

**TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM
SEMENTES DE *Leucaena leucocephala*
DURANTE A GERMINAÇÃO**

JULIO MAIA DE OLIVEIRA

2009

JULIO MAIA DE OLIVEIRA

**TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE *Leucaena
leucocephala* DURANTE A GERMINAÇÃO**

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

Orientador

Prof. Dr. José Márcio Rocha Faria

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

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

Oliveira, Julio Maia de.

Tolerância à dessecação em sementes de *Leucaena leucocephala*
durante a germinação / Júlio Maia de Oliveira. – Lavras : UFLA, 2009.
70 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.
Orientador: José Márcio Rocha Faria.
Bibliografia.

1. Sensibilidade à dessecação. 2. Conteúdo de DNA. 3. Integridade
de DNA. 4. Análise ultraestrutural. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 634.9562

JULIO MAIA DE OLIVEIRA

**TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE *Leucaena
leucocephala* DURANTE A GERMINAÇÃO**

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

APROVADA em 3 de março de 2009.

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães

UFLA

Prof. Dra. Queila de Souza Garcia

UFLA

Prof. Dr. José Marcio Rocha Faria

UFLA

(orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

2005

A Deus, minha família e amigos,

OFEREÇO.

A todos que, por alguma razão, buscam no conhecimento soluções para
as suas inquietações,

DEDICO.

*“Basta amar para escolher bem;
O diabo que fosse era sempre boa escolha.”*

Machado de Assis

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, aos familiares, aos amigos e a meus mentores que, ao longo de minha formação, não hesitaram em compartilhar suas experiências acumuladas.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciências Florestais, em especial ao Setor de Sementes, pela oportunidade de realização da pós-graduação.

À Fapemig, pelo auxílio financeiro

Aos meus professores e orientadores, Dr. José Márcio Rocha Faria (orientador) e Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva (coorientador), pela orientação, exemplo de ética na ciência e confiança em meu trabalho.

Aos professores, técnicos e alunos dos laboratórios de Sementes Florestais, Melhoramento Vegetal e Recursos Genéticos, Citogenética, Microscopia Eletrônica de Transmissão e Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras.

Aos meus colegas de laboratório, sem os quais não teria atingido meus objetivos, uma vez que a amizade e a coesão deste grupo foram essenciais para que, mesmo longe de casa, me sentisse acolhido por uma família.

Aos meus novos amigos de Lavras que, em tão pouco tempo de convivência, demonstraram ser pessoas de valor e às quais estarei ligado para sempre.

A minha namorada, pelo seu amor, compreensão, companheirismo e paciência.

Finalmente, agradeço a minha família, pelo apoio emocional, financeiro e pela compreensão de minha ausência.

OBRIGADO!

BIOGRAFIA

JULIO MAIA DE OLIVEIRA, filho de Cláudio Antônio Lara de Oliveira e Loanda Maia Silva, nasceu em 24 de abril de 1984, em Varginha, MG. Passou sua infância em Boa Esperança, MG e retornou a Varginha para finalizar os estudos do segundo grau, hoje ensino médio. Em agosto de 2002, iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Minas Gerais, concluindo-o em setembro de 2006. Durante esse período, estagiou nos laboratórios de Mecanismos Gerais de Infecção Fúngica (Departamento de Microbiologia), Interação Microrganismos/Plantas (Departamento de Botânica) e participou do programa de mobilidade estudantil (Convênio ANDIFES), com permanência de um semestre na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Em março de 2007, ingressou no Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Ciências Florestais, na UFLA, concluindo-o com a defesa desta dissertação.

SUMÁRIO

	Página
Resumo Geral.....	i
General Abstract.....	ii
CAPÍTULO 1.....	1
1 Introdução Geral.....	2
2 Referências Bibliográficas.....	6
CAPÍTULO 2: Perda da tolerância à dessecação em sementes de <i>Leucaena Leucocephala</i> durante e após a germinação.....	10
Resumo.....	11
Abstract.....	12
1 Introdução.....	13
2 Objetivo.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 Material e Métodos.....	17
4 Resultados e discussão.....	21
5 Conclusões.....	34
6 Referências bibliográficas.....	36
CAPÍTULO 3: Efeitos da dessecação em sementes germinadas de <i>Leucaena leucocephala</i> : integridade do DNA e danos ultraestruturais.....	41
Resumo.....	42
Abstract.....	43
1 Introdução.....	44
2 Objetivo.....	47
2.1 Objetivo geral.....	47
2.2 Objetivos específicos.....	47
3 Material e Métodos.....	48
4 Resultados e discussão.....	52
5 Conclusões.....	63
6 Referências bibliográficas.....	65
Considerações finais.....	70

RESUMO GERAL

OLIVEIRA, Julio Maia de. **Tolerância à dessecação em sementes de *Leucaena leucocephala* durante a germinação.** 2009. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Objetivou-se, com o presente estudo, buscar um modelo para a avaliação da sensibilidade à dessecação e, por meio de técnicas como eletroforese, citometria de fluxo e microscopia eletrônica de transmissão, investigar as alterações citológicas relacionadas à perda da tolerância à dessecação em radículas e raízes primárias de *Leucaena leucocephala* durante e após a germinação. Para tal, sementes germinadas com raízes de 1, 3 e 5 mm foram dessecadas em sílica gel até atingirem 50%, 40%, 30%, 20% e 8% de umidade, reidratadas e avaliadas quanto à sobrevivência. Radículas e raízes primárias (16, 24, 40 e 44 horas de embebição) foram coletadas e seu conteúdo de DNA nuclear foi mensurado por citometria de fluxo. Sementes germinadas com raiz primária de 3 mm foram secas (50%, 40%, 30%, 20% e 8% de umidade) e suas raízes avaliadas quanto à integridade do DNA e à ocorrência de danos ultraestruturais. A sensibilidade à dessecação aumentou ao longo da germinação. No entanto, independente do comprimento de radícula, as sementes germinadas apresentaram baixa ou nenhuma sobrevivência após secagem até 8% de umidade. A maioria dos núcleos avaliados ao longo da embebição e após a protrusão radicular apresentou um maior conteúdo de DNA 2C, indicando que a maior parte das células avaliadas encontrava-se na fase G₁ do ciclo celular. O percentual de núcleos 4C apresentou aumento significativo ($p > 0,05$) após 24 horas de embebição e atingiu seu máximo quando o comprimento da raiz primária atingiu 1 mm, coincidindo com a redução da capacidade das sementes de tolerarem a dessecação. O padrão eletroforético referente à integridade do DNA genômico, demonstrou não haver degradação do DNA ao longo da secagem. No entanto, a intensidade e a extensão dos danos ultraestruturais observados foram suficientemente grandes para anular a resiliência das células das raízes primárias e a consequente habilidade para retomar o crescimento normal.

Palavras chave: Sensibilidade à dessecação, conteúdo de DNA, integridade do DNA, microscopia eletrônica.

* Comitê Orientador: Dr. José Marcio Rocha Faria – UFLA (Orientador); Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva – UFLA (Co-orientador).

GENERAL ABSTRACT

OLIVEIRA, Julio Maia de. **Desiccation tolerance in *Leucaena leucocephala* seeds during germination**. 2009. 70 p. Dissertation (Master Degree in Forest Engineering) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

This study aimed to search a model system which can improve studies on desiccation tolerance and sensitivity in seeds, and using techniques such as electrophoresis, flow cytometry and transmission electron microscopy to investigate cytological changes related to the loss of desiccation tolerance in *Leucaena leucocephala* radicles and primary roots during and after germination. In order to do that, germinated seeds with radicles of 1, 3 and 5 mm were desiccated in silica gel (50, 40, 30, 20 and 8% moisture content - MC), rehydrated and their survival was evaluated. Radicles of *Leucaena leucocephala* (16, 24, 40 and 44 hours of imbibition) were collected and their nuclear DNA content was measured by flow cytometry. Germinated seeds (3 mm primary root length) were dried up to 50, 40, 30, 20 and 8% MC, and the radicles were evaluated regarding DNA integrity by electrophoresis. The occurrence of ultrastructural damages was evaluated by transmission electron microscopy. As expected, the desiccation sensitivity increased during germination. However, regardless of the radicle length, the germinated seeds showed low or no survival after drying up to 8% MC. Most of the evaluated nuclei along the imbibition and after radicle protrusion presented a higher 2C DNA content indicating that most of the evaluated cells were in the G₁ phase of the cell cycle. The number of 4C nuclei showed significant increase ($p > 0.05$) after 24 hours of imbibition and the highest value was observed after radicle protrusion when the length of the primary root reached 1 mm coinciding with a decrease in desiccation tolerance of the *L. leucocephala* seeds. The genomic DNA electrophoretic pattern obtained from primary roots of *L. leucocephala* showed no DNA degradation throughout the desiccation. Although the DNA had remained intact throughout the drying, the intensity and extent of the ultrastructural damages were severe enough to override the resilience of *L. leucocephala* primary roots cells and their consequent ability to resume normal growth.

Key words: Desiccation sensitivity, DNA content, DNA integrity, electron microscopy.

* Guidance Comittee: Dr. José Marcio Rocha Faria – UFLA (Advisor); Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva – UFLA (Co-advisor).

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

Dentre as plantas, a tolerância à dessecação (TD) é comum em briófitas (Proctor & Tuba, 2002; Oliver et al., 2005) e muito rara em indivíduos adultos de pteridófitas e angiospermas (Porembski & Barthlott, 2000). No entanto, esta é uma característica comum de seus esporos, sementes e pólen (Dickie & Prichard, 2002; Tweddle et al., 2003; Farnsworth, 2004; Illing et al., 2005).

Durante seu ciclo de vida, as angiospermas passam por estágios de tolerância e vulnerabilidade à dessecação, nos quais adquirem e perdem a capacidade de resistir a baixos teores de água. O pólen, na maioria das vezes, é extremamente tolerante a perdas de água, no entanto, após a fecundação e durante a embriogênese, as sementes não toleram grandes reduções em seus teores de água sem que haja danos significativos em suas estruturas e perda de viabilidade. Posteriormente à deposição de reservas, quando as sementes se encontram nos estágios finais do desenvolvimento, elas podem se tornar dormentes e dessecar. Finalmente, as sementes são, então, dispersas e estão aptas a germinar, tornando-se, ao final desse processo e concomitantemente à protrusão de radícula, novamente intolerantes à dessecação (Leprince et al., 1990; Hong & Ellis, 1992; Bewley & Black, 1994).

Para o homem, o principal estágio deste ciclo é quando a planta está sob a forma de semente, pois esta é a base da alimentação, servindo de fonte direta e indireta de energia, proteínas e outros elementos. Além disso, as sementes são o principal meio de propagação das plantas através do espaço e do tempo. Portanto, boas metodologias de armazenamento de sementes são fundamentais, uma vez que é necessário preservar e propagar as espécies vegetais.

Segundo seu comportamento quanto ao armazenamento e sensibilidade à dessecação, as sementes foram categorizadas em ortodoxas, recalcitrantes (Roberts, 1973) e intermediárias (Ellis et al., 1990). Embora essa classificação

venha sendo utilizada há algumas décadas, alguns autores sugerem a existência de um contínuo na sensibilidade à dessecação, assim como existe um contínuo nas variáveis ambientais (Farrant et al., 1988; Sun, 1999; Sun & Liang, 2001; Song et al., 2003). Eles afirmam que a aparente discrição dos graus críticos de teor de água se deve à falta de estudos para esta característica e também que esta é a causa da divisão das sementes, quanto à sensibilidade à dessecação, em grupos distintos.

A compreensão da razão dessas diferenças, cada vez mais, está se mostrando útil, uma vez que vários mecanismos têm sido sugeridos como estando relacionados com a tolerância à dessecação de sementes ortodoxas.

Sementes da maioria das espécies cultivadas, tais como cevada, milho, soja, arroz, trigo, feijão e sorgo, dentre outras são tolerantes à dessecação, sendo, assim, classificadas como ortodoxas. Entretanto, mais de 60 famílias de angiospermas contêm representantes que produzem sementes sensíveis à perda de água e estima-se que aproximadamente 70% das espécies, especialmente de climas úmidos, produzam sementes recalcitrantes, o que dificulta ou mesmo impede sua conservação, ainda que em médio prazo (Hong & Ellis, 1996; Berjak & Pammenter, 2001).

As respostas quanto à secagem são multivariadas e postula-se que alguns mecanismos estejam envolvidos com a aquisição de TD. Para que um organismo seja totalmente tolerante à dessecação são necessários síntese de ácido abscísico (ABA), redução da vacuolização, deposição de reservas insolúveis, manutenção da integridade e funcionalidade do citoesqueleto, proteção do DNA, desligamento do metabolismo, presença de um sistema antioxidante eficiente, presença de moléculas protetoras, tais como LEAs e açúcares, como a sacarose e a estaquiose, além de mecanismos de reparo durante a embebição (Bruggink & Toorn, 1995; Black et al., 1999; Berjak & Pammenter, 2000; Sreedhar et al., 2002; Buitink et al., 2003; Faria, 2006; Zhu et al., 2006). A insuficiência de um

ou mais desses mecanismos pode significar a ausência de TD ou redução na capacidade de tolerar perdas acentuadas no conteúdo de água (Pammenter & Berjak, 1999).

Estudos com algumas espécies têm mostrado que é possível tanto aumentar quanto reinduzir tolerância à dessecação, respectivamente, em sementes colhidas e secas e em sementes germinadas. Portanto, o estudo da sensibilidade à dessecação em sementes ortodoxas germinadas pode ser um sistema modelo para a compreensão desta característica em sementes recalcitrantes (Bruggink & Toorn, 1995; Sun, 1999; Pukacka, 2001).

Muitos dos modelos experimentais adotados baseiam-se na avaliação da aquisição de TD ao longo do desenvolvimento das sementes (Blackman et al., 1992; Xu & Bewley, 1995; Nedeva & Nikolova, 1997; Black et al., 1999; Sreedhar et al., 2002; Illing et al., 2005; Buitink et al., 2006). Modelos de estudo que consigam isolar eventos correlatos à aquisição ou à perda da capacidade de tolerar a secagem são extremamente importantes para o avanço das pesquisas e para o entendimento dos mecanismos envolvidos com a perda da TD.

Conforme mencionado, as nuances envolvidas na aquisição de TD são muitas e, portanto, estudos visando descobrir e avaliar mecanismos relacionados à aquisição e à perda da tolerância à dessecação são desejáveis. Estudos desta natureza estão em estágio inicial e técnicas para avaliações citológicas, tais como citometria de fluxo e microscopia eletrônica de transmissão, podem fornecer informações úteis.

Sabe-se que o ponto em que a TD começa a ser perdida, se forem levados em conta o tempo de embebição e o comprimento das raízes primárias após a protrusão, varia de espécie para espécie (Hong & Ellis, 1992; Leprince et al., 2000; Buitink et al., 2003; Koster et al., 2003; Masetto, 2008) e fatores, tais como integridade do DNA e danos ultraestruturais, relacionam-se diretamente

com a perda da TD em sementes germinadas (Berjak & Pammenter, 2000; Masetto et al., 2008).

Portanto, com o objetivo de estudar mecanismos associados à sensibilidade à dessecação, um modelo baseado em sementes germinadas de *Leucena leucocephala* foi proposto.

L. leucocephala, comumente conhecida como leucena, é uma Leguminosae-Mimosoideae de distribuição pantropical. Atualmente, a leucena é cultivada ou naturalizou-se ao redor do mundo entre as latitudes 25°N e 20°S (Skerman, 1977; Parrota, 1992). Suas sementes, produzidas anualmente e em grande quantidade, são ortodoxas e apresentam dormência tegumentar facilmente superável, após o quê, alcança elevados índices de germinação.

