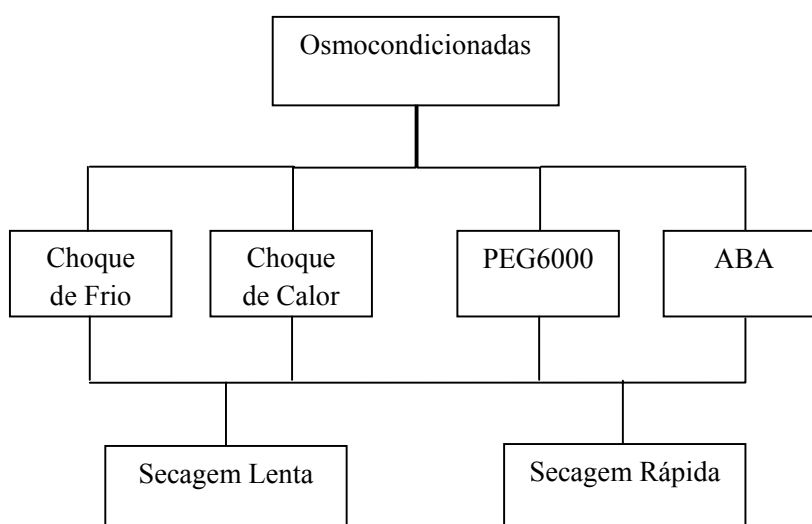
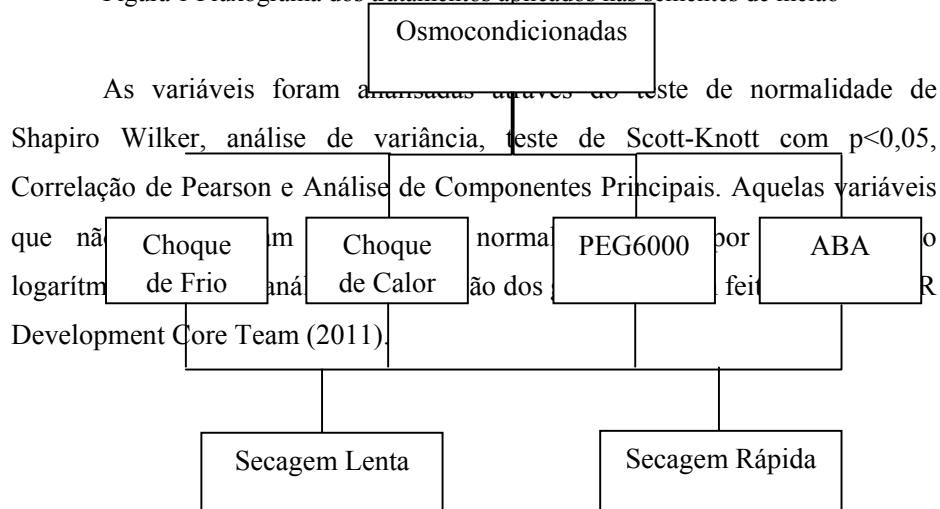


Figura 1 Fluxograma dos tratamentos aplicados nas sementes de melão



As variáveis foram analisadas através de teste de normalidade de Shapiro Wilker, análise de variância, teste de Scott-Knott com  $p < 0,05$ , Correlação de Pearson e Análise de Componentes Principais. Aquelas variáveis que não foram analisadas por teste de normalidade foram analisadas por teste de variância de Scott-Knott com  $p < 0,05$ . (Development Core Team (2011)).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva de embebição mostra aumento gradativo dos valores percentuais (Figura 2). A estabilização da curva ocorreu com 24 horas e a germinação se deu por volta das 30 horas.

Os valores da tabela 1 mostram que os tratamentos das sementes osmocondicionadas sem secagem e osmocondicionadas + ABA + secagem lenta tiveram redução na porcentagem de germinação quando comparado com o controle. Em relação à porcentagem de plântulas todos os tratamentos, com exceção das osmocondicionadas sem secagem e osmocondicionadas + ABA + secagem lenta obtiveram maiores valores em relação ao controle.

O Índice de Velocidade de Germinação (IVG) das sementes foi maior nos tratamentos das sementes osmocondicionadas + secagem lenta, osmocondicionadas + choque de frio + secagem lenta e osmocondicionadas + PEG + secagem rápida, enquanto os tratamentos sementes osmocondicionadas + ABA + secagem lenta e sementes osmocondicionadas + ABA + secagem rápida obtiveram os menores valores e os demais tratamentos não diferiram do controle.

A velocidade de formação das plântulas calculada pelo Índice de Velocidade de Emergência (IVE) foi maior nos tratamentos osmocondicionadas

+ secagem lenta, osmocondicionadas + choque de frio + secagem lenta, sementes osmocondicionadas + choque de frio + secagem rápida e osmocondicionadas + PEG + secagem rápida. Apenas as osmocondicionadas + ABA + secagem lenta apresentaram o menor valor de IVE em relação ao controle enquanto todos os outros tratamentos apresentaram valores maiores.

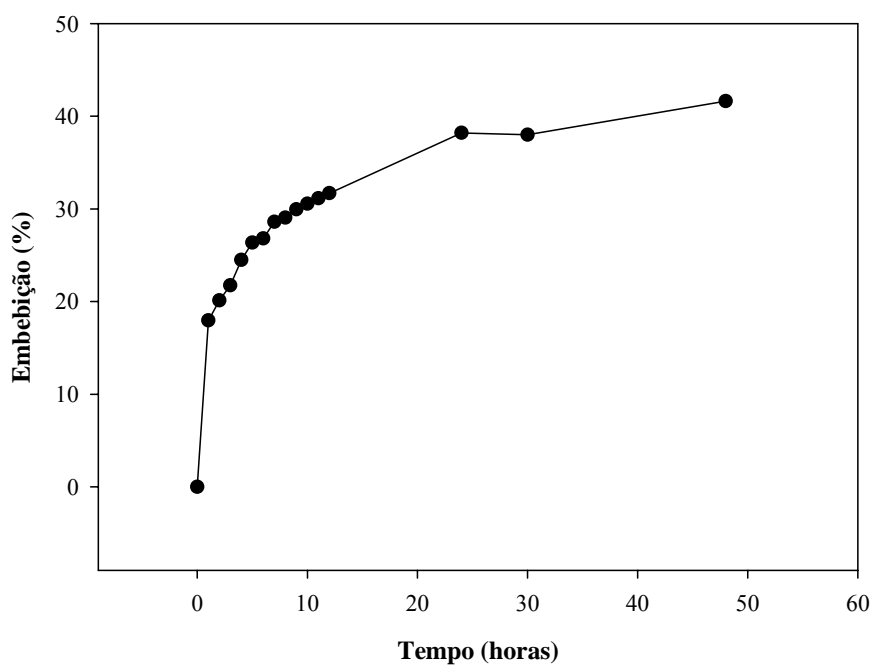


Figura 2 Curva de embebição de sementes de melão em condição ambiente

Tabela 1 Valores de Porcentagem de Germinação, Porcentagem de Plântulas, IVG e IVE para sementes de melão (*Cucumis melon* L.) – UFLA – 2012.

Tratamento	%Germinação	%Plântulas	IVG	IVE
PEG+S.Lenta	98,00a	98,00a	37,61b	7,23d
S. Lenta	96,00a	96,67a	44,80 <sup>a</sup>	10,37 <sup>a</sup>
PEG+S.Rápida	95,33a	95,33a	44,14 <sup>a</sup>	10,68 <sup>a</sup>
CF+S.Lenta	94,67a	93,33a	43,70 <sup>a</sup>	10,09 <sup>a</sup>
CF+S.Rápida	93,33a	93,33a	34,53c	10,03 <sup>a</sup>
CC+S.Lenta	92,67a	92,67a	37,19b	8,86c
S. Rápida	91,33a	92,00a	29,25c	8,13c
ABA+S.Rápida	91,33a	90,00a	15,47d	6,12e
CC+S.Rápida	91,33a	89,33a	31,16c	9,24b
Controle	90,67a	84,67b	26,00c	7,72f
ABA+S.Lenta	85,33b	79,33b	12,30d	3,35g
Osmocond.	80,67b	79,33b	9,88d	4,47e

As médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. IVG = Índice de Velocidade de Germinação e IVE = Índice de Velocidade de Emergência.

A redução na germinação das sementes de melão osmocondicionadas sem secagem é em função de o condicionamento osmótico promover mais benefícios em sementes com menor vigor, em relação às de maior vigor (BITTENCOURT et al., 2004). Nascimento e Aragão (2004) comprovaram que

em sementes de melão o condicionamento osmótico melhorou o desempenho das sementes de baixo vigor, dependendo da cultivar.

Nas sementes osmocondicionadas + ABA, este fitohormônio pode afetar as variáveis fisiológicas por exercer um efeito inibitório nos mecanismos iniciadores da germinação impedindo a expressão de genes relacionados à germinação (CATUSSE; JOB; JOB, 2008). Em sementes ortodoxas a tolerância à dessecação depende de diversos genes que são controlados pelo fitohormônio ácido abscísico (ABA), que estimula a biossíntese de proteínas de reserva e controla a expressão das LEA (Late Embryogenesis Abundant) (HIRAYAMA; SHINOZAKI, 2007).

Lin et al. (2005) observaram que a secagem rápida e lenta obtiveram melhores resultados na porcentagem de plântulas em relação ao controle. Estes mesmos autores verificaram que a secagem lenta é mais eficiente do que a secagem rápida em relação à uniformidade da emergência das plântulas, assim como se constatou neste experimento. No entanto, os autores atribuíram estes benefícios a redução da Peroxidação e aumento na atividade do sistema antioxidante, porém a redução gradativa do conteúdo de água pode funcionar como um fator de aclimação ativando, principalmente, as proteínas termorresistentes.

O trabalho de Buitink et al. (2003) constatou que a aplicação de um estresse hídrico e choque de frio mantiveram a viabilidade das sementes e recuperaram até 98% da tolerância à dessecação das sementes secas. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos com as sementes osmocondicionadas + PEG + secagem rápida, osmocondicionadas + choque de frio + secagem lenta e secagem rápida. Segundo os autores a ação do estresse nestas condições desencadearia a expressão de genes como o *PsDHN3* homólogo do *MtDHN* responsivos a tolerância à dessecação. Todavia a



transdução do sinal ocasionado pelo estresse que pode ser captada e dar origem a síntese de uma molécula conectora estruturando o sistema de defesa da semente (GENOUD; MÉTRAUX, 1999) pode ser o mecanismo que atue nas sementes acima citadas.

Ao serem submetidas ao teste de envelhecimento acelerado (EA), as sementes que obtiveram as maiores porcentagem de germinação foram: osmocondicionadas + secagem rápida, osmocondicionadas + choque de frio + secagem lenta, osmocondicionadas + choque de frio + secagem rápida, osmocondicionadas + PEG + secagem rápida e o controle. Enquanto os tratamentos osmocondicionadas + ABA + secagem lenta e osmocondicionadas + ABA + secagem rápida obtiveram os menores valores.

A porcentagem de plântulas no EA foi maior nos tratamentos controle: osmocondicionadas, osmocondicionadas + secagem rápida, osmocondicionadas + choque de frio + secagem lenta, osmocondicionadas + choque de frio + secagem rápida, osmocondicionadas + choque de calor + secagem rápida e osmocondicionadas + PEG + secagem rápida. Já os menores foram, respectivamente, osmocondicionadas + ABA + secagem lenta, osmocondicionadas + ABA + secagem rápida e osmocondicionadas + secagem lenta. Para o IVG apenas os tratamentos: osmocondicionadas + secagem lenta, osmocondicionadas + choque de calor + secagem lenta, osmocondicionadas + estresse hídrico + secagem lenta, osmocondicionadas + ABA + secagem lenta, osmocondicionadas + ABA + secagem rápida diferiram do controle, que obteve o maior valor de IVG.

Quanto ao IVE no envelhecimento acelerado as maiores velocidades na emergência das plântulas foram dos tratamentos: osmocondicionadas + secagem rápida, osmocondicionadas + choque de frio + secagem lenta e osmocondicionadas + choque de calor + secagem rápida. Nesta variável o

controle não apresentou o maior valor e não diferiram dos tratamentos: osmocondicionadas, osmocondicionadas + secagem lenta, osmocondicionadas + choque de frio + secagem lenta e osmocondicionadas + choque de calor + secagem lenta, enquanto osmocondicionadas + ABA + secagem lenta, osmocondicionadas + ABA + secagem rápida obtiveram os menores valores novamente (Tabela 2).

