



**CRISTIANE CARVALHO GUIMARÃES**

**ASPECTOS MOLECULARES, BIOQUÍMICOS E  
ANATÔMICOS DA TOLERÂNCIA À  
DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE  
*Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT**

**LAVRAS-MG  
2014**

**CRISTIANE CARVALHO GUIMARÃES**

**ASPECTOS MOLECULARES, BIOQUÍMICOS E ANATÔMICOS DA  
TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE  
*Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, área de concentração Ciências Florestais, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador  
Prof. José Marcio Rocha Faria  
Coorientador  
Henk W. M. Hilhorst

**LAVRAS-MG  
2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Guimarães, Cristiane Carvalho.

Aspectos moleculares, bioquímicos e anatômicos da tolerância à  
dessecação em sementes de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub/  
Cristiane Carvalho Guimarães. – Lavras : UFLA, 2014.

123 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: José Márcio Rocha Faria.

Bibliografia.

1. Restabelecimento da tolerância à dessecação. 2. Danos  
estruturais. 3. Proteínas. 4. Enzimas. 5. Expressão gênica. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.973323

**CRISTIANE CARVALHO GUIMARÃES**

**ASPECTOS MOLECULARES, BIOQUÍMICOS E ANATÔMICOS DA  
TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE  
*Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, área de concentração Ciências Florestais, para obtenção do título de “Doutor”.

Aprovada em 21 de março de 2014

Dr. Henk W. M. Hilhorst - WUR  
Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva - UNESP  
Dr. Anderson Cleiton José - UFLA  
Dr. Renato Mendes Guimarães - UFLA

Orientador  
Prof. José Marcio Rocha Faria

**LAVRAS-MG  
2014**

## ***Agradecimentos***

*Primeiramente agradeço ao meu pai, Sérgio, minha mãe, Maria José, minha irmã, Vanessa, e meu irmão, Leonardo. A cada nova experiência só aumenta a minha certeza de que é o amor incondicional entre uma família que faz as verdadeiras bases para uma pessoa continuar e acreditar.*

*Ao meu orientador, Dr. José Marcio Rocha Faria, pelos seis anos de colaboração para meu crescimento profissional; por ter me incentivado a viver o que chamo de a maior “aventura” da minha vida - meu doutorado sanduiche realizado na Holanda - e, claro, pelas conversas sempre ricas em conteúdo intelectual e/ou risadas .*

*Ao Departamento de Ciências Florestais e a toda equipe do Laboratório de Sementes Florestais (em especial ao Anderson José, Olivia Toneti, Janice Ferreira, Tatiana Arantes, Ailton Gonçalves, Túlio Gabriel, Ezequiel Gasparim e Wilson Vicente pelo excelente ambiente de trabalho que vocês me proporcionaram e, também, à Meire, responsável pelo café que me mantinha “em pé”); ao Laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão; e Laboratório de Sementes Agrícolas, da Universidade Federal de Lavras (Minas Gerais).*

*Agradeço, também, com muito orgulho por ter feito parte desta equipe, aos pesquisadores, doutorandos e técnicos do Laboratory of Plant Physiology, Wageningen University (Holanda), onde realizei parte do meu doutorado. Em especial ao Dr. Henk Hilhorst e Dr. Wilco Ligterink, pesquisadores com os quais tive o prazer de trabalhar, aprender e que passei a admirar ainda mais depois do nosso convívio.*

*Aos verdadeiros “anjos” que encontrei na minha estadia na Holanda: Carlos Alho, Victor Reiner, Renake Teixeira, Lilian Abreu, Daniel Ribeiro, Juracy Lins, Charles Moreira, Jennifer De, Julio Maia, Vanessa Hermes e Roberta Mariot. Foram estes amigos que me ensinaram que sempre existe amor pra recomeçar.*

*E, claro, aquelas pessoas que tive o privilégio de poder escolher ter ao meu lado:  
meus amigos.*

***A todos vocês agradeço com amor!***

*"(...) Realmente, quando se observa a vida no seu crisol de dor e de prazeres, não é possível cobrir o rosto com uma máscara de vidro nem impedir que os vapores sulfurosos nos ofusquem o cérebro e nos turvem a imaginação com fantasias monstruosas e sonhos disformes. Há venenos tão sutis que, para os conhecer, cumpre experimentá-los. Há males tão estranhos que, pra lhes entender a natureza, é preciso contrai-los. Ainda assim, que grande recompensa recebe o observador! Em que maravilha se torna o mundo aos seus olhos! Notar a lógica singular e inflexível da paixão, a vida colorida e emotiva da inteligência...verificar onde se cruzam e onde se apartam, que delícia! Que importava o custo? Não há preço demasiado alto para semelhante sensação.  
(...)"*

**Oscar Wilde, em O Retrato de Dorian Gray**

## Resumo Geral

Com o intuito de contornar o entrave nas pesquisas com sementes recalcitrantes, causado pela rápida perda da viabilidade destas, duas técnicas têm sido utilizadas, como modelos nos estudos da sensibilidade à dessecação. São elas o uso de sementes ortodoxas germinadas e reindução da tolerância à dessecação. Neste trabalho, eventos relacionados à perda da tolerância à dessecação, durante a germinação de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, foram avaliados por meio da expressão de proteínas resistentes ao calor (PRC), enzima removedora de radicais livres catalase (CAT), quantificação de açúcares e dados de expressão gênica. Possíveis alterações na quantificação de açúcares e na expressão gênica, também, foram mensuradas quando a tolerância à dessecação foi reinduzida. Os tempos de embebição utilizados foram 0h, 39h, 57h e 72h, pré-determinados, em virtude dos resultados obtidos nos ensaios de caracterização da perda da tolerância à dessecação (TD). Já na tentativa de reinduzir a tolerância à dessecação, foram testadas diferentes combinações de protocolos, sendo considerado como mais adequada a incubação das sementes germinadas em ABA 5  $\mu$ M, a 4°C, por 3 dias. Foram investigadas, também, alterações anatômicas em células do eixo embrionário de sementes embebidas e, posteriormente, submetidas à secagem, por meio da microscopia de luz. Danos por secagem foram averiguados em eixos embrionários de sementes embebidas por 72 horas e amostradas para cada um dos seguintes tratamentos: secagem a 60%, 30% e 10% de umidade. A alteração no padrão de proteínas resistentes ao calor corrobora com os resultados de perda da tolerância à dessecação, já que houve redução na expressão destas durante a embebição. Pelos resultados referentes à enzima CAT, observa-se que a intensidade da banda visualizada para o controle foi, consideravelmente, menor em relação aos demais tempos de embebição, mostrando-se constante posteriormente. Também, durante o processo germinativo, foi observado decréscimo nos valores dos açúcares refinose, estaquiose e trealose, sugerindo uma correlação destes com a tolerância à dessecação. Contudo, nesse caso, o tratamento de reindução da tolerância à dessecação não foi capaz de alterar estes valores. Os dois genes analisados nesta pesquisa, sendo eles MEDTR4G093060\_1 e MEDTR3G072000\_1 (descritos para proteínas de choque térmico e para enzima removedora de radicais livres superóxido dismutase, respectivamente) não evidenciaram alterações, durante o processo germinativo, porém houve incremento significativo na expressão de ambos após o tratamento para reindução da tolerância à dessecação. Danos em membranas celulares durante a secagem foram evidentes.

