



MARIA CECÍLIA DIAS COSTA

ARMAZENAMENTO DE PLÂNTULAS DE
Sesbania virgata

LAVRAS – MG
2011

MARIA CECÍLIA DIAS COSTA

ARMAZENAMENTO DE PLÂNTULAS DE *Sesbania virgata*

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

Orientador:

Dr. José Marcio Rocha Faria

Coorientadores:

Dr. Anderson Cleiton José

Dr. Joeferson Reis Martins

**LAVRAS – MG
2011**

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

Costa, Maria Cecília Dias.

Armazenamento de plântulas de *Sesbania virgata* / Maria Cecília
Dias Costa. – Lavras : UFLA, 2011.

78 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: José Márcio Rocha Faria.

Bibliografia.

1. Sementes germinadas. 2. Estresse osmótico. 3. Tolerância à
dessecação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.973322

MARIA CECÍLIA DIAS COSTA

ARMAZENAMENTO DE PLÂNTULAS DE *Sesbania virgata*

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

APROVADA em 08 de novembro de 2011.

Dr. Renato Mendes Guimarães UFLA

Dr. Anderson Cleiton José UFLA

Dr. Jessé Marques da Silva Júnior UFLA

Dr. José Marcio Rocha Faria

Orientador

Dr. Joeferson Reins Martins

Coorientador

LAVRAS- MG

2011

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, pela oportunidade de realização do curso.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor José Marcio Rocha Faria, orientador e amigo, pelas ideias, incentivos, ensinamentos e confiança.

Aos professores Anderson Cleiton José e Joeferson Reis Martins, co-orientadores, pela parceria e contribuições fundamentais.

Ao professor Renato Mendes Guimarães, pela disposição em participar nas bancas (qualificação e defesa) e contribuir com o trabalho.

Aos professores, técnicos e alunos dos Laboratórios de Análise e Biotecnologia de Sementes, de Conservação Genética de Espécies Arbóreas e de Microscopia Eletrônica.

A todos os colegas, funcionários, estagiários e alunos do Laboratório de Sementes Florestais e do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, pelas sugestões e pelo agradável ambiente de trabalho.

Aos professores Ary Teixeira de Oliveira Filho e Queila Souza Garcia, pela amizade e apoio.

À minha família, pelos modelos a seguir, estímulos e suportes imprescindíveis.

Aos queridos amigos, pela diversão, descontração, cumplicidade e acolhimento.

“We botanists attempt to explain the plants we find in nature and to ask questions and seek answers wherever they may be found (e.g. field and lab experimentation, ultrastructure, DNA, etc.)”.

“Plants can be interesting if only you observe them”.

D. W. Woodland

RESUMO

Estudos utilizando sementes sensíveis à dessecação encontram diversos obstáculos, como a perda rápida da viabilidade no armazenamento. Assim, plântulas de espécies com sementes ortodoxas, como *Sesbania virgata*, têm sido usadas em estudos da sensibilidade à dessecação e comportamento no armazenamento. Objetivou-se avaliar a longevidade no armazenamento de plântulas de *S. virgata* submetidas a tratamentos de restrição hídrica e secagem. Foram realizados: curvas de secagem em diferentes velocidades; avaliação da sobrevivência após secagem direta em sílica gel até 10% de grau de umidade precedida ou não por incubação em PEG (-2,04 MPa) ou PEG+ABA (-2,04 MPa e 100 μ M); armazenamento das plântulas por 0, 30, 60, 90, 180 e 240 dias a -15, 5 e 22°C; teste de condutividade elétrica; análise de imagens de microscopia eletrônica de varredura; avaliação da integridade do DNA; análise de padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor e catalase; e observação anatômica da formação de raízes laterais. A maioria (94%) das plântulas de *S. virgata* com raiz primária de 1 mm de comprimento se mostrou tolerante à dessecação, enquanto somente 16% daquelas com raiz de 2 e 3 mm de comprimento permaneceram tolerantes após a secagem em sílica gel. A secagem rápida favoreceu a sobrevivência das plântulas com raiz de 2 mm em relação à secagem lenta, enquanto nas com raiz de 1 mm a velocidade não produziu diferenças. Nenhum dos tratamentos adotados foi efetivo em restabelecer a tolerância à dessecação (TD) em plântulas com raiz de 3 mm, que apresentaram alta lixiviação de solutos e desestruturação irreversível de membranas, embora a integridade do DNA não tenha sido alterada. Por outro lado, aquelas com raiz de 1 mm mantiveram elevadas as porcentagens de reindução do crescimento, sem aumento significativo na condutividade elétrica, alterações ultraestruturais nas paredes celulares ou degradação do DNA. Quando armazenadas por 240 dias, temperaturas mais baixas foram mais propícias às plântulas com 1 mm de raiz. Houve redução no número e na intensidade das bandas referentes a proteínas resistentes ao calor entre sementes secas e plântulas com 1 e 3 mm de raiz. A atividade da catalase também apresentou redução com o aumento do comprimento da raiz, embora tenha permanecido aparentemente inalterada nas sementes secas e nas plântulas com raiz de 1 mm e durante o armazenamento por 90 dias. A emissão de raízes laterais pode ser considerada um fenômeno normal e decorrente da própria formação do sistema radicular mesmo quando o meristema apical da raiz está inativado. Assim, é possível o armazenamento por 240 dias a temperaturas até 5°C de plântulas de *S. virgata* com raiz de 1 mm de comprimento submetidas à secagem até 10% de grau de umidade.

Palavras-chave: Tolerância à dessecação. Sementes germinadas. Estresse osmótico.

ABSTRACT

The extent to which desiccation can be tolerated varies among species. Desiccation tolerance (TD) is acquired late in orthodox seeds development and is considered an important trait to enable seed survival during storage or environmental stress. Studies employing desiccation sensitive seeds are hindered due their inherent characteristics (e.g. short storage life span). Seedlings of orthodox-seed species, as *Sesbania virgata*, have being used in desiccation sensitivity and storage behavior studies. The aim of this work was to evaluate the storage longevity of *S. virgata* seedlings treated with osmotic solutions and dried. Were performed: slow and fast dry test; survival evaluation after dehydration in silica gel and incubation in PEG (-2,04 MPa) and PEG+ABA (-2,04 MPa and 100 μ M) + dehydration in silica and storage (0, 30, 60, 90, 180 and 240 days) in -15, 5 and 22 °C; electrical conductivity test; scanning electron microscopy image analysis; DNA integrity analysis; electrophoretic patterns of heat resistant proteins and catalase analysis; and anatomical observations of lateral root formation. Most (94%) of *S. virgata* seedlings dried in silica gel exhibiting primary root with 1 mm were still able to tolerate drying, whereas only 16% of the ones with 2 or 3 mm primary root were desiccation tolerant. Fast dry was better than slow dry to seedlings with 2 mm primary root, but both had the same effect in seedlings with 1 mm primary root. None of the treatment was effective in re-establish TD in stored seedlings with 3 mm primary root, which presented high solute leakage and membrane disruption, but didn't show DNA degradation. On the other hand, seedlings with 1 mm primary root presented high percentage of growth re-induction, without raise the electrical conductivity, show ultrastructural damage or DNA degradation after desiccation preceded or not by PEG or PEG+ABA incubation. After 240 days of storage, low temperatures were more favorable to seedlings with 1 mm primary root. There was reduction in number and intensity of the heat resistant proteins bands when comparing dry seeds and seedlings with 1 mm primary root and seedling with 1 and 3 mm primary root. Catalase activity decreased in seedlings with 3 mm primary root when compared with 1 mm, but remained unaltered in dry seeds and seedlings with 1 mm root and during storage. Lateral root formation was considered a regular phenomenon of the root system formation, operating even if the root apex meristem is inactivated. Finally, the storage of *S. virgata* seedlings dehydrated to 10% water content during 240 days in temperatures at least 5°C is possible.

Key-words: Desiccation tolerance. Germinated seeds. Osmotic stress.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 A espécie – <i>Sesbania virgata</i> (Cav.) Pers	11
2.2 Tolerância à dessecação (TD).....	12
2.2.1 Aspectos anatômicos e ultraestruturais da TD.....	15
2.2.2 Aspectos moleculares da TD	17
2.2.3 Perda e Restabelecimento da TD	18
2.2.4 Uso de plântulas no estudo da TD	20
2.3 Armazenamento de sementes.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Coleta e beneficiamento de sementes	23
3.2 Determinação do grau de umidade	23
3.3 Testes de germinação.....	24
3.4 Perda e Restabelecimento da TD	24
3.4.1 Secagem rápida	24
3.4.2 Secagem lenta	25
3.4.3 Perda da TD	25
3.5 Armazenamento de plântulas	26
3.6 Avaliação da integridade de membranas	29
3.7 Avaliação da integridade do DNA.....	31
3.8 Padrões eletroforéticos de proteínas resistentes ao calor e catalase.....	33
3.8.1 Proteínas resistentes ao calor (HSP).....	33
3.8.2 Catalase.....	34
3.9 Formação de raízes laterais.....	34
3.10 Análise dos dados	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Efeito da velocidade de secagem	36
4.2 Perda e restabelecimento da TD	38
4.3 Integridade de membranas.....	48
4.4 Integridade do DNA.....	50
4.5 Caracterização de padrões de HSPs e de catalase.....	52
4.5.1 HSPs	52
4.5.2 Catalase.....	56
4.6 Formação de raízes laterais.....	58
5 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

A tolerância à dessecação (TD) é uma característica complexa que envolve diversos genes e baseia-se na função bioquímica desses genes e em como sua transcrição é regulada (BARTELS, 2005, p. 699). É amplamente verificada em grãos de pólen, esporos e sementes tanto de espécies de plantas sensíveis como daquelas tolerantes à dessecação dos tecidos vegetativos (BLACK; PRITCHARD, 2002). Isso significa que a informação genética para a TD está presente no genoma da maioria, senão de todas, as plantas vasculares, e que o controle da expressão gênica é o provável responsável por diferenças na tolerância entre os estágios do desenvolvimento das plantas (BARTELS; SALAMINI, 2001). Sendo assim, talvez a causa imediata da sensibilidade à dessecação seja a inabilidade dos tecidos de desligarem os programas de desenvolvimento, desdiferenciarem estruturas subcelulares e se protegerem adequadamente contra as consequências da desidratação de um tecido metabolicamente ativo (PAMMENTER; BERJAK, 1999).

Entre as sementes, podem ser constatados diferentes graus de TD, formando um gradiente das tipicamente tolerantes às extremamente sensíveis (PAMMENTER; BERJAK, 1999). As tipicamente tolerantes são chamadas ortodoxas e podem ser secas até graus de umidade de cerca de 7% e armazenadas por longos períodos sem danos ao metabolismo (ROBERTS, 1973, p. 500). Seu potencial de conservação tende a ser inversamente proporcional ao grau de umidade e à temperatura ambiente dentro de limites (MARCOS FILHO, 2005, p. 360). Por outro lado, as sementes extremamente sensíveis são conhecidas como recalcitrantes e não toleram grandes reduções no grau de umidade ou o armazenamento por períodos que excedam algumas semanas ou meses (DAWS, GARWOOD; PRITCHARD, 2006; ROBERTS, 1973, p. 500).

Diversos fatores têm sido relacionados à TD, como a velocidade de secagem, a manutenção da integridade de membranas e ácidos nucleicos, a presença de protetores e a atuação de mecanismos antioxidantes e de reparo (BLACK; PRITCHARD, 2002; KALEMBA; JANOWIAK; PUKACKA, 2009; KRANNER et al., 2011; SPANÒ et al., 2007; VERTUCCI; FARRANT, 1995). Acredita-se que, isoladamente, nenhum desses fatores seja capaz de conferir a TD, mas, sim, sua atuação em conjunto (PAMMENTER; BERJAK, 1999). Por outro lado, a ausência de um ou mais desses fatores pode significar perda ou redução acentuada na TD (PAMMENTER; BERJAK, 1999).

Em sementes ortodoxas, a TD começa a ser perdida com a protrusão da radícula, e o comprimento da raiz primária no qual as plântulas a perdem irreversivelmente varia de acordo com a espécie (FARIA et al., 2005; GUTTERMAN; HUANG, 2004; VIEIRA et al., 2010).

A partir disso, compreender a TD representa um campo fértil para pesquisas sobre seus limites, suas implicações ecológicas e sobre como induzi-la ou reproduzi-la em organismos sensíveis, como grandes culturas sensíveis à seca (CROWE et al., 2005; DAWS et al., 2007a; TOLDI; TUBA; SCOTT, 2009). Contudo, estudos utilizando sementes sensíveis à dessecação encontram diversos obstáculos, como a perda rápida da viabilidade no armazenamento. Assim, sementes ortodoxas germinadas (plântulas) têm sido propostas como modelos convenientes e confiáveis para estudos de sensibilidade à dessecação e comportamento no armazenamento por proporcionarem mais flexibilidade ao planejamento de experimentos (SUN, 1999, p. 32). Esses estudos têm utilizado toda a gama de ferramentas disponíveis (fisiológicas, anatômicas e moleculares) para elucidar questões acerca dos processos envolvidos. Buscar essas respostas utilizando modelos, como plântulas de *Sesbania virgata*, pode fornecer informações úteis no prolongamento da viabilidade no armazenamento de

sementes recalcitrantes, plântulas em estádios iniciais de desenvolvimento e sementes sintéticas

Sementes de *S. virgata* (Cav.) Pers. (Fabaceae – Faboideae), uma espécie arbórea tropical (POTOMATI; BUCKERIDGE, 2002), têm se mostrado modelos eficientes em estudos da fisiologia da germinação e do crescimento de plântulas (LISBOA et al., 2006; POTOMATI; BUCKERIDGE, 2002; SIMÕES et al., 2008; TONINI et al., 2006, 2007; TONINI; PURGATTO; BUCKERIDGE, 2010; VEASEY et al., 1999). Nessa espécie, os mecanismos de tolerância e sensibilidade à dessecação foram investigados por Masetto (2008, p. 21), que analisou as alterações citológicas durante a perda e o restabelecimento da TD em plântulas.

Contudo, alguns fatores relacionados à manutenção e à reindução da TD em plântulas ainda precisam ser mais bem elucidados, como a longevidade no armazenamento das plântulas, o efeito de tratamentos de restrição hídrica na armazenabilidade dessas plântulas e a influência do armazenamento na manutenção da integridade do DNA e das membranas, na persistência das proteínas resistentes ao calor e na atividade da catalase.

Portanto, no presente trabalho, teve-se como objetivo geral avaliar a longevidade no armazenamento de plântulas de *Sesbania virgata* submetidas à restrição hídrica e secagem, identificando tratamentos que favoreçam seu armazenamento, sob diferentes temperaturas; e como objetivos específicos: avaliar o efeito da velocidade de secagem na manutenção da TD, examinar a integridade de membranas e do DNA após o armazenamento, caracterizar os padrões eletroforéticos para catalase e proteínas resistentes ao calor, e analisar a formação de raízes laterais após a reindução do crescimento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A espécie – *Sesbania virgata* (Cav.) Pers

Sesbania virgata (Fabaceae – Faboidea) é uma espécie arbórea, que ocorre naturalmente em formações campestres de quase todo o Brasil (exceto na região Norte), na Argentina, no Paraguai e no Uruguai (IGNACI; MIOTTO, 2010). Atinge cerca de 6 m de altura, 25 cm de diâmetro a altura do peito e 5 m de diâmetro de copa, tem vida curta (oito a nove anos) e capacidade moderada de competir com gramíneas e rebrotar da cepa após corte ou fogo (ARAÚJO et al., 2004). Desenvolve-se naturalmente em terrenos úmidos, associa-se a bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Rhizobium*, está relacionada aos primeiros estágios da sucessão ecológica e é indicada para revegetação de áreas de cava com extração de argila e recuperação de áreas degradadas (COUTINHO et al., 2006; POTOMATI; BUCKERIDGE, 2002). Seus principais usos econômicos são o fornecimento de pasto apícola, lenha e forragem (POTT; POTT, 1994).