Tabela 2 Valores de Porcentagem de Germinação, Porcentagem de Plântulas, IVG e IVE para sementes de melão (*Cucumis melon* L.) submetidas ao Envelhecimento Acelerado – UFLA – 2012.

Tratamento	%Germinação_EA	%Plântulas_EA	IVG_EA	IVE_EA
Controle	98,00a	96,67a	47,03a	44,55b
CF+S.Lenta	97,33a	96,67a	47,38a	42,87b
CF+S.Rápida	96,67a	96,67a	48,33a	45,51a
S. Rápida	96,67a	95,33a	47,84a	46,89a
CC+S.Rápida	96,00a	96,67a	48,33a	47,5a
PEG+S.Rápida	95,33a	98,67a	47,66a	16,22c
PEG+S.Lenta	94,67b	93,33b	36,93c	14,81c
Osmocond.	94,00b	96,00a	47,28a	42,14b
CC+S.Lenta	94,00b	94,00b	45,59b	42,54b
S. Lenta	92,00b	90,00c	44,93b	43,40b
ABA+S.Rápida	84,66c	80,00d	14,73d	8,34d
ABA+S.Lenta	82,66c	79,33e	14,32d	7,64d

As médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. IVG\_EA = Índice de Velocidade de Germinação das sementes submetidas ao Envelhecimento Acelerado e IVE\_EA = Índice de Velocidade de Emergência das sementes submetidas ao Envelhecimento Acelerado.

Foi observado que as sementes osmocondicionadas + secagem rápida, osmocondicionadas + choque de frio + secagem lenta, osmocondicionadas +

choque de frio + secagem rápida, osmocondicionadas + choque de calor + secagem rápida e osmocondicionadas + PEG + secagem rápida foram os tratamentos mais vigorosos entre os testados, pois o teste de Envelhecimento Acelerado é uma excelente ferramenta para testar vigor de sementes de melão (MUNIZ et al., 2004) uma vez que as sementes de alto vigor manterão sua viabilidade em quanto as de baixo vigor terão sua viabilidade reduzida (TORRES et. al., 2009).

A manutenção da viabilidade é importante para sementes que são condicionadas e que precisam ser secas e armazenadas, uma vez que em condições de alta temperatura e umidade ocorre à aceleração da formação dos produtos de Amadori e Maillard, principal reação de deterioração em sementes secas e armazenadas (WETTLAUFER; LEOPOLD, 1991).

A secagem rápida pode prolongar o vigor das sementes secas (LIN et al., 2005), enquanto a exposição a baixas e elevadas temperaturas e ao estresse hídrico promovem a manutenção da viabilidade através da síntese de proteínas termorresistentes como LEA e HSP (SABEHAT; LURIE; WEISS, 1998; BATTAGLIA et al., 2008). As LEA proteínas previnem a agregação de outras proteínas durante a perda de água (CHAKRABORTEE et al., 2007), enquanto as HSP podem juntar proteínas desnaturadas e com isso estabilizar sua conformação (WU et al., 2011). Diante disso, a manutenção da viabilidade dos tratamentos osmocondicionadas + choque de frio + secagem lenta, osmocondicionadas + choque de frio + secagem rápida, osmocondicionadas + choque de calor + secagem rápida e osmocondicionadas + PEG + secagem rápida poderiam estar associadas ao aumento da concentração destas proteínas termorresistentes que ajudariam combatendo a reação de Amadori e Maillard.

A atividade da Superóxido Dismutase (SOD) foi maior nos tratamentos osmocondicionadas + ABA + secagem lenta, osmocondicionadas + ABA +

secagem rápida e osmocondicionadas sem secagem. Os demais tratamentos não diferiram entre si (Figura 3).

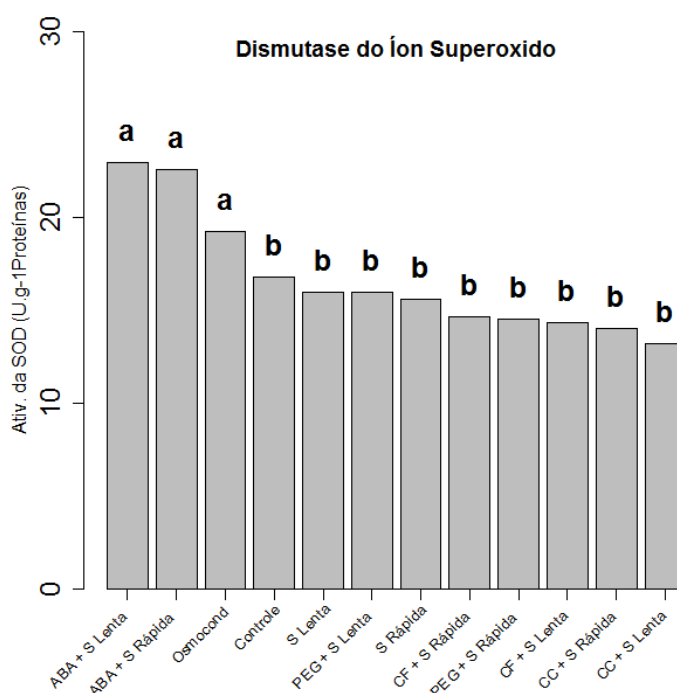


Figura 3 Atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) em função dos tratamentos aplicados em sementes de melão.

O aumento da atividade da SOD em sementes osmocondicionadas é constatado por Umair et al., (2012), que atribuem o reparo das membranas como responsável por evocar a atividade do sistema antioxidante enzimático.

Oracz et al. (2009), em seu trabalho, observaram na germinação de sementes dormentes uma inibição na atividade da SOD e Catalase. Os autores acreditam que a maior atividade do sistema antioxidante impede que os EROs

funcionem como sinalizadores no processo da germinação de sementes dormentes. Neste caso, a aplicação exógena de ABA pode ter favorecido a atividade da SOD nos tratamentos osmocondicionadas + ABA + secagem lenta, osmocondicionadas + ABA + secagem rápida e osmocondicionadas sem secagem impedindo o acúmulo de EROs prejudicando a germinação, devido a este hormônio ser sinalizador no processo de dormência (SEILER et al., 2011).

A redução da atividade da SOD em sementes secas também foi observado por Bailly et al. (2001) os quais alegaram que esta redução poderia culminar no acúmulo do anion superóxido causando danos ao sistema de membrana. Todavia, nas sementes dos tratamentos com secagem, aparentemente, não houve danos severos ao sistema de membranas.

A atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) não foi registrada em nenhum dos tratamentos. No entanto, houve atividade da enzima Catalase (CAT), sendo que, no controle, sementes osmocondicionadas + PEG + secagem lenta e sementes osmocondicionadas + PEG+ secagem rápida esta enzima mostrou maior atividade em relação aos demais tratamentos que não diferiram entre si (Figura 4).

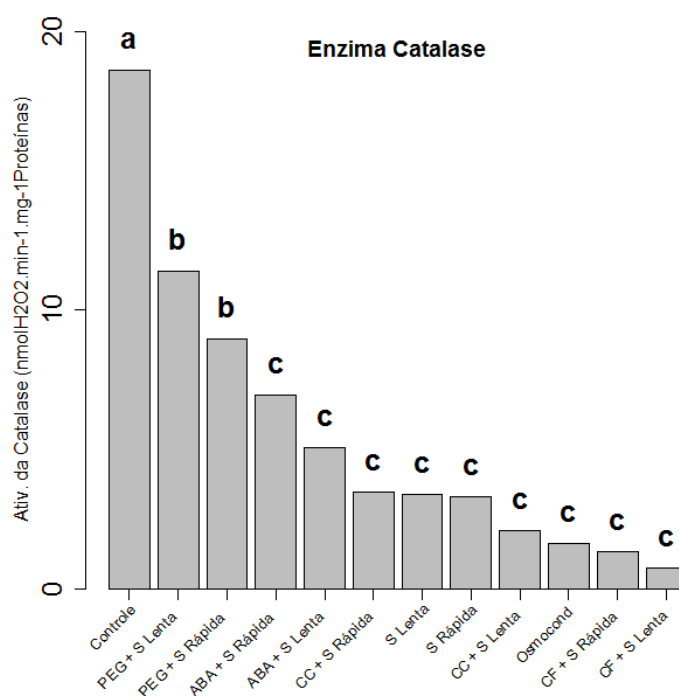


Figura 4 Atividade enzimática da Catalase (CAT) em função dos tratamentos aplicados em sementes de melão.

O fato da enzima APX não apresentar atividade em sementes secas é relatado também por Bailly et al. (2001), que justifica uma maior atividade da catalase para suprir a ausência da APX, já que, as duas agem dismutando o superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio.

Os autores Chen e Arora (2011) observaram que em sementes de espinafre que não passaram pelo osmocondicionamento não apresentaram atividade da APX, enquanto que sementes que passaram por secagem após o osmocondicionamento tiveram aumento de 100% na atividade da catalase.

Nos eventos que envolvem a perda de água da semente, assim como ocorrem nos tratamentos sementes osmocondicionadas + PEG + secagem lenta e sementes osmocondicionadas + PEG+ secagem rápida, ocorre o aumento da atividade da catalase devido a mudanças no padrão das isoformas da enzima (BAILLY et al., 2004).

O peróxido de hidrogênio não apresentou diferença na concentração entre os tratamentos testados (Figura 5).

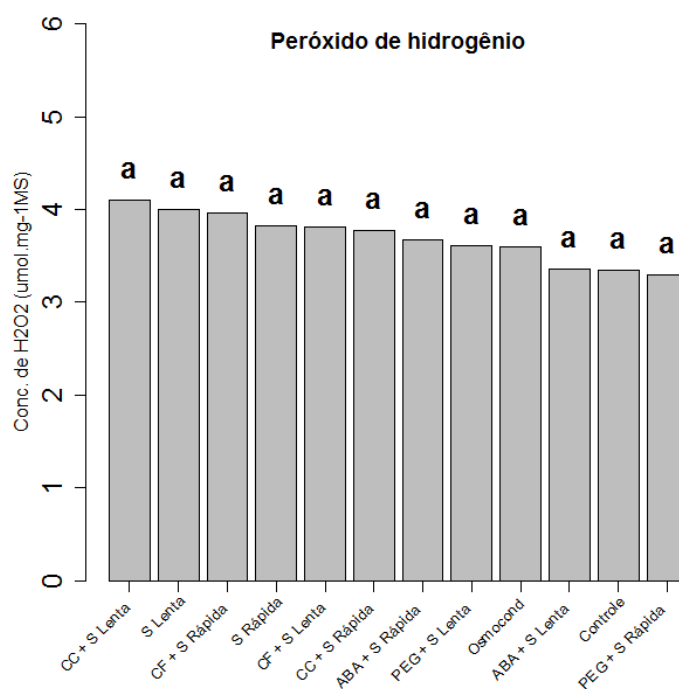


Figura 5 Concentração de Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em função dos tratamentos aplicados em sementes de melão.

Apesar de não diferir estatisticamente o peróxido de hidrogênio age de acordo com as concentrações. Em altas concentrações o composto é um dos agentes causadores da peroxidação lipídica e leva a morte celular programada, no entanto em baixas concentrações pode funcionar como sinalizador para diversos processos fisiológicos em plantas e sementes (GILL; TUTEJA, 2010). Todavia, definir os limites de concentração em sementes ainda não é uma tarefa das mais fáceis.

A concentração do Melonaldeído (MDA) não diferiu entre os tratamentos assim como a concentração de peróxido de hidrogênio. Desta forma, os níveis de peroxidação lipídica foram semelhantes nestas condições experimentais (Figura 6).