**Palavras-chave:** Dessecação. Sementes. Restabelecimento da tolerância à dessecação. Danos estruturais. Proteínas. Enzimas. Expressão gênica.

## General Abstract

To try to overcome the obstacle in research with recalcitrant seeds, caused by the rapid loss of viability of these two techniques have been used as reliable models, studies the sensitivity to desiccation. They are using germinated orthodox seeds and reinduction of desiccation tolerance. In this paper, events related to the loss of desiccation tolerance during seed germination of *Peltophorum dubium* were evaluated by protein heat resistant (PCRs) and catalase enzyme (CAT), quantification of sugars and gene expression data. Possible changes in sugars and quantification of gene expression were also measured when the desiccation tolerance (DT) was reinduced. The soaking times were used 0h, 39h, 57h and 72h, determined based in results obtained from tests about characterization of the loss of desiccation tolerance. Since the attempt to reinduce desiccation tolerance was tested different combinations of protocols, being considered as most appropriate incubation of seeds germinated in 5 mM ABA, at 4°C, during 3 days. Were also investigated anatomical changes in cells of the embryonic axis of seeds soaked and subsequently subjected to drying by light microscopy. Damages were checked by drying in embryonic axes from seeds imbibed for 72 h, at which time a loss is detected in DT and sampled for each of the following treatments: drying at 60%, 30% and 10% moisture. Change in the pattern of PCRs corroborates the results of loss of desiccation tolerance, since there was a reduction in the expression of these during soaking. The results concerning the CAT enzyme show that the intensity of the band visualized in the control (0 h) was considerably reduced compared to the other times soaking, showing constant thereafter. Also during the germination process a decrease in the amounts of sugars raffinose, stachyose and trehalose was observed, suggesting a correlation to desiccation tolerance. However, in this case, the processing of reinduction of desiccation tolerance was not able to alter these values. Two genes analyzed in this study, namely Medtr\_v1\_026081 and Medtr\_v1\_017781 (described for heat shock proteins and the free radical remover enzyme superoxide dismutase, respectively) showed no changes during the germination process, however there was a significant increase in expression of both after treatment for reinduction of desiccation tolerance, thus indicating that moderate stress can trigger such mechanisms in seed germination and that these genes may be involved in the mechanisms of acquisition of desiccation tolerance. Damage to cell membranes during drying were evident.

**Keywords:** Desiccation. Seeds. Reinduced of desiccation tolerance. Desiccation damage. Proteins. Enzymes. Gene expression.

## SUMÁRIO

### PRIMEIRA PARTE

1 Introdução Geral.....	10
2 Referencial Teórico.....	13
3 Referências Bibliográficas.....	24

### SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

#### **ARTIGO 1 Alteração no padrão da enzima catalase e de proteínas resistentes ao calor durante a perda da tolerância à dessecação e danos por secagem em sementes de *Peltophorum dubium*.....**

1 Introdução.....	33
2 Material e Métodos.....	36
3 Resultados e Discussão.....	43
4 Conclusões.....	61
5 Referências Bibliográficas.....	62

#### **ARTIGO 2 Expressão gênica e variações de carboidratos solúveis durante a embebição e reindução da tolerância à dessecação em sementes de *Peltophorum dubium*.....**

1 Introdução.....	71
2 Material e Métodos.....	76
3 Resultados e Discussão.....	85
4 Conclusões.....	112
5 Referências Bibliográficas.....	114

## PRIMEIRA PARTE

### Introdução Geral

#### 1. Introdução

O armazenamento *ex situ* em bancos de sementes é uma das melhores estratégias para a conservação da diversidade genética vegetal, requerendo que as sementes estejam com baixo teor de água e sob baixas temperaturas e umidade do ar. De acordo com Vertucci e Roos (1990), isso acontece porque teores elevados de água em sementes reduzem a longevidade das mesmas, acelerando o metabolismo e favorecendo o crescimento de patógenos prejudiciais à manutenção da capacidade germinativa. Assim, a secagem e o armazenamento de sementes, em ambiente frio e seco, podem contribuir para prolongar a manutenção de sua viabilidade.

No entanto, existem espécies em que as sementes são altamente sensíveis à perda de água. Ainda não se sabe ao certo como algumas espécies vegetais e/ou suas sementes, tornaram-se tolerantes à dessecação, entretanto a hipótese mais aceita é que a tolerância à dessecação em sementes é considerada uma evolução da sensibilidade (PAMMENTER; BERJAK, 2000; TWEDDLE et al., 2003). Isto porque o ambiente no qual se encontravam os vegetais primitivos era úmido e, durante a evolução, as espécies conquistaram ambientes mais secos. Assim, sementes sensíveis à dessecação são, geralmente, produzidas por espécies típicas de ambientes úmidos (HONG; LININGTON; ELLIS, 1996; TWEDDLE et al., 2003), visto que a condição não exerceu nenhuma pressão sobre essas espécies, para que elas evoluíssem para produção de sementes tolerantes à dessecação (PAMMENTER; BERJAK, 2000).

Atualmente observa-se que a sensibilidade/tolerância à dessecação em sementes de diferentes espécies é variável, podendo ser considerada a existência de um contínuo de tolerância, onde em um extremo teríamos as sementes extremamente tolerantes à dessecação, ou ortodoxas, enquanto em outro, as extremamente sensíveis ou recalcitrantes (FARRANT et al., 1996).

A capacidade de sobreviver à desidratação depende de diversos mecanismos de adaptação que evitam danos celulares durante a perda de água ou que os reparam durante a reidratação. Blackman et al. (1991) sugerem que a maturação e a aquisição de tolerância à desidratação em sementes ortodoxas podem estar relacionadas com a acumulação de açúcares, proteínas, lipídios e outros compostos similares. Em suma, os mecanismos envolvidos em TD podem ser divididos em três grupos: 1) mecanismos de sinalização, regulação gênica e proteômica, 2) ajuste metabólico e sistemas antioxidantes, e 3) estabilidade macromolecular e mecânica (MOORE et al., 2009).

Assim, cinco objetivos foram estabelecidos à execução do presente trabalho:

- ✓ Descrever o comportamento de sementes de *Peltophorum dubium* quanto à tolerância/sensibilidade à dessecação durante o processo germinativo.
- ✓ Determinar mudanças no padrão eletroforético da enzima removedora de radicais livres catalase e de proteínas resistentes ao calor - em células radiculares, após diferentes períodos de embebição, associando-as à perda da tolerância à dessecação.
- ✓ Analisar alterações de carboidratos solúveis durante o processo germinativo e reindução da tolerância à dessecação com vistas a relacionar essas variações com a sensibilidade/tolerância à dessecação.
- ✓ Utilizar dados de expressão gênica, já disponíveis para a leguminosa *Medicago truncatula*, para identificar genes compartilhados por esta e

pela espécie alvo deste estudo (*Peltophorum dubium*) nos estádios de perda e reindução da tolerância à dessecação.

- ✓ Identificar mudanças anatômicas e/ou danos estruturais em células do eixo embrionário de sementes embebidas e submetidas a diferentes níveis de secagem.

## **2. Referencial Teórico**

### **2.1 Tolerância à Dessecação em Sementes**

A tolerância à dessecação (TD) é um mecanismo que possibilita os organismos passarem por um processo rigoroso de secagem e manterem suas funções após a reidratação e em plantas é amplamente constatada em grãos de pólen, esporos e sementes (ALPERT; OLIVER, 2002). A maioria das sementes de angiospermas adquire a capacidade de tolerar reduções graves no teor de umidade ao final do seu desenvolvimento, o que lhes permite permanecer viáveis e em repouso por longos períodos (BEWLEY, 1995).