Os frutos de *S. virgata* contêm entre duas e seis sementes com dormência física devido à impermeabilidade do tegumento à água (ARAÚJO et al., 2004). Isso significa que, para que se inicie o processo germinativo, é necessária a superação dessa dormência. O método mais recomendado é o tratamento com ácido sulfúrico (VARI et al., 2007; VEASEY; TEIXEIRA DE FREITAS, 2002), que proporciona rápida escarificação, embora possa causar lesões no hipocótilo e na radícula se a exposição ao ácido ocorrer por tempo excessivo (CAMARGOS et al., 2008).

Existem evidências de que a testa das sementes de *S. virgata* participe do controle da mobilização de proteínas de armazenamento e da degradação de galactomananos, controlando a produção, a modificação e o armazenamento de

hidrolases (TONINI et al., 2007). No tegumento dessas sementes, foram encontrados bioflavonoides, ácido abscísico (ABA), catequinas e quercetinas (SIMÕES et al., 2008; TONINI et al., 2006). No endosperma, foi verificada a existência de endo- β -mananase, atuando (dependendo da localização) na emergência da radícula e na mobilização de reservas (galactomananos) após a germinação (LISBOA et al., 2006).

A escolha da espécie *S. virgata* está relacionada à sua alta produção de sementes viáveis por longos períodos e à quantidade de informações disponíveis sobre essa espécie, como aquelas fornecidas por estudos realizados por Coutinho et al. (2006), Masetto (2008), Potomati e Buckeridge (2002) e Simões et al. (2008).

2.2 Tolerância à dessecação (TD)

A TD é a habilidade de as células de um organismo equilibrarem seu potencial hídrico com o ar moderada a extremamente seco (50% de umidade relativa e 20°C) e, então, retomarem suas funções normais após a reidratação (ALPERT, 2000, p. 5). É mediada por mecanismos celulares de prevenção e reparo de danos bioquímicos, que agem em sinergia e previnem danos letais aos diferentes componentes celulares, incluindo membranas, proteínas e componentes do citosol (ALPERT, 2000, p. 11; HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001).

Os principais mecanismos de aquisição da TD incluem: formação de um estado vítreo, acumulação de di- e oligossacarídeos, ativação de sistemas antioxidantes, mudanças na estrutura física das células e síntese de proteínas de armazenamento e de “proteínas resistentes ao calor” (*Heat Stable Proteins* – HSPs) (ANGELOVICI et al., 2010; HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001).

As proteínas *Late Embryogenesis Abundant* (LEA) integram as HSPs e foram identificadas em tecidos vegetativos de todas as plantas tolerantes à dessecação já estudadas, além de bactérias, cianobactérias, protozoários, fungos e alguns procariontes (por exemplo: rotíferos, nematoides, coelobolas e tardígrados) (HAND et al., 2011). São ricas em glicina e outros aminoácidos hidrofílicos, capazes de permanecer solúveis a elevadas temperaturas, variáveis em tamanho (8 a 77 kDa) e podem ou não apresentar carga (JOSÉ et al., 2005; TUNNACLIFFE; WISE, 2007). As LEA são frequentemente associadas à tolerância ao estresse hídrico e/ou por baixas temperaturas (TUNNACLIFFE; WISE, 2007) e desempenham um papel valioso na TD, protegendo proteínas-alvo da inativação e da agregação durante o estresse hídrico (HAND et al., 2011). Proteínas LEA são intrinsecamente desestruturadas em solução aquosa, porém têm a habilidade de se tornarem mais ordenadas e estáveis enquanto a desidratação prossegue (HAND et al., 2011).

A dessecação induz à acumulação de espécies de radicais livres associadas à peroxidação lipídica (NTULI et al., 2011). Assim, a TD pode ser relacionada, ao menos em parte, à capacidade de as plantas eliminarem o excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, como consequência, atenuarem o ambiente oxidante dentro das células e minimizarem os danos causados pelo excesso de ROS (CONTRERAS-PORCIA et al., 2011). Em tecidos não fotossintetizantes, incluindo tecidos das sementes, a respiração é a maior produtora intracelular de ROS, sendo que essa produção é amplificada pela interrupção da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria durante a dessecação (ROACH et al., 2010).

Um dos fatores que afetam a resposta à desidratação é a taxa de secagem (PAMMENTER; BERJAK, 1999). Sementes sensíveis à dessecação ou embriões isolados dessas sementes, quando secos rapidamente, toleram graus de umidade mais baixos do que quando secos lentamente, pois passam pelos graus

de umidade intermediários tão rápido que os danos causados por reações deletérias associadas à água não se acumulam (BLACK; PRITCHARD, 2002; PAMMENTER; BERJAK, 1999). Por outro lado, sementes ortodoxas, antes de adquirirem a TD, respondem melhor à secagem lenta, já que a baixa velocidade oferece tempo suficiente para a indução de mecanismos de tolerância (BLACK; PRITCHARD, 2002).

Tratamentos de restrição hídrica empregando o agente osmótico Polietileno-glicol (PEG) têm alcançado êxito em reduzir os danos causados pela desidratação. A incubação em soluções contendo PEG tem sido utilizada em procedimentos de desidratação e reidratação controladas (BLACK; PRITCHARD, 2002). As moléculas de PEG formam pontes de hidrogênio com a água, reduzindo o potencial mátrico do substrato (BURNETT et al., 2005). Dessa forma, o tratamento com PEG gera uma significativa redução do potencial hídrico semelhante à produzida pelo estresse por seca, induzindo um ajuste osmótico por meio do rearranjo das membranas e servindo como inibidor do crescimento da raiz primária enquanto o ABA se acumula e começa a agir (AVELANGE-MACHEREL et al., 2006; BUITINK et al., 2003; CARUSO et al., 2008).

Em plântulas de *S. virgata* submetidas à incubação em PEG e PEG combinado com ácido abscísico (PEG+ABA) seguida de secagem até 10% de grau de umidade, foram alcançados níveis de reindução do crescimento próximos a 100 e a 50% para plântulas com raiz primária de 1 e 3 mm, respectivamente (MASETTO, 2008, p. 21).

O fitormônio ácido abscísico, um sesquiterpeno sintetizado durante a fase de maturação das sementes, aumenta a capacidade de reindução da TD (MASETTO, 2008, p. 23; VIEIRA, 2008, p. 25). O ABA induz a expressão de genes relacionados às proteínas LEA durante o desenvolvimento das sementes, bloqueia a replicação do DNA e inibe a acumulação de β -tubulina, a organização

transversal de microtúbulos e a replicação do DNA durante a embebição (BECKETT; CSINTALAN; TUBA, 2000; SILVA et al., 2008; DALAL et al., 2009). O bloqueio da replicação do DNA paralisa o ciclo celular, fazendo com que haja acúmulo de células na fase G1, que, comparadas às células nas fases S e M/G2, são mais resistentes a estresses e capazes de se manter viáveis por mais tempo (SILVA et al., 2008; DELTOUR, 1985, p.46).

2.2.1 Aspectos anatômicos e ultraestruturais da TD

A dessecação causa diversos estresses subcelulares e as plantas respondem a eles de forma variada e dependente do tecido ou órgão considerado e de características adaptativas (PEÑA-VALDIVIA et al., 2010). Exemplos dessas perturbações são: o estresse mecânico, associado ao dobramento da parede celular em resposta à redução do volume; o estresse oxidativo, devido à ação dos radicais livres gerados pelo metabolismo desregulado; e a desestabilização ou perda da integridade de membranas e macromoléculas (CONTRERAS-PORCIA et al., 2011; FARRANT, 2000, p. 30).

Nas membranas, Black e Pritchard (2002) citam que a desidratação tem dois efeitos principais. O primeiro, direto e reversível, está relacionado à separação lateral de fases dentro do plano da membrana e ao domínio da fase de gel, o que pode ocasionar sérios danos tanto para a membrana quanto para a organização das proteínas de membrana, para o suporte da atividade enzimática, a permeabilidade seletiva e a compartimentação. O segundo, indireto e irreversível, se refere ao aumento da viscosidade e à alteração da temperatura de transição de fase da membrana de tecidos sensíveis como consequência de mudanças no grau de insaturação dos fosfolípidios sob condições de severa dessecação.

Em tecidos vegetativos, diversas alterações morfológicas e ultraestruturais têm sido atribuídas à dessecação, como: volume celular reduzido; citoplasma mais condensado, opaco e pigmentado; contorno irregular das células; dobramentos na membrana plasmática, ganhando aspecto convoluto; sistema vacuolar típico do estado hidratado substituído por vacúolos menores e numerosos; agrupamento dos ribossomos; condensação da cromatina e justaposição das mitocôndrias e cloroplastos; redução da seção transversal da raiz, da espessura da epiderme, da exoderme e do córtex; diminuição do número de vasos de metaxilema; e aumento no número de células do parênquima (CONTRERAS-PORCIA et al., 2011; PEÑA-VALDIVIA et al., 2010; PROCTOR; LIGRONE; DUCKETT, 2007).

Para prevenir ou reduzir danos, as células podem ativar mecanismos que possibilitam sua sobrevivência no estado desidratado. Alguns dos processos ou mecanismos utilizados são: aumento da vacuolização, deposição de reservas insolúveis, mudanças no citoesqueleto e na conformação do DNA, desdiferenciação intracelular, redução do metabolismo, operação de sistemas antioxidantes eficientes, síntese e acumulação de moléculas protetoras, acumulação de moléculas anfipáticas, dobramento das membranas e formação de vesículas para acomodar mudanças de volume (BERJAK; PAMMENTER, 2000; FARRANT, 2000, p. 33; WALTERS; WHEELER; GROTEHUIS, 2005).

Estudos sobre o restabelecimento da TD em plântulas relatam o aparecimento de primórdios de “raízes adventícias” ao redor da porção final do hipocótilo (GUTTERMAN; GOZLAN, 1998; GUTTERMAN; HUANG, 2004; MASETTO, 2008, p.22; VIEIRA et al., 2010). O surgimento dessas raízes ocorreu após o ápice da raiz primária apresentar aspecto necrótico, caracterizado pelo escurecimento dos tecidos, ou quando a raiz primária sobreviveu totalmente (GUTTERMAN; HUANG, 2004; MASETTO, 2008, p. 22; VIEIRA et al.,

2010). Em todos os casos, as plântulas formadas não apresentaram sinais visíveis de baixa qualidade, indicando que essas raízes aumentam suas chances de sobrevivência (EHLERS; GOSS, 2003; MASETTO, 2008, p. 22; VIEIRA et al., 2010).

2.2.2 Aspectos moleculares da TD

Estudos sobre o programa genético utilizado por sementes ortodoxas na aquisição da TD durante seu desenvolvimento empregam frequentemente técnicas de transcriptômica e proteômica (BAI et al., 2011; BOUCHER et al., 2010; OLVERA-CARRILLO et al., 2010; RÖHRIG et al., 2006). Em sementes maduras secas, tais análises têm revelado alta abundância de transcritos codificando para proteínas LEA, HSPs e peroxirredoxinas e envolvidos na transdução de sinais, desenvolvimento, metabolismo de carboidratos, síntese de proteínas de armazenamento, metabolismo de lipídeos, resposta a estresses abióticos e fotossíntese (FARRANT; MOORE, 2011; RODRIGUEZ et al., 2010; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006; ZHOU et al., 2008).

Marcadores bioquímicos de proteínas também podem ser empregados no estudo de mudanças no programa genético relacionado à TD. A utilização desses marcadores oferece vantagens, como a obtenção de resultados em curto prazo (72-96 h) e a simplicidade de operação (VIEIRA et al., 2009). Os marcadores bioquímicos mais utilizados são os sistemas enzimáticos antioxidantes (por exemplo: superóxido dismutase, catalase, glutamato peroxidase e glutamato redutase) e as proteínas resistentes ao calor (BONOME, 2006, p. 89; CAIXETA, 2009, p. 42; JOSÉ et al., 2005; VIEIRA et al., 2009).

As superóxido dismutases são metaloenzimas que catalisam a transformação de duas moléculas de superóxido livres em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (BLACK; PRITCHARD, 2002). Entretanto, o peróxido

de hidrogênio, que também é tóxico para as células, pode originar o radical hidroxila, que é muito reativo e leva à oxidação dos fosfolipídios de membranas, do DNA e das proteínas (BAILLY et al., 2004). A catalase, presente nos peroxissomas, é uma das enzimas responsáveis por promover a desintoxicação celular mediante a decomposição desse peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água sem a produção de radicais livres (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Outro aspecto relacionado à sobrevivência das sementes no estado dessecado e durante a reidratação é a manutenção da integridade e da conformação do DNA. O reparo eficiente do DNA assume papel de componente crítico da maquinaria celular e seu alcance pode ser visto como um fator determinante do sucesso das células vegetais nos ciclos de desidratação/reidratação (BLACK; PRITCHARD, 2002).

Um indicativo da perda da integridade do DNA e da morte celular programada é a observação de fragmentos de aproximadamente 180 pares de bases em gel de eletroforese (BLACK; PRITCHARD, 2002; KRANNER et al., 2011). Esses fragmentos são formados quando o Citocromo *c* ativa a cascata da para- ou metacaspase, resultando em ativação de DNAses, que são as responsáveis pela geração dos fragmentos (KRANNER et al., 2011). Um exemplo é a formação de fragmentos de cerca de 200 pares de bases em plântulas de *Medicago truncatula* com raiz primária de 2 mm submetidas à secagem (FARIA et al., 2005).

2.2.3 Perda e Restabelecimento da TD

Plântulas originadas de sementes ortodoxas perdem a TD primeiro na raiz primária. O ponto de início dessa perda, quando analisado em termos de tempo de embebição ou de comprimento de raiz primária, varia entre espécies

(FARIA et al., 2005; GUTTERMAN; HUANG, 2004; MASETTO, 2008, p. 23; VIEIRA et al., 2010). Entretanto, independentemente da espécie, a perda da TD coincide com a retomada da divisão celular e da síntese de DNA e está relacionada à incapacidade das células de reconstituir o citoesqueleto microtubular (FARIA et al., 2005).

A manutenção da TD após a germinação e durante a fase inicial do desenvolvimento e do crescimento talvez reduza a vulnerabilidade que existe entre o estágio de plântula e planta estabelecida (BUITINK et al., 2003). É provável que o papel ecológico desse fenômeno seja a adaptação à disponibilidade limitada de água no solo resultante, por exemplo, de precipitação irregular (DAWS et al., 2007a; VIEIRA et al., 2010). Além disso, possivelmente, a reaquisição da TD capacita as plântulas a uma rápida adaptação a condições adversas durante as primeiras fases de seu estabelecimento, assegurando a sobrevivência da progênie (BUITINK et al., 2006).

Estudos têm demonstrado que tratamentos osmóticos são capazes de restabelecer a TD em raízes primárias de plântulas submetidas à dessecação e à reidratação (BUITINK et al., 2003; FARIA et al., 2005; LEPRINCE et al., 2000). Em *M. truncatula*, a TD foi reinduzida em 84% das plântulas com raiz primária de até 2 mm de comprimento tratadas com PEG e secas (as plântulas não tratadas perderam irreversivelmente a TD) (FARIA et al., 2005). Plântulas de *Tabebuia impetiginosa*, com raiz de 2,5 mm, tratadas com PEG e secas até 20% de grau de umidade são capazes de manter a viabilidade em 31% dos casos, enquanto o controle perdeu totalmente a viabilidade (VIEIRA et al., 2010). Em *S. virgata*, o tratamento osmótico com PEG foi capaz de prevenir a morte de 45% das plântulas com raiz primária de 3 mm de comprimento secas até 10% de grau de umidade (não houve sobrevivência entre as plântulas não tratadas) (MASETTO, 2008, p.25). Acredita-se que os efeitos da incubação em PEG sejam devidos ao fato de as plântulas tratadas permanecerem capazes de

reconstruir o citoesqueleto microtubular, manter a integridade do DNA e seguir seu desenvolvimento normal (FARIA et al., 2005).