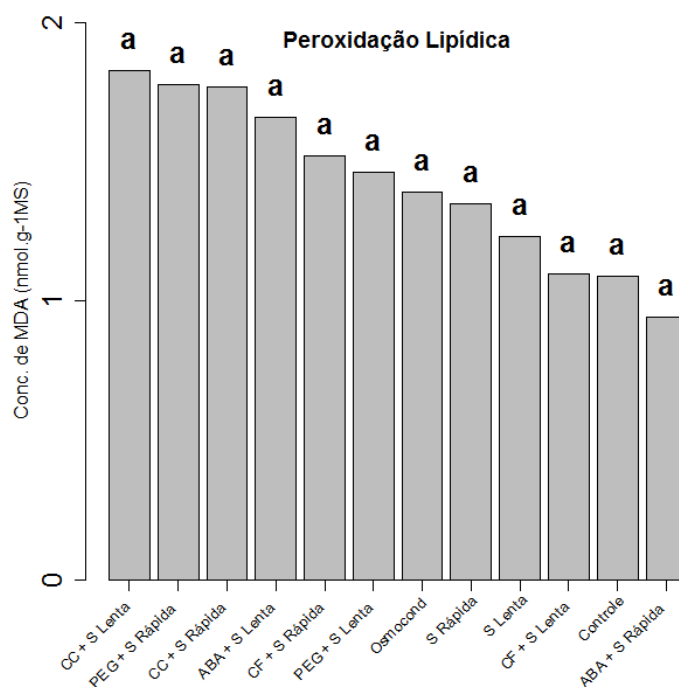


Figura 6 Concentração de Melonaldeído (MDA) em função dos tratamentos aplicados.

A peroxidação lipídica iniciada por EROs danifica a estrutura física da membrana através da decomposição de peróxidos lipídeos em radicais alcoxi e peroxi iniciando a reação em cadeia da peroxidação lipídica nas cadeias de ácido graxos da membrana (BHATTACHARJEE, 2005). Esta reação parece aumentar em sementes que passam por processo de secagem (CHEN; ARORA, 2011), porém neste experimento os níveis de Melonaldeído parecem não ter ligação com a viabilidade das sementes.

Dentre os tratamentos avaliados em relação à concentração das proteínas termorresistentes as sementes osmocondicionadas + secagem lenta,

osmocondicionadas + choque de frio + secagem lenta, osmocondicionadas + choque de frio + secagem rápida e osmocondicionadas + choque de calor + secagem lenta obtiveram os maiores valores, enquanto os demais tratamentos não diferiram entre si (Figura 7).

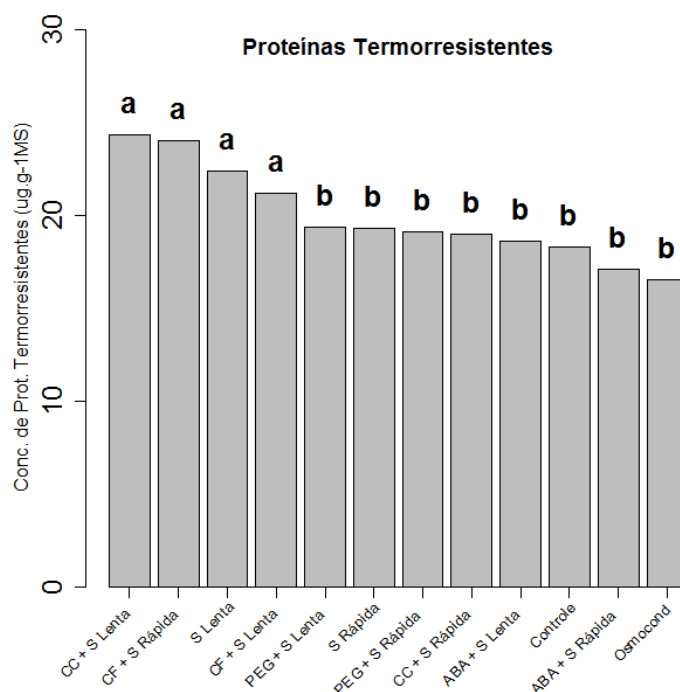


Figura 7 Concentração das Proteínas Termorresistentes em função dos tratamentos aplicados em sementes de melão.

O papel das proteínas termorresistentes na manutenção da viabilidade das sementes após a secagem e de proteção na tolerância à dessecação são notórios (BARTELS; SALAMINI, 2001). Os resultados da concentração das proteínas termorresistentes atestam para as sementes osmocondicionadas +

choque de frio + secagem rápida e lenta uma maior viabilidade quando impostos ao teste de envelhecimento acelerado, porém as sementes osmocondicionadas + choque de calor + secagem lenta e osmocondicionadas + secagem lenta não apresentaram mesmo desempenho, em relação à viabilidade.

Segundo Blackman, Obendorf e Leopold (1992) a secagem lenta pode promover o aumento das proteínas de maturação (termorresistentes), no entanto estas proteínas sozinhas não são capazes de promover a tolerância à dessecação e, conseqüentemente, manter a viabilidade das sementes.

Através das Correlações de Pearson verificou-se correlação positiva entre a concentração de proteínas termorresistentes e a porcentagem de germinação, porcentagem de plântulas, IVG e IVE (Figura 8). Além disso, constatou-se que houve uma correlação positiva entre a concentração de peróxido de hidrogênio e as proteínas termorresistentes e correlação negativa entre a atividade da enzima catalase e a concentração do peróxido de hidrogênio (Figura 9).

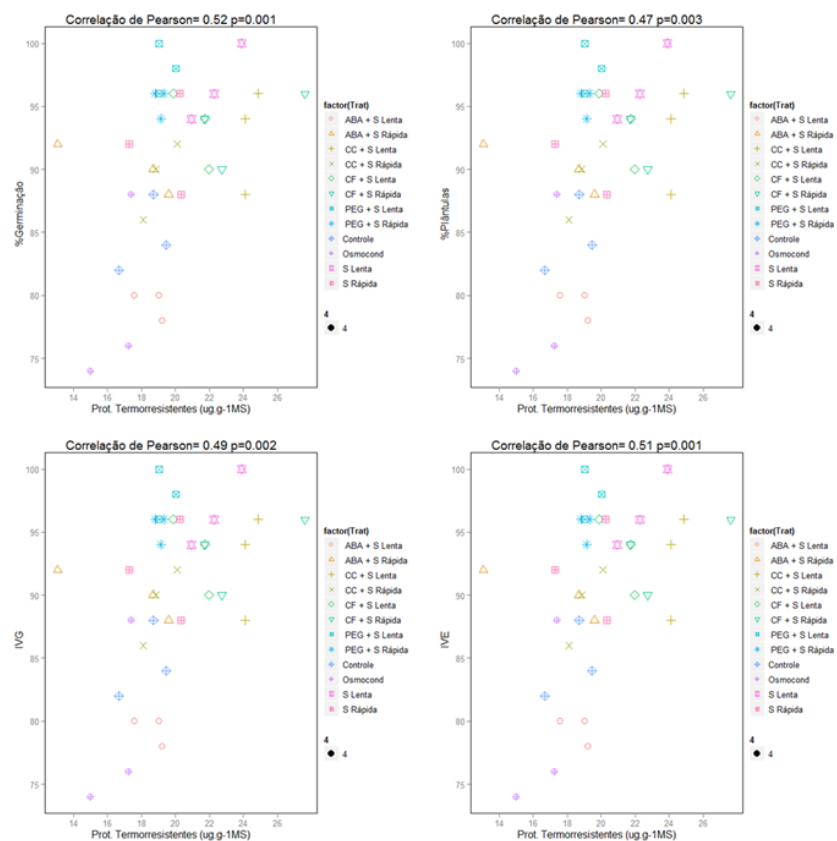


Figura 8 Gráficos de dispersão de Proteínas Termorresistentes com Porcentagem de Germinação, Porcentagem de Plântulas, IVG e IVE

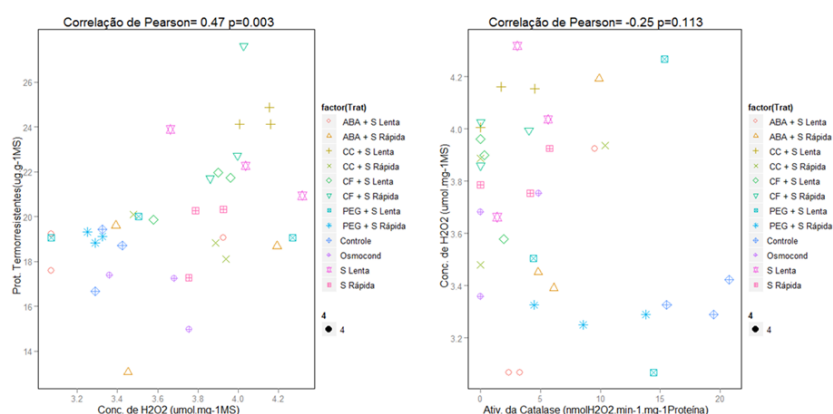


Figura 9 Gráficos de dispersão de Proteínas Termorresistentes com Peróxido de Hidrogênio e Peróxido de Hidrogênio com Atividade da Catalase

Apesar de sozinha as proteínas termorresistentes não conferirem a manutenção da viabilidade, como foi dito acima, fica evidente que o aumento da concentração da mesma tem um efeito positivo nas variáveis fisiológicas das sementes submetidas à secagem. Isso pode estar relacionado ao papel destas proteínas na proteção das estruturas de membranas e proteínas (principalmente enzimas importantes na reativação do metabolismo) na desidratação (WISE; TUNNACLIFFE, 2004).

O comportamento antagônico entre a atividade da catalase e a concentração de peróxido de hidrogênio é esperado, pois esta enzima catalisa a reação de transformação do peróxido de hidrogênio em uma molécula de água e de oxigênio e torna-se muito ativa em sementes secas em virtude da não atividade da APX (BAILLY et al., 2001).

Todavia, a correlação positiva entre o peróxido de hidrogênio e proteínas termorresistentes é surpreendente para as sementes sob secagem, apesar de que em algumas sementes como: osmocondicionadas,

osmocondicionadas + secagem lenta e osmocondicionadas + choque de frio + secagem lenta o aumento da concentração de peróxido provocou decaimento na concentração das proteínas termorresistentes.

Esse resultado corrobora com o que foi escrito acima sobre as variações provocadas pela concentração do peróxido de hidrogênio que pode agir de forma deletéria (KIBINZA et al., 2006) ou benéfica para a semente (LIU et al., 2010).

O resultado da análise de componentes principais mostrou a proximidade das variáveis fisiológicas correlacionadas positivamente como as proteínas termorresistentes e o peróxido de hidrogênio. A correlação negativa entre as atividades da SOD e Catalase com as concentrações de peróxido de hidrogênio e melonaldeído. (Figura 9).

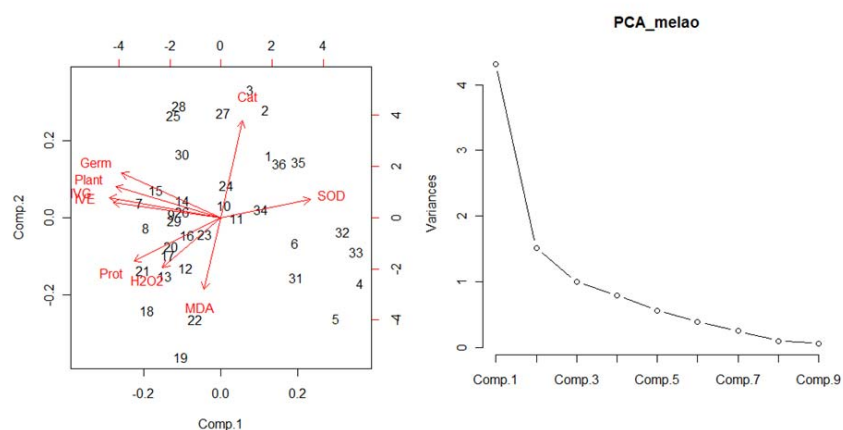


Figura 10 Componentes principais correlacionando todas as variáveis e Gráficos da variância dos componentes onde os componentes do eixo x são: Comp. 1= %Germinação, Comp. 2= %Plântulas, Comp. 3= IVG, Comp. 4= IVE, Comp. 5= Atividade da CAT, Comp. 6= Atividade da SOD, Comp. 7= Conc. MDA, Comp. 8= Conc. H2O2 e Comp. 9= Conc. Prot. Termo.