Notando-se que em sementes existem diferenças quanto à tolerância à desidratação, estas foram classificadas como ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias (ROBERTS, 1973; ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990). Segundo essa classificação, as sementes tipicamente tolerantes, chamadas de ortodoxas, podem ser secas até graus de umidade de cerca de 7% e armazenadas por longos períodos sem danos ao metabolismo. Seu potencial de conservação é inversamente proporcional ao grau de umidade e à temperatura ambiente, dentro de limites (MARCOS FILHO, 2005). Por outro lado, as sementes extremamente sensíveis, conhecidas como recalcitrantes, não toleram grandes reduções no grau de umidade ou o armazenamento por períodos que excedam algumas semanas ou meses (ROBERTS, 1973).

Embora esta classificação ainda seja aceita, foi proposta a existência de um contínuo de tolerância, onde em um extremo teríamos as sementes extremamente tolerantes, ou ortodoxas, enquanto em outro, as extremamente sensíveis, ou recalcitrantes (FARRANT et al., 1996).

## 2.2 Compostos de Reserva e Tolerância à Dessecação

Em sementes ortodoxas, a tolerância à dessecação é adquirida durante a fase de acúmulo de reservas (KERMODE, 1990; PAMMENTER; BERJAK, 1999) e aparentemente os carboidratos solúveis estão diretamente relacionados com esse processo (OBENDORF, 1997). Há, também, indícios de que os mesmos carboidratos relacionados com a tolerância à dessecação das sementes estejam igualmente envolvidos na tolerância ao congelamento.

Dentre os carboidratos solúveis presentes em tecidos como embriões e cotilédones, incluem-se alguns monossacarídeos e dissacarídeos, principalmente a sacarose, e os oligossacarídeos, dentre eles, rafinose, estaquiase e verbascose (KIGEL; GALILI, 1995).

Durante a desidratação, açúcares específicos podem prevenir os efeitos danosos da dessecação sobre as membranas celulares, na medida em que formam ligações de hidrogênio, substituindo a água normalmente associada com as superfícies das membranas, mantendo, assim, o espaçamento dos grupos de lipídios, evitando a transição da fase líquida cristalina para a fase gel (PAMMENTER; BERJAK, 1999).

Outro mecanismo por meio do qual os açúcares podem agir para proteger as células, durante a dessecação, é a formação de vidro intracelular. Uma abordagem foi introduzida para o entendimento dos efeitos do conteúdo de água e da temperatura sobre a longevidade do germoplasma, baseado na vitrificação ou na formação de “vidros” dentro do citoplasma (BURKE, 1986). Vidro pode ser entendido como uma solução líquida, com propriedades de viscosidade de um sólido, que não forma cristais mesmo em temperaturas muito baixas e com estabilidade numa ampla faixa de temperatura (KOSTER, 1991). A formação de vidro previne a desnaturação de moléculas e formação de agregados moleculares, ocupa espaços em tecidos e, durante a desidratação,

serve para evitar aumento excessivo do colapso nos tecidos, a concentração de solutos e alteração de pH (BURKE, 1986).

Açúcares, também, podem interagir com as proteínas, evitando a mudança de sua conformação e, conseqüentemente, de sua função (LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993). Estas proteínas são produzidas tanto por partes vegetativas das plantas submetidas a estresse como por sementes ortodoxas, durante a secagem de maturação, sendo associadas a diversas macromoléculas, evitando a desnaturação, podendo ser encontradas, também, em sementes recalcitrantes (PAMMENTER; BERJAK, 1999; BERJAK; PAMMENTER, 2008).

### **2.3 Aspectos Moleculares da Tolerância à Dessecação**

Um dos mecanismos associados à tolerância à dessecação, durante o desenvolvimento de sementes, é a expressão de proteínas específicas e diversos grupos têm sido correlacionados, temporariamente, com a transição da intolerância para tolerância. A estabilidade, propriedades físicas e abundância destas em organismos que toleram a desidratação sugerem um importante papel na tolerância à dessecação (BLACKMAN et al., 1991).

Dentre estas, está a síntese de determinadas proteínas na fase final de maturação, conhecidas como “LEA” (*Late Embryogenesis Abundant*) proteínas (BEWLEY; BLACK, 1994), cuja presença e acúmulo, nas fases finais do desenvolvimento de sementes, têm sido relacionados com aquisição de tolerância à dessecação em diferentes espécies. O padrão de acúmulo, a ocorrência abundante e as características físicas de resistência à desnaturação das proteínas LEA indicam seu papel na tolerância à dessecação, protegendo os componentes celulares da falta de água, promovendo ajustes osmóticos ou substituindo a água (HAN et al., 1997).

Foi sugerido que as proteínas LEA podem ligar íons e água, podendo, ainda, estar associadas aos açúcares, controlando a taxa de perda de água e mantendo, assim, a viabilidade das sementes ortodoxas no estado seco (MENTER; BERJAK; WALTERS, 2000). Por sua natureza anfipática, são capazes de impedir a desnaturação de macromoléculas e estabilizar estruturas intracelulares sob determinadas condições, incluindo estresse hídrico severo (BLACKMAN et al., 2000).

Proteínas de choque térmico (*Heat-Shock Proteins* - HSP) são outro grupo de produtos de genes usualmente encontrados em plantas submetidas ao déficit hídrico (JOSHI; NGUYEN, 1996). Algumas famílias funcionam ligando-se às regiões não dobradas das cadeias peptídicas, sugerindo que sua função possa estar relacionada com a manutenção da correta estrutura terciária de certas proteínas (COOPER, 1997; EFEOGLU, 2009). Assim, como o estresse promove a desnaturação e a agregação de proteínas, uma maior síntese de HSP ajudaria a proteger essas proteínas durante o estresse osmótico que ocorre após a desidratação da célula (ZHU; HENDRY; MCKERSIE, 1997).

Observa-se, também, que a dessecação induz o acúmulo de espécies de radicais livres, tóxicos às células e capazes de danificar constituintes celulares, e que a tolerância à retirada de água pode ser relacionada, ao menos em parte, à capacidade de as sementes eliminarem o excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) (CONTRERAS-PORCIA et al., 2011).

Foi descrita a incapacidade dos tecidos das sementes sensíveis à dessecação efetuarem a adequada proteção contra eventos oxidativos, consequentes do metabolismo desorganizado existente durante a desidratação e o armazenamento pode ser considerado como uma das principais causas da sensibilidade à dessecação e da reduzida longevidade (LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993).

Conforme já mencionado, determinados danos celulares podem ser reduzidos ou prevenidos por mecanismos protetores, entre os quais se podem citar os provenientes das ações de enzimas removedoras de radicais, dentre elas a glutathione redutase, superóxido dismutase, catalase e peroxidase (NKANG; OMOKARO; EGBE, 2000). Alguns trabalhos, investigando a sensibilidade à dessecação e atividade de enzimas removedoras de radicais livres em sementes, descreveram altas correlações entre a atividade destas enzimas e a viabilidade das sementes estudadas (LI; SUN, 1999; ROSA et al., 2005).