Aplicações de ABA exógeno, juntamente com o tratamento osmótico, também produziram resultados positivos no restabelecimento da TD (MASETTO, 2008, p. 39; VIEIRA et al., 2010). Nesse caso, acredita-se que o tratamento osmótico e o ABA operem na forma de estímulos independentes e necessários à reindução da TD (BUITINK et al., 2003).

2.2.4 Uso de plântulas no estudo da TD

Plântulas de espécies com sementes ortodoxas têm sido utilizadas como modelos no estudo da sensibilidade à dessecação (BUITINK et al., 2003, 2006; FARIA et al., 2005; GUTTERMAN; HUANG, 2004; LEPRINCE et al., 2000; MASETTO, 2008, p. 24; PUKACKA, 2001, p. 44; VIEIRA et al., 2010; WHALLEY et al., 2001).

O uso desses modelos foi proposto com base em semelhanças entre essas plântulas e sementes recalcitrantes: sensibilidade à dessecação; conteúdo crítico de água tolerado, afetado pela fase do desenvolvimento, pela taxa de secagem e pela temperatura de secagem; perda rápida da viabilidade quando armazenadas hidratadas; e características ultraestruturais, como alto grau de desenvolvimento subcelular e de vacuolização (SUN, 1999, p. 32).

O emprego de plântulas facilita estudos comparativos, garante maior flexibilidade ao planejamento de experimentos e possibilita, por meio da manipulação do tempo, da temperatura e da umidade, o controle da sensibilidade à dessecação, da cinética da germinação e dos eventos do desenvolvimento (BERJAK; PAMMENTER, 2008; SUN, 1999, p. 32).

Contudo, há certa dificuldade em definir precisamente o que é uma plântula. Com base no proposto por Fenner (1987, p. 35), este estudo considerou

que uma plântula começa a existir no momento em que a semente germina, ou seja, a partir da protrusão radicular.

2.3 Armazenamento de sementes

O armazenamento *ex situ* em bancos de sementes é uma das melhores estratégias para a conservação da diversidade genética vegetal e é influenciado por fatores genéticos, por condições ambientais durante o desenvolvimento das sementes, por características do ambiente de armazenamento e pelo grau de umidade e qualidade da semente (RAJJOU; DEBEAUJOUN, 2008). Nesse sentido, o armazenamento bem conduzido preserva a qualidade e permite o uso múltiplo do material tendo decorrido longo tempo (BONOME, 2006, p. 5; LEINO; EDQVIST, 2010). Em contraste, o armazenamento malconduzido pode levar à deterioração das sementes, que perdem seu vigor e se tornam mais sensíveis a estresses durante a germinação, podendo até perder a capacidade de germinar (RAJJOU; DEBEAUJOUN, 2008).

Para o armazenamento bem-conduzido, devem ser levados em conta fatores como a temperatura, a umidade relativa do ar e o grau de umidade das sementes. A importância desses fatores e suas interações são prioritárias para o entendimento das exigências das espécies quanto à manutenção da viabilidade das sementes (BONOME, 2006, p. 6).

Além disso, as espécies se comportam de maneiras diferentes quando mantidas sob as mesmas condições. Sementes ortodoxas respondem positivamente ao armazenamento *ex situ* em ambiente frio e seco, sendo que alguns registros apontam para a sobrevivência de sementes armazenadas por cerca de 200 anos em condições subótimas (DAWS et al., 2007b; LEINO; EDQVIST, 2010). Contudo, o mesmo não é verificado nas sementes

recalcitrantes ou intermediárias, que não sobrevivem se mantidas da mesma forma (HONG; ELLIS, 1996; RAJJOU; DEBEAUJON, 2008).

Para as sementes com comportamento intermediário, a desidratação pode, inicialmente, aumentar a longevidade no armazenamento, porém algumas espécies são sensíveis à desidratação e outras, a temperaturas abaixo de zero (PRITCHARD, 2004, p. 140).

A manutenção do vigor e da viabilidade de sementes recalcitrantes durante o armazenamento requer a menor temperatura possível que não cause danos por congelamento. Mesmo assim, armazená-las inteiras somente é possível por médio e curto prazos, já que permanecem metabolicamente ativas e tendem a progredir rumo à germinação se mantido o grau de umidade em que são dispersas. Ainda, o grau de umidade pode favorecer a proliferação de fungos, que também afetam a qualidade das sementes (BERJAK; PAMMENTER, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram realizados nos Laboratórios de Sementes Florestais e de Conservação Genética de Espécies Arbóreas, ambos do Departamento de Ciências Florestais (DCF) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no Laboratório de Análise e Biotecnologia de Sementes, do Departamento de Agricultura da UFLA e no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UFLA.

3.1 Coleta e beneficiamento de sementes

Frutos maduros (coloração marrom-escuro) de 12 matrizes de *Sesbania virgata* foram coletados, na região de Lavras (21°22'S, 45°1'W), Minas Gerais, em abril de 2010. O beneficiamento ocorreu no Viveiro Florestal do DCF/UFLA e consistiu na quebra dos frutos no interior de sacos de aniagem com martelo de borracha, seguindo as recomendações de Davide et al. (1995), e na separação das sementes e do material inerte (BRASIL, 2009, p. 93). Foram descartadas as sementes de coloração marrom-escuro, por terem supostamente sido produzidas no ano anterior, já que a espécie forma banco de sementes aéreo.

As sementes foram pesadas, colocadas em sacos plásticos selados (não-herméticos) e armazenadas em câmara fria a 5°C, onde permaneceram até o início dos experimentos.

3.2 Determinação do grau de umidade

A determinação do grau de umidade foi realizada com base nas Regras para a Análise de Sementes (BRASIL, 2009, p. 214), ou seja, pelo método da estufa, a 103±2°C, por 17±1 h, utilizando-se quatro repetições de 2 g de sementes. Os resultados foram calculados com base no peso das sementes úmidas.

3.3 Testes de germinação

A dormência tegumentar das sementes foi superada por escarificação química com uso de ácido sulfúrico concentrado por 60 min (VEASEY; TEIXEIRA DE FREITAS, 2002). Em seguida, as sementes foram lavadas em água corrente por 10 min, desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2% por 5 min e dispostas em rolos de papel de filtro umedecidos. Os testes foram conduzidos durante aproximadamente 36 h, em câmaras de germinação do tipo BOD, a 30°C, sob luz branca constante.

3.4 Perda e Restabelecimento da TD

3.4.1 Secagem rápida

Plântulas com raiz primária de 1 e 2 mm de comprimento foram secas em caixas do tipo gerbox, contendo, na parte inferior, sílica gel ativada e a redução em seu peso acompanhada por pesagens periódicas (0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 h).

Ao final da desidratação, as plântulas foram pré-umidificadas em atmosfera úmida (100% UR) por 24 h, a 30°C no escuro, e colocadas nas mesmas condições usadas para a germinação.

Paralelamente, antes e após a secagem, foi determinado o grau de umidade das plântulas, aplicando o método da estufa a $103\pm 2^\circ\text{C}$ durante 17 h. Os graus de umidade foram expressos na base úmida.

Para a redução do erro derivado da precisão da balança, foram utilizadas quatro repetições de 25 plântulas por comprimento de raiz.

3.4.2 Secagem lenta

Plântulas com raiz primária de 1 e 2 mm de comprimento foram secas em caixas de secagem, contendo, na parte inferior, soluções salinas concentradas de NaCl e $Mg(NO_3)_2$, as quais mantiveram as umidades relativas de 76 e 53%, respectivamente. Nessas condições, as sementes foram conservadas a 20°C, por quatro dias, no meio com umidade relativa mais alta, e depois, transferidas para o meio com umidade relativa mais baixa, onde permaneceram por mais quatro dias. A redução em seu peso foi acompanhada por pesagens diárias.

Ao final da desidratação, as plântulas foram pré-umidificadas em atmosfera úmida (100% UR) por 24 h, a 30°C no escuro, e colocadas nas mesmas condições usadas para a germinação. Paralelamente, foi determinado o grau de umidade das plântulas, aplicando o método já descrito.

Para a redução do erro derivado da precisão da balança, foram utilizadas quatro repetições de 25 plântulas por comprimento de raiz.

3.4.3 Perda da TD

Para a avaliação da perda da TD após a germinação, plântulas com raiz primária com 1, 2, 3 e 5 mm de comprimento foram submetidas à secagem rápida (até que atingissem seu teor de água original (aproximadamente 10% de grau de umidade). Durante a desidratação, foram realizadas pesagens periódicas até que o peso coincidissem com o peso desejado, correspondente ao grau de umidade almejado e calculado por meio da expressão proposta por Cromarty, Ellis e Roberts (1985).

$$M_{ud} = \frac{M_i(100 - U_i)}{100 - U_d}, \text{ onde}$$

M_{ud} = massa da amostra (g) no grau de umidade desejado após a secagem;

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

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

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

Após a desidratação, as plântulas foram pré-umidificadas em câmara úmida (100% UR), durante 24 h, a 30°C, e colocadas nas mesmas condições usadas para a germinação. Aquelas que retomaram seu desenvolvimento e originaram plântulas normais foram consideradas tolerantes à dessecação.

O experimento foi conduzido com 4 repetições de 20 plântulas para cada comprimento de raiz.

3.5 Armazenamento de plântulas

Plântulas com 1 mm de raiz primária foram submetidas a três tratamentos previamente ao armazenamento: secagem direta em sílica gel (umidade relativa do ar no interior da caixa de 8%), até atingirem 10% de grau de umidade; incubação em PEG + secagem em sílica gel; e incubação em PEG+ABA + secagem em sílica gel (Figura 1).

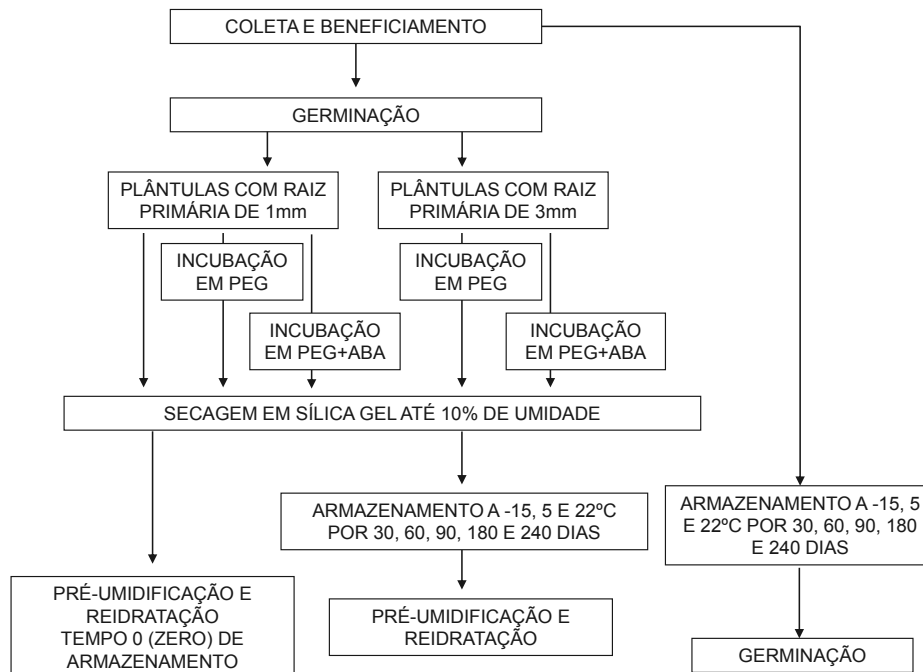


Figura 1: Fluxograma da metodologia adotada para a avaliação da tolerância das plântulas de *Sesbania virgata* ao armazenamento.

Plântulas com 3 mm de raiz primária foram submetidas a dois tratamentos antes do armazenamento: incubação em PEG + secagem em sílica gel até atingirem 10% de grau de umidade e incubação em PEG+ABA + secagem em sílica gel (Figura 1).

As plântulas foram colocadas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo uma folha de papel de germinação umedecida com 12 mL de solução PEG 8000 (380 g de PEG 8000 dissolvidos em 1 L de água). No caso de PEG+ABA, foi utilizada solução com a mesma concentração de PEG acrescida de solução de ABA (100 μ M). Em ambos os casos, as plântulas permaneceram nessas condições durante 72 h, a 5°C, o que implicou um potencial osmótico de

-2,04 MPa, suficiente para impedir a continuação do crescimento das raízes (MASETTO, 2008, p. 16). Para o preparo da solução estoque de ABA, o composto foi dissolvido em KOH 1N e, em seguida, neutralizado em HCl 1N.

Após esse período, as plântulas foram lavadas durante 10 min em água corrente para a remoção dos resíduos de solução e secas superficialmente sobre papel toalha para eliminar o excesso de água. Paralelamente, foi determinado o grau de umidade das plântulas.

Em seguida, as plântulas (incluindo aquelas sem incubação em PEG ou PEG+ABA) foram desidratadas em caixa gerbox contendo sílica gel ativada até que atingissem seu teor de água original. Durante a desidratação, foram realizadas pesagens periódicas até que o peso coincidissem com o peso desejado, correspondente ao grau de umidade almejado e calculado por meio da expressão proposta por Cromarty, Ellis e Roberts (1985).

As plântulas foram então armazenadas em sacos plásticos selados, ao abrigo da luz, em câmara fria (5°C e 35-40% UR), *freezer* (-15°C e 59±7% UR) e sala climatizada (22°C e 35±1,6%UR), por 30, 60, 90, 180 e 240 dias. Devido à disponibilidade de plântulas com raiz primária de 1 mm de comprimento incubadas em PEG, secas e armazenadas a -15°C e a 22°C e incubadas em PEG+ABA, secas e armazenadas a 5°C, realizou-se o armazenamento dessas plântulas até os 400 dias.

Com o objetivo de verificar a viabilidade das plântulas logo após a desidratação (tempo 0 de armazenamento), amostras foram retiradas, pré-umidificadas em câmara úmida (100% UR), durante 24 h, a 30°C, no escuro, e reidratadas sobre papel umedecido, a 30°C e luz branca constante. Plântulas que retomaram o crescimento normal, com hipocótilo reto, delgado e alongado e epicótilo bem desenvolvido, com folhas primárias verdes e em expansão (BRASIL, 2009, p. 166), foram consideradas tolerantes à dessecação.

Após cada período de armazenamento, amostras foram pré-umidificadas e reidratadas como descrito anteriormente. Plântulas que retomaram o crescimento normal foram consideradas tolerantes à dessecação e ao armazenamento.

Para efeito de comparação, sementes secas (não submetidas à germinação e desidratação) também foram armazenadas nas mesmas condições e pelos mesmos períodos de tempo descritos anteriormente. Ao fim de cada intervalo de armazenamento, amostras tiveram a viabilidade avaliada por meio de testes de germinação.

O experimento foi conduzido com quatro repetições de 20 plântulas (sementes, no caso do controle) por tratamento.

3.6 Avaliação da integridade de membranas

Para a avaliação da integridade de membranas, foram realizados testes de condutividade elétrica e análise de imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

O teste de condutividade elétrica foi efetuado, utilizando quatro repetições de 25 sementes ou plântulas para cada tratamento:

1. Controle: sementes imersas em ácido sulfúrico por 1 min e lavadas em água corrente por 10 min. As sementes passaram por rápida exposição em ácido com o objetivo de reduzir o erro derivado do uso do ácido nos outros tratamentos;
2. Sementes escarificadas em ácido sulfúrico por 60 min e lavadas em água corrente por 10 min;
3. Plântulas com raiz primária de 1 mm de comprimento submetidas à secagem em sílica gel e pré-umidificação conforme descrito anteriormente;

4. Plântulas com raiz primária de 1 mm de comprimento incubadas em solução de PEG+ABA, a 5°C, por 72 h, secas em sílica gel e pré-umidificadas, como descrito anteriormente;
5. Plântulas com raiz primária de 3 mm de comprimento submetidas à secagem em sílica gel e pré-umidificação da forma já apresentada.