O peróxido de hidrogênio, apesar de não apresentar diferença estatística entre os tratamentos, pode ser admitido como um conector. Neste contexto,

observou-se que o estresse térmico aplicado às sementes foi necessário para promover variações na concentração do peróxido, que por sua vez conectou as sementes, quando submetidas ao estresse posterior (secagem), ao mecanismo de defesa através das proteínas termorresistentes (KRANNER et al., 2010). Portanto, as sementes que apresentaram maior concentração de proteínas termorresistentes obtiveram os melhores resultados nas variáveis fisiológicas. Já a atividade da Catalase e SOD obtiveram correlação negativa com as variáveis fisiológicas, sendo que, resultado semelhante foi apresentado por Reuzeau e Cavalie (1995), ao trabalharem com sementes secas de girassol. Tal resultado levanta a questão sob como a correlação negativa entre catalase e SOD com germinação em sementes secas poderia ter uma relação com a diminuição dos níveis de peróxido de hidrogênio. Todavia, mais trabalhos devem ser feitos neste sentido.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados obtidos confirmam o papel chave das proteínas termorresistentes em sementes condicionadas osmoticamente submetidas a secagem. Além disso, incita a discussão do papel do peróxido de hidrogênio em sementes secas e o papel da tolerância cruzada na recuperação da tolerância à dessecação.



## 5 CONCLUSÃO

Os resultados observados evidenciam as sementes que sofreram o choque de frio como as mais aptas a serem secas, de ambas as maneiras, sem ocorrer perda da viabilidade. Tal fato comprova a tolerância cruzada como eficaz ferramenta para as sementes osmocondicionadas de melão (*Cucumis melon* L cv. Hales Best Jumbo).

## REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. et al. **Eletrofrese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: UFV, 1991. 242 p.

BAILLY, C. et al. Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 396, p. 475-483, 2004.

BAILLY, C. et al. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. **Journal of Experimental of Botany**, Oxford, v. 52, n. 357, p. 701-708, Apr. 2001.

BARTELS, D.; SALAMINI, F. Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. a contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. **Plant Physiology**, Washington, v. 127, p. 1346-1353, Dec. 2001.

BATTAGLIA, M. et al. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. **Plant Physiology**, Washington, v. 148, p. 6-24, 2008.

BELING, R. R. (Ed.). Aqui e acolá: com importante presença na pauta de exportações de frutas, melão ganha espaço no mercado interno, no qual vendas cresceram 25% em 2010. In: ANUÁRIO Brasileiro da Fruticultura - 2010. Santa Cruz do Sul: Gazeta, 2011. p. 59-59.

BHATTACHARJEE, S. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants. **Current Science**, Columbus, v. 89, n. 7, p. 1113-1121, Oct. 2005.

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-Aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Washington, v. 116, p. 651-658, 1998.

BITTENCOURT, M. C. C. et al. Efeito do condicionamento osmótico das sementes na germinação e no crescimento de plântulas de Aspargo. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 50-56, 2004.

BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. **Plant Physiology**, Washington, v. 100, p. 225-230, 1992.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 2, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO FILHO, J. U. T.; VASCONCELLOS, M. A. S. A cultura do meloeiro. In: GOTO, R.; TIVELLI, S. W. **Produção de hortaliças em ambiente protegido: condições subtropicais**. São Paulo: Unesp, 1998. p. 161-193.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 399 p.

BUITINK, J. et al. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 13, p. 273-286, 2003.

CATUSSE, J.; JOB, C.; JOB, D. Transcriptome- and proteome-wide analyses of seed germination. **Comptes Rendus Biologies**, Lyon, v. 331, p. 815-822, 2008.

CHAKRABORTEE, S. et al. Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function. **Cell Biology**, New York, v. 104, n. 46, p. 18073-18078, 2007.

CHEN, K.; ARORA, R. Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). **Plant Science**, Limerick, v. 180, p. 212-220, 2011.

FARIA, J. M. R. et al. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 418, p. 2119-2130, Aug. 2005.

GENOUD, T.; MÉTRAUX, J. Crosstalk in plant cell signaling: structure and function of the genetic network. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 4, n. 12, p. 503-507, 1999.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Washington, v. 59, p. 309-314, 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Nova Delhi, v. 48, p. 909-930, 2010.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A.. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Washington, v. 84, p. 450-455, 1987.

HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K. Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, n. 8, p. 343-351, Aug. 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/default.shtm>>. Acesso em: 12 nov. 2011.

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, Cambridge, v. 188, p. 655-673, 2010.

KIBINZA, S. et al. Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 128, p. 496-506, 2006.

LIN, R. H. et al. Slow post-hydration drying improves initial quality but reduces longevity of primed bitter melon seeds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 114-124, Aug. 2005.

LIU, Y. et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in Arabidopsis seed dormancy and germination. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 11, p. 2979-2990, 2010.

MUNIZ, M. F. B. et al. Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de melão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 144-149, 2004.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant And Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NASCIMENTO, W. M.; ARAGÃO, F. A. S. Muskmelon seed priming in relation to seed vigor. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 1, p. 114-117, Feb. 2004.

NASCIMENTO, W. M. **Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças**. Brasília: Embrapa, 2004. 12 p. (Circular Técnica, 33).

NASCIMENTO, W. M. Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças visando à germinação em condições de temperaturas baixas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 211-214, 2005.

NASCIMENTO, W. M. Sementes de melão osmoticamente condicionadas: vale a pena utilizá-las? **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 133-135, jun. 2002.

NASCIMENTO, W. M.; WEST, S. H. Drying during muskmelon (*Cucumis melo* L.) seed priming and its effects on seed germination and deterioration. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 28, n. 1, p. 211-215, 2000.

OLIVEIRA, A. C. S. et al. Testes de vigor em sementes baseados no desempenho das plântulas. **Inter Science Place**, São Paulo, n. 4, p.1-23, jan. 2008.

ORACZ, K. et al. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. **Plant Physiology**, Whashington, v. 150, p. 494-505, May 2009.

REUZEAU, C.; CAVALIE, G. Activities of free radical processing enzymes in dry sunflower seeds. **New Phytologist**, Cambridge, n. 130, p. 59-66, 1995.

SABEHAT, A.; LURIE, S.; WEISS, D. Expression of small heat-shock proteins at low temperatures: a possible role in protecting against chilling injuries. **Plant Physiology**, Whashington, v. 117, p. 651-658, 1998.

SEILER, C. et al. ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, p. 1-18, Feb. 2011. Disponível em: <<http://jxb.oxfordjournals.org/content/early/2011/02/02/jxb.erq446.long>>. Acesso em: 21 nov. 2011.

SINHA, S.; SAXENA, R.; SINGH, S. Chromium induced lipid peroxidation the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes. **Chemosphere**, Oxford, v. 58, n. 5, p. 595-604, 2005.

THE R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna, 2011. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 22 nov. 2011.

TORRES, S. B. et al. Envelhecimento acelerado para avaliação do potencial fisiológico de sementes de melão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 70-75, jan. 2009.

UMAIR, A. et al. Effects of seed priming on the antioxidant enzymes activity of Mungbean (*Vigna radiata*) seedlings. **Pakistan Journal of Nutrition**, Islamabad, v. 11, n. 2, p. 140-144, 2012.

VIEIRA, C. V. **Germinação e re-indução de tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Tabebuia impetiginosa* e *Alliaria petiolata***. 2008. 84 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

WETTLAUFER, S. H.; LEOPOLD, A. C. Relevance of amadori and maillard products to seed deterioration. **Plant Physiology**, Washington, v. 97, p.165-169, 1991.

WICKHAM, H. **ggplot2**: elegant graphics for data analysis. New York: Springer, 2009.

WISE, M. J.; TUNNACLIFFE, A. POPP the question: what do LEA proteins do? **Trends: in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 13-17, Jan. 2004.

WU, X. et al. Proteomic analysis of seed viability in maize. **Acta Physiology Plant**, Kraków, v. 33, p. 181-191, 2011.

**CAPÍTULO 3 Tolerância cruzada em sementes osmocondicionadas de  
*Lycopersicon esculentum* Mill.**



## RESUMO

Foram estudados neste trabalho os efeitos da secagem lenta e rápida associada ao estresse térmico (frio e calor), hídrico e aplicação exógena de ABA em sementes osmocondicionadas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Gaúcho Melhorado) em solução de  $\text{KNO}_3$  (0,30 M), potencial de -1,48 MPa, temperatura à 20°C, no escuro, com aeração constante durante sete dias. Após este período, as sementes foram submetidas aos tratamentos sem secagem, secagem lenta, secagem rápida, choque de frio + secagem lenta, choque de frio + secagem rápida, choque de calor + secagem lenta, choque de calor + secagem rápida, PEG + secagem lenta, PEG + secagem rápida, ABA + secagem lenta e ABA + secagem rápida. Para controle utilizamos as sementes não osmocondicionadas. Os efeitos dos tratamentos sobre porcentagem de germinação e plântulas, IVG, IVE, atividade do sistema antioxidante (SOD, CAT e APX), concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e concentração de proteínas termorresistentes foram avaliados. Também foi avaliada a viabilidade das sementes através do teste de envelhecimento acelerado. O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), com três repetições para cada tratamento. As análises estatísticas utilizadas foram teste de Scott-Knott, Correlação de Pearson e Análise de Componentes Principais através do R. A atividade da catalase e APX não foram detectadas nas sementes de tomate e houve redução das proteínas termorresistentes. Ação de um estresse em conjunto com secagem não surtiu efeito nas sementes de tomate.

Palavras-chave: Viabilidade. Secagem lenta. Catalase. APX.

### ABSTRACT

The effects of slow and fast drying associated with thermal stress (cold and heat), water and exogenous application of ABA in primed seeds of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Gaucho Melhorado) were evaluated. The tomato seeds in a solution of KNO<sub>3</sub> (0.30 M), potential of -1.48 MPa, temperature at 20 ° C in the dark, with constant aeration for a period of seven days. After washing the seeds were treated in priming without drying (T1) priming + slow drying (T2), priming + fast drying (T3), priming + cold shock + slow drying (T4), priming + cold shock + fast drying (T5), priming + heat shock + slow drying (T6), priming + heat shock + fast drying (T7), priming + water stress + slow drying (T8), priming + water stress + fast drying (T9 ) priming + ABA + slow drying (T10) and ABA priming + + fast drying (T11). Used to control the dry seeds. The effects of treatments on germination percentage, percentage of seedlings, IVG, IVE, activity of the antioxidant system (SOD, CAT and APX), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and concentration of heat-resistant proteins were evaluated. The viability of the seeds through the accelerated aging test was evaluated. The completely randomized design (CRD) with three replicates for each treatment. The statistical analyzes were Scott-Knott test, Pearson Correlation and Principal Component Analysis by R. Catalase was not detected and APX the tomato seeds of the protein was reduced and heat resistant. Action of a stress in conjunction with drying had no effect on tomato seeds.

Keywords: Availability. Slow drying. Catalase. APX.

## 1 INTRODUÇÃO

O valor total movimentado pelo comércio de hortaliças no Brasil é de 79,2 bilhões de reais, sendo que deste montante, 10,6 bilhões é o valor total da produção. Desse total gerado na produção, 346,5 milhões de reais são movimentados pela comercialização de sementes, pois a aquisição de sementes de qualidade é o primeiro passo para o sucesso de uma cultura e para uma boa colheita.

Entre as dez espécies de maior consumo do Brasil, o tomate possui o maior valor de comercialização de sementes movimentando 96,2 milhões de reais, sendo que, esta espécie possui a segunda maior produção (3,115.8 milhões de toneladas). No Brasil fica evidente que a produção de sementes de tomate é um segmento essencial dentro da cultura.

O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pertence à família das solanáceas, proveniente da América do Sul, mas domesticado no México, sendo esta hortaliça bastante consumida mundialmente em várias culturas alimentares. As grandes quantidades de vitaminas B, C e dos nutrientes ferro e fósforo, fazem do tomate um alimento importante na busca de uma dieta saudável.

A qualidade das sementes é essencial, pois quando estas são saudáveis, a cultura tornar-se-á mais vigorosa do que no caso de sementes de má qualidade. Embora seja possível reconhecer as sementes de boa qualidade, infelizmente, a confirmação ocorre somente após a sua germinação. Contudo, é fácil discernir as de má qualidade antes da germinação, observando o cheiro de bolor, o estado danificado, enrugado ou vazio, a presença de bolores, insetos e os tamanhos desiguais.

Na busca de uma melhor qualidade nas sementes de tomates, algumas técnicas são empregadas, dentre elas, o condicionamento osmótico

(ARGERICH; BRADFORD; TARQUIS, 1989; GOVINDEN-SOULANGE; LEVANTARD, 2008). Esta técnica propicia melhoria diante de baixas temperaturas (NASCIMENTO, 2005). No entanto, a redução na longevidade das sementes de tomate condicionadas osmoticamente é um dos fatores negativos da técnica (LIU et al., 1996).