Assim, qualquer característica que confere tolerância à dessecação pode ter origem em um estímulo que aciona o código genético e dá início a uma cascata gênica responsável por esta característica (KRANNER et al., 2010), e isto normalmente acontece durante a fase final do desenvolvimento das sementes, para qual a expressão de alguns genes já foi relatada. Nota-se, também, que alguns destes genes são necessários para a tolerância ao estresse e o acúmulo dos produtos da expressão destes, assim como a desativação da expressão de outros, podem, também, estarem ligados ao aumento da tolerância a condições adversas (NEPOMUCENO et al., 2000).

Com a secagem, mudanças fisiológicas e moleculares são detectadas em plantas, tanto em partes vegetativas quanto reprodutivas, como em sementes. Estas alterações são reguladas por genes específicos que estão envolvidos na tolerância à dessecação (INGRAM; BARTELS, 1996). Foi descrito que genes induzidos pelo déficit hídrico em plantas podem gerar tolerância da célula à desidratação, controle da acumulação de íons, funções de proteção no citoplasma, regulação adicional de expressão gênica, metabolização de compostos degradados pelo estresse, alterações no potencial osmótico celular para aumentar a absorção de água, dentre outros (BRAY, 1997; NEPOMUCENO et al., 2000). Certamente estes mesmos mecanismos, já detectados em partes vegetativas, podem ser descritos de forma semelhante para sementes.

A dificuldade no estudo destes genes é relacionar a expressão destes com os eventos aos quais estão envolvidos, pois, em sementes, eventos metabólicos podem estar envolvidos a estádios do desenvolvimento ou, também, em resposta a outros estresses. Diversos genes já foram identificados mostrando relação com a tolerância à dessecação, codificando moléculas importantes neste processo, como: proteínas LEA, enzimas que atuam na degradação de açúcares e antioxidantes (INGRAM; BARTELS, 1996).

Estudos da expressão de genes associados com a tolerância e a sensibilidade à dessecação têm sido utilizados de forma a compreender os mecanismos que levam à deterioração de sementes recalcitrantes, após secagem (Faria et al., 2006) como *LEC1*, *LEC2*, *ABI3*, dentre outros (BÄUMLEIN et al., 1994; HARADA, 2001; Parcy et al., 1994).

Em virtude de determinadas características particulares, algumas espécies, hoje, são alvo de grandes iniciativas no que se refere à identificação gênica, sendo utilizadas, assim, como espécies-modelo. Uma delas é a leguminosa *Medicago truncatula* que, recentemente, teve aproximadamente 95% do seu genoma sequenciado (Buitink e Pelletier, estudos preliminares). Parte destes estudos foi relacionada a alterações na expressão de determinados genes do estado sensível e tolerante à dessecação naquela espécie. O aumento do conhecimento científico é em virtude, principalmente, do uso de organismos-modelo e o ideal é que tais estudos sejam extrapolados para espécies selvagens, como *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert.

A identificação de genes e de seus produtos pode trazer novas ideias para traçar estratégias de produção sob estresses abióticos e caracterizar melhor os mecanismos envolvidos na regulação da sobrevivência de sementes no estado seco (MAIA et al., 2011). A expressão de genes em espécies tolerantes à dessecação pode, também, ser utilizada no estudo de mecanismos de tolerância à dessecação e para identificar outros genótipos com características similares.

## 2.4 Genes de Referência

Para a normalização dos dados obtidos com a análise por qRT-PCR, são necessários genes expressos de forma estável e uniforme cuja expressão não seja afetada pelo tratamento ou estágio de desenvolvimento em estudo. São estes os chamados genes constitutivos ou *housekeeping genes*, que são selecionados com base no conhecimento ou provável papel nos processos celulares básicos como, por exemplo, manutenção da estrutura celular ou metabolismo primário. Alguns dos mais conhecidos e utilizados genes-referência, em estudos com plantas, incluem aqueles codificadores do rRNA 18S, fator de alongamento (EF-1), actina (ACT), tubulina (TUB), dentre outros (DEKKERS et al., 2012; CZECHOWSKI et al., 2005).

De acordo com Jain et al. (2006), genes-referência com expressão estável em um organismo podem não ser adequados para a normalização da expressão gênica em outro organismo e, ainda, sob um determinado número de tratamentos e estádios de desenvolvimento. Na última década, relevantes ferramentas, para a seleção de possíveis genes para a normalização, tornaram-se disponíveis, dentre eles o programa geNORM (VANDESOMPELE et al., 2002) que possibilita o cálculo de um fator de normalização ao longo de vários genes de referência e melhora a precisão da normalização.

Dados de microarrays podem ser extraídos para genes que são expressos de forma estável ao longo de um conjunto diversificado de condições e têm sido empregados com sucesso em várias espécies de plantas (LI et al., 2012; DEKKERS et al., 2012; NARSAI et al., 2010).

## 2.5 Danos Estruturais por Secagem

O armazenamento *ex situ* em bancos de sementes é uma das melhores estratégias para a conservação da diversidade genética vegetal, sendo influenciado por fatores genéticos, condições ambientais, durante o desenvolvimento das sementes, características do ambiente de armazenamento e pelo grau de umidade e qualidade da semente (RAJJOU; DEBEAUJOUN, 2008).

Para sementes recalcitrantes, os métodos atuais de conservação e armazenamento são baseados na manutenção do índice de água, pois existe um valor ótimo para este índice, abaixo do qual podem ocorrer danos à germinação (BARBEDO; BILIA, 1998). Uma das conhecidas razões pelas quais os referidos danos à germinação acontecem é a perda da integridade das estruturas celulares.

A integridade das estruturas anatômicas das sementes é de extrema importância para o funcionamento celular e naturalmente essencial para a sobrevivência e crescimento das plântulas. Danos estruturais podem concorrer para redução da capacidade germinativa e conseqüente aumento, parcial ou total, na mortalidade das sementes.

É conhecido, por exemplo, que a integridade da membrana plasmática é essencial para manutenção da viabilidade de sementes. A mesma mantém a integridade celular e delimita a fronteira entre os meios intracelular e extracelular, constituindo uma barreira seletiva, por meio da qual se processam trocas de substâncias e energia entre a célula e o meio exterior. A membrana celular funciona, também, como um sensor, permitindo à célula modificar-se em resposta a diversos estímulos ambientais. Entretanto, com a secagem, estas sofrem um processo de desorganização estrutural, estando tanto mais desorganizadas, quanto menor for o grau de umidade das sementes e, conseqüentemente, verifica-se um grau maior de lixiviação de eletrólitos do

interior das células para o meio externo, descontrole de trocas hídricas e completa descompartimentalização celular (BEWLEY; BLACK, 1985; CORRÊA; AFONSO JÚNIOR, 1999; SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2004).

Walters et al. (2000) considerou que, para tolerar a desidratação, a semente necessita de diferentes sistemas de proteção a cada nível de remoção de água e, dessa forma, teria seu grau de tolerância condicionado ao tipo de água removida em cada etapa e a presença desses sistemas. Segundo Vertucci e Farrant (1995), os teores entre 10% e 20%, que são teores letais de água para grande parte das espécies com sementes recalcitrantes, caracterizam a água ligada a sítios hidrofílicos e não ocorre mais síntese de proteínas e de ácidos nucleicos.

A água tem participação decisiva nas reações enzimáticas, na solubilização e transporte de metabólitos, como reagente na digestão hidrolítica de tecidos de reserva da semente (BRADFORD, 1995), havendo ampla variação no limite de tolerância à redução dos níveis de água entre famílias, gêneros e espécies. Walters et al. (2000) denominaram como “grau de umidade crítico” o limite até o qual as macromoléculas e os tecidos das sementes podem ser desidratados sem a ocorrência de danos irreparáveis; e como “grau de umidade letal” a causa da perda integral da viabilidade da semente.