As amostras correspondentes a cada tratamento foram pesadas em balança analítica com precisão de 0,001 g e colocadas em *beckers* plásticos contendo 150 mL de água deionizada, permanecendo por um período de 24 h à temperatura constante de 25°C. Com um condutímetro de massa (DIGIMED, DM31), foi efetuada a leitura em $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$ e os resultados expressos com base no peso da amostra por meio da fórmula:

$$\text{Condutividade}(\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}) = \frac{\text{Condutividade lida} - \text{condutividade da água}}{\text{Peso das sementes (g)}}$$

O peso das sementes “duras” nos tratamentos “Controle” e “Sementes escarificadas por 60 minutos” foi descontado do peso total da amostra na realização dos cálculos.

Para as análises de MEV, foram isoladas de quatro a seis radículas ou raízes primárias de cada um dos seguintes tratamentos:

- Controle: radículas de sementes frescas (não escarificadas ou embebidas);
- Plântulas com raiz primária de 1 mm de comprimento secas em sílica gel;
- Plântulas com raiz primária de 3 mm de comprimento secas em sílica gel;

As raízes foram imersas em solução fixativa Karnovsky modificado (Glutaraldeído 2,5%, Paraformaldeído 2,0%, Tampão Cacodilato 0,05M, pH 7,2) por, no mínimo, uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, foram

transferidas para líquido crio-protetor (glicerol 30%) por 30 min e cortadas longitudinalmente em nitrogênio. Os fragmentos obtidos foram transferidos para uma solução de tetróxido de ósmio 1% (3 gotas) e água suficiente para cobri-los por uma hora, lavados três vezes em água destilada, desidratados em série de acetona (25, 50, 75, 90 e 100%) e levados para o aparelho de ponto crítico. O material foi montado em suportes de alumínio *stubs*, coberto com ouro e observado em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 XVP. Foram geradas e registradas digitalmente várias imagens para cada amostra.

3.7 Avaliação da integridade do DNA

A avaliação da integridade do DNA foi feita em radículas e raízes primárias conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Tratamentos para avaliação da integridade do DNA.

Comprimento da radícula / raiz primária	Tratamento para restabelecimento da TD	Tempo de armazenamento	Temperatura de armazenamento
controle	-	240 dias	5°C
1 mm	Secagem direta	Sem armazenamento	-
		90 e 240 dias	5°C
	PEG	Sem armazenamento	-
		90 e 240 dias	5°C
3 mm	Secagem direta	Sem armazenamento	-
	PEG	Sem armazenamento	-
		90 e 240 dias	5°C

O controle consistiu de sementes secas, ou seja, não submetidas a qualquer tipo de tratamento.

A porção distal (aproximadamente 1 mm) das radículas ou raízes primárias foi retirada, acondicionada imediatamente em microtubos imersos em nitrogênio líquido e armazenada em *freezer* (-15°C) até o momento da extração.

As amostras (três repetições de 25 pontas de radícula / raiz primária por tratamento) foram maceradas separadamente em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bem fino e misturadas com 600 µL de tampão de extração (0,6 M NaCl; 0,1 M Tris HCl; 0,04M EDTA; 2% Sarcosyl; 0,5% SDS; 40% Ureia 12 M; 5% fenol equilibrado). Os microtubos foram agitados em vórtex e acrescentaram-se 600 µL de fenol-clorofórmio (1:1 v/v). Em seguida, foram levados à centrifuga por 20 min a 4.000 rpm a 20°C. O volume da fase aquosa foi determinado e adicionaram-se 80% do volume de isopropanol. Os microtubos foram agitados gentilmente e deixados em temperatura ambiente por 10 min. Decorrido esse tempo, foram centrifugados por 10 min a 35.000 rpm a 20°C. A fase aquosa foi descartada, o pélete lavado com etanol 80%, dissolvido em TE pH 8,0 (10 mM TRIS-HCl e 1 mM EDTA) e armazenado a 4°C.

Para a avaliação por eletroforese, foram utilizados o marcador 1Kb Plus DNA Ladder (1 µg/µL) e 5 µL de cada amostra em um gel de agarose 1% com coloração de brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento EDAS 290 (Kodak®).

A integridade do DNA foi atestada quando a amostra originou uma banda íntegra na parte superior do gel, sem sinais de degradação ou formação de diversas bandas com fragmentos menores em intervalos de, aproximadamente, 200 pb (DNA laddering).

3.8 Padrões eletroforéticos de proteínas resistentes ao calor e catalase

Os padrões eletroforéticos de proteínas resistentes ao calor e catalase foram caracterizados em pontas de raízes primárias de plântulas submetidas aos mesmos tratamentos adotados para a avaliação da integridade do DNA (Tabela 1), exceto nos tratamentos que envolveram o armazenamento das plântulas por 240 dias. O controle utilizado e a forma de isolamento e armazenamento do material também foram idênticos.

As extrações foram realizadas em três repetições biológicas de 25 pontas de raiz primária por tratamento.

3.8.1 Proteínas resistentes ao calor (HSP)

As amostras foram maceradas separadamente em nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó bem fino, e misturadas com tampão de extração (50 mM Tris HCl pH 7,5; 0,5 M NaCl; 0,005 M MgCl₂; 0,001 M PMSF; e 0,1% β-mercaptoetanol) na proporção 1:10 (peso da amostra:volume do tampão). Os microtubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido para novos microtubos, que foram colocados em banho-maria por 15 min a 85°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas da mesma forma como anteriormente. Foram pipetados 70 µL do extrato para novos microtubos, aos quais foram adicionados 40 µL de tampão da amostra (2,5 mL glicerol; 0,46 g SDS; 20 mg azul de Bromofenol e tampão de extração em q.s.p. 20 mL). Os microtubos foram então imersos em água fervente por 5 min e 50 µL da amostra foram aplicados em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). Promoveu-se a corrida eletroforética, realizada a 150 V por 5 h. A coloração do gel foi feita, utilizando-se solução de 0,05% Coomassie Brillante Blue R 250 por 12 h e solução de ácido acético para descoloração.

A imagem do gel foi feita, utilizando-se scanner Umax, modelo PowerLook 1120. A análise das bandas e os cálculos de seu peso molecular e de seu volume bruto foram realizados com o auxílio do programa GelAnalyzer 2010 (LAZAR; LAZAR, 2010).

3.8.2 Catalase

Para a extração da catalase, as amostras foram maceradas separadamente em nitrogênio líquido até a formação de um pó bem fino e misturadas com 250 μ L de tampão Tris HCl 0,2M pH 8,0 + (0,1% de β -Mercaptoetanol, 0,4% de PVP, 0,4% de PEG e 1 mM EDTA). O material foi homogeneizado em vórtex e mantido por 12 h a 4°C. Decorrido esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 16.000 rpm por 30 min a 4°C e 50 μ L de sobrenadante foram aplicados em gel de poliacrilamida NATIVA PAGE a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). Promoveu-se a corrida eletroforética a 110 V por 6 h. O sistema gel / eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. μ L.

Terminada a corrida, os géis foram revelados para o sistema enzimático catalase, conforme Alfenas (1998), e a imagem do gel foi feita utilizando scanner (Umax, PowerLook 1120).

3.9 Formação de raízes laterais

Plântulas com 1 mm de raiz primária foram submetidas à secagem direta em sílica gel ativada (8%) até que fossem atingidos 10% de grau de umidade. Após a desidratação, as amostras foram pré-umidificadas em câmara úmida (100% UR), durante 24 h, a 30°C, no escuro, e reidratadas sobre papel umedecido, em placas de Petri, a 30°C e luz branca constante.

Nos casos em que houve retomada do crescimento, o hipocótilo foi retirado, fixado em FAA 70 (formaldeído + ácido acético + 70% de álcool

etílico) por 72 h e mantido em solução de 70% de álcool etílico até o momento da realização dos cortes.

Os cortes foram realizados à mão livre, com lâmina cortante, em suporte de medula de pecíolo de *Cecropia* sp., seguindo-se a metodologia usual. As seções foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio (20%), lavadas em água destilada e coradas com solução de safranina (0,1%) e azul de Astra (1%). Em seguida, os cortes foram montados entre lâmina e lamínula, em água glicerinada (1:1). Os registros fotográficos foram realizados em fotomicroscópio (Olympus, BX 51), no Laboratório de Anatomia da Madeira do DCF/UFLA.

3.10 Análise dos dados

Os dados percentuais de retomada do crescimento após o armazenamento e de sobrevivência após a realização das curvas de secagem em diferentes velocidades e os valores de condutividade elétrica foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Quando constatada distribuição não-normal ($p < 0,05$), os dados foram convertidos ao arco seno da raiz quadrada de $x/100$. Em seguida, foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e ao teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5%, exceto os dados de sobrevivência após diferentes velocidades de secagem, que foram comparados pelo teste t ao nível de significância de 5%.

As análises foram realizadas, utilizando o programa SISVAR 5.3.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito da velocidade de secagem

O progresso da secagem foi semelhante em plântulas de *Sesbania virgata* com raiz primária de 1 e 2 mm de comprimento, independentemente do método empregado (Figura 2). O método de secagem lenta permitiu redução no teor de água de 57 para 13% nas primeiras 145 h (Figura 2A). Nas 48 h seguintes, essa redução foi menor, com o grau de umidade chegando a 12%. A porcentagem de reindução do crescimento após a secagem lenta variou drasticamente entre os comprimentos de raiz (Figura 2B). Enquanto houve reindução em 65% das plântulas com raiz primária de 1 mm de comprimento, não foi observada reindução nas plântulas com raiz de 2 mm secas lentamente. Acredita-se que, na secagem lenta, tecidos sensíveis à dessecação permaneçam por um período prolongado em teores de água intermediários, nos quais ocorrem processos deletérios relacionados à secagem (VERTUCCI; FARRANT, 1995). Além disso, a perda de viabilidade pode ser considerada uma consequência da falência dos mecanismos protetores contra a atividade de espécies reativas de oxigênio (VARGHESE et al., 2011).

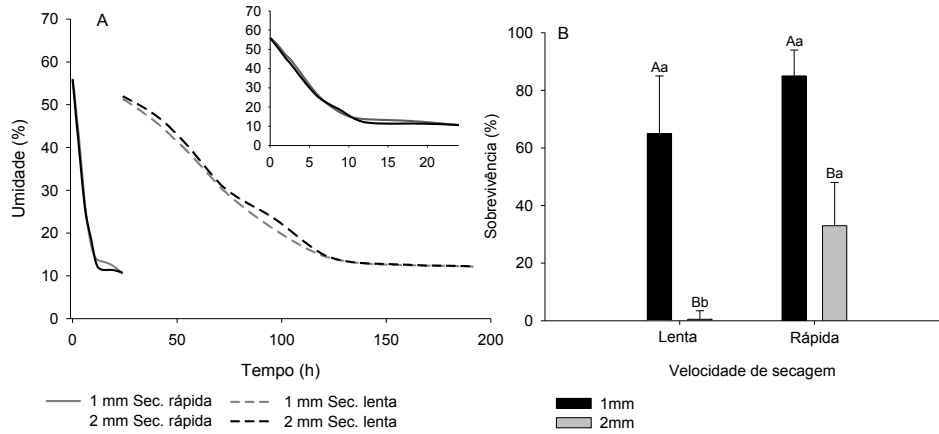


Figura 2: Plântulas de *S. virgata* com raiz primária de 1 e 2 mm de comprimento submetidas à secagem lenta e rápida até 10% de grau de umidade: (A) Curvas de secagem (no detalhe, o progresso da curva de secagem lenta); (B) Sobrevivência média. Letras maiúsculas comparam comprimentos de raiz na velocidade de secagem. Letras minúsculas comparam velocidades de secagem para o mesmo comprimento de raiz. Valores seguidos por letras iguais não diferem entre si pelo teste t a 5%.

Já a secagem rápida reduziu o teor de água para 10,5% em 24 h de secagem, em plântulas com ambos os comprimentos de raiz primária (Figura 2A). Novamente, a porcentagem de reindução do crescimento foi diferente entre os comprimentos: 85% em 1 mm e 33% em 2 mm (Figura 2B). Esses resultados podem estar associados ao fato de a secagem rápida minimizar o tempo de permanência em teores de água intermediários, limitando a acumulação de danos resultantes de processos deletérios associados à desidratação (BLACK; PRITCHARD, 2002).

Na maior velocidade de secagem, houve reindução do crescimento em plântulas com raiz de 2 mm (33%), enquanto na velocidade mais baixa todas as plântulas morreram (Figura 2B). Esses resultados reafirmam que a velocidade de

secagem influencia a sensibilidade à dessecação das plântulas e confirmam que a secagem rápida de tecidos sensíveis à dessecação permite a sobrevivência em teores de água mais baixo que a secagem lenta (NTULI et al., 2011; PAMMENTER et al., 1998; VARGHESE et al., 2011). Acredita-se que isso seja consequência de menos efeitos adversos ocorrerem sobre o metabolismo e os sistemas de processamento de radicais livres quando a desidratação é mais rápida (NTULI et al., 2011). Já para plântulas com raiz primária de 1 mm, a velocidade de secagem não influenciou na porcentagem de sobrevivência (Figura 2B).

Sun (1999, p. 32) propôs o uso de sementes ortodoxas germinadas como modelo para o estudo e a compreensão da tolerância à dessecação devido à sua similaridade com sementes recalcitrantes. Um dos argumentos a favor dessa sugestão é que o conteúdo crítico de água tolerado pelas sementes ortodoxas germinadas e pelas sementes recalcitrantes é afetado pela taxa de secagem.

4.2 Perda e restabelecimento da TD

O comprimento de raiz primária no qual plântulas formadas a partir de sementes ortodoxas perdem a TD varia de acordo com a espécie e pode mesmo variar segundo a cultivar (FARIA et al., 2005; GUTTERMAN; HUANG, 2004; VIEIRA et al., 2010).

As porcentagens de reindução do crescimento das plântulas de *S. virgata* com diferentes comprimentos de raiz primária submetidas à secagem direta em sílica gel até atingirem 10% de grau de umidade estão apresentadas no Gráfico 1. Apenas as plântulas com raiz primária com 1 mm de comprimento mantiveram alta a sobrevivência após a secagem (91%), sendo que aquelas com 2 e 3 mm apresentaram 16% de sobrevivência e as com 5 mm não sobreviveram.

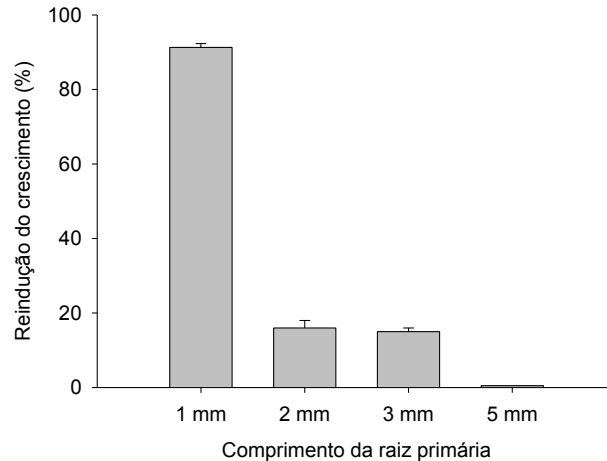


Gráfico 1: Porcentagem de reindução do crescimento de plântulas de *S. virgata* com raiz primária em diferentes comprimentos submetidas à secagem em sílica gel a 10% de umidade, seguida de pré-umidificação e reidratação.