Sendo assim, objetivou-se, com a realização do presente estudo, buscar um modelo para a avaliação da sensibilidade à dessecação, baseado em sementes germinadas e, por meio de técnicas como eletroforese, citometria de fluxo e microscopia eletrônica de transmissão, investigar as alterações no DNA (integridade e conteúdo) e citológicas relacionadas à perda da tolerância à dessecação em radículas e em raízes primárias de sementes de *L. leucephala*, durante e após a germinação.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Fortaleza, v. 12, p. 22-55, 2000. Edição especial.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Seed recalcitrance: current perspectives. **South African Journal of Botany**, Johannesburg, v. 67, n. 2, p. 79-89, Apr. 2001.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.

BLACK, M.; CORBINEAU, F.; GEE, H.; COME, D. Water content, raffinose and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 120, n. 2, p. 463-471, Feb. 1999.

BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 100, n. 1, p. 225-230, Jan. 1992.

BRUGGINK, G. T.; TOORN, P. V. T. Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. **Seed Science Research**, Wallington, v. 9, n. 1, p. 49-53, Mar. 1995.

BUITINK, J.; LEGER, J. J.; GUISE, I.; LY-VU, B.; WUILLÈME, S.; LE BARS, A.; LE MEUR, N.; BECKER, A.; KÜSTER, H.; LEPRINCE, O. Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation sensitive to tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. **Plant Journal**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 735-750, Sept. 2006.

BUITINK, J.; VU, B. L.; SATOUR, P.; LEPRINCE, O. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn: seeds. **Seed Science Research**, Wallington, v. 13, n. 4, p. 273-286, Dec. 2003.

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

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

FARIA, J. M. R. **Desiccation tolerance and sensitivity in *Medicago truncatula* and *Inga vera* seeds**. 2006. 135 p. Thesis (Ph.D. in Plant Physiology) - Wageningen University, Wageningen.

FARNSWORTH, E. Hormones and shifting ecology throughout plant development. **Ecology**, New York, v. 85, n. 1, p. 5-15, Jan. 2004.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Recalcitrance: a current assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 16, n. 11, p. 155-166, Nov. 1988.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. The survival of germinating orthodox seeds after desiccation and hermetic storage. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 239-247, Feb. 1992.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 64 p. (IPGRI Technical Bulletin, 1).

ILLING, N.; DENBY, K. J.; COLLETT, H.; SHEN, A.; FARRANT, J. M. The signature of seeds in resurrection plants: a molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. **Integrative and Comparative Biology**, San Diego, v. 45, n. 5, p. 771-787, Nov. 2005.

KOSTER, K. L.; REISDORPH, N.; RAMSAY, J. L. Changing desiccation tolerance of pea embryo protoplasts during germination. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 387, p. 1607-1614, June 2003.

LEPRINCE, O.; DELTOUR, R.; THORPE, P. C.; ATHERTON, N. W.; HENDRY, G. A. F. The role of free radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays*). **New Phytologist**, Cambridge, v. 116, n. 4, p. 573-580, Apr. 1990.

LEPRINCE, O.; HARREN, F. J. M.; BUITINK, J.; ALBERDA, M.; HOEKSTRA, F. A. Metabolic dysfunction and unabated respiration preced the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 122, n. 2, p. 597-608, Feb. 2000.

MASETTO, T. E. **Restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Sesbania virgata* e *Cedrela fissilis***. 2008. 82 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MASETTO, T. E.; FARIA, J. M. R.; DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A. da. Desiccation tolerance and DNA integrity in *Eugenia pleurantha* O. Berg.(myrtaceae) seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 30, n. 2, p. 51-56, Mar./Apr. 2008.

NEDEVA, D.; NIKOLOVA, A. Desiccation tolerance in developing seeds. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Lancaster, v. 23, n. 3/4, p. 100-113, Aug. 1997.

OLIVER, M. J.; VELTEN, J.; MISHLER, B. D. Desiccation tolerance in bryophytes: a reflection of the primitive strategy for plant survival in dehydration habitats. **Integrative and Comparative Biology**, San Diego, v. 45, n. 5, p. 788-799, Nov. 2005.

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

PARROTA, J. A. ***Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. Leucaena, tantan. Leguminosae (Mimosoideae) Legume family**. New Orleans: USDA Forest Service/Southern Forest Experiment Station, 1992. 8 p.

POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as centers of diversity for desiccation-tolerant vascular plants. **Plant Ecology**, New York, v. 151, n. 1, p. 19-28, Nov. 2000.

PROCTOR, M. C. F.; TUBA, Z. Poikilohydry and homoihydry: antithesis or spectrum of possibilities? **New Phytologist**, Lancaster, v. 156, n. 3, p. 327-349, Nov. 2002.

PUKACKA, S. Loss of tolerance to desiccation in germinated Norway maple (*Acer platanoides* L.) seeds: changes in carbohydrate content. **Dendrobiology**, Kórnik, v. 46, p. 43-48, 2001.

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

SKERMAN, P. J. **Tropical forage legumes**. Rome: FAO, 1977. 609 p.

SONG, S. Q.; PATRICIA, B.; PAMMENTER, N.; NTULI, T. M.; FU, J. R. Seed recalcitrance: a current assessment. **Acta Botanica Sinica**, Xiangshan, v. 45, n. 6, p. 638-643, June 2003.

SREEDHAR, L.; WOLKERS, W. F.; HOEKSTRA, F. A.; BEWLEY, J. D. In vivo characterization of the effects of abscisic acid and drying protocols associated with the acquisition of desiccation tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. **Annals of Botany**, London, v. 89, n. 4, p. 391-400, Apr. 2002.

SUN, W. Q. Desiccation sensitivity of recalcitrant seeds and germinated orthodox seeds: can germinated orthodox seeds serve as a model system for studies of recalcitrance? In: IUFRO SEED SYMPOSIUM, 1998, Kuala Lumpur, Malaysia. **Proceedings...** Kuala Lumpur: FRIM, 1999. p. 29-42.

SUN, W. Q.; LIANG, Y. H. Discrete levels of desiccation sensitivity in various seeds as determined by the equilibrium dehydration method. **Seed Science Research**, Wallington, v. 11, n. 4, p. 317-323, Dec. 2001.

TWEDDLE, J. C.; DICKIE, J. B.; BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. **Journal of Ecology**, Cambridge, v. 91, n. 2, p. 294-304, Apr. 2003.

XU, N.; BEWLEY, J. D. The role of abscisic acid in germination, storage protein synthesis and desiccation tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) seeds, as shown by inhibition of its synthesis by fluridone during development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, n. 6, p. 687-694, June 1995.

ZHU, C.; LI, L. P.; LIU, X. Changes in sugars during rice seed desiccation. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 53, n. 2, p. 198-204, Apr. 2006.

CAPÍTULO 2

PERDA DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE *Leucaena leucocephala*, DURANTE E APÓS A GERMINAÇÃO

RESUMO

Leucaena leucocephala (leucena) é uma espécie arbórea encontrada em toda a região tropical. Suas sementes, produzidas anualmente e em grande quantidade, são ortodoxas e apresentam dormência tegumentar facilmente superável, após o quê alcança elevados índices de germinação. Por essas características, apresenta potencial para uso como espécie modelo na pesquisa com sementes. Sendo assim, objetivou-se, com a realização deste estudo, caracterizar o padrão de embebição, a germinação e a perda da tolerância à dessecação (TD) em sementes dessa espécie, como um primeiro passo na busca de um modelo experimental para um entendimento mais profundo da tolerância e da sensibilidade à dessecação em sementes. Além disso, foi mensurado o conteúdo de DNA nuclear, ao longo e após a germinação, como uma primeira indicação dos mecanismos envolvidos na perda da TD. Para a caracterização dessa perda, sementes germinadas com raízes de 1, 3 e 5 mm foram desseccadas em sílica gel até atingirem graus de umidade de 50%, 40%, 30%, 20% e 8%. Após a secagem, as sementes foram reidratadas e avaliadas quanto à sobrevivência. Radículas e raízes primárias de leucena (16, 24, 40 e 44 horas de embebição) foram coletadas e seu conteúdo de DNA nuclear foi mensurado por citometria de fluxo. Conforme esperado, a sensibilidade à dessecação aumentou ao longo da germinação. No entanto, independente do comprimento de radícula, as sementes germinadas apresentaram baixa ou nenhuma sobrevivência após secagem até 8% de umidade. A maioria dos núcleos avaliados ao longo da embebição e após a protrusão radicular apresentou maior conteúdo de DNA 2C, indicando que a maior parte das células avaliadas encontrava-se na fase G₁ do ciclo celular. O percentual de núcleos 4C apresentou aumento significativo ($p>0,05$) após 24 horas de embebição, tendo o maior valor encontrado sido observado após a protrusão radicular quando o comprimento da raiz primária atingiu 1 mm, coincidindo com a redução da capacidade das sementes de *L. leucocephala* tolerarem a dessecação.

Palavras chave: germinação, tolerância à dessecação, ciclo celular, sementes florestais.

ABSTRACT

Leucaena leucocephala (leucaena) trees grow throughout the tropical region. Its seeds, produced annually in large amounts, are orthodox, with an easily released coat-imposed dormancy, after what reach high rates of germination. For these characteristics, it has a potential to be used as a model species for seed research. Therefore, this study aimed to investigate the imbibition pattern, germination and the loss of desiccation tolerance (DT) in *L. leucocephala* seeds, as a first step to search a convenient model system which can improve studies on desiccation tolerance and sensitivity in seeds. Furthermore, the nuclear DNA content was assessed during and after germination, as a first indication of the mechanisms involved in the loss of DT in *L. leucocephala* radicle tips. To characterize the loss of DT, germinated seeds with radicles of 1, 3 and 5 mm long were dehydrated in closed boxes containing silica gel until they reached moisture contents of 50, 40, 30, 20 and 8%. After the drying process, the seeds were pre-humidified, rehydrated and their survival was evaluated. Radicles (16, 24, 40 and 44 hours of imbibition) were collected and their nuclear DNA content was measured by flow cytometry. As expected, the desiccation sensitivity increased during germination. However, regardless of the radicle length, the germinated seeds showed low or no survival after drying up to 8% moisture content. Most of the evaluated nuclei along the imbibition and after radicle protrusion presented a higher 2C DNA content indicating that most of the evaluated cells were in the G₁ phase of the cell cycle. The number of 4C nuclei increased significantly ($p > 0.05$) after 24 hours of imbibition and the highest value was observed after radicle protrusion when the length of the primary root reached 1 mm coinciding with a decrease in desiccation tolerance of the seeds.

Key words: germination, desiccation tolerance, cell cycle, tree seeds.

1 INTRODUÇÃO

Sementes ortodoxas adquirem tolerância à dessecação (TD) ao final da maturação, concomitantemente ao acúmulo de reservas (Bewley & Black, 1994). Ao contrário, sementes recalcitrantes não adquirem TD durante seu desenvolvimento, sendo dispersas com graus de umidade elevados e com longevidade muito limitada (Berjak & Pammenter, 2001).

A maioria das espécies cultivadas produz sementes tolerantes à dessecação. Entretanto, boa parte das espécies arbóreas, especialmente de climas úmidos, produz sementes sensíveis à perda de água, o que dificulta ou mesmo impede sua conservação, ainda que em médio prazo. Sendo assim, a compreensão dos aspectos fisiológicos, morfológicos, citológicos e moleculares que regem a sensibilidade à dessecação em sementes recalcitrantes tem fundamental importância no desenvolvimento de estratégias para prolongar a conservação “ex-situ” dessas espécies.

Embora as implicações da suscetibilidade à secagem tenham sido evidenciadas (Chin & Roberts, 1980), estudos relativos às respostas das sementes a esse estresse estão ainda em estágio inicial, principalmente para sementes recalcitrantes (Sun, 1999). Isso ocorre, em parte, devido à dificuldade de seu armazenamento e à conseqüente baixa disponibilidade de material para pesquisa (Faria, 2006). A falta de um sistema modelo para o estudo da sensibilidade à dessecação em sementes também tem sido apontada como uma das causas para o lento progresso na compreensão da recalcitrância (Bray, 1993).

Em dois momentos as sementes ortodoxas mostram sensibilidade à dessecação, conseqüentemente assemelhando-se às recalcitrantes: no início de seu desenvolvimento e já maduras, quando são embebidas e entram em processo

germinativo. Portanto, a utilização de sementes ortodoxas em suas fases sensíveis à dessecação pode funcionar como um modelo para estudos da sensibilidade à dessecação em sementes. Vários estudos sobre a aquisição da TD ao longo do desenvolvimento das sementes já foram realizados (Blackman et al., 1992; Xu & Bewley, 1995; Nedeva & Nikolova, 1997; Black et al., 1999; Sreedhar et al., 2002; Illing et al., 2005; Buitink et al., 2006), ao passo que pesquisas sobre a perda da TD durante a germinação são mais escassas (Lin et al., 1998; Buitink et al., 2003; Faria et al., 2005; Daws et al., 2007).

Um conjunto de fatores, tais como acúmulo de açúcares, mudanças em sistemas metabólicos e presença de sistemas de reparo durante a reidratação, tem sido apontado como causa da aquisição de TD em sementes ortodoxas. A ausência ou a ineficiência de um ou mais desses fatores pode ser crítica durante a secagem e é considerada a causa da sensibilidade à dessecação nas sementes recalcitrantes (Pammenter & Berjak, 1999). Dentre estes fatores está o ciclo celular, o qual tem sido apontado como um bom marcador do avanço do desenvolvimento e da perda da tolerância à dessecação em muitas espécies (Boubriak et al., 2000; Osborne, 2000; Osborne et al., 2002).

No ciclo celular, o conteúdo de DNA nuclear $2C$ é encontrado em células na fase de pré-síntese (G_1) e o $4C$, em células nas quais a replicação do DNA já ocorreu (G_2). A constante C denota o conteúdo de DNA para a condição haploide. Células na fase G_1 do ciclo celular ($2C$) são mais resistentes a estresses e possuem maior longevidade, quando comparadas a células na fase G_2 ($4C$) (Saracco et al., 1995). A passagem de um estado tolerante para um estado sensível à dessecação em sementes ortodoxas ainda não foi completamente desvendada, mas coincide com a entrada das células na fase G_2 , podendo ser uma das causas da sensibilidade à dessecação (Boubriak et al., 2000). Células de embriões de sementes secas de diferentes espécies possuem a maior parte de seu

DNA nuclear na fase G₁ e parece claro que, em geral, a fase M (mitose) ocorre concomitantemente ou logo após a protrusão radicular (Bewley & Black, 1994).

Sementes ortodoxas germinadas possuem diversas propriedades, as quais podem ser utilizadas para elucidar eventos estruturais, citológicos, bioquímicos, genéticos e ontogenéticos associados à sensibilidade à dessecação e ao comportamento no armazenamento.

Leucaena leucocephala (Lam.) De Wit., comumente conhecida como leucena, é uma Leguminosae-Mimosoideae encontrada em toda a região tropical. Atualmente, é cultivada ou naturalizou-se ao redor do mundo entre as latitudes 25°N e 20°S (Skerman, 1977; Parrota, 1992).

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho, geral e específicos, estão descritos a seguir.

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a perda da tolerância à dessecação, em sementes de *Leucaena leucocephala*, como um primeiro passo na busca de um modelo experimental para um entendimento mais profundo da tolerância e sensibilidade à dessecação em sementes e mensurar o conteúdo de DNA nuclear, ao longo e após a germinação, como uma primeira indicação dos mecanismos envolvidos na perda da TD.