Alterações anatômicas podem ocorrer em plantas sob déficit hídrico, visando à proteção e à adaptação das espécies a este estresse. Os tecidos expostos ao estresse hídrico, geralmente, mostram características de processo de lignificação, bem como redução no tamanho celular, aumento no tecido vascular, aumento na espessura da parede celular, dentre outros (LEVITT, 1980; PITMAN et al., 1983). Estas variações morfológicas e anatômicas têm sido muito estudadas em tecidos vegetativos, mas ainda pouco conhecidas em sementes. Informações básicas referentes a aspectos fisiológicos relacionados a tais variações, especialmente em condições de estresse hídrico, podem ser

bastante úteis na compreensão das diferentes respostas à secagem apresentada por sementes recalcitrantes e ortodoxas.

## **2.6 Desativação de Mecanismos de Tolerância à Dessecação em Sementes Ortodoxas Germinadas e Reindução da Tolerância à Dessecação**

Um grande obstáculo enfrentado no estudo da recalcitrância é justamente o fato destas perderem a viabilidade em curto período. A fim de contornar este entrave nas pesquisas, duas técnicas têm sido utilizadas, como modelos confiáveis, nos estudos da sensibilidade à dessecação. São elas o uso de sementes ortodoxas germinadas e a re-indução da tolerância à dessecação (BUITINK et al., 2003; BUITINK et al., 2006; FARIA et al., 2005; MASETTO, 2008; VIEIRA et al., 2010; MAIA et al., 2011).

Como as sementes ortodoxas perdem progressivamente a tolerância à dessecação, durante a germinação, tornando-se comparáveis às recalcitrantes, Sun (1999) sugeriu o uso desse grupo de sementes como sistema modelo para estudo da recalcitrância. As evidências são de que muito dos processos que ocorrem durante a perda da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas germinadas são similares àqueles responsáveis pela sensibilidade à dessecação em recalcitrantes.

Bruggink e Van der Toorn (1995) demonstraram ser possível restaurar a tolerância à dessecação em sementes ortodoxas germinadas de *Cucumis sativus* e *Impatiens walleriana* e sugeriram que esta abordagem poderia servir como um sistema modelo adequado e confiável em estudos desta natureza. A técnica foi aplicada, com sucesso, para outras espécies, como *Medicago truncatula* (Buitink et al, 2003) e *Tabebuia impetiginosa* (VIEIRA et al., 2010), pela aplicação de ácido abscísico exógeno e/ou de estresse osmótico moderado.

Mudanças estruturais, bioquímicas e gênicas, durante a germinação e/ou re-indução da tolerância à dessecação, podem fornecer uma visão mais ampla dos mecanismos de sensibilidade à dessecação.

## 2.7 Caracterização da Espécie

Conhecida popularmente como canafístula, farinha-seca, faveira, sobrasil, tamboril-bravo, guarucaia, ibira puita, angico-amarelo, dentre outros, a espécie *Peltophorum dubium* pertence à família Leguminosae.

Árvore decídua, pioneira e com ocorrência na Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul até o Paraná, é uma espécie frequente em todo o domínio da Floresta Estacional Semidecidual, abundante em formações secundárias, mas com poucos indivíduos, geralmente de grande porte, ocupando o estrato dominante do dossel em floresta primária. Verifica-se que esta é uma espécie de rápido crescimento e possui alto potencial para reflorestamentos mistos de áreas degradadas. Madeira moderadamente densa utilizada em obras de acabamento de construções e de sua casca pode-se extrair o tanino, usado em indústrias de couro (LORENZI, 1992).

*Peltophorum dubium* produz sementes em grande quantidade e de fácil manipulação. Possui comportamento ortodoxo, constituindo-se eficiente ferramenta para estudos de longa duração. A dormência tegumentar observada em sementes desta espécie é facilmente superável não trazendo, portanto, problemas, durante a germinação, a qual é completada com, aproximadamente, 72 horas após o início da embebição (GUIMARÃES et al., 2011).

### 3. Referências bibliográficas

ALPERT, P.; OLIVER, M. J. Drying without dying. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Eds.). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford: CABI, 2002. p. 4-43.

BARBEDO, C. J.; BILIA, D. A. C. Evolution of research on recalcitrant seeds. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, nesp., p. 121-125, ago. 1998.

BÄUMLEIN, H. et al. The *FUS3* gene of *Arabidopsis thaliana* is a regulator of gene expression during late embryogenesis. **Plant Journal**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 379-387, Sept. 1994.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, London, v. 101, n. 2, p. 213-228, Aug. 2008.

BERJACK, P.; PAMMANTER, N. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, nesp., p. 22-55, 2000.

BEWLEY, J. D. Physiological aspects of desiccation tolerance: a retrospect. **Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 156, n. 4, p. 393-403, July 1995.

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

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1985.

BLACKMAN, S. A. et al. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n. 3, p. 868-874, July 1991.

BRADFORD, K. J. Water relations in seed germination. In: KIGEL, J.; GALILI, J. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 351-396.

BRAY, E. A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 407, p. 2331-2341, Sept. 2004.

BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 2, p.48-54, Feb. 1997.

BRUGGINK, T.; VAN DER TOORN, P. Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 5, n. 1, p. 1–4, Mar. 1995.

BUITINK, J. et al. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 13, n. 4, p. 273–286, Dec. 2003.

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. **Plant Journal**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 735-750, Sept. 2006.

BURKE, M. J. The glassy state and survival of anhydrous biological systems. In: LEOPOLD, A. C. (Ed.). **Membranes, metabolism and dry organisms**. Ithaca: Cornell University Press, 1986. p. 358-363.

CONTRERAS-PORCIA, L. et al. Identification of copper-induced genes in the marine alga *Ulva compressa* (Chlorophyta). **Marine Biotechnology**, New York, v. 13, n. 3, p. 544–556, June 2011.

COOPER, G. M. **The cell: a molecular approach**. Washington: ASM Press, 1997.

CORRÊA, P. C.; AFONSO JÚNIOR, P. C. Uso do teste de condutividade elétrica na avaliação dos danos provocados por diferentes taxas de secagem em sementes de feijão. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 1, n. 1, p. 21-26. 1999.

DEKKERS, B. J. W. et al. Identification of reference genes for RT-qPCR expression analysis in *Arabidopsis* and tomato seeds. **Plant & Cell Physiology**, Wageningen, v. 53, n. 1, p. 28–37, 2012.

EFEOGLU, B. Heat shock proteins and heat shock response in plants. **G. U. Journal of Science**, Turkey, v. 22, n. 2, p. 67-75, 2009.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, 1990.

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, June 2005.

FARIA, J. M. R.; LAMMEREN, A. A. M. V.; HILHORST, H. W. M. Desiccation sensitivity and cell cycle aspects in seeds of *Inga vera* subsp. affinis. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 14, n. 2, p.165-178, May 2004.

FARRANT, J. M. et al. Presence of dehydrin-like proteins and levels of abscisic acid in recalcitrant (desiccation sensitive) seeds may be related to habitat. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 6, n. 4, p. 175-182, Dec. 1996.

FARRANT, M. J.; PAMMENTER, W. N.; BERJAK, P. Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation-sensitive (recalcitrant) seed of *Avicennia marina* and desiccation tolerant types. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 3, n. 1, p. 1-13, Mar. 1993.