Trabalhando com outro lote da mesma espécie e utilizando o mesmo protocolo de secagem, Masetto (2008, p. 24) encontrou resultados similares, com alta taxa de sobrevivência (97%) de plântulas com 1 mm de raiz primária desidratadas ao teor de água original da semente seca (em torno de 10% de grau de umidade). Também foram obtidos resultados semelhantes com os outros comprimentos de raiz, que, nesse caso, não sobreviveram (MASETTO, 2008, p.25).

O método de secagem utilizado para alcançar os 10% de grau de umidade, a secagem com sílica gel, pode ter provocado uma desidratação tão rápida das plântulas com 2 mm ou mais de comprimento de raiz a ponto de diminuir as chances da síntese *de novo* de componentes protetores (FARIA et al., 2005).

Os efeitos negativos da dessecação na sobrevivência das células e tecidos estão correlacionados a vários fatores, dentre eles: desarranjo do citoesqueleto e falhas na operação de sistemas eliminadores de radicais livres (FARIA et al., 2005; GARNCZARSKA; BEDNARSKI; JANCELEWICZ, 2009; PROCTOR; LIGRONE; DUCKETT, 2007).

No lote de *S. virgata* avaliado, a perda da capacidade de reindução do crescimento após secagem foi drasticamente reduzida quando a raiz primária atingiu 2 mm de comprimento, independente do tratamento adotado (dados não apresentados). Para Masetto (2008, p. 28), foi possível a reindução do crescimento após o tratamento com PEG e PEG+ABA em plântulas com raiz primária de até 5 mm de comprimento. Acredita-se que a heterogeneidade existente entre indivíduos de espécies não domesticadas e as variações ambientais naturais entre os anos durante a fase de maturação das sementes influenciem, além da profundidade da dormência e da produção de sementes, a resposta à dessecação de sementes e plântulas (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006; HONG; ELLIS, 1996). Além disso, devido exatamente a essa heterogeneidade, talvez o tempo, a temperatura de incubação no PEG, o potencial hídrico e/ou a concentração de ABA utilizados não tenham sido ideais para o lote analisado.

A incubação em PEG ou PEG+ABA, seguida de secagem até 10% de grau de umidade, ou a secagem direta proporcionaram valores estatisticamente iguais de sobrevivência (94, 86 e 91%, respectivamente) a plântulas com raiz primária de 1 mm de comprimento. Essas plântulas retiveram a competência para retomar o crescimento, confirmando a existência de um período no desenvolvimento entre a germinação e o estabelecimento da plântula em que a TD ainda não foi perdida ou pôde ser restabelecida (BUITINK et al., 2003).

Em outras espécies arbóreas também foi constatada a existência desse período. Em *Cedrela fissilis*, a secagem direta provocou a morte de todas as

plântulas, independente do comprimento de raiz. Contudo, o tratamento com PEG foi capaz de restabelecer a TD em plântulas com raiz de 1 e 2 mm (71 e 29%, respectivamente) e a incubação em PEG+ABA somente naquelas com 1 mm (100%) (MASETTO, 2008, p. 62). Plântulas de *Tabebuia impetiginosa* com até 2,5 mm de comprimento de raiz primária mantiveram a porcentagem de reindução do crescimento acima de 50% após secagem em sílica gel até 20% de grau de umidade e reidratação e após incubação em PEG seguida de secagem e reidratação (VIEIRA et al., 2010). Nessa espécie, a incubação em PEG+ABA foi capaz de restabelecer a TD nas plântulas com raiz de 3 mm de comprimento (VIEIRA et al., 2010).

Acredita-se que a sustentação da TD após a germinação e durante a fase inicial do desenvolvimento e do crescimento diminua a vulnerabilidade que existe entre o estágio de plântula e planta estabelecida e possibilite rápida adaptação a condições ambientais adversas, como o suprimento limitado de água (BUITINK et al., 2003, 2006; VIEIRA et al., 2010).

Somente 16% das plântulas de *S. virgata* com raiz primária com 3 mm de comprimento resistiram à secagem até 10% de grau de umidade. Quando a secagem foi antecedida por incubação em PEG ou PEG+ABA, não houve melhora do resultado, ou seja, as raízes permaneceram sensíveis à dessecação. É possível que isso tenha ocorrido devido à reativação e progressão do ciclo celular, com acúmulo de células nas fases G2/M, com o DNA duplicado, que são mais sensíveis a estresses (BAGNIEWSKA-ZADOWRNA, 2008, p. 184, DELTOUR, 1985, p. 67; FARIA; LAMMEREN; HILHORST, 2004). Ainda assim, foi realizado o armazenamento dessas plântulas incubadas em PEG e PEG+ABA. Conforme esperado, as plântulas não resistiram ao armazenamento em nenhum dos ambientes.

A partir desses resultados, optou-se por trabalhar com plântulas com raiz primária com 1 e 3 mm de comprimento por oferecem um contraste claro na resposta à secagem.

Sementes secas (não escarificadas, nem germinadas) foram mantidas nas mesmas condições de armazenamento das plântulas com raiz primária de 1 e 3 mm, ou seja, a -15, 5 e 22°C por 30, 60, 90, 180 e 240 dias em sacos plásticos selados e ao abrigo da luz. Essas sementes mantiveram altas as porcentagens de formação de plântulas normais (entre 100 e 80%), sem diferenças significativas entre os tratamentos. Esse comportamento é esperado para sementes ortodoxas, como as de *S. virgata*, que toleram o armazenamento em baixa temperatura e baixa umidade relativa do ar por longo tempo, sendo que a redução da temperatura (dentro de limites) é benéfica para a longevidade das sementes (HONG; ELLIS, 1996).

O sucesso do armazenamento das plântulas com raiz primária de 1 mm de comprimento, secas diretamente até 10% de grau de umidade ou incubadas em PEG ou PEG+ABA antes da secagem, mostrou-se dependente da temperatura.

As plântulas com raiz primária de 1 mm, submetidas à secagem direta e armazenadas por 240 dias, alcançaram maiores porcentagens de reindução do crescimento quando mantidas a 5°C (50%) e a -15°C (64%) (Gráfico 2). No caso do armazenamento a -15°C, a sobrevivência se manteve até os 60 dias de armazenamento. Aos 90 dias, houve uma queda para 51% e a sobrevivência manteve-se até os 240 dias. Quando o armazenamento foi realizado a 5°C, houve uma redução na porcentagem de retomada do crescimento nos primeiros 30 dias (de 91 para 76%) e outra em torno de 180 dias (de 76 para 54%). No armazenamento a 22°C, a sobrevivência não se alterou entre 30 e 60 dias. Entre 60 e 90 dias, houve diminuição de 66 para 29%, valor que não se alterou significativamente até os 240 dias.

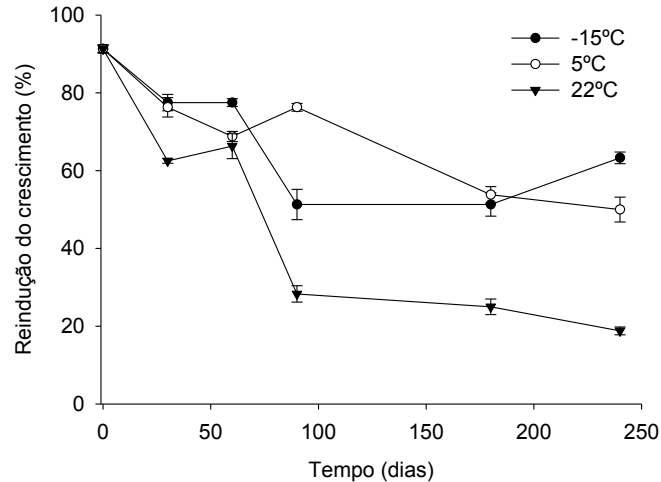


Gráfico 2: Porcentagem de reindução do crescimento de plântulas de *S. virgata* com raiz primária de 1 mm de comprimento submetidas à secagem em sílica gel até 10% de grau de umidade e armazenamento em diferentes temperaturas. As barras representam o desvio padrão da média.

Plântulas de *S. virgata* com raiz primária de 1 mm tratadas com PEG, secas rapidamente até 10% de grau de umidade e armazenadas por 240 dias, alcançaram porcentagens de reindução do crescimento maiores a -15°C (55%) (Gráfico 3). Essas plântulas foram capazes de manter a alta viabilidade nos primeiros 90 dias de armazenamento (de 84 para 79%), experimentando um decréscimo de 18% nos 90 dias seguintes. Aos 400 dias, essas plântulas mantiveram a viabilidade acima dos 50% após 400 dias. O armazenamento a 5°C proporcionou resultados semelhantes aos obtidos a -15°C durante cerca de 180 dias, quando a redução observada produziu um resultado significativamente menor (14%) do que a -15°C. A 22°C, a porcentagem de reindução do

crescimento foi decrescendo progressivamente durante o armazenamento, chegando a 8% aos 400 dias.

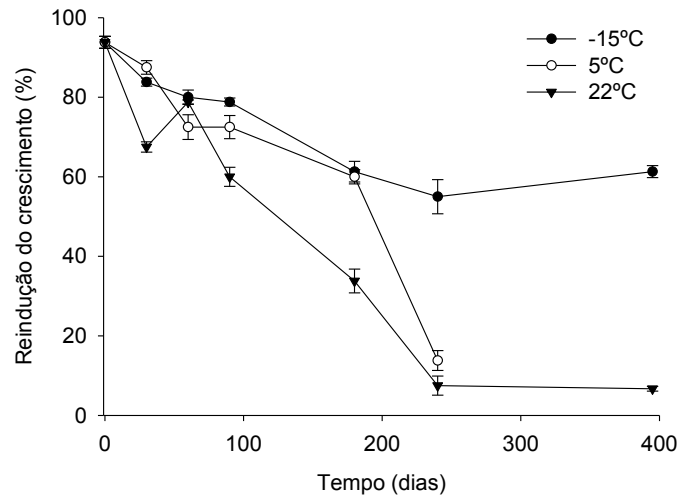


Gráfico 3: Porcentagem de reindução do crescimento de plântulas de *S. virgata* com raiz primária de 1 mm de comprimento submetidas à incubação em PEG por 72 h seguida de secagem em sílica gel até 10% de grau de umidade e armazenamento em diferentes temperaturas. As barras representam o desvio padrão da média.

A incubação de plântulas com raiz primária de 1 mm em solução de PEG+ABA, como já apresentada, não alterou a sobrevivência após a secagem (86%). Quando essas plântulas foram armazenadas, observou-se que a temperatura que menos afetou a viabilidade foi -15°C (42% após 240 dias) (Gráfico 4). A viabilidade dessas plântulas reduziu-se significativamente nos primeiros 90 dias (de 86 para 59%) e manteve-se estatisticamente igual até os 240 dias (42%). A viabilidade das plântulas mantidas a 5°C diminuiu nos primeiros 30 dias (de 86 para 70%), permaneceu estável nos 60 dias seguintes (de 60 para 61%) e, entre 90 e 180 dias de armazenamento, chegou a 31%. Aos

400 dias, somente 11% das plântulas foram capazes de retomar o crescimento normal. As plântulas armazenadas a 22°C apresentaram redução gradativa na porcentagem de reindução do crescimento, atingindo os menores valores aos 240 dias (1%).

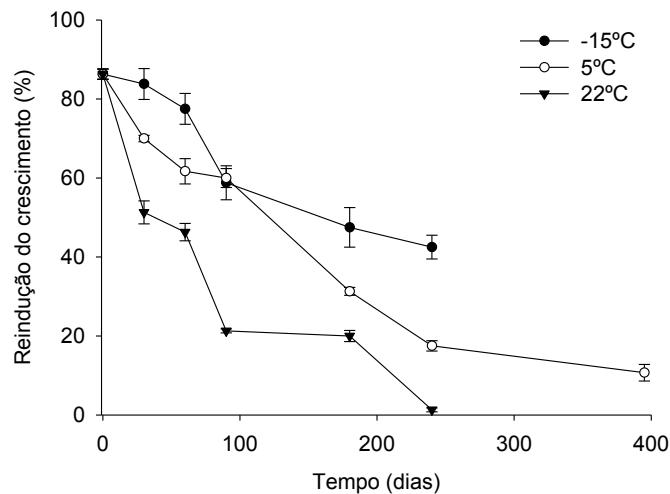


Gráfico 4: Porcentagem de reindução do crescimento de plântulas de *S. virgata* com raiz primária de 1 mm de comprimento submetidas à incubação em PEG+ABA por 72 h seguida de secagem em sílica gel até 10% de grau de umidade e armazenamento em diferentes temperaturas. As barras representam o desvio padrão da média.

Assim, para essas plântulas, independentemente do tratamento, quanto mais baixa a temperatura do ambiente de armazenamento, maior a porcentagem de sobrevivência. A temperatura baixa, aliada ao baixo grau de umidade, talvez restrinja a mobilidade e a interação de moléculas e radicais livres e reduza a velocidade de processos degradativos e reações enzimáticas (BERJAK, 2006, p. 4; SPANÒ et al., 2007).

Esses resultados sugerem que plântulas de *S. virgata* são mais sensíveis ao armazenamento em temperaturas mais elevadas. Em sementes de *Colocasia esculenta* e de *Pyrus betulaefolia*, o armazenamento em baixas temperaturas (4° - 5°C) foi mais recomendado do que em temperatura ambiente devido à menor ocorrência de peroxidação de lipídeos de membrana (BAO; SHA; ZANG; 2011; PRICE et al., 2007). Da mesma forma, altas temperaturas de armazenamento foram deletérias para sementes de *Helianthus annuus* por aumentarem a ocorrência de processos oxidativos e a acumulação de radicais livres (CORBINEAU et al., 2002).

Tratamentos de restrição hídrica utilizando PEG e/ou PEG+ABA têm sido empregados em diversos estudos de reindução da TD em plântulas (AVELANGE-MACHEREL et al., 2006; BUITINK et al., 2003, 2006; FARIA et al., 2005; LEPRINCE et al., 2000, 2004; MASETTO, 2008; VIEIRA et al., 2010). Nesses casos, verificou-se que a TD é mantida após a germinação enquanto a raiz primária não atinge um comprimento determinado (variável de acordo com a espécie). Uma vez perdida, a TD pode ser reinduzida com o uso desses tratamentos também até certo ponto de crescimento da raiz. Desse momento em diante, as plântulas se tornam irreversivelmente sensíveis à dessecação.

Foram utilizadas, na maior parte deste estudo, plântulas de *S. virgata* com raiz primária em dois pontos contrastantes: antes da perda da TD e após sua perda irreversível (de acordo com os tratamentos empregados). Essas plântulas foram submetidas à incubação em PEG e PEG+ABA no intuito de avaliar seu efeito sobre a longevidade no armazenamento. Foi reportado que esses tratamentos paralisam o crescimento radicular, provocam mudanças nos níveis de transcritos que controlam a expressão de enzimas em resposta a estresses, induzem o acúmulo de protetores, como deidrininas e sacarose; geram ajuste osmótico via rearranjo das membranas e induzem a síntese de proteínas

nucleares (AVELANGE-MACHEREL et al., 2006; BOUDET et al., 2006; BUITINK et al., 2003, 2006; FARIA et al., 2005; LEPRINCE et al., 2004). Contudo, não foram observadas as melhoras esperadas, principalmente por que a secagem direta em sílica gel foi suficiente para a manutenção da viabilidade durante o período avaliado. É provável que variações nos tratamentos de restrição hídrica adotados poderiam ter proporcionado os efeitos esperados.