2.2 Objetivos específicos

Caracterizar a perda da TD durante e após a germinação em sementes *L. leucocephala*.

Quantificar o conteúdo de DNA nuclear ao longo e após a germinação de sementes de *L. leucocephala*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal: as sementes de *Leucaena leucocephala* foram cedidas pelo Laboratório de Sementes Florestais da Universidade Federal de Lavras (Lote 3145). As coletas foram realizadas em fevereiro de 2007, no entorno de Lavras, MG, em, pelo menos, 20 matrizes. Após a coleta, as sementes foram armazenadas em sacos plásticos em câmara fria (40% UR a 10°C).

Determinação do grau de umidade: foram determinados os graus de umidade de sementes secas e germinadas (1, 3 e 5 mm de comprimento de raiz primária). Para tal, 120 sementes, divididas em quatro repetições de 30 sementes para cada tratamento, foram secas em estufa, a $103\pm 2^\circ\text{C}$, durante 17 horas (Brasil, 1992). Os graus de umidade foram expressos na base úmida.

Teste de germinação: em testes preliminares realizados com sementes de leucena foi observada a presença de dormência imposta pelo tegumento, portanto, para homogeneizar e acelerar a germinação, duas metodologias para superação da dormência foram utilizadas: 1) escarificação com lima metálica seguida de imersão em água destilada, por 16 horas, a 25°C e 2) imersão em água, a 96°C, por 1 hora e em água destilada, a 25°C, por 16 horas. Após esse período, as sementes foram postas para germinar em rolos de papel umedecidos com água destilada em germinadores, a 25°C, sob luz branca constante. Foram utilizadas 4 repetições de 25 sementes para cada tratamento. A germinação foi acompanhada diariamente e a protrusão radicular foi definida como critério para germinação. Sementes mortas e duras foram diferenciadas e contabilizadas por meio da observação do amolecimento de seus tecidos e o índice de velocidade da germinação foi calculado.

Curva de embebição: sementes de leucena foram escarificadas com auxílio de uma lima metálica e imersas em água destilada, a 25°C, durante 16

horas. Após esse período, as sementes foram dispostas em rolos de papel umedecidos e incubadas em germinadores, a 25°C, sob luz branca constante. Para a caracterização do padrão de embebição, o peso de 10 repetições de três sementes foi acompanhado ao longo do tempo (0, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas), com auxílio de uma balança analítica.

Curvas de secagem: após a germinação, as sementes germinadas foram agrupadas de acordo com o comprimento de suas raízes primárias (1, 3 e 5 mm), com auxílio de um paquímetro digital e uma curva de secagem para cada comprimento de raiz primária foi feita. Para tal, as sementes foram secas em caixas de secagem contendo sílica e a redução em seu peso acompanhada por pesagens sucessivas (0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 32, 57, 72 horas), durante três dias. Para a redução do erro derivado da precisão da balança, foram utilizadas 10 repetições de três sementes cada.

Caracterização da perda da tolerância à dessecação após a germinação: após o tratamento pré-germinativo (escarificação com lima metálica e imersão em água destilada, a 25°C, por 16 horas) e semeadura, conforme descrito anteriormente, quatro repetições de 20 sementes de cada categoria (1, 3 e 5 mm) foram amostradas para serem dessecadas em caixas de secagem contendo sílica gel até atingirem graus de umidade de 50%, 40%, 30%, 20% e 8%. Para a obtenção das sementes germinadas em quantidades suficientes para a realização dos testes, foi posto para germinar o dobro do número de sementes que se pretendia obter para cada classe. Utilizou-se a expressão proposta por Cromarty et al. (1985) para a estimativa do conteúdo de água pela diferença de massa:

$$Mf = Mi(100 - Ui) \times (100 - Uf)^{-1}, \text{ onde:}$$

Mf = massa da amostra (g) após a secagem;

M_i = massa da amostra (g) antes da secagem;
 U_i = grau de umidade (%) antes da secagem;
 U_f = grau de umidade (%) desejado após a secagem.

Sementes recém-germinadas (67% de umidade) foram utilizadas como controle e os dados obtidos nas curvas de secagem serviram de base para estimar o melhor momento para as pesagens. Após a desidratação, as sementes que atingiram grau de umidade igual ou inferior a 20% foram pré-umedecidas em câmara úmida (100% UR), por 24 horas, a 20°C, para prevenir danos causados pela embebição (Leopold & Vertucci, 1986). Posteriormente, as sementes foram reidratadas em rolos de papel umedecidos e acondicionadas conforme mencionado acima, para retomar seu crescimento. A sobrevivência foi avaliada observando-se a formação de plântulas normais. Foi observada também a sobrevivência das raízes primárias e a emissão de raízes laterais.

Avaliação da massa fresca: sementes de leucena foram germinadas e retiradas para a secagem após atingirem 3 mm de comprimento da raiz primária. Quatro repetições de vinte sementes foram secas em caixas contendo sílica até atingirem 50%, 40%, 30% e 20% de umidade. Após a secagem, as sementes germinadas foram pré-umedecidas em câmara úmida (100% UR), por 24 horas, a 20°C e, posteriormente, reidratadas em rolos de papel umedecidos e acondicionadas conforme mencionado anteriormente para retomar seu crescimento. A sobrevivência foi avaliada observando-se a formação de plântulas normais e a massa fresca foi obtida por pesagens das plântulas, após 7 dias, em balança analítica.

Avaliação do conteúdo de DNA nuclear: para a seleção de pontos para a avaliação do conteúdo de DNA nuclear, foi avaliada a perda da tolerância à dessecação ao longo da embebição, logo após a protrusão radicular e em sementes germinadas com raízes de um milímetro de comprimento. Para tal, quatro repetições de vinte sementes foram escarificadas com uma lima metálica,

imersas em água destilada, a 25°C, durante 16 horas e postas em rolos de papel umedecidos com água destilada em germinadores, a 25°C, sob luz branca constante. As sementes foram secas em caixas contendo sílica gel após 16, 24, 40 (protrusão) e 44 horas (raízes com 1 mm) de embebição até atingirem 8% de umidade. Após a desidratação, as sementes foram pré-umedecidas em câmara úmida (100% UR), por 24 horas, a 20°C e postas para retomar seu crescimento conforme descrito anteriormente. O conteúdo de DNA nuclear foi quantificado por citometria de fluxo, utilizando-se suspensões de núcleos intactos obtidos de raízes primárias e radículas de *L. leucocephala*. As amostras foram preparadas de acordo com o proposto por Carvalho et al. (2008) e analisadas em um citômetro de fluxo Partec PAS (Partec® GmbH, Munster, Germany) equipado com uma fonte de laser e uma série de filtros (TK 420, TK 560 and RG 610). Cada suspensão nuclear foi processada no citômetro com não menos que 5.000 núcleos e as amostras que apresentaram coeficientes de variação superiores a 5% foram descartadas e repetidas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A compreensão da dinâmica da germinação e da simultânea ou consequente perda da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas constitui uma ferramenta útil para o entendimento da recalcitrância (Bruggink & Toorn, 1995; Sun, 1999; Pukacka, 2001).

Os valores médios obtidos para os graus de umidade encontrados para as sementes de *Leucaena leucocephala* estão expostos na Tabela 1. As sementes são dispersas com reduzido grau de umidade (aproximadamente 12%) e toleram secagem prévia ao armazenamento a teores de umidade próximos de 8% sem perda de viabilidade. Quando completamente embebidas e, ao atingirem comprimento de raiz primária de 1, 3 e 5 mm, atingem graus de umidade de 65,92%, 66,3% e 67,95%, respectivamente (Tabela 1).

TABELA 1 Grau de umidade de sementes de leucena sob diversas condições.

Condição	GU (%)	Desvio padrão
Sementes retiradas diretamente do lote	11,93	0,229
Sementes retiradas do lote e secas três dias em caixas de secagem contendo sílica gel	7,55	0,452
Sementes germinadas (raiz primária de 1 mm)	65,92	1,240
Sementes germinadas (raiz primária de 3 mm)	66,30	0,666
Sementes germinadas (raiz primária de 5 mm)	67,95	1,256

Os índices de germinação encontrados para as sementes tratadas com água a 100°C, lima metálica e não tratadas foram, respectivamente, 86%, 96% e 11% (Tabela 2). Embora eficaz para quebrar a impermeabilidade do tegumento, a exposição das sementes a elevadas temperaturas prejudicou a velocidade da germinação e o percentual final de sobrevivência, sendo neste tratamento observado o maior número de sementes mortas (Tabela 2). O tratamento mais

eficaz foi a escarificação com lima metálica, seguida de 16 horas de imersão em água destilada. Para este tratamento foi observado um elevado índice de germinação, tendo 95% das sementes germinado em 24 horas (Figura 1).

TABELA 2 Percentual de germinação (média±DP) de sementes de *Leucaena leucocephala* submetidas ou não a métodos para a superação da dormência tegumentar.

Tratamento	Germinação (%) (p < 0,01)	Sementes duras	Sementes mortas (p < 0,05)	IVG
Controle	11±4 ^c	84±7	5±4 ^b	1,38±0,34
Escarificação mecânica	96±3 ^a	-	4±3 ^b	12,04±0,57
Água a 100°C	83±8 ^b	-	17±8 ^a	6,39±0,55

Médias em colunas seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Assim como a maioria das espécies da família leguminosae, *L. leucocephala* produz sementes com dormência imposta pela impermeabilidade do tegumento à água (Kramer & Kozlowski, 1972; Bianchetti & Ramos, 1982). Entretanto, se tratadas adequadamente, suas sementes podem alcançar elevados índices de germinação e velocidade de germinação quando comparadas a sementes não submetidas a tratamentos para a quebra de dormência.

O padrão de embebição encontrado para as sementes de *L. leucocephala* corresponde ao padrão trifásico descrito por Bewley & Black (1994). Este padrão caracteriza-se por uma rápida tomada inicial de água (Fase I), seguida de uma fase estacionária (Fase II) que culmina em um aumento repentino da massa fresca juntamente à protrusão radicular (Figura 2). O ponto correspondente à protrusão radicular ocorreu próximo a 40 horas de embebição, com subsequente retomada do aumento da massa fresca (Figura 2).

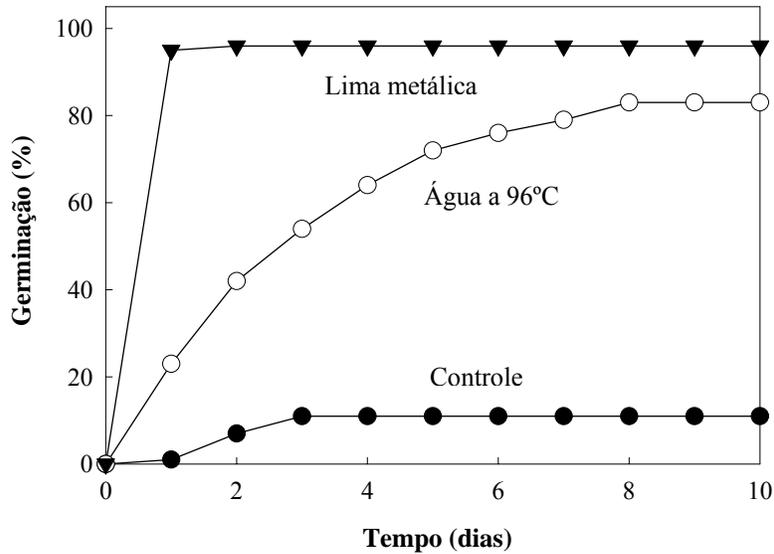


FIGURA 1 Germinação de sementes de *Leucaena leucocephala* submetidas a diferentes tratamentos para a quebra da dormência imposta pelo tegumento. Escarificação mecânica com lima metálica, seguida de imersão em água, a 25°C, por 16 horas (▼); Imersão em água a 100°C (○) e sementes sem tratamento prévio à germinação (●). Cada ponto no gráfico representa a média de 4 repetições de 25 sementes cada.

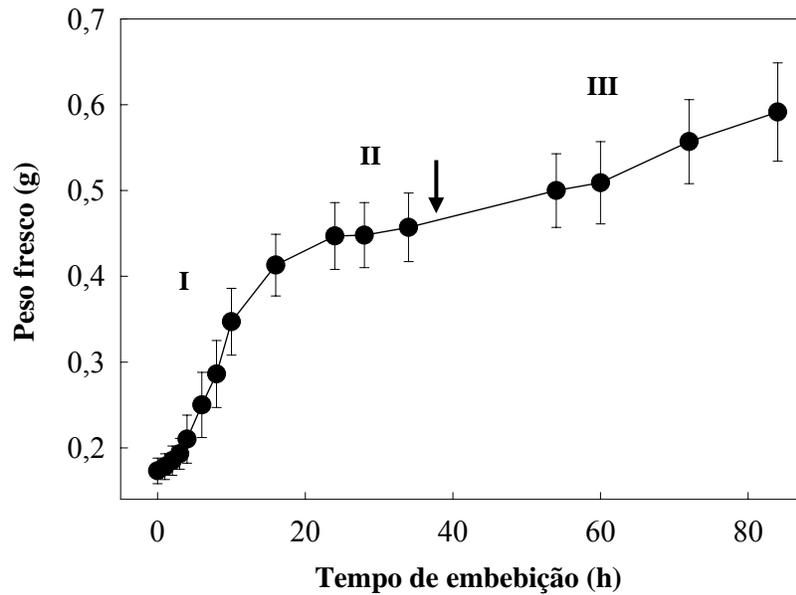


FIGURA 2 Padrão de embebição de sementes de *Leucaena leucocephala* escarificadas com lima metálica. A seta indica o momento em que ocorreu a protrusão da radícula. Cada ponto no gráfico representa a média de 10 repetições com três sementes cada e as barras representam o desvio padrão.

A duração de cada uma dessas fases depende de características inerentes a cada tipo de semente (permeabilidade do tegumento, tamanho da semente e a composição de seu material de reserva) e das condições durante a hidratação (Bewley & Black, 1994).

As curvas de secagem das sementes germinadas de *L. leucocephala* com diferentes comprimentos da raiz primária encontram-se na Figura 3. Conforme esperado, o padrão de secagem observado não sofreu influência do estágio de desenvolvimento das sementes, tendo todas elas atingido seu grau

mínimo de umidade aproximadamente após 24 horas de secagem, quando pode ser observada a estabilização do peso.

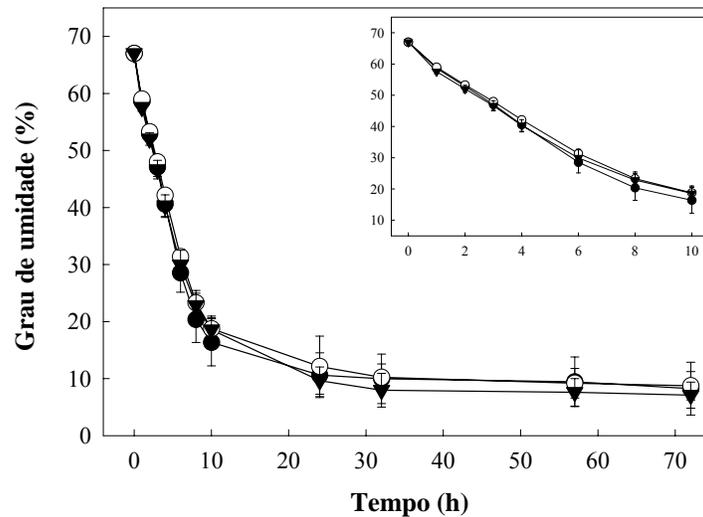


FIGURA 3 Curva de secagem de sementes germinadas de *Leucaena leucocephala* desidratadas em caixas de secagem contendo sílica gel. Sementes com raiz primária de 1 mm (●), 3 mm (○) e 5 mm (▼). Cada ponto no gráfico representa a média de 10 repetições com três sementes cada e as barras representam o desvio padrão.