GUIMARÃES, C. C. et al. Avaliação da perda da tolerância à dessecação e da quantidade de DNA nuclear em sementes de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert durante e após a germinação. **Revista Brasileira de Sementes, Londrina**, v. 33, n. 2, p. 207-215, 2011.

HAN, M. et al. Stellar populations in the Dwarf Elliptical Galaxy NGC 147. **Astronomical Journal**, Woodbury, v.113, n. 3, p. 1001, Mar. 1997.

HARADA, J. J. Role of *Arabidopsis* *LEAFY COTYLEDON* genes in seed development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 158, n. 4, p. 405-409, 2001.

HONG, T. D.; LININGTON, S.; ELLIS, R. H. **Seed storage behaviour: a compendium**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. (Handbooks for Genebanks, 4)

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 377-403, June 1996.

JAIN, M. et al. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 345, n. 2, p. 646-651, June 2006.

JOSHI, C. P.; NGUYEN, H. T. Differential display-mediated rapid identification of different members of a multigene family, HSP16.9 in wheat. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 31, n. 3, p. 575-584, June 1996.

KERMODE, A. R. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 155-195, 1990.

KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995.

KOSTER, K. L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n. 1, p. 302-304, May 1991.

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, Cambridge, v. 188, n. 3, p. 655-673, 2010.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 3, n. 4, p. 231-246, Dec. 1993.

LEVITT, J. Responses of plants to environmental stress. In: LEVITT, J. **Water, radiation, salt, and other stresses**: volume 2. New York: Academic Press, 1980. p. 240-287.

LI, Q. et al. Validation of reference genes for real-time quantitative PCR normalization in soybean developmental and germinating seeds. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, n. 10, p. 1789–1798, Oct. 2012.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

LI, X; SUN, A. Y. Paraquat induced activation of transcription factor AP-1 and apoptosis in PC12 cells. **Journal of Neural Transmission**, Vienna, v. 106, n. 1, p. 1-21, 1999.

MAIA, J. et al. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated arabidopsis thaliana seeds and its associated transcriptome. **PlosOne**, Califórnia, v. 6, n. 12, e29123, Dec. 2011.

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

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.

MENTER, N. W.; BERJAK, P.; WALTERS, C. The effect of drying rate on recalcitrant seeds: "lethal water contents", causes of damage, and quantification of recalcitrance. In: BLACK, M.; BRADFORD, K. J.; VAZQUEZ-RAMOS, J. (Ed.). **Seed biology: advances and applications**. Wallingford: CABI Publishing, 2000. p. 215-221.

MOORE, M. M. et al. Phylogenetic analysis of 83 plastid genes resolves relationships among major clades of eudicot angiosperms and reveals multiple rapid radiations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 10, p. 4623-4628, 2009.

NARSAI, R. et al. Defining reference genes in *Oryza sativa* using organ, development, biotic and abiotic transcriptome datasets. **BMC Plant Biology**, London, v. 10, p. 56, Jan. 2010.

NEPOMUCENO, A. L. et al. Isolation of a cotton NADP(H) oxidase homologue induced by drought stress. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 7, p. 1407-1416, jul. 2000.

NKANG, A.; OMOKARO, D.; EGBE, A. Effects of desiccation on the lipid peroxidation and activities of peroxidase and polyphenoloxidase in seeds of *Telfairia occidentalis*. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2000.

OBENDORF, R. L. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 7, n. 2, p. 63-74, June 1997.

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

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Some thoughts on the evolution and ecology of recalcitrant seeds. **Plant Species Biology**, London, v. 15, n. 2, p. 153-156, Aug. 2000.

PARCY, F. et al. Regulation of gene expression programs during Arabidopsis seed development: roles of the *ABI3* locus and of endogenous abscisic acid. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, n. 11, p. 1567-1582, Nov. 1994.

PITMAN, W. D. et al. Histological differences in moisture-stressed and nonstressed kleingrass forage. **Crop Science**, Madison, v. 23, p. 793-795, 1983.

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

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

ROSA, D. V. F. S. et al. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas lea associadas à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 27, n. 2, p. 91-101, 2005.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 110-119, 2004.

STEADMAN, K. J.; PRITCHARD, H. W.; DEY; P. M. Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. **Annals of Botany**, London, v. 77, n. 6, p. 667-674, 1996.

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.). **IUFRO seed symposium "recalcitrant seeds"**. Kuala Lumpur: Forest Research Institute of Malasya, 1999. p. 29-42.

TWEDDLE, J. C. et al. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 91, n. 2, p. 294-304, Apr. 2003.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, June 2002. RESEARCH0034.

VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. **Acquisition and loss of desiccation tolerance**. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). Seed development and germination. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 237-271.

VERTUCCI, C. W.; ROSS, E. E. Theoretical basis of protocols for seed storage. **Plant Physiology**, Washington, v. 94, n. 3, p. 1019-1023, 1990.

VIEIRA C. V. et al. Stress-associated factors increase after desiccation of germinated seeds of *Tabebuia impetiginosa* Mart. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 62, n. 3, p. 257-263, Dec. 2010.

WALTERS, C. et al. Levels of recalcitrance in seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, nesp., p. 7-21, 2000.

ZHU, J.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Molecular aspects of osmotic stress in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 253-277, 1997.

## SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

### ARTIGO 1

#### **Alteração no padrão de catalase e proteínas resistentes ao calor durante a perda da tolerância à dessecação e alterações anatômicas celulares em sementes de *Peltophorum dubium*.**

##### **Resumo**

Neste trabalho, mecanismos de proteção relacionados à tolerância à dessecação (TD) foram avaliados durante a embebição de sementes de *Peltophorum dubium* por meio da expressão de proteínas resistentes ao calor (PRC) e da enzima removedora de radicais livres catalase (CAT). A determinação do padrão eletroforético de PRCs e da enzima CAT foi realizada em diferentes pontos, pré-determinados, em virtude dos resultados obtidos nos ensaios de caracterização da perda da tolerância à dessecação, durante a germinação, para os seguintes tempos de embebição: 0h (controle), 39h, 57h e 72h (quando a TD é totalmente perdida). Já as alterações anatômicas, em células do eixo embrionário de sementes embebidas e, posteriormente, submetidas à secagem, foram investigadas com auxílio da microscopia de luz. Danos por secagem foram averiguados em eixos embrionários de sementes embebidas por 72 horas e desidratadas, e a 60%, 30% e 10% de umidade. Alteração no padrão de PRCs pode ser correlacionada à perda da tolerância à dessecação, já que houve redução na expressão destas durante a embebição. A referida diminuição na disponibilidade dessas proteínas, no momento em que foi detectada e perda da tolerância à dessecação podem ter contribuído para a incapacidade das sementes tolerarem a desidratação. Pelos resultados referentes à enzima CAT, observa-se que a intensidade da banda visualizada para o controle (0 hora) foi, consideravelmente, reduzida em relação aos demais tempos de embebição, mostrando-se constante posteriormente. Entretanto, embora o acréscimo na atividade desta enzima seja frequentemente correlacionado com a capacidade das sementes minimizarem danos causados pela dessecação, para *Peltophorum dubium*, o referido aumento não foi suficiente para manter a TD durante a germinação. Foram evidentes os danos em paredes celulares, conforme visualizados com o uso da microscopia de luz.