O PEG também é utilizado para o condicionamento fisiológico de sementes (*priming*). Nesse caso, as sementes secas passam por hidratação controlada (em água ou solução osmótica) e suficiente somente para ativar o metabolismo da germinação, sem que haja protrusão radicular (GONZÁLEZ-ZETUCHE et al., 2001). Os benefícios mais evidentes incluem o estímulo e a sincronização da germinação e da emergência das plântulas e a redução da sensibilidade de sementes e plântulas a estresses (ODELL; CANTLIFFE, 1986). Alguns processos têm sido observados durante o condicionamento fisiológico: ativação do ciclo celular, mobilização do endosperma e de proteínas de armazenamento, ativação de mecanismos de reparo e aumento na atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase e peroxidase (KIBINZA et al., 2011). Tem sido sugerido que o *priming* aumenta a longevidade principalmente em lotes de sementes deteriorados, já que nesses lotes os mecanismos de reparo ativados seriam mais efetivos (GONZÁLEZ-ZETUCHE et al., 2001). A maioria dos estudos sobre o *priming* usa as sementes imediatamente após o condicionamento, sendo poucos os relatos de armazenamento. Sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*), condicionadas e armazenadas por 19 meses germinaram em menor porcentagem (49%) do que o controle (96%) (ODELL; CANTLIFFE, 1986). Já para sementes de alface (*Lactuca sativa*), o *priming* não alterou a viabilidade ou o vigor após o armazenamento por 12 meses para genótipos termotolerantes (NASCIMENTO; CANTLIFFE, 1998).

O processo de incubação em PEG e PEG+ABA a que as plântulas de *S. virgata* foram submetidas foi semelhante àquele utilizado para o condicionamento osmótico, com a marcante diferença de o *priming* ser aplicado a sementes secas, e não a plântulas. Ainda assim, os resultados obtidos indicaram que o tratamento osmótico não conseguiu melhorar a armazenabilidade das plântulas.

4.3 Integridade de membranas

Na Figura 3, pode-se observar, tanto em radículas como em raízes primárias de 1 e 3 mm de comprimento, células multifacetadas do parênquima amilífero, com diâmetro periclinal maior que o anticlinal, e parede celular primária delgada, sem espaços intercelulares.

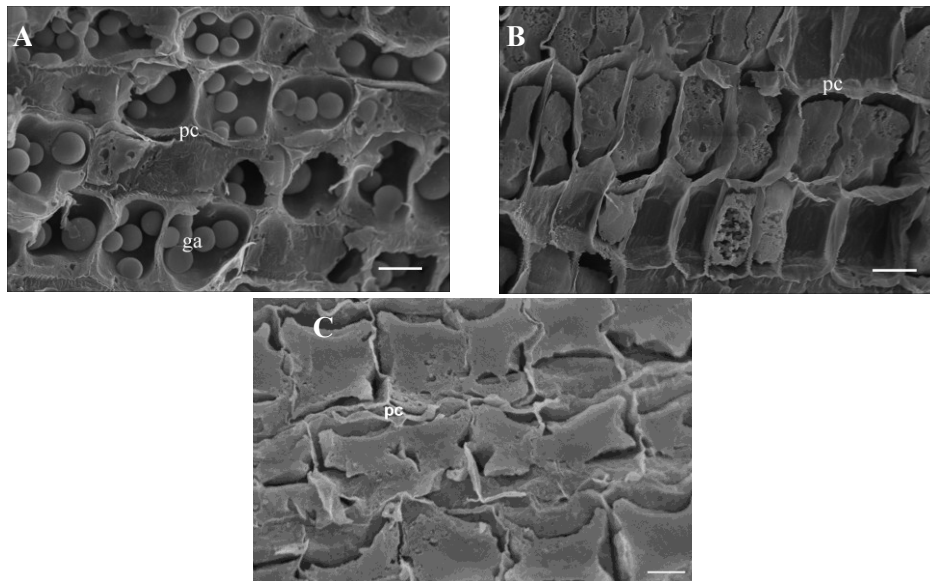


Figura 3: Imagens de micrografia eletrônica de varredura de radículas e raízes primárias de *S. virgata*. (A) sementes frescas; (B) 1 mm de comprimento secas em sílica gel; e (C) 3 mm de comprimento secas em sílica gel. pc = parede celular; ga = grãos de amido. Barras = 10 μ m.

Nas plântulas com raiz primária de 1 mm, a secagem, precedida ou não por incubação em PEG+ABA, não produziu alterações significativas na condutividade elétrica (Gráfico 5). Também não foram verificadas alterações morfológicas nem danos ultraestruturais nas paredes celulares (Figura 3B), o que indica a manutenção de sua integridade. Assim, a diferença observada na porcentagem de reindução do crescimento dessas plântulas não foi causada por alterações na integridade das membranas celulares.

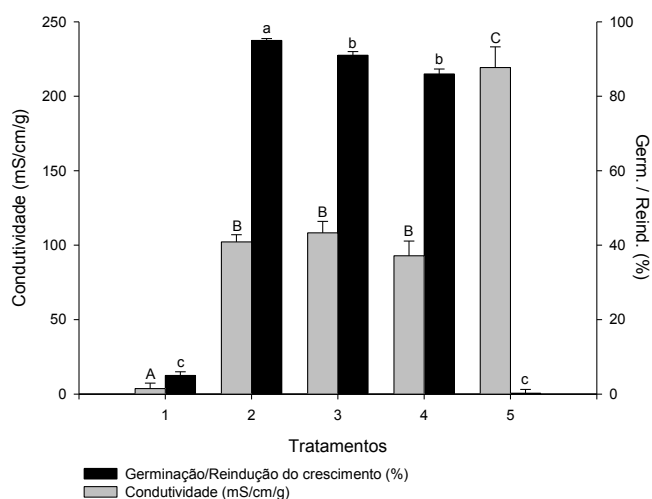


Gráfico 5: Porcentagem de germinação / reindução do crescimento e condutividade elétrica em sementes e plântulas de *S. virgata*: (1) Controle; (2) sementes escarificadas; (3) plântulas com raiz primária de 1 mm de comprimento secas em sílica gel; (4) plântulas com raiz primária de 1 mm incubadas em solução de PEG+ABA e secas em sílica gel; (5) plântulas com raiz primária de 3 mm secas em sílica gel. Letras maiúsculas comparam médias de condutividade e minúsculas de germinação / reindução do crescimento pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Tratamentos de reindução da TD com o uso de ABA estão conectados com a minimização de danos mecânicos associados à perda de turgor, à manutenção da integridade funcional de macromoléculas e membranas e à iniciação de mecanismos de reparo na reidratação (BAGNIEWSKA-ZADWORNA et al., 2007). Talvez, o uso de solução de PEG+ABA tenha alcançado desempenho igual à secagem direta devido à concentração inadequada de ABA.

Nas plântulas com raiz primária de 3 mm, a secagem produziu desestruturação irreversível das membranas, aumento significativo na condutividade elétrica e redução drástica na porcentagem de reindução do crescimento. Nesse caso, o aumento na condutividade elétrica demonstra a sensibilidade dessas plântulas à secagem e ilustra a relação entre TD e integridade e estabilidade das membranas (KALEMBA; JANOWIAK; PUKACKA, 2009; SPANÒ et al., 2007).

4.4 Integridade do DNA

Não foram observadas alterações na integridade do DNA genômico dos tratamentos avaliados, sugerindo a existência de mecanismos de sobrevivência celular em condições de níveis reduzidos de hidratação. As bandas formadas apresentaram-se íntegras, na parte superior do gel, sem sinais de degradação ou indícios de fragmentação (Figura 4).

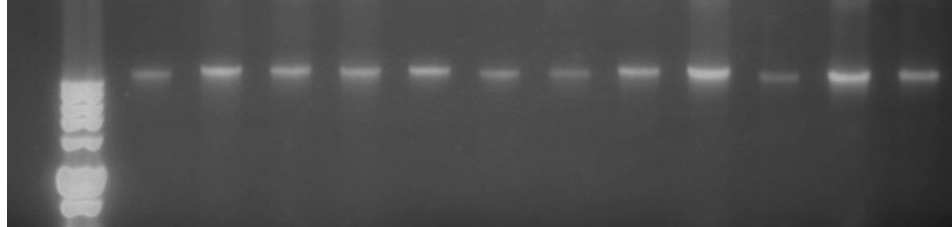


Figura 4: Gel de agarose 1% com DNA extraído de radículas e pontas de raízes primárias de plântulas de *S. virgata*. M: Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder. 1: Sementes secas. 2-8: Plântulas com raiz primária de 1 mm de comprimento. 2: secas diretamente (SD). 3: SD e armazenadas por 90 dias a 5°C. 4: SD e armazenadas por 90 dias a 22°C. 5: SD e armazenadas por 240 dias a 5°C. 6: incubadas em PEG e secas. 7: incubadas em PEG, secas e armazenadas por 90 dias a 5°C. 8: incubadas em PEG, secas e armazenadas por 240 dias a 5°C. 9-12: plântulas com raiz primária de 3 mm de comprimento. 9: SD. 10: incubadas em PEG e secas. 11: incubadas em PEG, secas e armazenadas por 90 dias a 5°C. 12: incubadas em PEG, secas e armazenadas por 240 dias a 5°C.

A fragmentação do DNA é uma das evidências da perda da integridade de ácidos nucleicos, que está relacionada à morte celular programada e a danos ocasionados durante a secagem e o armazenamento (FARIA et al., 2005; KRANNER et al., 2011). Em sementes tolerantes à dessecação, alguns danos que ocorrem no DNA durante a desidratação ou o armazenamento podem ser reparados quando a água está novamente disponível, mas a presença de fragmentação indica irreversibilidade do processo (FARIA et al., 2005). Contudo, ainda não se sabe se essa degradação é causa ou efeito do processo de envelhecimento celular, sendo provável que contenha elementos de ambos (KRANNER et al., 2011).

Em *S. virgata*, aparentemente a perda da capacidade de reindução do crescimento após secagem e armazenamento ocorre antes da perda da integridade do DNA ou em condições nas quais não há ação de caspases. Na

morte celular causada por falta de oxigênio, mudanças no citoplasma, acumulação de acetaldeído e etanol, exposição à fosfatidilsisteína e aumento da permeabilidade de membranas podem ser observados antes da condensação da cromatina e da fragmentação do DNA (XU; CHEN; FERGUSON, 2004).

No caso das plântulas de *S. virgata* que não resistiram à secagem e ao armazenamento, mas apresentaram DNA íntegro, talvez tenham ocorrido morte celular programada e necrose, já que ambas podem ser observadas simultaneamente em populações de células submetidas a estresses (KRISHNAMURTHY et al., 2000). Na morte celular programada, a condensação do citoplasma e seu extravasamento sempre ocorrem, provavelmente devido à ação dos radicais livres, enquanto a fragmentação do DNA nem sempre é verificada, sendo que, em alguns casos, essa fragmentação pode ser produto de artefatos ou observações equivocadas (KRISHNAMURTHY et al., 2000; PAMMENTER; BERJAK, 1999). Já a necrose é um processo não-fisiológico, dissociado de eventos do desenvolvimento e da morfogênese e envolve lise e extravasamento de conteúdos celulares sem mudanças óbvias no DNA, como condensação da cromatina ou fragmentação (KRISHNAMURTHY et al., 2000).

4.5 Caracterização de padrões de HSPs e de catalase

4.5.1 HSPs

A indução de HSPs é um dos mecanismos mais estudados na tolerância à dessecação. As HSPs incluem várias famílias de proteínas conservadas, relacionadas à preservação e ao reparo de macromoléculas na desidratação e na reidratação (JOSÉ et al., 2008). Uma dessas famílias é a das hidrofílicas, proteínas ricas em glicina (mais de 6%) e relacionadas ao estresse osmótico

(BOUDET et al., 2006). Fazem parte dessa família as proteínas LEA. Diversas proteínas LEA são expressas durante o desenvolvimento das sementes e em resposta a estresses abióticos e podem ser associadas à defesa contra a dessecação (ILLING et al., 2005).

O padrão eletroforético das HSPs das pontas de raiz primária de plântulas de *S. virgata* está apresentado na Figura 5 e seus respectivos valores de volume bruto (VB, diretamente correlacionado com a intensidade da banda no gel) na Tabela 2.

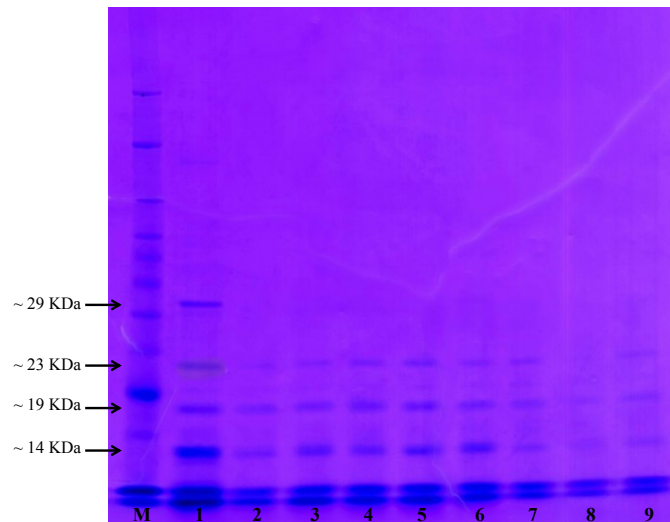


Figura 5: Padrão eletroforético das HSPs de pontas de radículas e raízes primárias de plântulas de *S. virgata*. M: Marcador. 1: Sementes secas. 2-6: Plântulas com raiz de 1 mm. 2: secas diretamente (SD). 3: SD e armazenadas a 5°C por 90 dias. 4: SD e armazenadas a 22°C por 90 dias. 5: incubadas em PEG e secas. 6: incubadas em PEG, secas e armazenadas a 5°C por 90 dias. 7-9: Plântulas com raiz primária de 3 mm de comprimento. 7: SD. 8: incubadas em PEG e secas. 9: incubadas em PEG, secas e armazenadas a 5°C por 90 dias.

Tabela 2: Volume bruto das bandas (VB) observadas no gel de eletroforese das HSPs de pontas de raiz primária de plântulas de *S. virgata*. PM: Peso molecular aproximado das bandas. 2-10: Tratamentos na mesma ordem aplicada no gel.

Tratamento / PM (kDa)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
29	393	-	-	-	-	-	-	-	-
23	250	4	18	19	13	7	5	-	1
19	636	138	310	80	318	76	27	9	1
14	964	113	455	213	482	493	57	2	10

Nas sementes secas, foram observadas quatro bandas de, aproximadamente, 14, 19, 23 e 29 kDa. Nas plântulas com raiz primária com 1 mm de comprimento, a banda com cerca de 29 kDa não foi observada e as demais (14, 19 e 23 kDa) se mostraram com valores de VB menor, independentemente do tratamento adotado. As plântulas com 3 mm de raiz primária tampouco apresentaram a banda com 29 kDa, sendo que, naquelas submetidas à incubação em PEG, a banda com cerca de 23 kDa também não foi observada. Nas plântulas com raiz de 3 mm, o VB de todas as bandas foi consideravelmente reduzido, sendo que a incubação em PEG produziu diminuição mais acentuada do que a secagem direta. É importante lembrar que somente uma pequena porcentagem dessas plântulas com raiz primária de 3 mm sobreviveu à secagem, precedida ou não por incubação em PEG e que nenhuma sobreviveu ao armazenamento.

Nas plântulas com raiz de 1 mm secas diretamente e armazenadas a 5°C, o VB das bandas foi maior do que naquelas armazenadas a 22°C, exceto para as bandas com cerca de 23 kDa, que apresentaram VB similar. As plântulas armazenadas a 5°C apresentaram porcentagem de reindução do crescimento significativamente maior do que as armazenadas a 22°C.

As plântulas com raiz de 1 mm incubadas em PEG e secas apresentaram bandas com VB maior do que as secas diretamente, embora a porcentagem de

reindução do crescimento não tenha sido alterada. No entanto, o VB das bandas das plântulas não-armazenadas foi menor do que a das armazenadas. Em plântulas de *Medicago truncatula*, a fração de HSPs da radícula decaiu 2,3 vezes quando as sementes secas foram colocadas para germinar, sendo que o tratamento osmótico com PEG não foi capaz de reverter essa diminuição (BOUDET et al., 2006). Nesse mesmo estudo, foram encontradas proteínas LEA induzidas em raízes submetidas a tratamento osmótico e que permaneciam sensíveis à dessecação.