Os dados relativos à perda da tolerância à dessecação de sementes germinadas ao longo da secagem estão evidenciados na Figura 4. Quando as sementes germinadas de *L. leucocephala* foram secas a 8% de umidade, não houve sobrevivência para aquelas com raiz primária de 3 e 5 mm e apenas 16% das sementes com raiz de 1 mm sobreviveram (Figura 4). Quando dessecadas até 20% de umidade, tanto as sementes germinadas com 1 mm quanto as com 3 mm de comprimento de raiz primária apresentaram baixa sobrevivência das raízes primárias. Todavia, a emissão de raízes laterais garantiu a formação de plântulas

normais, em índices próximos de 100% (Figura 4A e B). A sensibilidade à secagem é distinta nas diferentes partes da semente e, geralmente, a raiz é a primeira parte a se tornar intolerante à secagem. Entretanto, muitas sementes desenvolvem raízes laterais quando ocorre a morte da raiz primária e elas permanecem aptas a desenvolver uma plântula normal (Nemmer & Luyet, 1954; Karen & Leopold, 1988; Lin et al., 1998). A emissão de raízes laterais em sementes submetidas a estresses hídricos também foi demonstrada por Vieira (2008) em sementes de *Tabebuia impetiginosa* (ipê roxo) e por Masetto (2008), em sementes de *Sesbania virgata*.

Conforme esperado, as sementes com o menor comprimento de raiz primária foram mais tolerantes à perda de água (Figura 4A). Embora a sobrevivência total tenha sido semelhante para as sementes com até 30% de grau de umidade, diferentemente das sementes com 1 e 3 mm de comprimento de raiz primária, a formação de plântulas normais das sementes com 5 mm de raiz primária decaiu aproximadamente 50% quando estas foram secas a 20% de GU (Figura 4C). Foi possível notar uma queda gradativa na sobrevivência das raízes primárias em relação ao grau de desenvolvimento das sementes germinadas (Figura 4A, B e C).

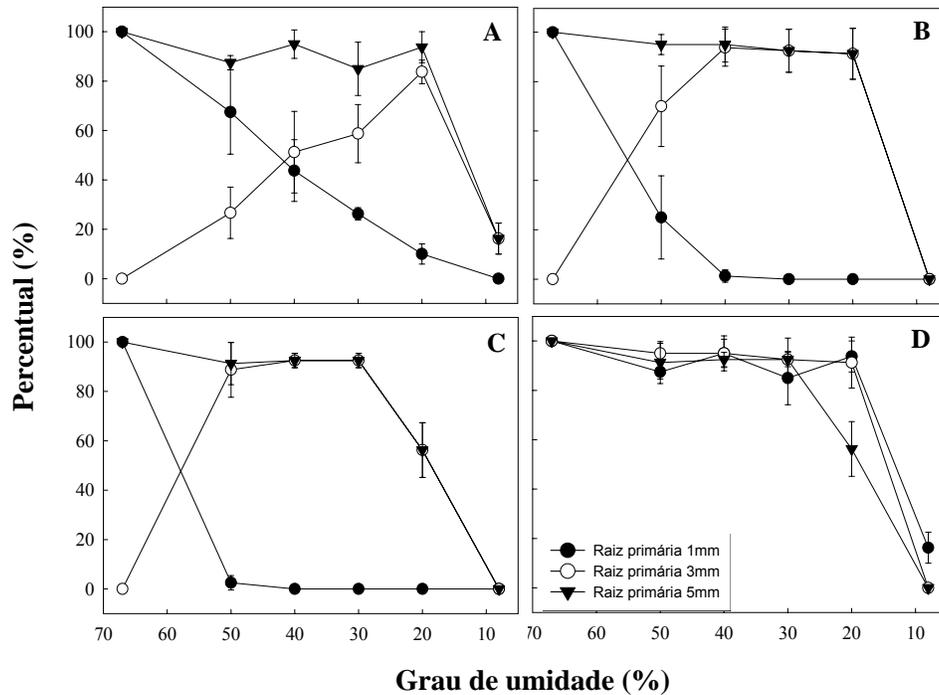


FIGURA 4 Sobrevivência de raízes primárias (●), emissão de raízes secundárias (○) e formação de plântulas normais (▼) após secagem de sementes germinadas de *Leucaena leucocephala* com raízes primárias de 1 mm de comprimento (A), 3 mm (B) e 5 mm (C). D – Formação de plântulas normais nos três comprimentos de raízes primárias estudados. As sementes foram secas em caixas contendo sílica gel até graus de umidade pré-determinados, reidratadas e a sobrevivência foi avaliada. Cada ponto nos gráficos representa a média de quatro repetições de 20 sementes cada e as barras representam o desvio padrão.

Mesmo tendo suportado a secagem a 20% de umidade, as plântulas provenientes das sementes com raízes primárias de 3 mm apresentaram decréscimo em sua taxa de crescimento (Figura 5). Embora tenha ocorrido a formação de aproximadamente 91% de plântulas normais, houve redução

gradual no peso fresco das plântulas formadas após sete dias de embebição (Figura 5).

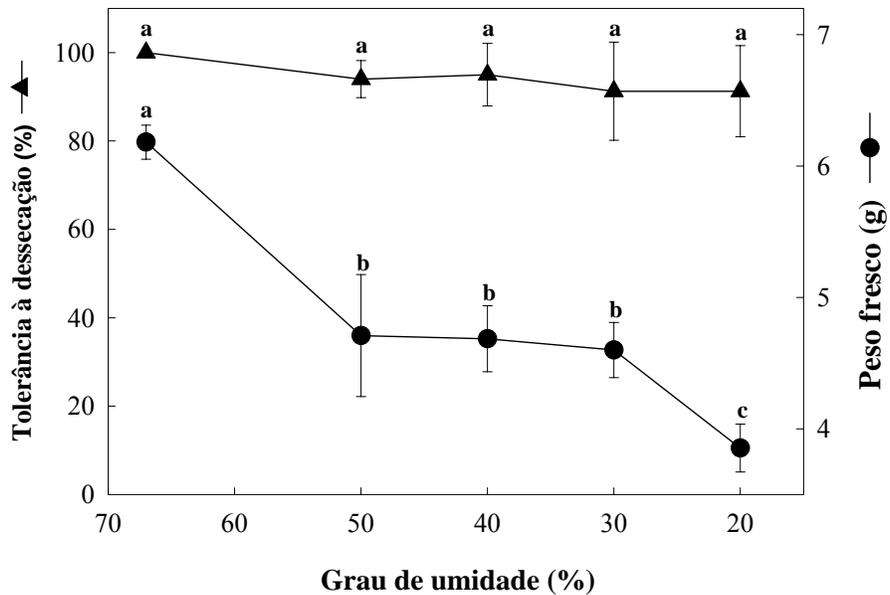


FIGURA 5 Efeito da secagem a diferentes conteúdos de água sobre o peso fresco de plântulas de *Leucaena leucocephala* em relação à tolerância à dessecação. Sementes germinadas com raiz primária de 3 mm foram selecionadas para a realização das secagens. Cada ponto representa a média de quatro repetições de 20 sementes cada e as barras representam o desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade.

Sementes de leucena, assim como de outras espécies que produzem sementes ortodoxas, perdem sua capacidade de tolerar a secagem ao final da germinação quando o eixo embrionário inicia a elongação, usualmente pela radícula (Leprince et al., 1990; Hong & Ellis, 1992; Bewley & Black, 1994).

O ponto em que a tolerância à dessecação começa a ser perdida, se levados em conta o tempo de embebição e o comprimento da raiz primária após a protrusão, varia de espécie para espécie (Hong & Ellis, 1992; Leprince et al., 2000; Buitink et al., 2003; Koster et al., 2003). Entretanto, outros fatores, tais como ciclo celular e síntese de DNA relacionam-se diretamente com a perda de TD em sementes germinadas (Osborne, 2000; Osborne et al., 2002).

Foi evidenciado em alguns estudos que o conteúdo de DNA nuclear relaciona-se diretamente ao aumento da sensibilidade a estresses em sementes (Saracco et al., 1995; Sliwinska, 2003; Faria et al., 2005). No presente estudo, as análises de citometria de fluxo indicaram a existência de núcleos 2C, 4C e 8C em radículas, ao longo e após a germinação (Figura 6).

A maioria dos núcleos avaliados ao longo da embebição e após a protrusão radicular apresentou um maior conteúdo de DNA 2C, indicando que a maior parte das células avaliadas se encontra na fase G₁ do ciclo celular (Figuras 6 e 7). Embora predominantemente retidas na fase G₁, foi evidenciado um aumento significativo no conteúdo de DNA 4C nas radículas ao longo da embebição, o que indica a entrada de mais células na fase G₂ do ciclo celular. Deltour (1985) sugeriu que a retenção e o acúmulo de células na fase G₁ estão relacionados à acentuada queda no conteúdo de água, decorrente da secagem durante a maturação. No entanto, o alto conteúdo relativo de DNA 4C (32%) encontrado nas radículas de leucena (Figura 7) indica que, ao final da maturação, dois bloqueios podem estar atuando sobre o ciclo celular. O primeiro deles atua mantendo as células da fase G₁/S (DNA 2C, fase pré-sintética do ciclo celular) e o segundo atua impedindo que as células que se encontram na fase G₂ (DNA 4C) progridam para a mitose. Resultados semelhantes foram encontrados por Faria et al. (2005), quando demonstraram que aproximadamente 45% dos núcleos de radículas provenientes de embriões maduros de *Medicago truncatula* possuem conteúdo de DNA 4C.

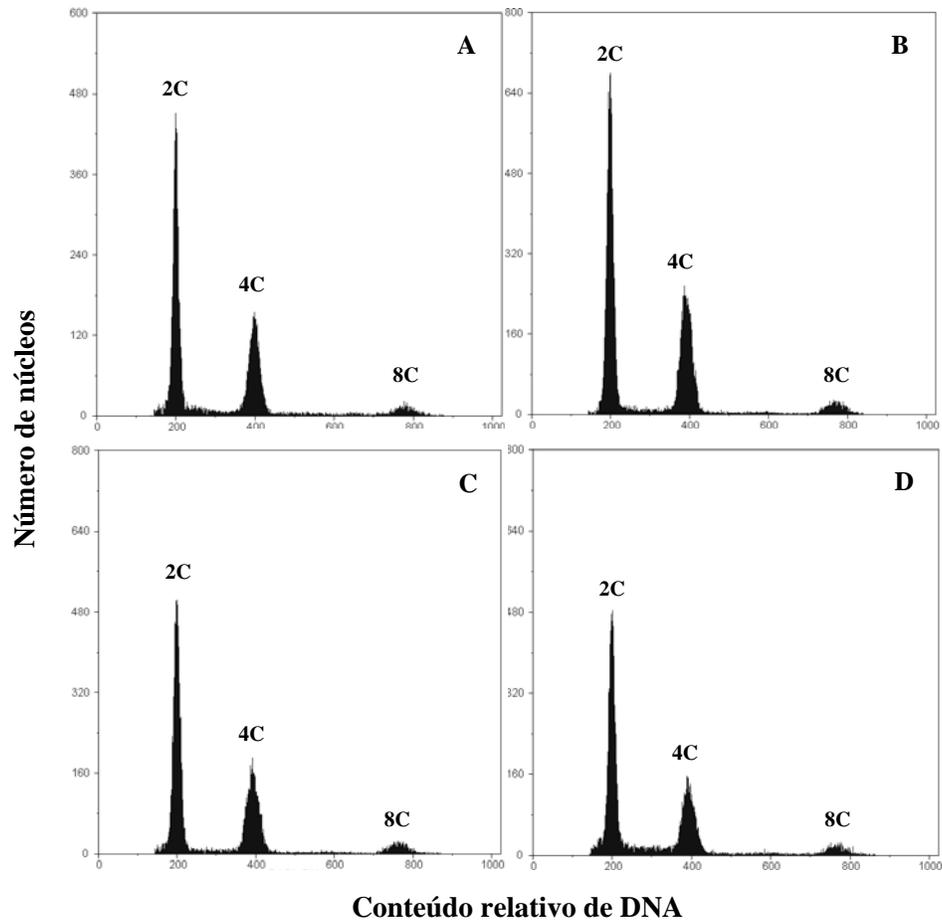


FIGURA 6 Histogramas de citometria de fluxo, mostrando o conteúdo de DNA nuclear em raízes de *L. leucocephala*, ao longo e após a germinação. (A) Sementes secas; (B) sementes após 16 horas de embebição; (C) 24 horas de embebição e (D) raízes primárias com 1 mm de comprimento.

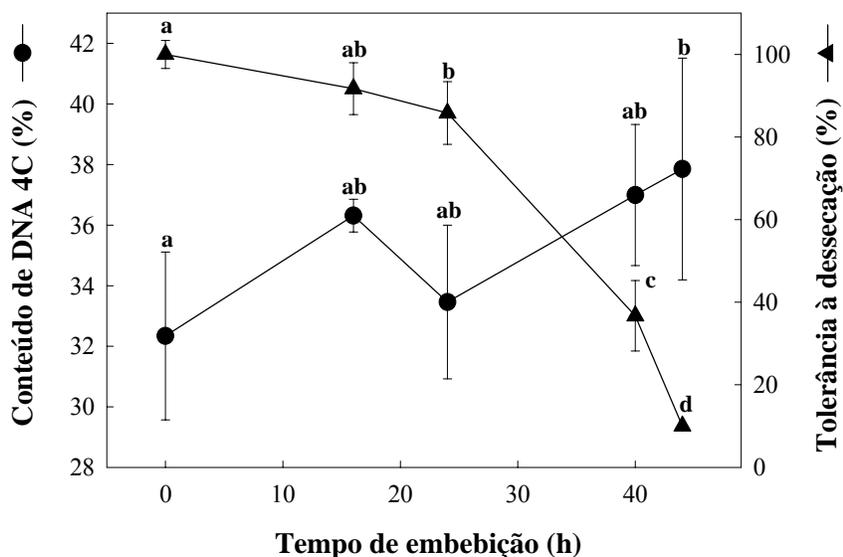


FIGURA 7 Conteúdo de DNA 4C e tolerância à dessecação ao longo e após a germinação de sementes de *Leucaena leucocephala*. A tolerância à dessecação foi determinada após a secagem das sementes em caixas de secagem contendo sílica gel, seguida de pré-umidificação e reidratação. As sementes que retomaram seu crescimento e formaram plântulas normais foram consideradas tolerantes à dessecação. Cada ponto no gráfico representa a média de quatro experimentos independentes. Para a citometria de fluxo, cada ponto no gráfico representa a média de cinco repetições de seis raízes primárias. As barras representam o desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais, na mesma curva, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% (conteúdo de DNA 4C) e a 1% (tolerância à dessecação).