**Palavras-chave:** Sementes. Dessecação. Enzimas. Proteínas. Danos em parede celular. Secagem.

**Change in the pattern of catalase and heat resistant proteins during loss of desiccation tolerance and damage by drying of *Peltophorum dubium* seeds**

**Abstract**

In this work, protection mechanisms related to the loss of desiccation tolerance (DT) during imbibition of seeds of *Peltophorum dubium* were assessed by the expression of heat resistant protein (HRP) and the enzyme remover free radicals catalase (CAT). The determination of the electrophoretic pattern of PRCs and the CAT activity was carried out at different interest points, determined because the results obtained from tests for characterization of the loss of desiccation tolerance during germination, for the following soaking times: 0h (control), 39h, 57h and 72h. The anatomical changes in cells of the embryonic axis of seeds soaked and subsequently submitted to drying were investigated with the aid of light microscopy. Damages were checked by drying in embryonic axes from seeds imbibed for 72h, at which time a loss is detected in TD, and sampled for each of the following treatments: drying at 60 %, 30 % and 10 % moisture. Change in the pattern of PRCs can be correlated to the loss of desiccation tolerance, since there was a reduction in the expression of these during soaking. Such reduced availability of these proteins at the moment is detected and loss of desiccation tolerance for this kind may have contributed to the inability to tolerate study seed dehydration and damage caused by drying. The results about CAT show that the intensity of the band visualized in the control (0h) was considerably reduced compared to the other times soaking, showing constant thereafter. Although the increase in the activity of this enzyme is often correlated with the ability of the seeds to minimize desiccation damage in *Peltophorum dubium*, this increase was not enough to keep the TD during germination . The damage to the cell membranes were evident with the use of transmission microscopy.

**Keywords:** Seeds. Desiccation. Enzymes. Proteins. Damage to the cell. Drying.

## 1. Introdução

A sensibilidade/tolerância à dessecação, em sementes de diferentes espécies é variável, podendo ser considerada a existência de um contínuo de tolerância, onde em um extremo temos as sementes extremamente tolerantes, ou ortodoxas, enquanto em outro, as extremamente sensíveis, ou recalcitrantes (FARRANT et al., 1996). A presença de sensibilidade à dessecação impõe um sério problema ao armazenamento em longo prazo, já que o alto teor de água nas sementes, durante o armazenamento, acelera os processos naturais de degeneração dos sistemas biológicos, de maneira que, sob esta condição, as sementes perdem rapidamente o vigor e a capacidade germinativa (ALMEIDA; MORAES, 1997).

As respostas envolvidas na tolerância à dessecação estão interligadas, tornando difícil traçar uma demarcação clara entre elas. A base molecular deste mecanismo é complexa e, ainda, não há clareza sobre como estes mecanismos podem variar entre espécies e diferentes tecidos. Entretanto, hoje observa-se que há uma forte correlação entre os mecanismos de proteção ativados, durante a desidratação, tais como acúmulo de proteínas, açúcares não redutores, sacarose e enzimas removedoras de radicais livres (BERJAK, 2006).

Verifica-se que o grupo das proteínas resistentes ao calor (PRCs) desempenha um papel fundamental na modulação da resposta das plantas ao estresse. Uma das funções das proteínas de choque térmico, inclusas no referido grupo, está relacionada à prevenção da desnaturação de outras proteínas durante a desidratação celular (NEPOMUCENO et al., 2002; EFEOGLU, 2009). Algumas famílias funcionam ligando-se às regiões não dobradas das cadeias peptídicas, podendo ser correlacionadas com a manutenção da correta estrutura terciária das mesmas (COOPER, 1997; NEPOMUCENO et al., 2002). Assim, como o estresse promove a desnaturação e a agregação de proteínas, uma maior

síntese de PRCs ajudaria a proteger essas proteínas durante o estresse osmótico que ocorre após a desidratação da célula (ZHU; WA; BRESSAN, 1997).

Foi sugerido, também, que a perda de viabilidade, durante a secagem de diversas sementes sensíveis à dessecação, é acompanhada por um acúmulo de radicais livres, tóxicos às células (LEPRINCE; BRONCHART; DELTOUR, 1990). Portanto, um tipo de proteção importante que ocorre nas sementes é a exercida por sistemas antioxidantes contra a ação de radicais livres e, embora ainda hoje não haja consenso com relação ao sistema de ativação e supressão contra radicais livres, durante a hidratação, a importância destas enzimas é incontestável. A redução na atividade das mesmas aumenta a sensibilidade das sementes a estresses oxidativos e pode-se afirmar que superóxido dismutase, catalase e peroxidase compõem o principal sistema enzimático contra radicais livres (BERJAK, 2006).

Outro importante aspecto que pode concorrer para redução da capacidade germinativa e consequente aumento, parcial ou total, na mortalidade das sementes, são os possíveis danos estruturais decorrentes da retirada de água. Walters et al. (2000) consideraram que, para tolerar a desidratação, a semente necessita de diferentes sistemas de proteção a cada nível de remoção de água e, dessa forma, teria seu grau de tolerância condicionado ao tipo de água removida em cada etapa e a presença desses sistemas, já que a dessecação causa diversos estresses subcelulares e as plantas respondem a eles de forma variada, dependem do tecido ou órgão considerado e de características adaptativas (PEÑA-VALDIVIA et al., 2010).

Baseando-se no fato de que sementes ortodoxas perdem, progressivamente, a tolerância à dessecação, tornando-se comparáveis às recalcitrantes, Sun, Koh e Ong (1997) sugeriram o uso deste grupo de sementes como sistema modelo para estudo da recalcitrância. As evidências são de que muito dos processos que ocorrem durante a perda da tolerância à dessecação em

sementes ortodoxas germinadas são similares àqueles responsáveis pela sensibilidade à dessecação em recalcitrantes.

Assim, objetivou-se nesta pesquisa determinar mudanças no padrão eletroforético da enzima removedora de radicais livres catalase e de proteínas resistentes ao calor em células radiculares de *Peltophorum dubium* durante a embebição e consequente perda da tolerância à dessecação. Foram avaliadas, também, mudanças anatômicas em células do eixo embrionário de sementes embebidas e, posteriormente, submetidas a diferentes níveis de secagem.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Material vegetal**

Frutos maduros de *Peltophorum dubium* foram coletados no Campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, sendo as sementes beneficiadas, manualmente, com a quebra dos frutos e uso de peneiras para separação das mesmas. Após este processo, a retirada de impurezas presentes na amostra foi realizada com sopradores tipo South Dakota e General.

### **2.2 Germinação**

O tratamento pré-germinativo utilizado para quebra de dormência tegumentar foi realizado por meio de imersão das sementes em água quente (96°C) e deixadas em repouso na mesma água, fora do aquecimento, por 24 horas (OLIVEIRA; DAVIDE; CARVALHO, 2003; GUIMARÃES et al., 2011). Após a quebra de dormência tegumentar, 4 repetições de 25 sementes foram postas para germinar sobre papel (PEREZ; FANTI; CASALI, 1999), umedecido com água destilada até a saturação (BRASIL, 1992), em placas de petri e germinadores (Marconi tipo MA 400) a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. A germinação foi avaliada durante 20 dias.

### **2.3 Curva de embebição**

A umidade inicial foi determinada pelo método de estufa a  $103 \pm 3^\circ\text{C}$ , por 17 horas (BRASIL, 1992), com 4 repetições de 10 sementes cada. O cálculo foi feito na base úmida, sendo o grau de umidade expresso em porcentagem.