Em *Arabidopsis thaliana*, foram encontradas algumas proteínas LEA específicas das sementes maduras e outras ativadas somente durante a maturação das sementes ou em resposta a tratamentos de estresse abiótico (ILLING et al., 2005). Também em *A. thaliana*, foi observada variação no padrão de expressão dessas proteínas entre sementes secas, sementes em processo germinativo e plântulas (OLVERA-CARRILLO et al., 2010). Coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*) tolerantes à dessecação apresentaram proteínas homólogas às LEA em resposta à desidratação, que não foram induzidas em tecidos sensíveis, indicando contribuição dessas proteínas na habilidade de tolerar a dessecação (FARRANT et al., 2004). Da mesma forma, sementes e plântulas de *S. virgata* exibem diferentes padrões de expressão das proteínas LEA e, nas sementes secas e plântulas tolerantes à dessecação (raiz primária de 1 mm de comprimento), formas dessas proteínas foram mais preservadas do que nas plântulas sensíveis à dessecação (3 mm de raiz primária).

Esses resultados fornecem subsídios para a hipótese de que a chave para a manutenção da TD após a germinação é manter a habilidade de induzir certos componentes da tolerância ao déficit hídrico, como a acumulação de solutos compatíveis, LEA e deidrininas, que minimizam os danos causados pela desidratação e atuam no reparo dos danos inevitáveis (FARRANT et al., 2004).

4.5.2 Catalase

No perfil isoenzimático de pontas de raízes primárias de plântulas de *S. virgata*, verificou-se, para a catalase, uma diminuição na intensidade das bandas com o aumento do comprimento da raiz primária (Figura 6); ou seja, em raízes primárias com 3 mm de comprimento, as isoformas da enzima apresentaram atividade menos intensa do que naquelas com 1 mm.

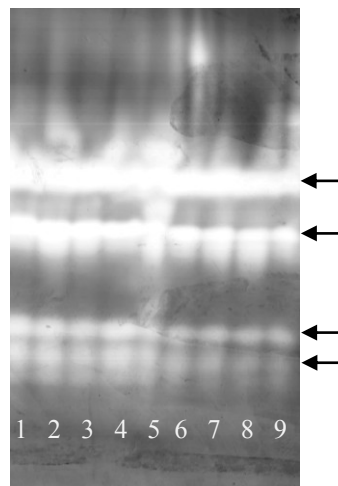


Figura 6: Padrão isoenzimático de catalase de radículas e raízes primárias de plântulas de *S. virgata* com diferentes comprimentos. 1: Sementes secas. 2-6: Plântulas com raiz primária com 1 mm de comprimento. 2: secas diretamente (SD). 3: SD e armazenadas por 90 dias a 5°C. 4: SD e armazenadas por 90 dias a 20 °C. 5: incubadas em PEG e secas. 6: incubadas em PEG, secas e armazenadas por 90 dias a 5°C. 7-9: Plântulas com raiz primária com 3 mm de comprimento. 7: SD. 8: incubadas em PEG e secas. 9: incubadas em PEG, secas e armazenadas por 90 dias a 5°C. As setas indicam as bandas visualizadas.

A catalase é uma enzima envolvida no controle de peróxidos endógenos produzidos sob condições de estresse, sendo que a ineficiência em sua atividade

pode provocar redução da prevenção de danos oxidativos (BONOME, 2006, p. 99). Assim, na medida em que houve crescimento da raiz primária e redução na atividade da enzima, pode ter ocorrido diminuição da proteção contra o estresse oxidativo, o que condiz com os resultados de sobrevivência após secagem das plântulas com 3 mm de raiz primária (16%).

Aparentemente, para as plântulas com raiz de 3 mm, o tratamento com PEG seguido de secagem provocou redução da atividade da enzima maior do que a promovida pela secagem direta. Contudo, essa redução não é refletida na sobrevivência das plântulas, que se manteve estatisticamente igual após ambos os tratamentos (15 e 16%, respectivamente).

A intensidade da atividade não diferiu entre as plântulas com raiz de 1 mm e as sementes secas, provavelmente devido ao fato de as plântulas com 1 mm de raiz se comportarem como as sementes secas frente à desidratação.

Para as plântulas com raiz primária de 1 mm, os tratamentos antes do armazenamento e o período de armazenamento não influenciaram no número nem na intensidade das bandas. Contudo, em sementes de girassol (*Helianthus annuus*), o envelhecimento acelerado alterou a atividade da enzima, comprovando que a catalase é determinante na recuperação e na germinação das sementes envelhecidas e que a viabilidade das sementes é dependente da resistência ao estresse oxidativo (KIBINZA et al., 2011).

Foi relatado que a atividade específica da catalase está relacionada ao grau de umidade, sendo que quanto mais seco o tecido, maior a atividade da enzima (BAILLY et al., 2004). Portanto, acredita-se que a manutenção dos níveis de atividade da enzima possa estar relacionada às plântulas com raiz de 1 mm (independentemente do tratamento e do período de armazenamento) e ao fato de as sementes secas apresentarem aproximadamente o mesmo grau de umidade.

Tanto na radícula das sementes secas quanto nas pontas das raízes primárias foram observadas quatro isoformas. Em cotilédones recém-emergidos de *S. virgata*, três isoformas foram identificadas (VEASEY et al., 2002). Essa diferença demonstra que o padrão de isoformas da catalase muda de acordo com o tecido considerado e indica que também existem mudanças de acordo com o grau de hidratação do tecido e a fase do desenvolvimento (BAILLY et al., 2004).

4.6 Formação de raízes laterais

Plântulas de *S. virgata* não submetidas à secagem apresentaram crescimento normal em 100% dos casos, com hipocótilo reto, delgado e alongado e epicótilo bem desenvolvido, com folhas primárias verdes e em expansão, o que caracteriza uma plântula normal (BRASIL, 2009, p. 149). Porém, quando o estresse de secagem foi imposto, a formação de plântulas normais caiu para 91%. Nas plântulas normais formadas após o estresse, observou-se que, em alguns casos houve necrose do ápice da raiz primária.

Nos casos em que não houve necrose do ápice da raiz primária, que seguiu seu crescimento normal, foi verificado o surgimento de raízes laterais nos flancos da principal (Figura 7A). Segundo Dubrovsky et al. (2000), inicialmente, pensava-se que a formação do primórdio da raiz lateral ocorria após desdiferenciação das células do periciclo. Contudo, o intervalo entre a morte do meristema e o surgimento do primórdio é muito curto para que houvesse essa desdiferenciação.



Figura 7: Plântulas de *S. virgata*: (A) raiz primária retomando o crescimento; (B) morte do ápice da raiz primária (evidenciada por necrose) e surgimento de raízes laterais. Barras: 1 cm.

Quando houve morte do ápice da raiz primária de algumas das plântulas que retomaram o crescimento normal, um ponto de necrose (Figura 7B), caracterizado por tecido escurecido, foi formado e raízes laterais cresceram das porções da raiz primária que permaneceram vivas. Acredita-se que, nesses casos, o estresse provocado pela dessecação até 10% de grau de umidade tenha provocado, no meristema radicular, a perda da capacidade de originar novas células para formar o sistema radicular. Contudo, o estresse não afetou o periciclo, que manteve sua capacidade de iniciar primórdios de raízes laterais.

Raízes adventícias não procedem da radícula do embrião ou da raiz principal (ou primária) formada a partir dessa radícula (EHLERS; GOSS, 2003; QUER, 2001, p. 927). Isso significa que elas se diferenciam a partir de órgãos diferentes da raiz, com localização precisa (por exemplo, perto de gemas caulinares) e padrão temporal definido (HODGE et al., 2009). Já as raízes

laterais se diferenciam (na maioria dos casos) por iniciação de um primórdio localizado nas células do periciclo adjacentes aos polos de protoxilema, a certa distância do meristema apical da raiz, podendo envolver em sua organização a endoderme, o parênquima do cilindro vascular ou camadas mais internas do córtex (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006; DUBROVSKY et al., 2000; EHLERS; GOSS, 2003; HODGE et al., 2009; QUER, 2001, p. 927). Enfim, ambas têm origem endógena e seu desenvolvimento é semelhante (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006).

A iniciação de raízes laterais é um ponto central no crescimento das plântulas submetidas a estresse. Essa capacidade é de particular importância na adaptação à sazonalidade da precipitação, pois, em ambientes com uma estação seca bem definida, o início da estação chuvosa é marcado por precipitações irregulares e variáveis em intensidade (DAWS et al., 2007b; VIEIRA et al., 2010). Assim, o papel ecológico da produção dessas raízes parece ser o de aumentar as chances de estabelecimento e sobrevivência das plântulas (BUTINK et al., 2003; VIEIRA et al., 2010). Vieira et al. (2010) afirmam que, possivelmente, essa habilidade de emissão de raízes laterais, somada ao efeito do potencial mátrico do solo (agindo de forma equivalente a um tratamento osmótico realizado em laboratório), proporcionaria a adaptação necessária à seca sazonal presente em biomas tropicais.

Além disso, a emissão de raízes laterais forma a base do sistema radicular nas plantas. Na maioria das plantas, a iniciação de raízes laterais começa com a ativação de células iniciais do periciclo que originam uma população de células se dividindo ativamente e formando o primórdio de raiz lateral (DUBROVSKY et al., 2006). Em plântulas de *Arabidopsis thaliana*, houve formação de maior número de primórdios de raízes laterais após a

remoção do meristema apical do que em raízes intactas (DITENGOU et al., 2008).

Nos cortes anatômicos realizados (Figura 8), percebe-se que, assim como em outras espécies, após ter sido formado nas adjacências de um polo de xilema, o primórdio seguiu crescendo, emergiu através da endoderme, do córtex e, finalmente, da epiderme da raiz primária (BENKOVÁ; BIELACH, 2010). É possível observar, além da presença da epiderme e do córtex, a estrutura do cilindro vascular, formando uma raiz tetraarca. O xilema é exarco, com elementos de protoxilema voltados para a periferia do órgão e elementos de metaxilema para o interior do órgão (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006).

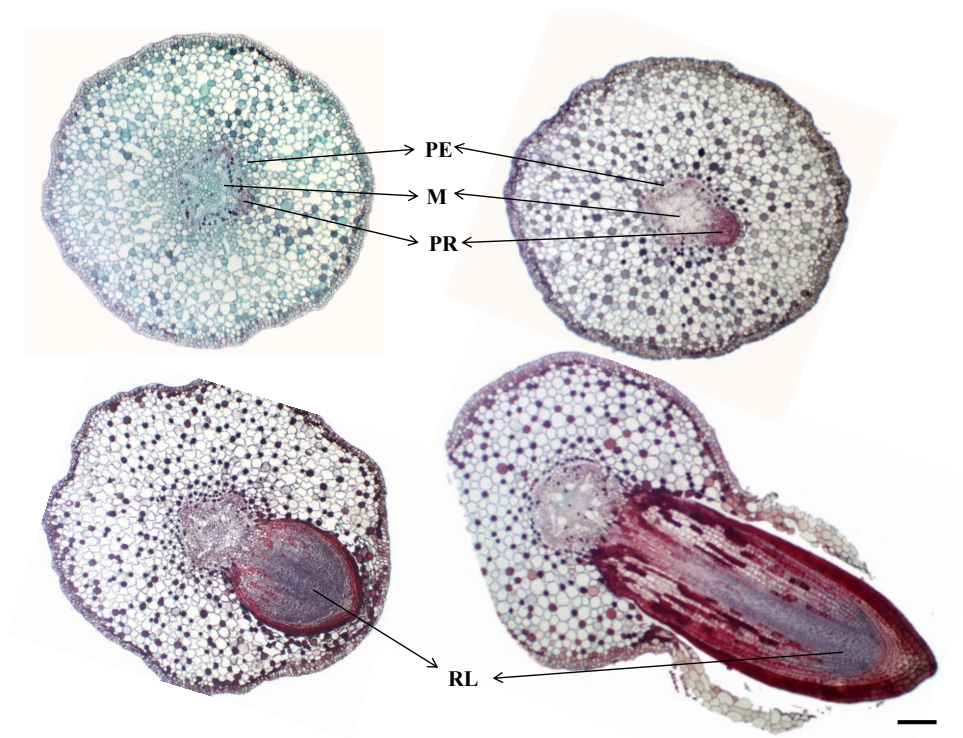


Figura 8: Seções transversais de raízes primárias de plântulas de *S. virgata* evidenciando surgimento de raiz lateral. PE: periciclo. M: medula. PR: primórdio de raiz lateral. RL: raiz lateral. Barra: 10 μ m.

Raízes laterais crescem em resposta a estímulos ambientais em meios dinâmicos onde se desenvolvem simultaneamente com a raiz primária (BENKOVÁ; BIELACH, 2010). Sua iniciação é dependente da ação coordenada de vários genes, embora a auxina e seu transporte polar atuem como reguladores centrais (DITENGOU et al., 2008). Variações locais recorrentes das concentrações de auxina em células distintas do periciclo controlam os locais e a frequência da iniciação de raízes laterais tanto em condições de laboratório como no meio ambiente instável (BENKOVÁ; BIELACH, 2010).

Assim, em *S. virgata*, a emissão de raízes laterais pode ser considerada um fenômeno normal e decorrente da própria formação do sistema radicular mesmo quando o meristema apical da raiz está inativado.

5 CONCLUSÕES

A capacidade de reindução da TD em plântulas de *Sesbania virgata* varia de acordo com o comprimento da raiz primária considerado e os tratamentos empregados. A taxa de secagem afeta o grau de umidade tolerado. A incubação em PEG e PEG+ABA não proporcionou melhora na porcentagem de sobrevivência com relação à secagem direta em sílica gel.

É possível o armazenamento por 240 dias a temperaturas menores ou iguais a 5°C de plântulas de *S. virgata* com raiz primária de 1 mm de comprimento submetidas à secagem até 10% de grau de umidade.

Em plântulas armazenadas, há relação positiva entre a manutenção da integridade de membranas e do DNA, a presença de mecanismos protetores, como proteínas resistentes ao calor e catalase, e a habilidade de formação de raízes laterais.

Plântulas de *S. virgata* com raiz primária de 1 mm de comprimento se comportaram como sementes tolerantes à dessecação, enquanto aquelas com raiz primária de 2 mm ou mais se assemelharam a sementes sensíveis, indicando que essas plântulas podem ser utilizadas como modelos no estudo da sensibilidade à dessecação.

A perda da capacidade de reindução do crescimento, observada nas plântulas com raiz primária de 3 mm de comprimento, pode ser relacionada à desestruturação irreversível das membranas celulares e à ineficiência em induzir certos mecanismos protetores, mas não à perda de integridade do DNA.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa, MG: UFV, 1998. 574 p.

ALPERT, P. The Discovery, scope, and puzzle of desiccation tolerance in plants. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 151. p. 5-17, 2000.

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

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 438 p.

ARAÚJO, E. C. et al. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 105-110, 2004.

AVELANGE-MACHEREL, M. H. et al. NMR metabolite profiling analysis reveals changes in phospholipid metabolism associated with the re-establishment of desiccation tolerance upon osmotic stress in germinated radicles of cucumber. **Plant, Cell and Environment**, Dordrecht, v. 29, p. 471-482, 2006.

BAGNIEWSKA-ZADWORNA, A. et al. The effect of dehydration with or without abscisic acid pretreatment on buds regeneration from *Polypodium vulgare* L. rhizomes. **Acta Physiologiae Plantarum**, Cracóvia, v. 29, p. 47-56, 2007.

BAGNIEWSKA-ZADWORNA, A. The root microtubule cytoskeleton and cell cycle analysis through desiccation of *Brassica napus* seedlings. **Protoplasma**, Viena, v. 233, p. 177-185, 2008.