Embora algumas espécies apresentem elevados conteúdos de DNA 4C, esta não é a situação prevalente encontrada em sementes ortodoxas, nas quais, geralmente, o embrião quiescente exibe a maioria de suas células com conteúdo de DNA 2C, refletindo a retenção do ciclo celular na fase G₁ (Deltour, 1985; Bino et al., 1993; Castro et al., 2000). Este comportamento também foi evidenciado em sementes classificadas como intermediárias (Sacandé et al.,

1997; Silva et al., 2008) e indica que, ao contrário do relatado para as espécies recalcitrantes, a dificuldade no armazenamento de sementes intermediárias não está relacionada à elevada atividade replicativa do DNA nas células.

No presente trabalho, o menor conteúdo de DNA 4C, conforme esperado, foi encontrado nas radículas retiradas das sementes secas, tendo, durante as primeiras 24 horas de embebição, ocorrido pequena alteração no perfil de replicação. O percentual de núcleos 4C apresentou aumento significativo ($p > 0,05$), após 24 horas de embebição, tendo o maior valor sido observado após a protrusão radicular, quando o comprimento da raiz primária atingiu 1 mm (44 h), coincidindo com a quase completa redução da capacidade das sementes de *L. leucocephala* tolerarem a dessecação, evidenciando uma relação inversa entre essa tolerância e o conteúdo de DNA 4C (Figura 7). Um aumento no conteúdo de DNA 4C também marca o avanço da germinação em *Lycopersicon esculentum*, *Capsicum annum*, *Pinus banksiana*, *Beta vulgaris*, *Coffea arabica* e *Hordeum vulgare*, dentre muitas outras espécies (Sliwinska, 2009). Apesar de as relações entre o progresso do ciclo celular e a sensibilidade a estresses não terem sido elucidadas, apregoa-se que células na fase G₂ são mais sensíveis a estresses do que aquelas na fase G₁ (Sybenga, 1972), como mostrado por alguns estudos que indicaram que o conteúdo de DNA nuclear relaciona-se diretamente com o aumento da sensibilidade a estresses em sementes (Saracco et al., 1995; Sliwinska, 2003; Faria et al., 2005).

Para que haja proliferação celular, alguns eventos, tais como aumento do tamanho da célula, síntese de DNA, duplicação dos cromossomos e, finalmente, distribuição equitativa destes entre as células filhas, são necessários. Esses eventos exigem gastos energéticos e, provavelmente, quanto mais avançada no processo de mitose uma célula estiver, maior será a dificuldade desta em desligar seus programas de desenvolvimento e religar programas metabólicos relacionados à TD.

Assim como as radículas de embriões maduros de *L. leucocephala*, sementes germinadas de *M. truncatula* perdem a capacidade de restabelecer tolerância à dessecação, quando submetidas a um estresse osmótico, concomitantemente à retomada de duplicação do conteúdo de DNA de seus núcleos (Faria et al., 2005).

Os dados encontrados neste estudo indicam a possibilidade do uso de sementes germinadas de *L. leucocephala* como um modelo experimental para a compreensão de mecanismos envolvidos na perda da tolerância à dessecação em sementes. Além disso, o conteúdo de DNA nuclear pode ser utilizado, para esta espécie, como indicador do avanço no processo de germinação e concomitante perda da capacidade de tolerar a secagem a reduzidos conteúdos de água.

5 CONCLUSÕES

Sementes de leucena perdem a capacidade de tolerar a secagem ao final da germinação, quando o eixo embrionário inicia a elongação.

Houve relação inversa entre a tolerância à dessecação em sementes germinadas de leucena e o conteúdo de DNA nuclear nas células da radícula.

O padrão de perda da TD observado em sementes de *Leucaena leucocephala* pode ser utilizado como base experimental para elucidar eventos estruturais, bioquímicos, genéticos e ontogenéticos associados à sensibilidade à dessecação.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), processo CRA APQ-3615-5.04/07 e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), processo 2005/04139-7, pelo apoio financeiro.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Seed recalcitrance: current perspectives. **South African Journal of Botany**, Johannesburg, v. 67, n. 2, p. 79-89, Apr. 2001.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. 2. ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.
- BIANCHETTI, A.; RAMOS, A. Comparação de tratamentos para superar a dormência de sementes de canafístula *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 4, p. 91-99, jun. 1982.
- BINO, R. J.; LANTERI, S.; VERHOEVEN, H. A.; KRAAK, H. L. Flow cytometric determination of nuclear replication stage in seed tissues. **Annals of Botany**, London, v. 72, n. 3, p. 181-187, Sept. 1993.
- BLACK, M.; CORBINEAU, F.; GEE, H.; COME, D. Water content, raffinose and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 120, n. 2, p. 463-471, June 1999.
- BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 100, n. 1, p. 225-230, Sept. 1992.
- BOUBRIAK, I.; DINI, M.; BERJAK, P.; OSBORNE, D. J. Desiccation and survival in the recalcitrant seeds of *Avicennia marina*: DNA replication, DNA repair and protein synthesis. **Seed Science Research**, Wallington, v. 10, n. 3, p. 307-315, Sept. 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para a análise de sementes**. Brasília, DF, 1992. 365 p.
- BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 103, n. 4, p. 1035-1040, Dec. 1993.
- BRUGGINK, G. T.; TOORN, P. V. T. Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. **Seed Science Research**, Wallington, v. 9, n. 1, p. 49-53, Mar. 1995.

BUITINK, J.; LEGER, J. J.; GUIBLE, I.; LY-VU, B.; WUILLÈME, S.; LE BARS, A.; LE MEUR, N.; BECKER, A.; KÜSTER, H.; LEPRINCE, O. Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation sensitive to tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. **Plant Journal**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 735-750, Sept. 2006.

BUITINK, J.; VU, B. L.; SATOUR, P.; LEPRINCE, O. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. Seeds. **Seed Science Research**, Wallington, v. 13, n. 4, p. 273-286, Dec. 2003.

CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R.; PRAÇA, M. M.; ARAÚJO, F. S.; CARELS, N. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L.: an important biofuel plant. **Plant Science**, Clare, v. 174, n. 6, p. 613-617, June 2008.

CASTRO, R. D. de; LAMMEREN, A. A. M. van; GROOT, S. P. C.; BINO, R. J.; HILHORST, H. W. M. Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 122, n. 2, p. 327-335, Feb. 2000.

CHIN, H. F.; ROBERTS, E. H. (Ed.). **Recalcitrant crop seeds**. Kuala Lumpur: Tropical SDN/BHD, 1980. 152 p.

CROMARTY, A. S.; ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. **Design of seed storage facilities for genetic conservation**. Rome: IPGRI, 1985. 100 p.

DAWS, M. I.; BOLTON, S.; BURSLEM, D. F. R. P.; GARWOOD, N. C.; MULLINS, C. E. Loss of desiccation tolerance during germination in neotropical pioneer seeds: implications for seed mortality and germination characteristics. **Seed Science Research**, Wallington, v. 17, n. 4, p. 273-281, Dec. 2007.

DELTOUR, R. Nuclear activation during early germination of the higher plant embryo. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 75, n. 1, p. 43-83, Apr. 1985.

FARIA, J. M. R. **Desiccation tolerance and sensitivity in *Medicago truncatula* and *Inga vera* seeds**. 2006. 135 p. Thesis (Ph.D. in Plant Physiology) - Wageningen University, Wageningen.

FARIA, J. M. R.; BUITINK, J.; LAMMEREN, A. A. M. van; HILHORST, H. W. M. 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.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. The survival of germinating orthodox seeds after desiccation and hermetic storage. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 239-247, Feb. 1992.

ILLING, N.; DENBY, K. J.; COLLETT, H.; SHEN, A.; FARRANT, J. M. The signature of seeds in resurrection plants: a molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. **Integrative and Comparative Biology**, San Diego, v. 45, n. 5, p. 771-787, Nov. 2005.

KAREN, L. K.; LEOPOLD, A. C. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 88, n. 3, p. 829-832, Nov. 1988.

KOSTER, K. L.; REISDORPH, N.; RAMSAY, J. L. Changing desiccation tolerance of pea embryo protoplasts during germination. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 387, p. 1607-1614, June 2003.

KRAMER, P. J.; KOZLOWSKI, T. T. **Fisiologia das árvores**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkan, 1972. 745 p.

LEOPOLD, A. C.; VERTUCCI, C. W. Physical attributes of desiccated seeds. In: LEOPOLD, A. C. (Ed.). **Membranes, metabolism, and dry organisms**. Ithaca: Comstock, 1986. p. 22-34.

LEPRINCE, O.; DELTOUR, R.; THORPE, P. C.; ATHERTON, N. W.; HENDRY, G. A. F. The role of free radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays*). **New Phytologist**, Cambridge, v. 116, n. 4, p. 573-580, Apr. 1990.

LEPRINCE, O.; HARREN, F. J. M.; BUITINK, J.; ALBERDA, M.; HOEKSTRA, F. A. Metabolic dysfunction and unabated respiration preced the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 122, n. 2, p. 597-608, Feb. 2000.

LIN, T.; YEN, W.; CHIEN, C. Disappearance of desiccation tolerance of imbibed crop seeds is not associated with the decline of oligosaccharides. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, n. 324, p. 1203-1212, July 1998.

MASETTO, T. E. **Restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Sesbania virgata* e *Cedrela fissilis***. 2008. 82 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

NEDEVA, D.; NIKOLOVA, A. Desiccation tolerance in developing seeds. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Lancaster, v. 23, n. 3/4, p. 100-113, Aug. 1997.

NEMMER, M. W.; LUYET, B. J. Survival of dehydrated pea seedlings. **Biodynamica**, Normandy, v. 7, n. 145/148, p. 193-211, Dec. 1954.

OSBORNE, D. J. Hazards of a germinating seed: available water and the maintenance of genomic integrity. **Israel Journal of Plant Science**, Jerusalem, v. 48, n. 3, p. 173-179, Sept. 2000.

OSBORNE, D. J.; BOUBRIAK, I.; LEPRINCE, O. Rehydration of dried systems: membranes and the nuclear genome. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford: CABI, 2002. p. 343-364.

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

PARROTA, J. A. ***Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. Leucaena, tantan. Leguminosae (Mimosoideae) Legume family**. New Orleans: USDA Forest Service/Southern Forest Experiment Station, 1992. 8 p.

PUKACKA, S. Loss of tolerance to desiccation in germinated Norway maple (*Acer platanoides* L.) seeds: changes in carbohydrate content. **Dendrobiology**, Kórnik, v. 46, p. 43-48, 2001.

SACANDÉ, M.; GROOT, S. P. C.; HOEKSTRA, F. A.; CASTRO, R. D. D.; BINO, R. J. Cell cycle events in developing neem (*Azadirachta indica*) seeds: are they related to intermediate storage behaviour? **Seed Science Research**, Wallington, v. 7, n. 2, p. 161-168, June 1997.

SARACCO, F.; BINO, R. J.; BERGERVOET, J. H. W.; LANTERI, S. Influence of priming-induced nuclear replication activity on storability of pepper (*Capsicum annuum* L.) seed. **Seed Science Research**, Wallington, v. 5, n. 1, p. 25-29, Mar. 1995.

SILVA, E. A. A. da; TOOROP, P. E.; LAMMEREN, A. A. M. van; HILHORST, H. W. M. ABA inhibits embryo cell division events during coffee (*Coffea arabica* 'Rubi') seed germination. **Annals of Botany**, London, v. 102, n. 3, p. 425-433, Sept. 2008.

SKERMAN, P. J. **Tropical forage legumes**. Rome: FAO, 1977. 609 p.

SLIWINSKA, E. Cell cycle and germination of fresh, dried and deteriorated sugarbeet seeds as indicators of optimal harvest time. **Seed Science Research**, Wallington, v. 13, n. 2, p. 131-138, June 2003.

SLIWINSKA, E. Nuclear DNA replication and seed quality. **Seed Science Research**, Wallington, v. 19, n. 1, p. 15-25, Mar. 2009.

SREEDHAR, L.; WOLKERS, W. F.; HOEKSTRA, F. A.; BEWLEY, J. D. In vivo characterization of the effects of abscisic acid and drying protocols associated with the acquisition of desiccation tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. **Annals of Botany**, London, v. 89, n. 4, p. 391-400, Apr. 2002.

SUN, W. Q. Desiccation sensitivity of recalcitrant seeds and germinated orthodox seeds: can germinated orthodox seeds serve as a model system for studies of recalcitrance? In: IUFRO SEED SYMPOSIUM, 1998, Kuala Lumpur, Malaysia. **Proceedings...** Kuala Lumpur: FRIM, 1999. p. 29-42.

SYBENGA, J. **General cytogenetics**. Amsterdam: North-Holand, 1972. 359 p.

VIEIRA, C. V. **Germinação e re-indução de tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Tabebuia impetiginosa* e *Alliaria petiolata***. 2008. 80 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

XU, N.; BEWLEY, J. D. The role of abscisic acid in germination, storage protein synthesis and desiccation tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) seeds, as shown by inhibition of its synthesis by fluridone during development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, n. 6, p. 687-694, June 1995.

CAPÍTULO 3

EFEITOS DA DESSECAÇÃO EM SEMENTES GERMINADAS DE *Leucaena leucocephala*: INTEGRIDADE DO DNA E DANOS ULTRAESTRUTURAIIS

RESUMO

Leucaena leucocephala (leucena) é uma espécie pantropical, com sementes produzidas anualmente em grande quantidade, ortodoxas e com dormência tegumentar facilmente superável, após o quê alcança elevados índices de germinação. Por essas características, apresenta potencial para uso como espécie modelo na pesquisa com sementes. Dessa maneira, objetivou-se, com a realização deste estudo, avaliar a integridade do DNA e os prováveis danos ultraestruturais causados pela secagem de sementes germinadas de *L. leucocephala* a diferentes graus de umidade. Para tal, sementes germinadas com raízes primárias de 3 mm foram secas a diferentes graus de umidade (50%, 40%, 30%, 20% e 8%) e suas raízes foram avaliadas quanto à integridade do DNA, via eletroforese em gel desnaturante de agarose e quanto à ocorrência de danos ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão. O padrão eletroforético referente à integridade do DNA genômico obtido de raízes primárias de *L. leucocephala* demonstrou não haver degradação do DNA ao longo da secagem. A desidratação de sementes germinadas abaixo de 40% de umidade causou a morte das raízes primárias. Quando avaliadas em microscópio eletrônico, sementes germinadas de *L. leucocephala* não submetidas à secagem (67% de umidade) apresentaram ultraestrutura similar à apresentada por sementes recalcitrantes recém-dispersas, com elevado número de mitocôndrias, perfis de retículo endoplasmático rugoso, corpos de golgi e polissomos. Ao longo da secagem ocorreram danos irreversíveis aos tecidos da raiz primária, desaparecimento de organelas, desprendimento e rompimento da plasmalema e fusão de vacúolos. Quando o grau de umidade atingiu 8%, ocorreu o colapso das estruturas intracelulares. Os dados obtidos sugerem que, embora o DNA tenha se mantido íntegro ao longo da secagem, a intensidade e a extensão dos danos ultraestruturais observados foram suficientemente grandes para anular a resiliência das células das raízes primárias de *L. leucocephala* e a consequente habilidade para retomar o crescimento normal.

Palavras-chave: tolerância à dessecação, secagem, grau de umidade, microscopia eletrônica de transmissão, eletroforese.