Na tentativa de diminuir ou mesmo superar o efeito negativo desta técnica, há alguns mecanismos que vem sendo estudados. Dentre esses mecanismos pode-se citar: fisiológico, metabólico e expressão de genes relacionados com a aquisição da tolerância à dessecação em sementes (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001) que podem ter efeito benéfico na recuperação da longevidade e posterior armazenamento. A ação conjunta de dois ou mais estresses podem ser benéficos para as sementes, uma vez que podem ativar as redes de proteção que incluem o mecanismo antioxidante e proteínas protetoras. Quando agindo em conjunto, estes mecanismos podem reinduzir a tolerância à dessecação através da proteção das membranas e enzimas necessárias à germinação, crescimento e desenvolvimento da planta.

Diante do exposto, foi realizado um estudo com intuito de testar diferentes combinações de estresses com secagens, a fim de estabelecer se a ação da tolerância cruzada poderá auxiliar na recuperação da tolerância à dessecação e, conseqüentemente, na longevidade. Verificou-se também qual é a melhor combinação para as sementes de tomate. Além disso, se buscou estudar possíveis mecanismos fisiológicos relacionados com a reaquisição da tolerância à dessecação por sementes submetidas ao condicionamento osmótico.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Locais de realização dos Experimentos**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas - LCDP do Departamento de Biologia, setor de Fisiologia Vegetal-SFV e no Laboratório de Análise de Sementes – LAS, Departamento de Agricultura, ambos da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras.

### **2.2 Material utilizado**

Foram utilizadas sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Gaucho Melhorado), produzidas pela FELTRIN Ltda.

### **2.3 Condicionamento osmótico**

As sementes de tomate foram condicionadas em solução de  $\text{KNO}_3$ , concentração de 0,30 M, e potencial de -1,48 MPa, temperatura à 20°C, no escuro, com aeração constante por um período de sete dias (NASCIMENTO, 2004).

### **2.4 Secagem das sementes osmoticamente condicionadas**

Após a retirada das sementes do condicionamento osmótico procedeu-se a lavagem em água corrente, para remoção da substância osmocondicionante e secagem superficial, em folha de papel toalha. Na sequência foram aplicados, aos respectivos tratamentos, secagem rápida, lenta e osmocondicionadas sem secar. O controle foi feito com as sementes secas sem condicionar. Foram

utilizadas 21 g de sementes por tratamento, destas foram retiradas quatro repetições de 50 sementes para variáveis fisiológicas e teste de envelhecimento acelerado, três repetições de 1 g para teste de umidade, três repetições de 0,2 g para cada atividade do sistema antioxidante e 0,1 g para análise das proteínas termorresistentes.

A secagem rápida foi efetuada em cinco caixas de polietileno tipo gerbox, espalhadas dentro de uma estufa de circulação de ar forçada, a 32°C por duas horas até atingir o conteúdo de água inicial (0,05 - 0,07 gH<sub>2</sub>O/g MS).

A secagem lenta foi realizada em uma bandeja plástica (27x35 cm), onde as sementes foram colocadas sobre papel toalha e acondicionadas em uma sala com temperatura de 25°C e umidade relativa de 50% por 24 horas até atingir o conteúdo de água inicial (0,05 - 0,07 gH<sub>2</sub>O/g MS).

O conteúdo de água inicial das sementes foi obtido através da metodologia prescrita nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), pelo método da secagem em estufa a 105±3°C, durante 24 horas, utilizando-se três repetições de 1 grama.

## **2.5 Choque Térmico**

Ao serem retiradas do condicionamento, as sementes passaram por lavagem e secagem em papel toalha sendo em seguida, colocadas em caixas tipo gerbox dentro de uma câmara de germinação tipo BOD onde foram submetidas às temperaturas de 1°C (Choque de frio) e 45°C (Choque de calor), ambos por duas horas.

## **2.6 Manutenção do osmocondicionamento**

Após seis dias, as sementes de tomate foram transferidas para outra solução com Polietileno glicol, peso molecular 6000 (PEG6000), concentração de 60 mM e potencial osmótico de -1,7 MPa mantidos sob aeração em uma câmara de germinação tipo BOD no escuro a 5°C por 3 dias (BUITINK et al., 2003, FARIA et al., 2005).

## **2.7 ABA**

Uma solução de ABA + PEG com o potencial osmótico de -1,7 MPa foi utilizada para a submersão das sementes. Para tanto, foi utilizada uma solução estoque de ABA de 100 µM diluída em etanol 0,1% para gerar a solução de ABA na concentração de 10 µM. As sementes que constituíram o tratamento foram incubadas em condição de escuro, a 5°C e aeradas por três dias (VIEIRA, 2008).

## **2.8 Atividade do sistema antioxidante**

As sementes coletadas para extração enzimática foram lavadas em água corrente para completar remoção das substâncias osmocondicionantes e, em seguida, uma amostra de 0,2 g por repetição foram submersas em nitrogênio líquido e acondicionada em crio tubos. Posteriormente, as sementes foram armazenadas a -80°C até as análises.

O extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 0,2g de semente, as quais foram adicionadas 1,5 mL do tampão de extração contendo: 1,47 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), 15 µL de EDTA 0,1 M (pH 7,0), ácido ascórbico 0,001 M e 12 mg de PVPP. O extrato foi

centrifugado a 12000 g por 30 minutos a 4°C e sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C durante o período das análises. Os sobrenadantes coletados foram utilizados nas análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (BIEMELT et al., 1998).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), conforme proposto por Giannopolitis e Ries (1977), com modificações. Foram adicionados 10 µL do extrato enzimático a 190 µL do meio de incubação composto por: tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 µM, NBT 75 µM e riboflavina 2 µM. A placa de acrílico UV contendo o meio de incubação mais amostra foram iluminados com lâmpada fluorescente de 20 W por 10 minutos. Para o controle, foi utilizado o mesmo meio de reação sem a amostra, que foi mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm em espectrofotômetro de ELISA e o cálculo da enzima foi feito com a seguinte equação: % de inibição =  $(A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$ . Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

A atividade da enzima CAT foi avaliada segundo Havir e McHale (1987), em que uma alíquota de 10 µL do extrato enzimático foi adicionada a 190 µL do meio de incubação contendo 100 µL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e 10 µL de peróxido de hidrogênio 12,5 mM e 80 µL de água destilada incubado a 28°C. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio através do espectrofotômetro de ELISA. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 36 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> corrigido para 18 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> uma vez que os poços da placa UV possuem 0,5 cm de comprimento.



A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos monitorados através do espectrofotômetro de ELISA. Uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foi adicionada a 190  $\mu\text{L}$  de tampão de incubação composto por 100  $\mu\text{L}$  de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 10  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 10 mM, 10  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 2 mM e 70  $\mu\text{L}$  de água destilada (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi 2,8  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  corrigido para 1,4  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  uma vez que os poços da placa UV possuem 0,5 cm de comprimento.

A concentração do Peróxido de Hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi determinada através da metodologia descrita por Sinha et al. (2005). Foram maceradas 200 mg de sementes em nitrogênio líquido, acrescido de 20% de PVPP, homogeneizados em 5 mL de TCA 0,1% e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C. Após esse período, foi retirada uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  do extrato, 40  $\mu\text{L}$  de TCA 0,1%, 50  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) 100 mM e 100  $\mu\text{L}$  de iodeto de potássio 1 M. As leituras foram feitas em placas no espectrofotômetro de ELISA a 390 nm. O conteúdo de Peróxido ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi calculado comparando as leituras com as obtidas através de uma curva padrão de Peróxido de Hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

A Peroxidação lipídica determinada pela quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como descrito por Buege e Aust (1978). Foram maceradas em nitrogênio líquido 200 mg de sementes mais 20% de PVPP (polivinilpolipirrolidone) e homogeneizadas em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (w / v). O homogeneizado foi então centrifugado a 10.000 g por 10 min. Dez microlitros do sobrenadante foram adicionados a 190  $\mu\text{L}$  do meio de reação (0,5% (w / v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (w / v) de TCA, incubados então a 95 ° C por 30 minutos. A reação foi interrompida rapidamente

por um resfriamento no gelo, e a absorbância medida foi determinada em um espectrofotômetro de ELISA em 535 nm e 600 nm. A concentração do complexo MDA / TBARS foi calculada utilizando a extinção coeficiente de 1,55 mmol L<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. Assim como para a atividade da CAT e da APX o coeficiente de extinção molar foi corrigido para 77 μmol.L<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> uma vez que os poços da placa UV possuem 0,5 cm de comprimento.

A quantificação de proteínas nos extratos foi realizada de acordo com a metodologia de Bradford (1976) para a determinação da atividade específica das enzimas.

## **2.9 Proteínas Termorresistentes**

As sementes coletadas para quantificação das proteínas termorresistentes foram lavadas em água corrente para completa remoção das substâncias osmocondicionantes e, em seguida, uma amostra de 0,1 g por repetição foram mergulhada em nitrogênio líquido e acondicionada em crio tubos. Posteriormente, as sementes foram armazenadas a -80°C até o momento das análises.

Para a eletroforese, foram utilizadas duas repetições maceradas em cadinho adicionando-se tampão de extração (Tris Base 50 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M, MgCl<sub>2</sub> 0,005 M, Metil Sulfonil Fluoreto - PMSF 0,001 M, H<sub>2</sub>O destilada e acrescentar β mercaptoetanol 0,1%), na proporção de 10 partes de tampão para 1 de amostra. Este tampão é descrito por Alfenas (1998).

As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi separado e incubado em banho-maria a 85°C por 15 minutos. Em seguida centrifugou-se novamente como descrito acima e coletou-se 70 μL do sobrenadante, os quais foram postos em microtubos de 2 mL com um furo na

tampa, acrescentando-se 40  $\mu$ L tampão da amostra ( 2,5 mL de glicerol, 0,46 g de SDS e 20 mg de azul de Bromofenol. O volume foi completado para 20 mL com tampão de extração e, em seguida, transferido para água fervente durante 5 minutos.

Em uma canaleta aplicou-se 10  $\mu$ L da amostra em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador), e 6% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi realizada a 150 v por 4 horas, como descrito por Alfenas (1998). A coloração dos géis foi feita utilizando-se solução de Coomassie Blue 0,05% por 12 horas e solução de ácido cítrico para descoloração.

### **2.10 Curva de Embebição**

A curva de embebição foi determinada através da pesagem inicial de três repetições de 50 sementes para cada espécie. A seguir, as sementes foram colocadas para embeber em água destilada sob luz, na temperatura ideal para a germinação das espécies estudadas, sendo pesadas após 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24 e 48h de embebição. Antes de cada pesagem, as sementes foram secas com papel absorvente e posteriormente recolocadas em água destilada. Com os valores das percentagens consecutivas foi calculada a percentagem de ganho de água em relação ao peso inicial das sementes, a fim de se estabelecer a curva de embebição.

### **2.11 Teste de Germinação**

Os testes de germinação foram realizados conforme Brasil (2009), utilizando-se quatro repetições de 50 sementes colocadas em placas de petri forradas com papel Germitest® umedecido com água destilada, equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco e mantido em câmara de germinação tipo BOD,

sob temperatura de 20-30°C. A contagem da germinação foi efetuada diariamente sendo adotada como critério a protrusão radicular, além da contagem de plântulas normais. Com os dados de germinação e formação de plântulas foram obtidos o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Índice de Velocidade de Emergência (IVE) através de Maguire (1962).

### **2.12 Envelhecimento Acelerado**

As sementes foram colocadas em uma tela metálica acoplada a uma caixa gerbox contendo 40 mL de água destilada ao fundo. As caixas tampadas foram conduzidas a incubadora BOD, permanecendo a temperatura de 41°C, por 72 horas (MUNIZ et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2008; TORRES et. al., 2009). Foram obtidas as variáveis porcentagem de germinação, porcentagem de plântulas, IVG e IVE. Ao término deste período, foi determinado o grau de umidade através da metodologia prescrita nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), pelo método da secagem em estufa a 105±3°C, durante 24 horas, utilizando-se três repetições de 01g cada e o teste de germinação seguindo a recomendação de Brasil (2009).

### **2.13 Delineamento experimental e Análise estatística**

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), com três repetições para cada tratamento. Os tratamentos aplicados foram de acordo com o fluxograma da figura 1.