BAI, X. et al. Nitric oxide enhances desiccation tolerance of recalcitrant *Antiaris toxicaria* seeds via protein S-Nitrosylation and Carbonylation. **PLoS ONE**, Melbourne, v. 6, n. 6, p. 1-11, 2011.

BAILLY, C. et al. Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 396, p. 475-83, 2004.

BAO, J.; SHA, S.; ZHANG, S. Changes in germinability, lipid peroxidation, and antioxidant enzyme activities in pear stock (*Pyrus betulaefolia* Bge.) seeds during room- and low-temperature storage. **Acta Physiologiae Plantarum**, Cracovia, v. 33, p. 2035-2040, 2011.

BARTELS, D. Desiccation tolerance studied in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. **Integrative and Comparative Biology**, McLean, v. 45, p. 696-701, 2005.

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

BECKETT, R. P.; CSINTALAN, Z.; TUBA, Z. ABA treatment increases both the desiccation tolerance of photosynthesis, and nonphotochemical quenching in the moss *Atrichum undulatum*. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 151, p. 65-71, 2000.

BENKOVÁ, E.; BIELACH, A. Lateral root organogenesis: from cell to organ. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 13, p. 677-683, 2010.

BERJAK, P. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 16, p. 1-15, 2006.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From Avicennia to Zizania: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, Londres, v. 101, p. 213-228, 2008.

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

BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Londres: CABI, 2002. 422 p.

BONOME, L. T. D. S. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex ADR. de Juss.) Müell.-Arg.] durante o armazenamento**. 2006. 136 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

BOUCHER, V. et al. MtPM25 is an atypical hydrophobic late embryogenesis-abundant protein that dissociates cold and desiccation-aggregated proteins. **Plant, Cell and Environment**, Dordrecht, v. 33, p. 418-30, 2010.

BOUDET, J. et al. Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, p. 1418-1436, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para a análise de sementes**. Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009. 399 p.

BUITINK, J. et al. Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. **The Plant Journal**, Michigan, v. 4, p. 735-750, 2006.

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

BURNETT, S. E. et al. Controlled drought affects morphology and anatomy of *Salvia splendens*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, New York, v. 130, n. 5, p. 775-781, 2005.

CAIXETA, F. **Alterações fisiológicas e bioquímicas durante o desenvolvimento, a germinação e o armazenamento de sementes de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.) e habanero yellow (*Capsicum chinenses*).** 2009. 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

CAMARGOS, V. N. et al. Superação da dormência e avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Sesbania virgata*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1858-1865, 2008.

CARUSO, A. et al. Physiological characterization and identification of genes differentially expressed in response to drought induced by PEG 6000 in *Populus canadensis* leaves. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 165, p. 932-941, 2008.

CONTRERAS-PORCIA, L. et al. Tolerance to oxidative stress induced by desiccation in *Porphyra columbina* (Bangiales, Rhodophyta). **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 62, n. 6, p. 1815-1829, 2011.

CORBINEAU, F. et al. Decrease in sunflower (*Helianthus annuus*) seed viability caused by high temperature as related to energy metabolism, membrane damage and lipid composition. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 116, p. 489-496, 2002.

COUTINHO, M. P. et al. Substrate from clay extraction area enriched with agroindustrial and urban byproducts for *Sesbânia* seedlings cultivation. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 30, n. 1, p. 147-153, 2006.

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

CROWE, J. H. et al. Stabilization of dry mammalian cells: lessons from nature. **Integrative and Comparative Biology**, McLean, v. 45, p. 810-820, 2005.

DALAL, M. et al. Abiotic stress and ABA-inducible Group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance. **Journal of Biotechnology**, New York, v. 139, p. 137-145, 2009.

DAVIDE, A.C.; FARIA, J.M.R.; BOTELHO, S.A. **Propagação de espécies florestais**. Belo Horizonte: CEMIG/UFLA/FAEPE; Lavras, MG: UFLA, 1995, 41 p.

DAWS, M. I. et al. Loss of desiccation tolerance during germination in neotropical pioneer seeds: implications for seed mortality and germination characteristics. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 17, p. 273-281, 2007a.

DAWS, M. I. et al. Two-hundred-year seed survival of *Leucospermum* and two other woody species from the Cape Floristic region, South Africa. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 17, p. 73-79, 2007b.

DAWS, M. I.; GARWOOD, N. C.; PRITCHARD, H. W. Prediction of desiccation sensitivity in seeds of woody species: A probabilistic model based on two seed traits and 104 species. **Annals of Botany**, Londres, v. 97, p. 667-674, 2006.

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

DITENGOU, F. A. et al. Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Stanford, v. 105, n. 48, p. 1818-1823, 2008.

DUBROVSKY, J. G. et al. Lateral root initiation in *Arabidopsis*: developmental window, spatial patterning, density and predictability. **Annals of Botany**, Londres, v. 97, p. 903-15, 2006.

DUBROVSKY, J. G. et al. Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, p. 1648-57, 2000.

EHLERS, W.; GOSS, M. **Water dynamics in plant production**. Londres: CABI, 2003. 288 p.

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

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

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

FARRANT, J. M. et al. Wheat seedlings as a model to understand desiccation tolerance and sensitivity. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 120, p. 563-574, 2004.

FARRANT, J. M.; MOORE, J. P. Programming desiccation-tolerance: from plants to seeds to resurrection plants. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 14, p. 340-345, 2011.

FENNER, M. Seedlings. **New Phytologist**, Cambridge, v. 106, p. 35-47, 1987.

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

GARNCZARSKA, M.; BEDNARSKI, W.; JANCELEWICZ, M. Ability of lupine seeds to germinate and to tolerate desiccation as related to changes in free radical level and antioxidants in freshly harvested seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, Bari, v. 47, p. 56-62, 2009.

GONZÁLEZ-ZETUCHE, L. et al. Natural priming of *Wigandia urens* seeds during burial: effects on germination, growth and protein expression. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 11, p. 27-34, 2001.

GUTTERMAN, Y.; GOZLAN, S. Amounts of winter or summer rain triggering germination and “the point of no return” of seedling desiccation tolerance, of some *Hordeum spontaneum* local ecotypes in Israel. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 204, n. 2, p. 223-234, 1998.

GUTTERMAN, Y.; HUANG, Z. Seedling desiccation tolerance of *Leymus racemosus* (Poaceae) (wild rye), a perennial sand-dune grass inhabiting the Junggar Basin of Xinjiang, China. **Seed Science Research**, Wallingford, n. 14, p. 233-239, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. (Ed.). **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon, 1989. 527 p.

HAND, S. C. et al. LEA proteins during water stress: not just for plants anymore. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 73, p. 115-134, 2011.

HODGE, A. et al. Plant root growth, architecture and function. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 321, p. 153-187, 2009.

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

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behavior**. Roma: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 55 p. Bulletin, 1.

IGNACI, J. R. V.; MIOTTO, S. T. S. *Sesbania* in **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB019125>>. Acesso em: 26 jul. 2010.

ILLING, N. et al. The signature of seeds in resurrection plants : A molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. **Integrative and Comparative Biology**, McLean, v. 45, p. 771-787, 2005.

JOSÉ, A. C. et al. Changes in gene expression during drying and imbibition of desiccation sensitive *Magnolia ovata* (A. St.-Hil.) Spreng. seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 270-280, 2008.

JOSÉ, S. C. B. R. et al. Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 115-121, 2005.

KALEMBA, E. M.; JANOWIAK, F.; PUKACKA, S. Desiccation tolerance acquisition in developing beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds: the contribution of dehydrin-like protein. **Trees**, Berlin, v. 23, n. 2, p. 305-315, 2009.

KIBINZA, S. et al. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant Science**, Clare, v. 181, p. 309-15, 2011.

KRANNER, I. et al. Inter-nucleosomal DNA fragmentation and loss of RNA integrity during seed ageing. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 63, p. 63-72, 2011.

KRISHNAMURTHY, K. V. et al. The programme of cell death in plants and animals: a comparison. **Current Science**, Bangalore, v. 79, p. 1169-1181, 2000.

LAZAR, I.; LAZAR, I. **Gel analyzer** (The "Software"). [S. l.: s. n.], 2010.

LEINO, M. W.; EDQVIST, J. Germination of 151-year old *Acacia* spp. seeds. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Berlin, v. 57, p. 741-746, 2010.

LEPRINCE, O. et al. Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 597-608, 2000.

LEPRINCE, O. et al. The role of sugars and hexose phosphorylation in regulating the re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Cucumis sativa* and *Medicago truncatula*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 122, p. 200-209, 2004.

LISBOA, C. G. S. et al. Endo- β -mannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae): purification, characterization and its dual role in germination and early seedling growth. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goitacazes, v. 18, p. 269-280, 2006.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

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, 2008.

NASCIMENTO, W.; CANTLIFFE, D. J. Germination of primed lettuce seeds after storage. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Lake Alfred, v. 111, p. 96-99, 1998.

NTULI, T. M. et al. Increased drying rate lowers the critical water content for survival in embryonic axes of English Oak (*Quercus robur* L.) seeds. **Journal of Integrative Plant Biology**, Pequim, v. 53, p. 270-80, 2011.

ODELL, G. B.; CANTLIFFE, D. J. Seed priming procedures and the effect of subsequent storage on the germination of fresh market tomato seeds. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Lake Alfred, v. 99, p. 303-306, 1986.

OLVERA-CARRILLO, Y. et al. Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 154, p. 373-90, 2010.

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

PAMMENTER, N. W. et al. Effects of differential drying rates on viability of recalcitrant seeds of *Ekebergia capensis*. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, n. 4, p. 463-471, Dec. 1998..

PEÑA-VALDIVIA, C. B. et al. Anatomical root variations in response to water deficit: wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Biological Research**, Santiago, v. 43, p. 417-427, 2010.

POTOMATI, A.; BUCKERIDGE, M. S. Effect of abscisic acid on the mobilization of galactomannan and embryo development of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae –Faboideae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 303-310, 2002.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do pantanal**. Corumbá: Embrapa, 1994. 320 p.

PRICE, T. V. et al. Effect of seed storage under ambient and cold temperatures on germination of taro seed (*Colocasia esculenta*). **Seed Science and Technology**, Basserdorf, v. 35, p. 674-687, 2007.

PRITCHARD, H. W. Classification of seed storage types for ex situ conservation in relation to temperature and moisture. In: GUERRANT JÚNIOR, E. O.; HAVENS, K.; MUNDER, M. (Ed.). **Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild**. Washington: Island, 2004. p. 139-161.

PROCTOR, M. C. F.; LIGRONE, R.; DUCKETT, J. G. Desiccation tolerance in the moss *Polytrichum formosum*: physiological and fine-structural changes during desiccation and recovery. **Annals of Botany**, Londres, v. 99, p. 75- 93, 2007.

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

QUER, P. F. **Diccionario de botánica**. Barcelona: Península, 2001. 1244 p.

RAJJOU, L.; DEBEAUJON, I. Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **Comptes Rendus Biologies**, Oxford, v. 331, n. 10, p. 796-805, 2008.

ROACH, T. et al. Extracellular superoxide production, viability and redox poise in response to desiccation in recalcitrant *Castanea sativa* seeds. **Plant, Cell and Environment**, Dordrecht, v. 33, p. 59-75, 2010.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Basserdorf, v. 1, n. 4, p. 449-514, 1973.

RODRIGUEZ, M. C. S. et al. Transcriptomes of the desiccation-tolerant resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. **The Plant Journal**, Michigan, v. 63, p. 212-28, 2010.

RÖHRIG, H. et al. Desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* induces dynamic changes in protein phosphorylation. **Plant, Cell and Environment**, Dordrecht, v. 29, p. 1606-1617, 2006.

SILVA, E. A. et al. ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea Arabica* "Rubi") seed germination. **Annals of Botany**, Londres, v. 102, p. 425-433, 2008.

SIMÕES, K. et al. Phytotoxic catechin leached by seeds of the tropical weed *Sesbania virgata*. **Journal of Chemical Ecology**, Kentucky, v. 34, p. 681-687, 2008.

SPANÒ, C. et al. RNases and nucleases in embryos and endosperms from naturally aged wheat seeds stored in different conditions. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 164, p. 487-95, 2007.

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: Marzalina, M. et al. (Ed.). **Recalcitrant seeds: proceedings of IUFRO Seed Symposium 1998**. Kuala Lumpur: Forest Research Institute, 1999. p. 29-42.

TOLDI, O.; TUBA, Z.; SCOTT, P. Vegetative desiccation tolerance: is it a goldmine for bioengineering crops? **Plant Science**, Clare, v. 176, p. 187-199, 2009.

TONINI, P. P. et al. Effect of abscisic acid on galactomannan degradation and endo- β -mannanase activity in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). **Trees**, Berlin, v. 20, p. 669-678, 2006.

TONINI, P. P. et al. Testa is involved in the control of storage mobilization in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., a tropical legume tree from of the Atlantic Forest. **Trees**, Berlin, v. 21, p. 13-21, 2007.

TONINI, P. P.; PURGATTO, E.; BUCKERIDGE, M. S. Effects of abscisic acid, ethylene and sugars on the mobilization of storage proteins and carbohydrates in seeds of the tropical tree *Sesbania virgata* (Leguminosae). **Annals of Botany**, Londres, v. 106, n. 4, p. 607-616, 2010.

TUNNACLIFFE, A.; WISE, M. J. The continuing conundrum of the LEA proteins. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 94, p. 791-812, 2007.

VARGHESE, B. et al. Differential drying rates of recalcitrant *Trichilia dregeana* embryonic axes: a study of survival and oxidative stress metabolism. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 142, p. 326-38, 2011.

VARI, A. K. et al. Seed coat imposed dormancy in *Sesbania* spp. And treatments to improve germination. **Seed Science and Technology**, Basserdorf, v. 35, n. 1, p. 318-325, 2007.

VEASEY, E. A. et al. Early growth and seedling morphology of species of *Sesbania* Scop. (Leguminosae, Robiniaea). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, p. 1-9, 1999.

VEASEY, E. A.; TEIXEIRA DE FREITAS, J. C. Breaking seed dormancy in *Sesbania sesban*, *S. rostrata* and *S. virgata*. **Seed Science and Technology**, Basserdorf, v. 30, n. 1, p. 211-217, 2002.

VEASEY, E.A. et al. Germplasm characterization of *Sesbania* accessions based on isozyme. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Berlin, v. 49, p. 449-462, 2002.

VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In.: KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development germination**. New York: M. Dekker, 1995. 853 p.

VIEIRA, C. V. et al. Stress-associated factors increase after desiccation of germinated seeds of *Tabebuia impetiginosa* Mart. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 62, p. 257-263, 2010.

VIEIRA, C. V. Germinação e re-indução de tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Tabebuia impetiginosa* e *Alliaria petiolata*. 2008. 98 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

VIEIRA, E. S. N. et al. Caracterização de cultivares de soja por descritores morfológicos e marcadores bioquímicos de proteínas e isoenzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, p. 86-94, 2009.

WALTERS, C.; WHEELER, L. M.; GROTEHUIS, J. M. Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. **Seed Science Research**, Wallington, v. 15, p. 1-20, 2005.

WHALLEY, W. R. et al. Water stress can induce quiescence in newly-germinated onion (*Allium cepa* L.) seedlings. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 1129-33, 2001.

XU, C. J.; CHEN, K. S.; FERGUSON, I. B. Programmed cell death features in apple suspension cells under low oxygen culture. **Journal of Zhejiang University Science**, Zhejiang, v. 5, p. 137-43, 2004.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 781-803, 2006.

ZHOU, Q. Y. et al. Soybean WRKY-type transcription factor genes, GmWRKY13, GmWRKY21, and GmWRKY54, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants. **Plant, Cell and Environment**, Dordrecht, v. 6, p. 486-503, 2008.