ABSTRACT

Leucaena leucocephala is a pantropical tree species. Its seeds, produced annually in large amounts are orthodox and have an easily breakable seed coat dormancy, reaching high levels of germination. For these characteristics, it is a potential species to be used as a study model for seed research. Therefore, this study aimed to evaluate the DNA integrity and the ultrastructural damages in *L. leucocephala* germinated seeds dried to different moisture contents (MC). Germinated seeds (3 mm radicle length) were dried up to 50, 40, 30, 20 and 8% MC, and the radicles were evaluated regarding DNA integrity by electrophoresis. The occurrence of ultrastructural damages was evaluated by transmission electron microscopy. The genomic DNA electrophoretic pattern obtained from primary roots of *L. leucocephala* showed no DNA degradation throughout the desiccation. When desiccated to MC below 40%, *L. leucocephala* radicles were not able to resume growth upon rehydration. The electron microscopy data showed that radicles of *L. leucocephala* germinated seeds (67% MC) have similar ultrastructural features to fresh recalcitrant seeds, with high number of well developed mitochondria, rough endoplasmic reticulum profiles, golgi bodies and polysomes. Irreversible damage occurred to the radicle tissues along drying, with disappearance of most of the organelles, detachment and disruption of the plasmatic membrane and fusion of vacuoles. When MC reached 8%, the intracellular structures collapsed. These data suggest that although the DNA had remained intact throughout the drying, the intensity and extent of the ultrastructural damages were severe enough to override the resilience of *L. leucocephala* primary roots cells and their consequent ability to resume normal growth.

Key words: Desiccation tolerance, drying, water content, transmission electron microscopy, electrophoresis.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de estratégias para a conservação *ex-situ* de espécies sensíveis à dessecação permanece um desafio para a manutenção de espécies ameaçadas e economicamente importantes que produzem sementes recalcitrantes. Embora a maioria das espécies cultivadas produza sementes tolerantes à dessecação, estima-se que aproximadamente 70% das espécies, especialmente de climas úmidos, produzam sementes sensíveis à perda de água, o que dificulta ou, mesmo, impede sua conservação, ainda que em médio prazo (Hong & Ellis, 1996; Berjak & Pammenter, 2001).

Sementes ortodoxas adquirem tolerância à dessecação (TD) ao final da maturação, concomitantemente ao acúmulo de reservas (Bewley & Black, 1994). Diferentemente dessas, as sementes recalcitrantes não adquirem TD durante seu desenvolvimento, sendo dispersas com graus de umidade elevados e com longevidade muito limitada (Roberts, 1973; Berjak & Pammenter, 2001). Diferentes estratégias para a secagem e o armazenamento de sementes recalcitrantes têm sido testadas, porém, sem êxito.

A conservação em médio e longo prazos em câmaras frias e a criopreservação exigem secagem prévia das sementes para que estas reduzam seu metabolismo e para que, no caso da criopreservação, cristais de gelo não sejam formados durante o congelamento (Sun, 1999a; Vernon et al., 1999). No entanto, a secagem de sementes recalcitrantes em graus de umidade que permitiriam seu congelamento provoca danos e perda da viabilidade (King & Roberts, 1980). Sendo assim, a compreensão dos aspectos fisiológicos, morfológicos e citológicos que regem a sensibilidade à dessecação em sementes recalcitrantes tem fundamental importância no desenvolvimento de estratégias para prolongar a conservação *ex-situ* dessas espécies.

Por não adquirirem TD, sementes recalcitrantes não podem ser secas e armazenadas por longos períodos de tempo, o que dificulta o avanço de pesquisas para essa classe de sementes. A baixa disponibilidade de material tem sido apontada como uma das causas para o lento avanço na compreensão dos processos envolvidos com estresses por secagem (Bray, 1993) e estudos relativos às respostas das sementes a esse estresse estão ainda em estágio inicial, principalmente para sementes recalcitrantes.

Um conjunto de fatores, como acúmulo de açúcares, mudanças em sistemas metabólicos e a presença de sistemas de reparo durante a reidratação, tem sido apontado como causa da aquisição de TD em sementes ortodoxas. A ausência ou a inadequação de um ou mais desses fatores pode ser crítica durante a secagem e é considerada a causa da sensibilidade à dessecação nas sementes recalcitrantes (Pammenter & Berjak, 1999).

Sementes ortodoxas perdem gradativamente a tolerância à dessecação durante a germinação e, geralmente, tornam-se totalmente sensíveis à perda de água concomitantemente à protrusão radicular (Leprince et al., 1990; Hong & Ellis, 1992; Bewley & Black, 1994; Reisdorph & Koster, 1999). Ao longo da germinação, essas sementes passam a se comportar como recalcitrantes e o seu uso como um modelo para estudos dos mecanismos relacionados à sensibilidade à dessecação em sementes vem sendo indicado (Sun, 1999b).

Vários estudos sobre a aquisição da TD ao longo do desenvolvimento das sementes já foram realizados (Blackman et al., 1992; Xu & Bewley, 1995; Nedeva & Nikolova, 1997; Black et al., 1999; Sreedhar et al., 2002; Illing et al., 2005; Buitink et al., 2006), ao passo que pesquisas sobre a perda da TD durante a germinação são mais escassos (Lin et al., 1998; Buitink et al., 2003; Faria et al., 2005; Daws et al., 2007).

Modelos de estudo que consigam isolar eventos correlatos à aquisição ou à perda da capacidade de tolerar a secagem são importantes para o avanço das

pesquisas e para o entendimento dos mecanismos e danos envolvidos com a perda da TD.

Danos por dessecação ocorrem quando a água é retirada das células. A água possui múltiplas funções e, conforme é removida das células, altera suas propriedades físicas e fisiológicas, causando inúmeras injúrias que podem ser atribuídas à multiplicidade de papéis que esta exerce sobre os organismos vivos (Alpert, 2005). A água preenche espaços, provê características hidrofílicas e hidrofóbicas, controla as distâncias intermoleculares que determinam a conformação de proteínas, protege superfícies reativas e tem papel fundamental na manutenção do metabolismo, dentre outras incontáveis funções (Walters et al., 2002). Organismos tolerantes à dessecação sobrevivem à remoção da água devido a mecanismos de proteção ou reparo de seus constituintes celulares. Entretanto, a natureza dos danos experimentados por organismos sujeitos a estresses hídricos continua obscura. Diversos tipos de danos celulares e moleculares, tais como danos a membranas e ao citoesqueleto, vacuolização, alterações estruturais e redução do número de mitocôndrias, aparição de corpos de Golgi e degradação do DNA, têm sido reportados e correlacionados a estresses por secagem em sementes (Berjak & Pammenter, 2001; Wesley-Smith et al., 2001; Faria et al., 2005; Masetto et al., 2008). Contudo, ainda existe uma grande lacuna na compreensão de quais danos ocorrem e qual a sua extensão ao longo da secagem de sementes e da perda da tolerância à dessecação.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho, geral e específicos, são descritos a seguir.

2.1 Objetivo geral

Com base em um modelo de perda da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Leucaena leucocephala*, avaliar a integridade do DNA genômico e os prováveis danos ultraestruturais causados em raízes primárias de leucena secas a diferentes conteúdos de água.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar, por eletroforese, a integridade do DNA genômico de raízes primárias de *L. leucocephala*, ao longo da secagem.

Visualizar, via microscopia eletrônica de transmissão, os prováveis danos ultraestruturais em células de raízes primárias de sementes germinadas de *L. leucocephala* secas a diferentes graus de umidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal: as sementes de *Leucaena leucocephala* foram cedidas pelo Laboratório de Sementes Florestais da Universidade Federal de Lavras (Lote 3145). As coletas foram realizadas em fevereiro de 2007, no entorno de Lavras, MG, em, pelo menos, 20 matrizes. Após a coleta, as sementes foram armazenadas em sacos plásticos em câmara fria (40% UR a 10°C).

Determinação do grau de umidade: foram determinados os graus de umidade de sementes secas e germinadas (1, 3 e 5 mm de comprimento de raiz primária). Para tal, 120 sementes, divididas em quatro repetições de 30 sementes para cada tratamento, foram secas em estufa, a $103\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 17 horas (Brasil, 1992). Os graus de umidade foram expressos na base úmida.

Curvas de secagem: após a germinação, as sementes germinadas foram agrupadas de acordo com o comprimento de suas raízes primárias (1, 3 e 5 mm) com auxílio de um paquímetro digital e uma curva de secagem para cada comprimento de raiz primária foi feita. Para tal, as sementes foram secas em caixas de secagem contendo sílica e a redução em seu peso acompanhada por pesagens sucessivas (0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 32, 57, 72 hora), durante três dias. Para a redução do erro derivado da precisão da balança, foram utilizadas 10 repetições de três sementes cada.

Caracterização da perda da tolerância à dessecação após a germinação: após o tratamento pré-germinativo (escarificação com lima metálica e imersão em água destilada, a 25°C, por 16 horas) e semeadura conforme descrito anteriormente, quatro repetições de vinte sementes, de cada categoria (1, 3 e 5 mm), foram amostradas para serem desseccadas em caixas de secagem contendo sílica gel até atingirem graus de umidade de 50%, 40%, 30%, 20% e 8%. Para a obtenção das sementes germinadas em quantidades suficientes

para a realização dos testes, foi posto para germinar o dobro do número de sementes que se pretendia obter para cada classe. Utilizou-se a expressão proposta por Cromarty et al. (1985) para a estimativa do conteúdo de água pela diferença de massa:

$$Mf = Mi(100 - Ui) \times (100 - Uf)^{-1}, \text{ onde:}$$

Mf = massa da amostra (g) após a secagem;

Mi = massa da amostra (g) antes da secagem;

Ui = grau de umidade (%) antes da secagem;

Uf = grau de umidade (%) desejado após a secagem.

Sementes recém-germinadas (67% de umidade) foram utilizadas como controle e os dados obtidos nas curvas de secagem serviram de base para estimar o melhor momento para as pesagens. Após a desidratação, as sementes que atingiram grau de umidade igual ou inferior a 20% foram pré-umedecidas em câmara úmida (100% UR), por 24 horas, a 20°C, para prevenir danos causados pela embebição (Leopold & Vertucci, 1986). Posteriormente, as sementes foram reidratadas em rolos de papel umedecidos e acondicionadas conforme mencionado acima para retomar seu crescimento. A sobrevivência foi avaliada observando-se a formação de plântulas normais.

Extração de DNA e eletroforese para avaliação de sua integridade:

o DNA genômico foi extraído de raízes primárias de 3 mm de comprimento frescas (67% de umidade), secas a diferentes graus de umidade (50%, 30% e 8%) e radículas obtidas de sementes retiradas diretamente do lote e secas a 8% de umidade. O DNA foi isolado de acordo com o protocolo do CTAB 2X modificado de Liu et al. (1995). Três repetições de, aproximadamente, 45 raízes primárias, para cada tratamento, foram maceradas em nitrogênio líquido até a formação de um pó bem fino e misturadas em 700 µL de tampão de extração CTAB 2X (20 g de CTAB; 100 ml de TRIS-HCl 1M pH 8,0; 100 ml de EDTA 0,2M pH 8,0; 81,81 g NaCl 1,4M; 10 g de PVP-40 (1%) e 1 g de Sarcosyl;

completar para um litro) previamente aquecido, a 65°C, mantendo-se esta temperatura por 1 hora. Após esse período, foram adicionados 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e os tubos foram agitados, durante 5 minutos, até a formação de uma emulsão homogênea. Os tubos contendo as amostras foram centrifugados, durante 10 minutos, a 12.000 rpm e a fase superior aquosa foi removida e transferida para novos tubos, aos quais foram adicionados 450 µL de isopropanol gelado. Os tubos foram incubados, a -20°C (overnight). Após a precipitação do DNA, as amostras foram centrifugadas novamente, por 10 minutos, a 12.000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 100 µL de álcool 70% foram acrescentados. Após 5-10 minutos, os tubos foram centrifugados, a 4.000 rpm e a 4°C, por 10 minutos e invertidos em papel limpo para secar o pelet que posteriormente foi dissolvido em 50 µL de TE pH 8,0 (10mM TRIS-HCl e 1mM EDTA). As amostras de DNA foram marcadas com brometo de etídeo e separadas em gel de agarose 1%.

Amostras para microscopia eletrônica de transmissão: o preparo e a observação das amostras em microscópio eletrônico de transmissão foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. Para tal, sementes germinadas de *Leucaena leucocephala* com raízes primárias de 3 mm de comprimento frescas e secas a diferentes graus de umidade (67%, 30% e 8%) e sementes retiradas diretamente do lote e secas a 8% de umidade foram analisadas. Após a secagem, as raízes foram removidas e fixadas em fixador Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%; formaldeído 2% em tampão sódio caccodilato 0,05M; CaCl₂ 0,001M, pH 7,2), por 24 horas. Após a fixação, as amostras foram lavadas em tampão caccodilato 0,05M, pH 7,2 (três vezes por dez minutos), pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio por 1 hora, lavadas duas vezes com água destilada e imersas em uma solução de acetato de uranila, a 0,5%, a 4°C, durante 12 horas. As raízes foram lavadas em água destilada

novamente e, subsequentemente, desidratadas em série gradativa de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%, três vezes). Os tecidos desidratados foram gradualmente infiltrados com spurr/acetona 30%/8h, 70%/12h e 100%, duas vezes, por 24 horas cada. Os espécimes obtidos foram colocados em moldes de silicone e polimerizados, a 70°C, durante 48 horas, para a formação de blocos. Foi feito um desbaste para a remoção do excesso de resina e a confecção da mesa de corte. Foram obtidos cortes semi e ultrafinos com auxílio de uma lâmina de diamante em um ultramicrótomo Reichert-Jung. As secções semifinas foram capturadas com auxílio de um anel metálico, dispostas em lâminas para microscopia, coradas com azul de toluidina (1g de azul de toluidina, 1g borato de sódio e 100 ml de água), filtradas em um filtro do tipo Millipore (0,2 µm) e fixadas em permalte para a confecção de lâminas permanentes. As secções ultrafinas foram capturadas em telas metálicas cobertas com formvar e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo, por três minutos e examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão (MET) Zeiss Mod. EM-109 a 80kV.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Somente as curvas obtidas para as sementes germinadas com raiz primária de 3 mm (Figura 1) foram utilizadas para a seleção de pontos de interesse para a mensuração dos danos ultraestruturais e dos danos causados ao DNA. Sendo assim, o termo “sementes germinadas” refere-se às sementes com raiz primária de 3 mm de comprimento.

Quando as sementes germinadas foram secas a 50% de umidade, apenas 25% das raízes primárias foram capazes de sobreviver. No entanto, houve a emissão de raízes laterais em 70% das sementes, o que garantiu a formação de plântulas normais e a sobrevivência de 95% das plântulas (Figura 1).

A perda da capacidade das raízes primárias de tolerarem a dessecação acentuou-se conforme a secagem tornou-se mais severa e, a partir de 40% de umidade, não houve sobrevivência destes tecidos. Entretanto, mais uma vez, a emissão de raízes laterais garantiu índices de sobrevivência próximos a 95%. Após a secagem das sementes a 8% de umidade, não houve sobrevivência (Figura 1).