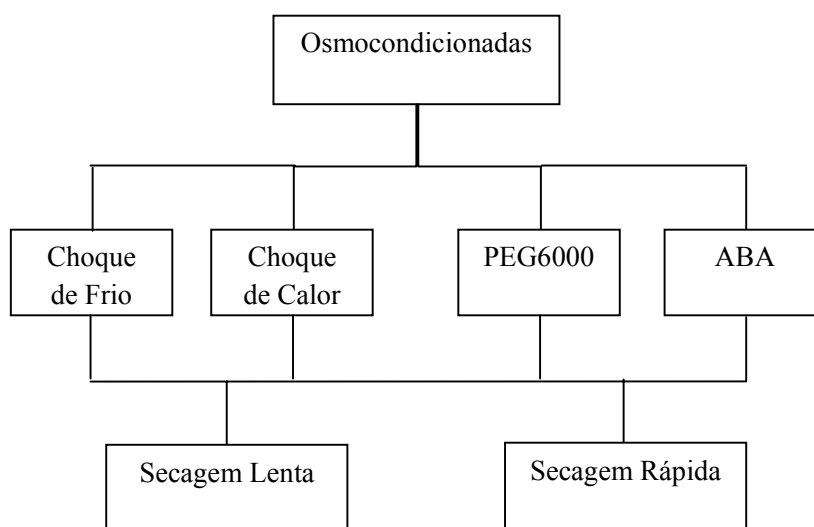


Figura 1 Fluxograma dos tratamentos aplicados nas sementes de tomate

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva de embebição mostra aumento gradativo dos valores percentuais (Figura 2). A estabilização da curva ocorreu com 24 horas e a germinação se deu por volta das 36 horas.

Os valores da tabela 1 mostram que apenas os tratamentos das sementes osmocondicionadas sem secar e sementes osmocondicionadas + PEG+ secagem lenta não tiveram redução na porcentagem de germinação quando comparados ao controle. Em relação à porcentagem de plântulas todos os tratamentos, com exceção das sementes osmocondicionadas sem secar e osmocondicionadas + secagem lenta obtiveram menores valores em relação ao controle.

O Índice de Velocidade de Germinação (IVG) foi menor nos tratamentos osmocondicionadas + choque de frio + secagem lenta, osmocondicionadas + choque de calor + secagem lenta, osmocondicionadas + PEG + secagem lenta e osmocondicionadas + ABA + secagem lenta, enquanto os demais tratamentos não diferiram do controle.

A velocidade de formação das plântulas calculada pelo Índice de Velocidade de Emergência (IVE) foi maior no tratamento osmocondicionadas + secagem lenta. Os tratamentos osmocondicionadas + choque de calor + secagem lenta, osmocondicionadas + PEG + secagem lenta e osmocondicionadas + ABA + secagem lenta apresentaram os menores valores de IVE, enquanto o controle não diferiu das osmocondicionadas sem secagem.

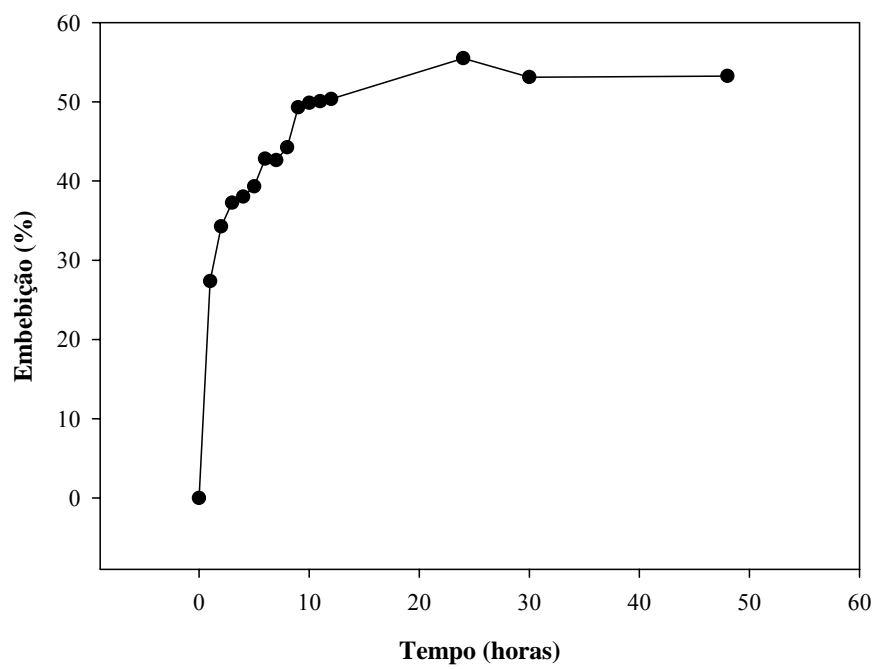


Figura 2 Curva de embebição de sementes de tomate em condição ambiente

Tabela 1 Valores de Porcentagem de Germinação, Porcentagem de Plântulas, IVG e IVE – UFLA – 2012.

Tratamento	%Germinação	%Plântulas	IVG	IVE
Controle	75,33a	64,00a	10,22a	6,96b
Osmocond.	72,00a	67,33a	10,39a	7,45b
PEG+S.Lenta	72,00a	18,00d	5,96b	1,54e
PEG+S.Rápida	64,67b	49,33b	10,96a	3,65d
CC+S.Rápida	64,67b	53,33b	9,52a	5,54c
S. Lenta	64,00b	59,33a	11,18a	8,43a
S. Rápida	64,00b	53,33b	9,60a	4,52c
ABA+S.Rápida	64,00b	52,00b	10,30a	5,23c
CF+S.Rápida	59,33b	56,00b	10,62a	6,05c
CF+S.Lenta	58,00b	31,33c	5,71b	5,43c
CC+S.Lenta	36,67c	18,66d	3,30c	2,29e
ABA+S.Lenta	18,67d	13,33d	1,96c	1,34e

As médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. IVG = Índice de Velocidade de Germinação e IVE = Índice de Velocidade de Emergência.



O condicionamento osmótico é uma técnica bastante utilizada em sementes de tomate para promover um melhor desempenho na germinação, uniformidade, contra fatores adversos e na formação das plântulas (MAUROMICALE; CAVALLARO, 1995; NASCIMENTO, 2005; NAWAZ et al., 2011), como pode ser notado nas sementes sem secar. Estas melhoras são atribuídas ao avanço para a fase dois da germinação, avanço do ciclo celular para a fase de mitose, reparo do DNA e síntese “de novo” de RNA e proteínas são processos que estão relacionados (VARIER, et al., 2010), corroborando com os benefícios do condicionamento osmótico para sementes de tomate (MUKHTAR; BAJWA, 2011). Todavia, o efeito da técnica de condicionamento pode ser reduzido ou até mesmo perdido quando as sementes são expostas a secagem até um conteúdo de água igual ou inferior a 15% (BUTLER et al., 2009). Isto pode ter acontecido com as sementes de tomate quando submetidas à secagem, com exceção das sementes do osmocondicionadas + PEG + secagem lenta o restante apresentaram redução na germinação.

O desempenho ruim das sementes osmocondicionadas + ABA + secagem lenta pode ser em função do fitohormônio ABA exercendo um efeito inibitório nos mecanismos iniciadores da germinação por impedir a expressão de genes relacionados a germinação (CATUSSE; JOB; JOB, 2008). Os maiores valores de IVE neste experimento para as sementes com secagem lenta corrobora com o resultado de Lin et al. (2005), os quais observaram que a secagem lenta obteve melhores resultados na porcentagem de plântulas em relação ao controle.

Quando submetidas ao teste de Envelhecimento Acelerado (EA), as sementes que obtiveram as maiores porcentagem de germinação foram das osmocondicionadas + secagem lenta. Enquanto os tratamentos

osmocondicionadas + PEG + secagem lenta, osmocondicionadas + ABA + secagem lenta e osmocondicionadas + ABA + secagem rápida obtiveram os menores valores. As sementes do controle também apresentaram redução na porcentagem de germinação.

A porcentagem de plântulas no EA foi maior nos tratamentos osmocondicionadas sem secar, osmocondicionadas + secagem lenta osmocondicionadas + secagem rápida, osmocondicionadas + choque de frio + secagem rápida e osmocondicionadas + choque de calor + secagem rápida. Já os menores foram osmocondicionadas + ABA + secagem rápida, osmocondicionadas + ABA + secagem lenta, osmocondicionadas + choque de calor + secagem lenta e controle. Para o IVG e IVE o tratamento osmocondicionadas + secagem lenta obteve os maiores valores, enquanto os tratamentos osmocondicionadas + ABA + secagem rápida e osmocondicionadas + PEG + secagem lenta, menores valores no IVG, controle e osmocondicionadas + ABA + secagem rápida, menores valores no IVE (Tabela 2).

Tabela 2 Valores de Porcentagem de Germinação, Porcentagem de Plântulas, IVG e IVE para sementes submetidas ao Envelhecimento Acelerado – UFLA – 2012.

Tratamento	%Germinação_EA	%Plântulas_EA	IVG_EA	IVE_EA
S. Lenta	68,00a	49,33a	10,59a	7,45a
S. Rápida	57,33b	44,67a	6,68c	4,23c
Osmocond.	56,67b	52,00a	7,17c	4,85b
PEG+S.Rápida	56,67b	38,67b	8,35b	3,36c
CF+S.Rápida	53,33c	44,67a	5,61c	4,78b
CC+S.Rápida	52,67c	42,00a	5,52c	4,35c
CF+S.Lenta	48,67c	31,33b	4,34d	5,43b
CC+S.Lenta	46,00c	18,67c	4,27d	2,61d
Controle	44,67c	12,67c	6,01c	0,53e
ABA+S.Rápida	34,67d	0,66d	3,84d	0,02e
PEG+S.Lenta	24,67e	18,00c	2,07e	1,63d
ABA+S.Lenta	13,33f	11,33c	1,34e	1,17e

As médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. IVG\_EA = Índice de Velocidade de Germinação das sementes submetidas ao Envelhecimento Acelerado e IVE\_EA = Índice de Velocidade de Emergência das sementes submetidas ao Envelhecimento Acelerado.

A técnica de envelhecimento acelerado permite que as sementes de menor vigor deteriorem-se mais rapidamente do que as sementes vigorosas, apresentando uma acentuada redução na viabilidade (PANOBIANCO; MARCOS FILHO, 2001), como foi constatado nas sementes do osmocondicionadas + PEG + secagem lenta, osmocondicionadas + ABA + secagem rápida e controle. Diante disso, a redução no potencial de armazenamento é a primeira manifestação fisiológica da deterioração, após o decréscimo da velocidade de germinação (DELOUCHE; BASKIN, 1973).

A submissão das sementes à secagem lenta pode manter a viabilidade da semente condicionada osmoticamente quando armazenada sem, contudo, perder as propriedades do condicionamento (JOSÉ et al., 2011). Um dos fatores que contribuem para que a secagem lenta mantenha a viabilidade das sementes de tomate após o armazenamento é o aumento da produção das proteínas termorresistentes (GURUSINGHE; POWELL; BRADFORD, 2002).

A atividade da Superóxido Dismutase (SOD) foi maior nos tratamentos osmocondicionadas sem secagem, osmocondicionadas + choque de frio + secagem lenta e osmocondicionadas + choque de frio + secagem rápida. Os tratamentos com menor atividade da SOD foram osmocondicionadas + ABA + secagem lenta, osmocondicionadas + PEG + secagem lenta e osmocondicionadas + ABA + secagem rápida, enquanto os demais tratamentos não diferiram do controle (Figura 3).

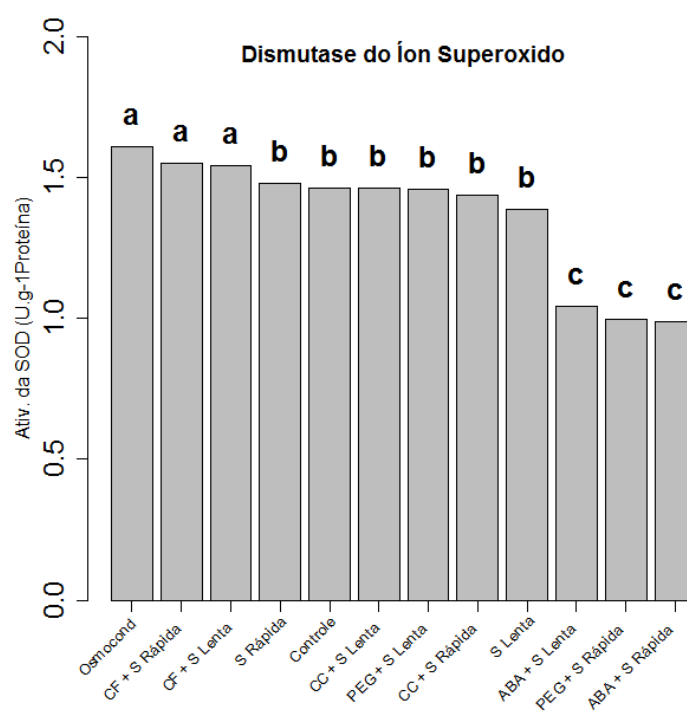


Figura 3 Atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) em função dos tratamentos aplicados em sementes de tomate.

O condicionamento osmótico promove o aumento na atividade da SOD (CHIU; CHUANG; SUNG, 2006). O início da germinação nas sementes osmocondicionadas induz ao aumento da atividade metabólica e formação de espécies reativas de oxigênio (BAILLY, 2004), o que pode ter contribuído para atividade da SOD ser maior nas sementes osmocondicionadas sem secagem.

No processo de tolerância à dessecação, neste caso os tratamentos submetidos à secagem, há uma redução nos níveis de oxigênio (ANGELOVICI et al., 2010) e nestas condições a produção de espécies reativas de oxigênio é diminuída (BORISJUK; ROLLETSCHEK, 2009).

As sementes de tomate testadas não apresentaram atividade das enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). De acordo com EL-Araby e Hegazi (2004) estas enzimas apresentaram atividade em sementes de tomate condicionadas osmoticamente e com secagem após o condicionamento estes autores não avaliaram a atividade destas enzimas. Todavia, Reuzeau e Cavalie (1995) acreditam que em sementes secas outras rotas antioxidantes são mais ativas em relação ao sistema enzimático “tradicional”.

A concentração do peróxido de hidrogênio foi maior nas sementes osmocondicionadas + choque de frio + secagem rápida seguido do controle. Os tratamentos osmocondicionadas + choque de frio + secagem lenta, osmocondicionadas + secagem rápida, osmocondicionadas + choque de calor + secagem lenta, osmocondicionadas + ABA + secagem lenta, T2 e osmocondicionadas + PEG + secagem rápida com as concentrações intermediárias, osmocondicionadas + sem secagem e osmocondicionadas + ABA + secagem rápida com as menores concentrações (Figura 4).

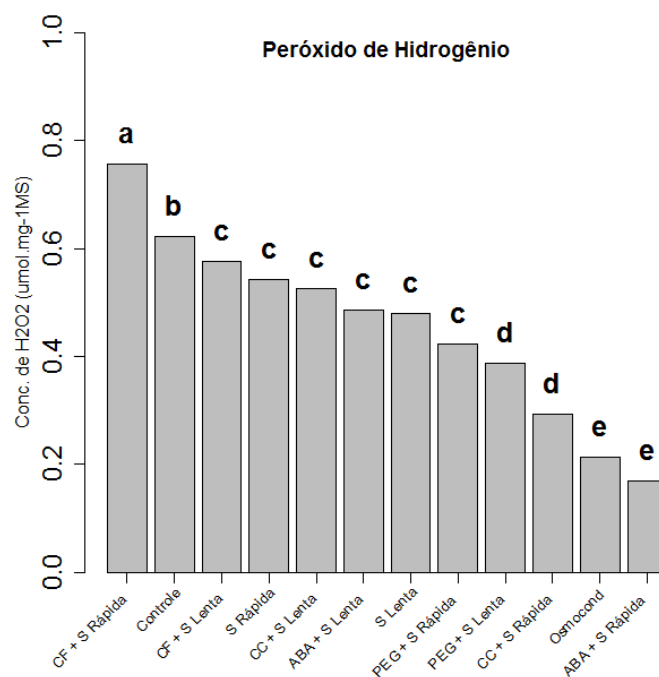


Figura 4 Concentração de Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em função dos tratamentos aplicados em sementes de tomate.

Dentre os tratamentos com maior concentração de peróxido de hidrogênio, apenas o controle não estava entre os tratamentos com maior atividade da SOD. O acúmulo do peróxido de hidrogênio ocorre devido à atividade da SOD e ineficiência ou inexistência de enzimas como a APX e a catalase (DAT et al., 2000). Nas sementes osmocondicionadas sem secagem não se observou acúmulo do peróxido, possivelmente, pela ação de outras enzimas como peroxidase (POD), a qual segundo Yang et al. (2010) aumentou atividade em sementes osmocondicionadas de *Picea asperata*. Também Farhoudi, Saedipour e Mohammadreza (2011) observaram que em sementes de melão

osmocondicionadas a POD apresentou maior atividade quando comparada a CAT.

A concentração do Melonaldeído (MDA) foi menor nas sementes osmocondicionadas + choque de frio + secagem lenta e sementes osmocondicionadas + secagem rápida, enquanto os demais tratamentos não diferiram entre si (Figura 5).

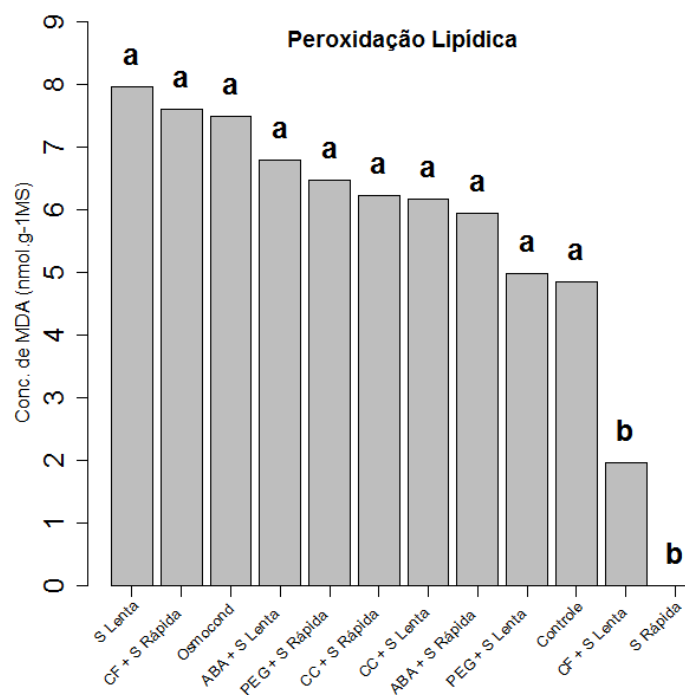


Figura 5 Concentração de Melonaldeído (MDA) em função dos tratamentos aplicados em sementes de tomate.

Os maiores valores de Melonaldeído parecem não ter interferido na viabilidade das sementes, uma vez que, as sementes osmocondicionadas +



secagem lenta tiveram o melhor desempenho quando submetidas ao envelhecimento acelerado.

Chen e Arora (2011) observaram que apesar da secagem das sementes de espinafre promover aumento da peroxidação lipídica, aparentemente, este comportamento não causou danos em relação às variáveis fisiológicas. Enquanto EL-Araby e Hegazi (2004) constataram que em sementes de tomates osmocondicionadas, submetidas à secagem e armazenadas as maiores concentrações de MDA implicam em redução da porcentagem de germinação, no entanto não alteram o IVG.

A concentração obtida no tratamento sementes osmocondicionadas + secagem rápida destoa das análises aplicadas, sendo necessária realização de novas avaliações.

Dentre os tratamentos avaliados em relação à concentração das proteínas termorresistentes as sementes do controle, osmocondicionadas + PEG + secagem lenta, osmocondicionadas + PEG + secagem rápida, osmocondicionadas + choque de frio + secagem rápida, osmocondicionadas + choque de frio + secagem lenta e osmocondicionadas + ABA + secagem rápida obtiveram os maiores valores, enquanto os tratamentos osmocondicionadas + secagem lenta, osmocondicionadas + secagem rápida e osmocondicionadas + choque de calor + secagem rápida os valores intermediários osmocondicionadas + ABA + secagem lenta e osmocondicionadas + sem secagem os menores valores. (Figura 6).

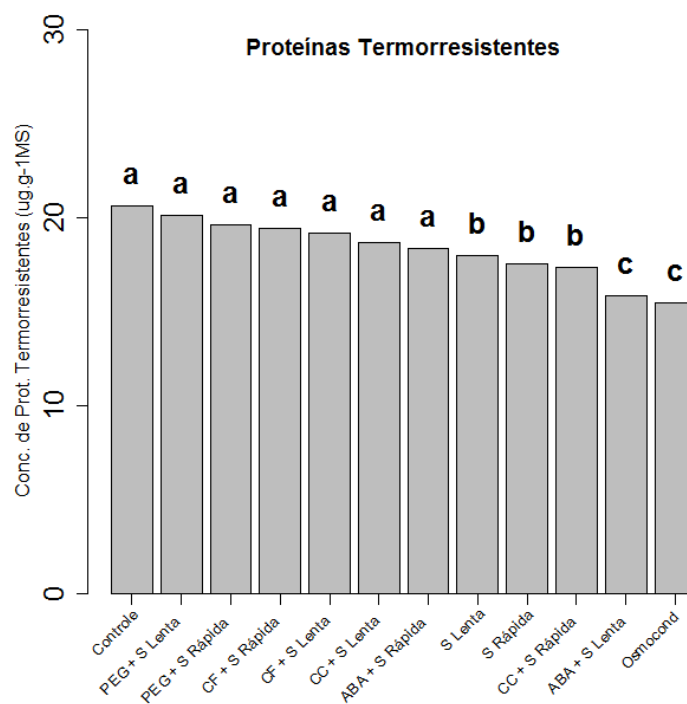


Figura 6 Concentração das Proteínas Termorresistentes em função dos tratamentos aplicados em sementes de tomate.

O menor conteúdo das proteínas termorresistentes como as LEAs e as HSPs no tratamento condicionado sem secagem ocorre em virtude da germinação. Uma vez iniciada, a germinação promove a redução nas concentrações de proteínas termorresistentes e perda da tolerância à dessecação (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006; ANGELOVICI et al., 2010). De fato, a técnica de osmocondicionamento por iniciar o processo germinativo tem o mesmo efeito sobre as sementes (VARIER; VARI; DADLANI, 2010).

No entanto, apesar de ficar evidente que a secagem aliada há estresses térmicos, hídrico e aplicação exógena de ABA possam recuperar a concentração

das proteínas termorresistentes que conferem proteção à dessecação, sozinhas não podem manter a viabilidade das sementes (BLACKMAN; OBENDORF; LEOPOLD, 1992).

Através da Correlação de Pearson verificou-se que as proteínas termorresistentes tiveram correlação positiva com a germinação e o IVG (Figura 7), também apontaram para relação positiva entre o peróxido de hidrogênio e as proteínas termorresistentes, atividade da SOD com a concentração de peróxido de hidrogênio (Figura 8).