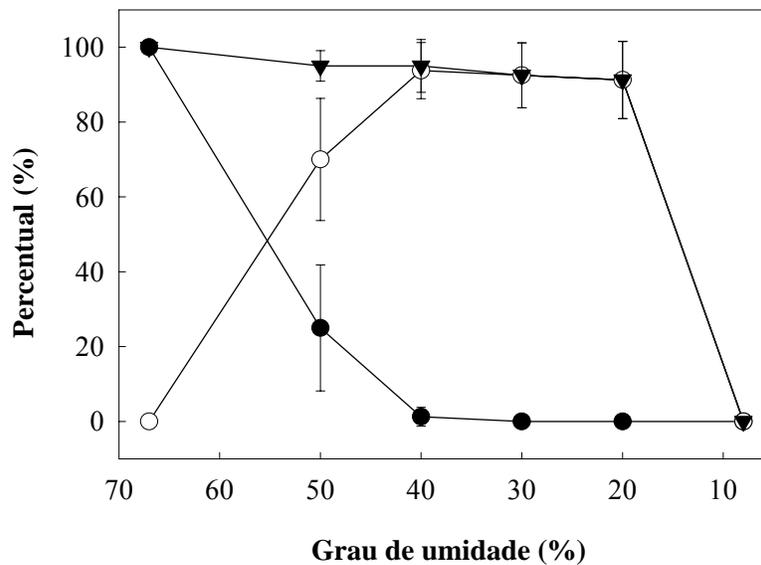


FIGURA 1 Sobrevivência de raízes primárias (●), emissão de raízes secundárias (○) e formação de plântulas normais (▼) após secagem de sementes germinadas de *Leucaena leucocephala*. As sementes foram secas em caixas contendo sílica gel, reidratadas e a sobrevivência foi avaliada. Cada ponto nos gráficos representa a média de quatro repetições com 20 sementes cada e as barras representam o desvio padrão.

Geralmente, a raiz é a primeira parte da semente germinada a se tornar intolerante à secagem, o que, necessariamente, não acarreta em classificar a semente germinada como intolerante à dessecação. Quando submetidas a estresses capazes de causar a morte da raiz primária, muitas sementes desenvolvem raízes laterais e permanecem aptas a completar a germinação (Nemmer & Luyet, 1954; Karen & Leopold, 1988; Lin et al., 1998; Masetto, 2008; Vieira, 2008).

O padrão eletroforético referente à integridade do DNA genômico obtido de raízes primárias de *Leucaena leucocephala* (Figura 2) demonstra não haver degradação do DNA ao longo da secagem, até o ponto estudado. Em todos

os tratamentos foi observada uma banda íntegra situada na parte superior do gel, atestando a inexistência de relação entre a degradação do DNA e a morte dos tecidos das raízes primárias de leucena, uma vez que essas não foram capazes de tolerar a dessecação e retomar o crescimento, quando dessecadas a 40% de umidade.

Em sementes ortodoxas, a habilidade de manter a integridade do DNA ao longo da secagem certamente relaciona-se com mecanismos de sobrevivência celular em condições de reduzidos níveis de hidratação. Assim como observado em raízes primárias de leucena, o DNA genômico de sementes de *Psidium guajava* mantém sua integridade, mesmo quando essas são secas até 7% de grau de umidade (Masetto et al., 2008).

Ao contrário do observado para sementes germinadas de leucena, Faria et al. (2005) demonstraram a ocorrência de danos ao DNA genômico em raízes primárias de sementes germinadas de *Medicago truncatula*, após estresse por secagem. Os padrões eletroforéticos obtidos por estes autores sugerem a ocorrência de morte celular programada das células da raiz primária ao longo da secagem e a existência de mecanismos de proteção ao DNA que podem ser ativados por estresses osmóticos, uma vez que houve menos fragmentação do DNA quando as raízes foram submetidas a um tratamento prévio com polietileno glicol (PEG).

Danos ao DNA também foram observados em radículas de *Sesbania virgata* e *Cedrela fissilis*, quando estas foram secas a graus de umidade próximos de 7%. Entretanto, o padrão observado no gel não é característico de morte celular programada e sim de morte passiva por necrosamento dos tecidos (Masetto, 2008).

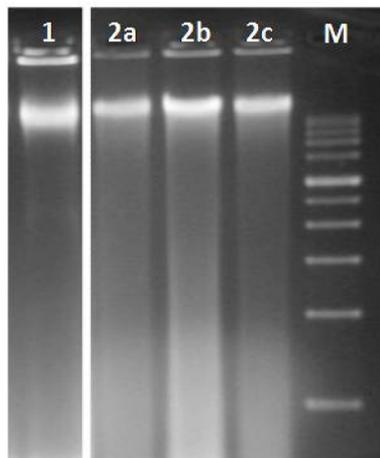


FIGURA 2 Perfil eletroforético para a avaliação da integridade do DNA genômico de raízes primárias com 3 mm de comprimento, em sementes germinadas de *Leucena leucocephala* completamente embebidas (1) e secas até 8% de umidade (2a, b e c). Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (M).

Embora sementes ortodoxas possuam mecanismos para tolerar condições de extrema restrição de água, quando estas são germinadas, mecanismos relacionados à tolerância à dessecação são desligados e gradativamente substituídos por rotas ligadas ao desenvolvimento e ao crescimento (Faria, 2007) e as sementes passam a se comportar como recalcitrantes.

Os mecanismos de resposta a estresses observados para *S. virgata*, *C. fissilis* e *M. truncatula* não condizem com o comportamento de sementes germinadas de *L. leucocephala* com raízes de 3 mm frente à secagem, pois, mesmo apresentando seu DNA intacto, não houve sobrevivência das raízes primárias quando as sementes foram secas a graus de umidade iguais ou inferiores a 40%.

A degradação do DNA está relacionada a estresses por secagem, no entanto, não consiste em uma característica padrão para todas as espécies e tecidos. A constituição do DNA, sua estrutura tridimensional e seu grau de metilação, dentre outros mecanismos de proteção, tal como associação com

proteínas, vária de espécie para espécie e, provavelmente, são fundamentais na interação das moléculas de DNA com estresses abióticos (Osborne & Boubriack, 1994).

A microscopia, em todos os níveis, tem se mostrado uma ferramenta útil e eficaz na determinação da amplitude dos danos sofridos por sementes sob diversos tipos de estresse (Berjak & Pammenter, 2000).

Raízes primárias provenientes de sementes germinadas de *L. leucocephala* não submetidas à secagem (67% de umidade) possuem elevado número de mitocôndrias bem desenvolvidas, marcante presença de perfis de retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi (Figura 3A, B e C). A presença destas estruturas indica ativação metabólica e marcante atividade celular. Nestas raízes, também pôde ser observada a plasmalema intacta e aderida à parede celular (Figura 3D).

A vacuolização, geralmente, ocorre em resposta a estresses, tais como desidratação e aquecimento (Berjak & Pammenter, 2000). No entanto, tecidos metabolicamente ativos de raízes primárias de leucena apresentam elevado número relativo de vacúolos (Figura 3A).

Raízes primárias de *L. leucocephala* possuem ultraestrutura similar à apresentada por sementes recalcitrantes recém-dispersas de outras espécies (Berjak & Pammenter, 2000; Kioko et al., 2006) e, portanto, podem servir de modelo para o estudo dos danos causados pela secagem e auxiliar no entendimento da recalcitrância.

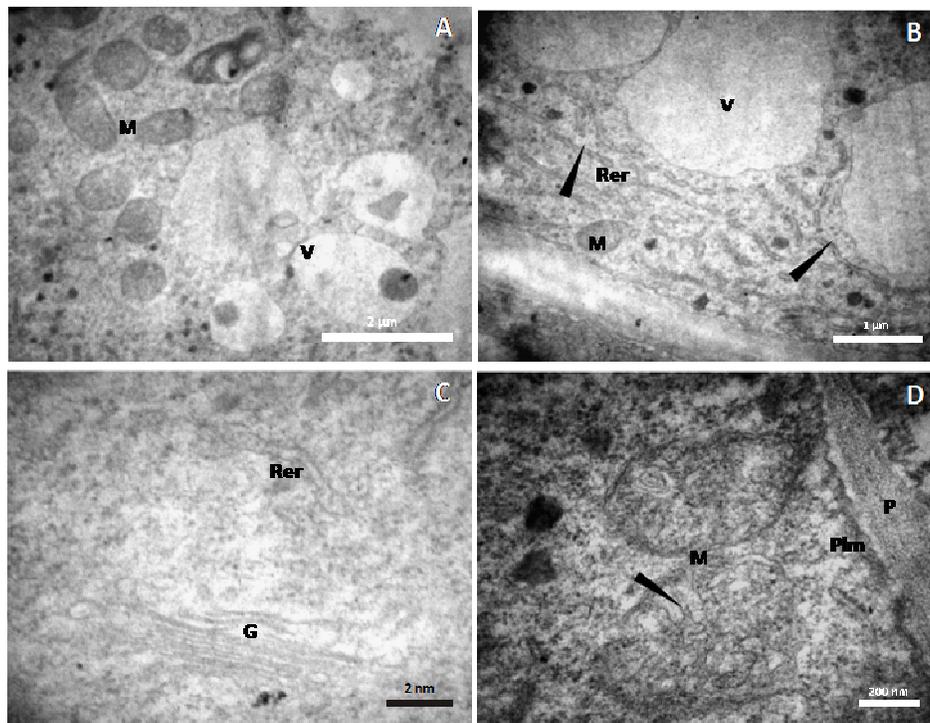


FIGURA 3 Microscopia eletrônica de transmissão de células de raízes primárias (3 mm de comprimento) frescas de *Leucaena leucocephala*. M = mitocôndria; V = vacúolo; Rer = retículo endoplasmático rugoso; G = complexo de Golgi; P = parede celular e Plm = plasmalema. As setas na Figura B indicam o retículo endoplasmático rugoso e, na Figura D, as cristas mitocondriais.

Quando as sementes germinadas atingiram 30% de umidade, houve danos irreversíveis aos tecidos da raiz primária (Figura 4). As organelas, em sua grande maioria, desapareceram e foi possível notar apenas algumas mitocôndrias aparentemente degradadas (dados não demonstrados) e amiloplastos pouco eletrondensos (Figura 4D).

Devido à retenção do lúmen celular acarretada pela perda de água, houve o desprendimento da plasmalema em relação à parede celular e ao

rompimento de sua estrutura trilaminar (Figura 4A-B). Também foram observados a fusão de vacúolos, a descaracterização de sua forma e, em alguns casos, o extravasamento de seu conteúdo (Figura 4C). A severidade e a dimensão dos danos encontrados corroboram os resultados encontrados para a sobrevivência das raízes primárias após a secagem a 30% de umidade (Figura 1).

A secagem das sementes germinadas até 8% de umidade provocou o colapso das estruturas intracelulares de suas raízes primárias. Em algumas células, o citoplasma apresentou-se granular e todo o conteúdo intracelular mostrou-se completamente descaracterizado (Figura 5A). A plasmalema se rompeu e se despreendeu da parede celular, a qual se mostrou menos espessa e revoluta (Figura 5 B, C e D). Na maioria dos casos, não foi possível notar a presença de organelas. Entretanto, muitas células apresentaram inúmeros vacúolos de tamanho reduzido (Figura 5C).

Ao contrário das sementes germinadas (raiz primária de 3 mm) e secas a 8% de umidade (Figura 5), as sementes retiradas diretamente do lote (12% de umidade) e secas, também, a 8% de umidade (Figura 6) apresentaram o espaço intracelular de suas raízes primárias relativamente organizado. Foi possível observar algumas organelas, como mitocôndrias pouco diferenciadas com cristas pouco desenvolvidas (Figura 6B, C e D) e intensa vacuolização (Figura 6C). Houve o desprendimento da plasmalema em relação à parede celular, entretanto, não houve danos extensos à sua estrutura trilaminar (Figura 6A).

Aparentemente, o deslocamento da plasmalema causado pela retração do citoplasma está ligado à capacidade de tolerar a secagem e garante a manutenção da integridade das membranas durante o estágio seco. As formas das organelas em células de raízes primárias de leucena no estágio seco são convolutas e irregulares e, assim como sugerido por Opik (1985), o dobramento das paredes e membranas durante a secagem pode estar ligado à prevenção da formação de tensão entre a plasmalema e a parede celular. Além dos dobramentos

observados, o preenchimento do espaço intracelular por vacúolos também pode estar ligado à manutenção da estrutura celular, evitando a retração do citoplasma, o desprendimento da plasmalema e o colapso da parede celular

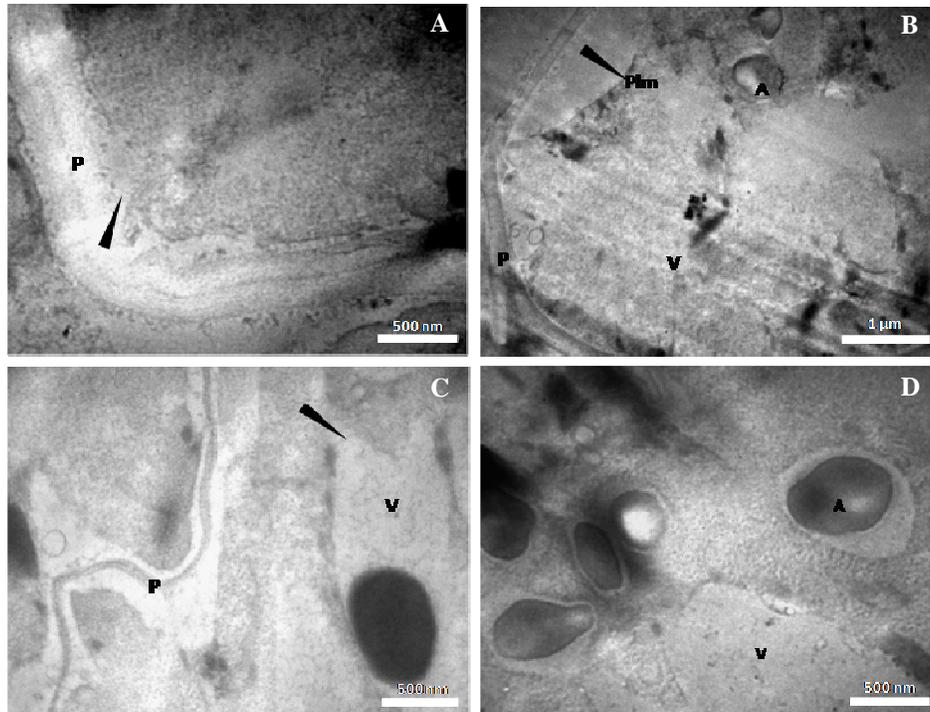


FIGURA 4 Microscopia eletrônica de transmissão de células de raízes primárias (3 mm de comprimento) de *Leucaena leucocephala* secas a 30% de umidade em caixas contendo sílica gel. V = vacúolo; P = parede celular; Plm = plasmalema e A = amiloplasto. As setas nas figuras A, B e C indicam, respectivamente, regiões onde a plasmalema se rompeu, o descolamento da plasmalema em relação à parede celular e o extravasamento do conteúdo vacuolar, devido a seu rompimento.

Mecanismo semelhante foi encontrado em células do mesófilo das plantas revivescientes *Xerofita humilis* e *Craterostigma wilmsii*. Em ambas as espécies, a vacuolização ocorreu em resposta à secagem e a prevenção do

desprendimento da plasmalema e do colapso da parede celular foi associada a essa estratégia (Farrant, 2000).