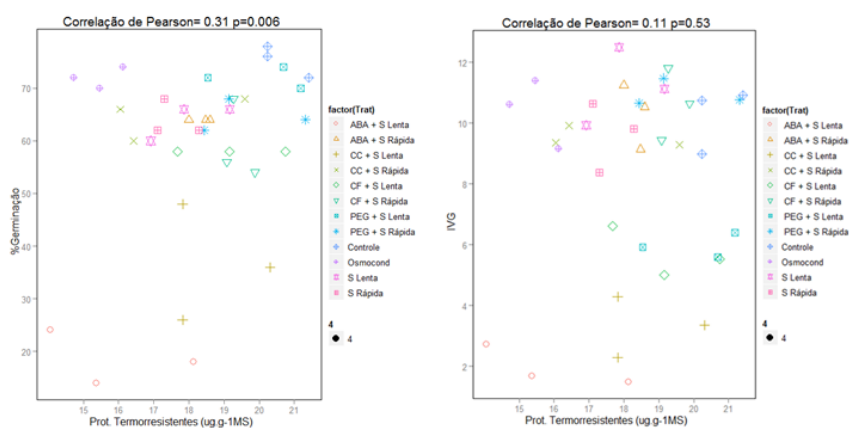


Figura 7 Gráficos de dispersão de proteínas termorresistentes com %Germinação e IVG

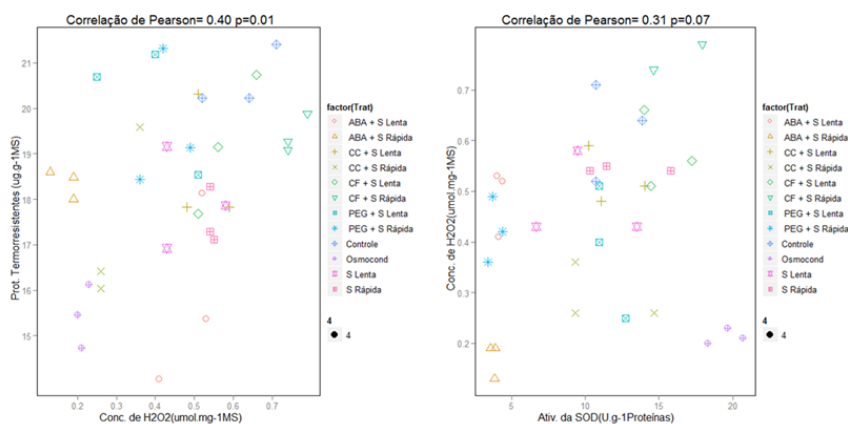


Figura 8 Gráficos de dispersão de proteínas termorresistentes com peróxido de hidrogênio e peróxido de hidrogênio com Atividade da SOD

O gráfico mostra o comportamento do controle, sementes osmocondicionadas + PEG + secagem lenta e osmocondicionadas + ABA + secagem rápida que apesar de apresentarem altas concentrações das proteínas termorresistentes não mantiveram a viabilidade, como comprovado pelo teste de Envelhecimento Acelerado. Mesmo tendo uma redução na viabilidade as sementes do osmocondicionadas + sem secagem apresentaram baixas concentrações de proteínas termorresistentes e tiveram desempenho melhor em relação aos tratamentos acima citados, devido à ação do sistema antioxidante que pode promover melhora no vigor das sementes (UMAIR et al., 2012).

Quanto à correlação das proteínas e o peróxido apesar de positivas, tratamentos como: osmocondicionadas + ABA + secagem rápida, osmocondicionadas + PEG + secagem rápida, osmocondicionadas + PEG + secagem lenta e osmocondicionadas + choque de calor + secagem lenta não apresentaram maior concentração de peróxido, ou seja, a ação do estresse não promoveu acúmulo inicial de peróxido e nem esse funcionou como sinalizador

para estas sementes. Neste caso, o peróxido passa a ser um agente deletério para estas sementes (BAILLY et al., 2004). Apenas para o choque de frio associado à secagem lenta e rápida o peróxido pode ter funcionado como um sinalizador para a síntese de proteínas termorresistentes (AHMAD et al., 2012), no entanto estas não conferiram maior viabilidade.

A correlação positiva entre a SOD e  $H_2O_2$  evidencia o mecanismo de acúmulo deste composto por meio da atividade da SOD para os tratamentos osmocondicionadas + choque de frio + secagem rápida, osmocondicionadas + choque de frio + secagem lenta, osmocondicionadas + choque de calor + secagem lenta, osmocondicionadas + secagem rápida e osmocondicionadas + secagem lenta. Enquanto o osmocondicionadas + sem secagem, apesar da maior atividade da SOD não apresentou acúmulo do peróxido de hidrogênio.

Através da análise de componentes principais constatou-se que o peróxido de hidrogênio, proteínas termorresistentes e atividade da SOD estão proximamente relacionadas e antagônicas a formação do MDA, enquanto as variáveis fisiológicas são intimamente correlacionadas e, mesmo que não tão próximas, são influenciadas pelas variáveis bioquímicas (peróxido de hidrogênio, proteínas termorresistentes e atividade da SOD), as quais exercem menor peso na variância dos dados (Figura 9).

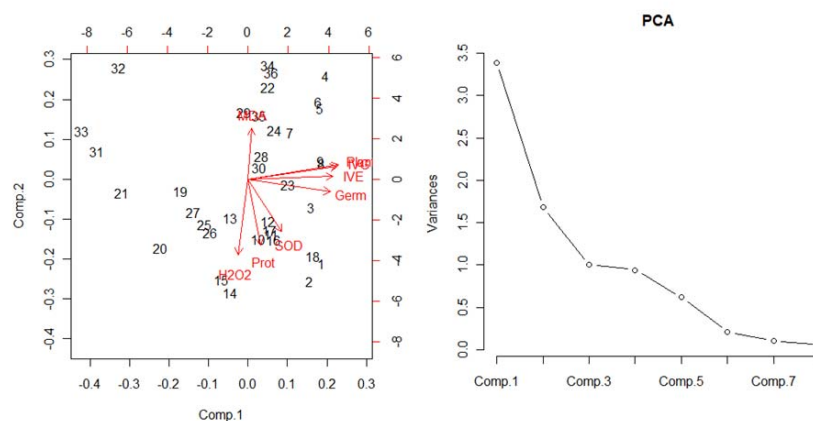


Figura 9 Gráficos de Componentes principais correlacionando a todas as variáveis e Gráfico da variância dos componentes onde os componentes do eixo x são: Comp. 1= %Germinação, Comp. 2= %Plântulas, Comp. 3= IVG, Comp. 4= IVE, Comp. 5= Atividade da SOD, Comp. 6= Conc. MDA, Comp. 7= Conc. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Comp. 8= Conc. Prot. Termo.

Nas sementes de tomate ação do sistema antioxidante, no caso, a atividade da SOD é um fator que permite a manutenção da viabilidade nas sementes osmocondicionadas sem secar através do combate as espécies reativas de oxigênio (EROs) (BAILLY et al., 2000). Já nas sementes secas o acúmulo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode agir como sinalizador para a síntese das proteínas termorresistentes que conferem proteção à dessecação através da recuperação de proteínas em processo de desnaturação e evita a agregação de moléculas (WISE; TUNNACLIFFE, 2004).

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que a secagem lenta foi eficaz na manutenção da viabilidade das sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Carmem) condicionadas osmoticamente. Além disso, técnicas envolvendo a tolerância cruzada não apresentaram os benefícios esperados na reindução à tolerância à dessecação das sementes de tomate osmocondicionadas. Contudo uso do regulador de crescimento ABA associado à secagem parece não ser uma boa alternativa por reduzir a germinação e outras variáveis fisiológicas.

## REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. et al. **Eletrofrese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: UFV, 1991. 242 p.

AHMAD, I. et al. Effect of seed priming with ascorbic acid, salicylic acid and hydrogen peroxide on emergence, vigor and antioxidant activities of maize. **African Journal of Biotechnology**, Faisalabad, v. 11, n. 5, p. 1127-1132, Jan. 2012.

ANGELOVICI, R. et al. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 211-218, 2010.

ARGERICH, C.; BRADFORD, K. J; TARQUIS, A. M. The effects of priming and ageing on resistance to deterioration of tomato seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 593-598, 1989.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, Wallingford, n. 14, p. 93-107, 2004.

BAILLY, C. et al. Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 10, p. 35-42, 2000.

BAILLY, C. et al. Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 396, p. 475-483, 2004.

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-Aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Washington, v. 116, p. 651-658, 1998.



BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. **Plant Physiology**, Washington, v. 100, p. 225-230, 1992.

BORISJUK, L.; ROLLETSCHEK, H. The oxygen status of the developing seed. **New Phytologist**, Cambridge, n. 182, p. 17-30, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 2, p. 248-254, 1976.

BUITINK, J. et al. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 13, p. 273-286, 2003.

CATUSSE, J.; JOB, C.; JOB, D. Transcriptome and proteome-wide analyses of seed germination. **Comptes Rendus Biologies**, Lyon, v. 331, p. 815-822, 2008.

CHEN, K.; ARORA, R. Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). **Plant Science**, Limerick, v. 180, p. 212-220, 2011.

CHIU, K. Y.; CHUANG, S. J.; SUNG, J. M. Both anti-oxidation and lipid-carbohydrate conversion enhancements are involved in priming-improved emergence of *Echinacea purpurea* seeds that differ in size. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, n. 108, p. 220-226, 2006.

DAT, J. et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 57, p. 779-795, 2000.

DELOUCHE, J. C.; BASKIN, C. C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, p. 427-452, 1973.

EL-ARABY, M. ; HEGAZI, A. Z. Response of tomato seeds to hydro- and osmo-priming, and possible relations of some antioxidant enzymes and endogenous polyamine fractions. **Egyptian Journal of Biology**, Cairo, v. 6, p. 81-93, 2004.

FARHOUDI, R.; SAEEDIPOUR, S.; MOHAMMADREZA, D. The effect of NaCl seed priming on salt tolerance, antioxidant enzyme activity, proline and carbohydrate accumulation of Muskmelon (*Cucumis melo* L.) under saline condition. **African Journal of Agricultural Research**, South African, v. 6, n. 6, p. 1363-1370, 2011.

FARIA, J. M. R. et al. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 418, p. 2119-2130, Aug. 2005.

FINCH-SAVAGE, W. E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, Cambridge, n. 171, p. 501-523, 2006.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Washington, v. 59, p. 309-314, 1977.

GOVINDEN-SOULANGE, O.; LEVANTARD, M. Comparative studies of seed priming and pelleting on percentage and meantime to germination of seeds of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **African Journal of Agricultural Research**, South African, v. 3, n. 10, p. 725-731, Oct. 2008.

GURUSINGHE, S.; POWELL, A. L. T.; BRADFORD, K. J. Enhanced expression of BiP is associated with treatments that extend storage longevity of primed tomato seeds. **Journal American Society Scientific**, Davis, v. 127, n. 4, p. 528-534, 2002.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in Tobacco leaves. **Plant Physiology**, Washington, v. 84, p. 450-455, 1987.

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, set. 2001.

JOSÉ, A. C. et al. Effects of drying rate and storage time on *Magnolia ovata* Spreng. seed viability. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 39, n. 2, p. 425-434, July 2011.

LIN, R. H. et al. Slow post-hydration drying improves initial quality but reduces longevity of primed bitter melon seeds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p.114-124, Aug. 2005.

LIU, Y. et al. Effects of osmotic priming on dormancy and storability of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 6, p. 49-55, 1996.

MAUROMICALE, G.; CAVALLARO, V. Effects of seed osmopriming on germination of tomato at different water potential. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 23, n. 2, p. 393-403, 1995.

MUKHTAR, I.; BAJWA, R. Effect of aqueous extracts of some weeds on germination and seedling growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* MILL.). **Pakistan Journal of Phytopathology**, Punjab Lahore, v. 23, n. 2, p. 138-143, 2011.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant And Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NASCIMENTO, W. M. **Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças**. Brasília: Embrapa, 2004. 12 p. (Circular Técnica, 33).

NASCIMENTO, W. M. Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças visando à germinação em condições de temperaturas baixas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 211-214, 2005.

NAWAZ, A. et al. Effect of halopriming on germination and seedling vigor of tomato. **African Journal of Agricultural Research**, South African, v. 6, n. 15, p. 3551-3559, Aug. 2011.

PANOBIANCO, M.; MARCOS FILHO, J. Envelhecimento acelerado e deterioração controlada em sementes de tomate. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 3, p. 525-531, set. 2001.

REUZEAU, C.; CAVALIE, G. Activities of free radical processing enzymes in dry sunflower seeds. **New Phytologist**, Cambridge, v. 130, p. 59-66, 1995.

SINHA, S.; SAXENA, R.; SINGH, S. Chromium induced lipid peroxidation the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes. **Chemosphere**, Oxford, v. 58, n. 5, p. 595-604, 2005.

UMAIR, A. et al. Effects of seed priming on the antioxidant enzymes activity of Mungbean (*Vigna radiata*) seedlings. **Pakistan Journal of Nutrition**, Islamabad, v. 11, n. 2, p. 140-144, 2012.

VARIER, A.; VARI, A. K.; DADLANI, M. The subcellular basis of seed priming. **Current Science**, Columbus, v. 99, n. 4, p. 450-456, 2010.

VIEIRA, C. V. **Germinação e re-indução de tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Tabebuia impetiginosa* e *Alliaria petiolata***. 2008. 84 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

YANG, Y. et al. Germination, osmotic adjustment and antioxidant enzyme activities of gibberellin-pretreated *Picea asperata* seeds under water stress. **New Forests**, Chengdu, v. 39, p. 231-243, 2010.

WISE, M. J.; TUNNACLIFFE, A. POPP the question: what do LEA proteins do? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 13-17, Jan. 2004.