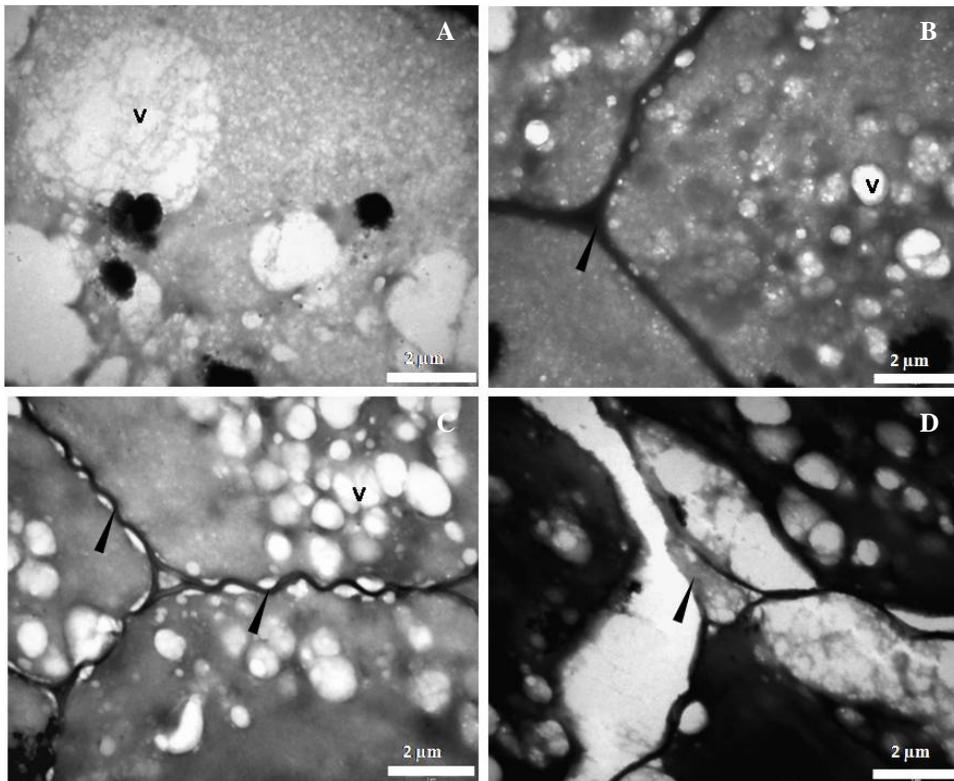


FIGURA 5 Microscopia eletrônica de transmissão de células de raízes primárias com 3 mm de comprimento, secas a 8% de umidade. As sementes foram secas em caixas contendo sílica gel. As setas indicam a parede celular; V = vacúolo.

Os vacúolos são núcleos de “turnover” intracelular, pois atuam como compartimentos líticos, onde organelas, rotineiramente, são engolfadas e lisadas em seus componentes moleculares básicos. Sob condições de estresse, a vacuolização, ou ativação de vacúolos pré-existentes, é esperada e serve para remover danos ou organelas redundantes (Berjak & Pammenter, 2000).

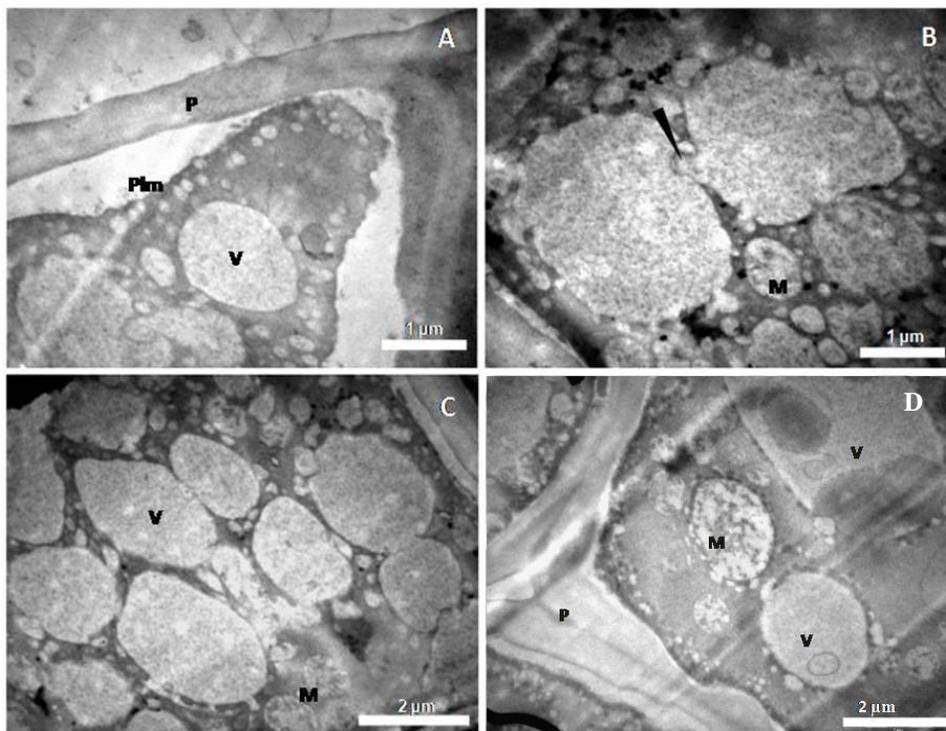


FIGURA 6 Microscopia eletrônica de transmissão de células de radículas de sementes de *Leucaena leucocephala* retiradas diretamente do lote (12% de umidade) e secas a 8% de umidade. As sementes foram secas em caixas contendo sílica gel. V = vacúolo; M = mitocôndria; P = parede celular; Plm = plasmalema. A seta na Figura B indica o ponto em que dois vacúolos estão se fundindo.

Corpos de Golgi são importantes centros de catabolismo de carboidratos, processamento de proteínas de membrana e de proteínas contidas em vesículas. Além disso, em células vegetais, eles estão intimamente ligados à síntese de precursores da parede celular ao longo do desenvolvimento, sendo a presença deste tipo de estrutura um importante indicador do status fisiológico das células e o aumento de seu desenvolvimento um sinal de acentuação da atividade intracelular, podendo também estar ligado a estresses (Berjak & Pammenter, 2000).

A estabilidade do DNA e da cromatina no estado desidratado é pré-requisito para a manutenção da tolerância à dessecação em sementes. Entretanto, os dados obtidos neste estudo sugerem que, embora a integridade do DNA tenha sido mantida, a amplitude dos danos ultraestruturais causados pela retirada de água foi suficientemente grande para anular completamente a resiliência das células das raízes primárias de leucena.

5 CONCLUSÕES

Raízes primárias de sementes germinadas de *Leucaena leucocephala* foram incapazes de sobreviver à dessecação, a graus de umidade iguais ou inferiores a 40%.

Embora a mensuração dos danos ao DNA por meio de eletroforese em gel desnaturante de agarose tenha indicado não haver degradação do DNA durante a perda da tolerância à dessecação, foi possível explicar, por meio da avaliação dos danos ultraestruturais, a perda da capacidade de sementes germinadas de *Leucaena leucocephala* de tolerarem a secagem.

Células de raízes primárias de sementes germinadas de leucena possuem características ultraestruturais semelhantes às observadas em sementes recalcitrantes, portanto, constituem um sistema interessante para o estudo da tolerância à dessecação em sementes germinadas.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), processo CRA APQ-3615-5.04/07 e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), processo 2005/04139-7, pelo apoio financeiro.

Ao professor Eduardo Alves (Departamento de Fitopatologia da UFLA), pelo apoio nas análises de microscopia eletrônica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPERT, P. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. **Integrative and Comparative Biology**, Madison, v. 45, n. 5, p. 685-695, Nov. 2005.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Fortaleza, v. 12, p. 22-55, 2000. Edição Especial.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Seed recalcitrance: current perspectives. **South African Journal of Botany**, Johannesburg, v. 67, n. 2, p. 79-89, Apr. 2001.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.

BLACK, M.; CORBINEAU, F.; GEE, H.; COME, D. Water content, raffinose and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 120, n. 2, p. 463-471, June 1999.

BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 100, n. 1, p. 225-230, Sept. 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para a análise de sementes**. Brasília, DF, 1992. 365 p.

BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 103, n. 4, p. 1035-1040, Dec. 1993.

BUITINK, J.; LEGER, J. J.; GUISE, I.; LY-VU, B.; WUILLÈME, S.; LE BARS, A.; LE MEUR, N.; BECKER, A.; KÜSTER, H.; LEPRINCE, O. Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation sensitive to tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. **Plant Journal**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 735-750, Sept. 2006.

BUITINK, J.; VU, B. L.; SATOUR, P.; LEPRINCE, O. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. **Seed Science Research**, Wallington, v. 13, n. 4, p. 273-286, Dec. 2003.

CROMARTY, A. S.; ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. **Design of seed storage facilities for genetic conservation**. Rome: IPGRI, 1985. 100 p.

DAWS, M. I.; BOLTON, S.; BURSLEM, D. F. R. P.; GARWOOD, N. C.; MULLINS, C. E. Loss of desiccation tolerance during germination in neotropical pioneer seeds: implications for seed mortality and germination characteristics. **Seed Science Research**, Wallington, v. 17, n. 4, p. 273-281, Dec. 2007.

FARIA, J. M. R. Alterations in gene expression during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating and germinated *Medicago truncatula* seeds. In: ADKINS, S. W.; ASHMORE, S.; NAVIE, S. C. **Seeds: biology, development and ecology**. Wallingford: CABI, 2007. p. 50-56.

FARIA, J. M. R.; BUITINK, J.; LAMMEREN, A. A. M. van; HILHORST, H. W. M. 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. 411, p. 2119-2130, Jan. 2005.

FARRANT, J. M. A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. **Plant Ecology**, v. 151, n. 1, p. 29-39, Nov. 2000.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. The survival of germinating orthodox seeds after desiccation and hermetic storage. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 239-247, Feb. 1992.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 64 p. (IPGRI Technical Bulletin, 1).

ILLING, N.; DENBY, K. J.; COLLETT, H.; SHEN, A.; FARRANT, J. M. The signature of seeds in resurrection plants: a molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. **Integrative and Comparative Biology**, San Diego, v. 45, n. 5, p. 771-787, Nov. 2005.

KAREN, L. K.; LEOPOLD, A. C. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 88, n. 3, p. 829-832, Nov. 1988.

KING, M. W.; ROBERTS, E. H. A strategy for future research into the storage of recalcitrant seeds. In: CHIN, H. F.; ROBERTS, E. H. (Ed.). **Recalcitrant crop seeds**. Kuala Lumpur: Tropical, 1980. p. 53-89.

KIOKO, J. I.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Viability and ultrastructural responses of seeds and embryonic axes of *Trichilia emetica* to different dehydration and storage conditions. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 72, n. 1, p. 167-176, Feb. 2006.

LEOPOLD, A. C.; VERTUCCI, C. W. Physical attributes of desiccated seeds. In: LEOPOLD, A. C. (Ed.). **Membranes, metabolism and dry organisms**. Ithaca: Comstock, 1986. p. 22-34.

LEPRINCE, O.; DELTOUR, R.; THORPE, P. C.; ATHERTON, N. W.; HENDRY, G. A. F. The role of free radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays*). **New Phytologist**, Cambridge, v. 116, n. 4, p. 573-580, Apr. 1990.

LIN, T.; YEN, W.; CHIEN, C. Disappearance of desiccation tolerance of imbibed crop seeds is not associated with the decline of oligosaccharides. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, n. 324, p. 1203-1212, July 1998.

LIU, Y. G.; NORIHIRO, M.; TERUKO, O.; WHITTIER, R. F. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. **The Plant Journal**, v. 8, n. 3, p. 457-463, Sept. 1995.

MASETTO, T. E. **Restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Sesbania virgata* e *Cedrela fissilis***. 2008. 82 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MASETTO, T. E.; FARIA, J. M. R.; DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A. da. Desiccation tolerance and DNA integrity in *Eugenia pleurantha* O. Berg. (myrtaceae) seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 30, n. 2, p. 51-56, Mar./Apr. 2008.

NEDEVA, D.; NIKOLOVA, A. Desiccation tolerance in developing seeds. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Lancaster, v. 23, n. 3/4, p. 100-113, Sept. 1997.

NEMMER, M. W.; LUYET, B. J. Survival of dehydrated pea seedlings. **Biodynamica**, Normandy, v. 7, n. 145/148, p. 193-211, Dec. 1954.

OPIK, H. The fine structure of some dry seed tissues observed after completely anhydrous chemical fixation. **Annals of Botany**, London, v. 56, n. 4, p. 453-466, Oct. 1985.

OSBORNE, D. J.; BOUBRIAK, I. I. DNA and desiccation tolerance. **Seed Science Research**, Wallington, v. 4, n. 2, p. 175-185, June 1994.

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

REISDORPH, N. A.; KOSTER, K. L. Progressive loss of desiccation tolerance in germinating pea (*Pisum sativum*) seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 105, n. 2, p. 266-271, Feb. 1999.

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

SREEDHAR, L.; WOLKERS, W. F.; HOEKSTRA, F. A.; BEWLEY, J. D. In vivo characterization of the effects of abscisic acid and drying protocols associated with the acquisition of desiccation tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. **Annals of Botany**, London, v. 89, n. 4, p. 391-400, Apr. 2002.

SUN, W. Q. State and phase transition behaviors of *Quercus rubra* seed axes and cotyledonary tissues: relevance to the desiccation sensitivity and cryopreservation of recalcitrant seeds. **Cryobiology**, San Diego, v. 38, n. 4, p. 372-385, June 1999a.

SUN, W. Q. Desiccation sensitivity of recalcitrant seeds and germinated orthodox seeds: can germinated orthodox seeds serve as a model system for studies of recalcitrance? In: IUFRO SEED SYMPOSIUM, 1998, Kuala Lumpur, Malaysia. **Proceedings...** Kuala Lumpur: FRIM, 1999b. p. 29-42.

VERNON, P.; VANNIER, G.; ARONDEL, V. Supercooling capacity of seeds and seedlings in *Arabidopsis thaliana*. **Cryobiology**, San Diego, v. 39, n. 4, p. 138-143, June 1999.

VIEIRA, C. V. **Germinação e re-indução de tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Tabebuia impetiginosa* e *Alliaria petiolata***. 2008. 80 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

XU, N.; BEWLEY, J. D. The role of abscisic acid in germination, storage protein synthesis and desiccation tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) seeds, as shown by inhibition of its synthesis by fluridone during development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, n. 6, p. 687-694, June 1995.

WALTERS, C.; FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Desiccation stress and damage. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Ed.). **Desiccation and survival in plants**. Wallingford: CABI, 2002. p. 263-282.

WESLEY-SMITH, J.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; WALTERS, C. The effects of two drying rates on the desiccation tolerance of embryonic axes of recalcitrant jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) seeds. **Annals of Botany**, London, v. 88, n. 4, p. 653-664, Oct. 2001.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Leucena leucocephala mostrou-se uma espécie muito útil para a pesquisa com sementes. Esta espécie produz, anualmente, muitas sementes viáveis, com dormência tegumentar facilmente superável. Além disso, suas sementes foram pouco susceptíveis a fungos durante os processos de germinação, secagem e retomada do crescimento.

Quando sementes de leucena são submetidas a tratamentos pré-germinativos com lima metálica e imersão em água por 16 horas, sua germinação torna-se muito homogênea e rápida, características extremamente desejáveis quando se tem o objetivo de trabalhar sensibilidade à dessecação em sementes germinadas com comprimentos de raiz primária específicos.

Além dessas características, os resultados encontrados, tanto para o conteúdo de DNA nuclear, no qual se espera que haja uma relação negativa entre a porcentagem de DNA 4C e a capacidade de células de raízes tolerarem a secagem, quanto os relativos aos danos ultraestruturais corroboraram a maioria dos relatos existentes para modelos experimentais semelhantes. Células de raízes primárias de sementes germinadas de leucena possuem características ultraestruturais semelhantes às observadas em sementes recalcitrantes e respondem, também, de maneira similar, a estresses por dessecação.

Embora não tenha sido evidenciada relação positiva entre a degradação do DNA genômico e a intensidade da secagem, possíveis danos a esta molécula podem ter ocorrido após reidratação das sementes, constituindo a avaliação da integridade do DNA após a reidratação, um tema a ser futuramente investigado.