Para avaliar o padrão de embebição de água pelas sementes, as curvas foram elaboradas, utilizando-se 2 repetições com 10 sementes cada, sendo cada uma delas pesada individualmente para determinação da evolução da hidratação. Foram consideradas sementes com e sem quebra de dormência, para comparação do padrão de embebição em ambos os casos e a quebra de dormência foi realizada em água fervente, para amolecimento do tegumento, porém as sementes não foram deixadas em repouso em água por 24 horas.

Posteriormente ao referido tratamento, as sementes foram colocadas para embeber em bandejas plásticas tendo como substrato duas folhas de papel mata borrão saturado com água destilada e acondicionado em germinadores regulados a 25°C e fotoperíodo 12 horas. A cada 3 horas, estas eram removidas dos recipientes e pesadas em balança, precisão de 0,01g, durante 3 dias, período este em que se verifica a protrusão radicular da maior parte das sementes em estudo. Para as amostras, onde não foi realizada quebra de dormência tegumentar, as pesagens foram realizadas a cada 24 horas, durante 3 dias. As duas repetições foram pesadas, simultaneamente, ao longo do dia, inferindo-se os dados coletados de uma das repetições aos pesos que seriam coletados durante a madrugada.

#### **2.4 Caracterização da perda da tolerância à dessecação durante a embebição**

Para caracterização da perda da tolerância à dessecação, durante a germinação, foram amostradas 100 sementes divididas em quatro repetições de 25 sementes, para cada um dos seguintes tratamentos, fundamentados na observação do padrão de absorção de água desta espécie: 9h, 18h, 39h, 57h e 72h de embebição.

Após a quebra de dormência, a hidratação foi conduzida em placas de petri, contendo papel de filtro (Germitest), até que fossem atingidos os períodos de hidratação pré-determinados.

A desidratação foi feita em caixas acrílicas tipo gerbox, vedadas com filme plástico, colocando-se as sementes sobre um telado, tendo uma camada de 100 g de sílica gel ao fundo, a 20°C. O período necessário para que sementes desta espécie atinjam o grau de umidade inicial (7%) é de 24 horas (GUIMARÃES et al., 2011). Porém, estas foram mantidas na referida condição, durante 72 horas, com o intuito de manter as sementes em situação prolongada de estresse.

Após a desidratação, as sementes foram pré-umedecidas em ar úmido (100% UR) por 24 horas, a 25°C, para prevenir danos causados pela embebição (Crowe et al., 1989). Em seguida, foram colocadas sobre papel de filtro saturado com água, em placas de petri e mantidas em germinadores (Marconi tipo MA 400) a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. As sementes que formaram plântulas normais foram consideradas tolerantes à dessecação (TD).

## **2.5 Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor (PRCs) ao longo da germinação**

A determinação do padrão eletroforético de proteínas foi amostrada em cada ponto de interesse, pré-determinado em virtude dos resultados obtidos nos ensaios de caracterização da perda da tolerância à dessecação durante a germinação. Os pontos selecionados foram 0h (controle), 39h, 57h e 72h de embebição e as extrações foram realizadas em três repetições biológicas de 25 pontas de raiz primária por tratamento.

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 MgCl<sub>2</sub>; 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 minutos a 4 °C e o sobrenadante recolhido para novos tubos, que foram colocados em banho-maria por 15 minutos a 85 °C.

Em seguida, as referidas amostras foram novamente centrifugadas, conforme descrito anteriormente e 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 minutos e 50 µL da amostra aplicados em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). Foi realizada a corrida eletroforética, a 150 V por 5 h e a coloração do gel feita, utilizando-se solução de 0,05% Coomassie Brilhante Blue R 250 por 12 h com solução de ácido acético para descoloração. Avaliou-se a imagem do gel com auxílio do scanner Umax (modelo PowerLook 1120).

## **2.6 Atividade de enzimas removedoras de radicais livres**

As atividades das enzimas catalase, peroxidase e superóxido dismutase foram verificadas utilizando-se 100 mg de eixo embrionário de sementes durante o processo de embebição, nos pontos descritos a seguir: 0h (controle), 39h, 57h e 72h.

Os referidos eixos foram macerados com 2,5 vezes o seu peso de tampão de extração (Tris-HCl 0,2M + 0,001% de β-mercaptoetanol pH 8), tampão fosfato (0,034M de fosfato de sódio bi-básico; 0,2M de sacarose; 2,56% de PVP40; 3M de DTT; 5,7mM ácido ascórbico; 2,5mM de borato de sódio; 1%

de PEG 6000, 0,002% de  $\beta$ -mercaptoetanol) e 2g do antioxidante PVP 40 (polivinilpirrolidone). O tampão fosfato foi utilizado somente para a extração da enzima peroxidase.

Após a maceração e adição do tampão de extração, as amostras foram deixadas a uma temperatura de 4°C por uma noite e então centrifugadas a 16.000 xg por 30 minutos a 4 °C, sendo, em seguida, aplicados 100  $\mu$ L do sobrenadante de cada amostra em gel de poli(acrilamida 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador); o tampão de corrida utilizado foi Tris-glicina pH 8,9 e a corrida eletroforética realizada a 4 °C por quatro horas a uma voltagem de 150V, após a qual, os géis foram revelados para os sistemas enzimáticos peroxidase (PO-EC 1.11.1.7), seguindo as prescrições de Tanksley (1983), e para os sistemas superóxido dismutase (SOD-EC 1.15.1.1) e catalase (CAT-EC 1.11.1.6), seguindo as prescrições de Alfenas (1998). A avaliação dos géis foi realizada, visualmente, com utilização de transluminador, sendo considerada a intensidade das bandas.

### **2.7 Comportamento de sementes embebidas de *Peltophorum dubium* submetidas a diferentes níveis de secagem.**

Para este ensaio, sementes de *Peltophorum dubium* foram embebidas por 72 horas, momento em que é detectada a perda da TD (GUIMARÃES et al., 2011) e amostradas, selecionando-se apenas aquelas que não apresentavam germinação visível, em quatro repetições de 20 para cada um dos seguintes tratamentos: secagem a 60%, 50%, 40%, 30%, 20% e 10% de umidade da semente.

Para alcançar os referidos graus de umidade, a desidratação foi feita em caixas plásticas tipo gerbox, vedadas com filme plástico, com as sementes sobre um telado e uma camada contendo 100 g de sílica gel ao fundo, a 20 °C no

escuro. Durante a desidratação pesagens sucessivas foram realizadas até que o peso desejado fosse alcançado, correspondente ao grau de umidade desejado, por meio da expressão proposta por Cromarty, Ellis e Roberts (1985).

Após a desidratação, as sementes foram pré-umedecidas em ar úmido (100% UR) por 24 horas a 25 °C, no intuito de prevenir possíveis danos causados pela rápida embebição (CROWE; CROWE; HOEKSTRA, 1989) e, posteriormente, colocadas de volta nas mesmas condições usadas para germinação. As sementes que germinaram e formaram plântulas normais foram consideradas tolerantes à remoção do percentual de água pré-determinado. Os tratamentos mais interessantes foram amostrados para análise por microscopia.

## **2.8 Análise de danos por secagem através da microscopia de luz**

Para detecção de danos por secagem por meio da análise estrutural, amostras de radículas foram coletadas ao longo da secagem, em estágios pré-determinados, em virtude dos resultados coletados e descritos no item anterior. Os pontos selecionados foram 59%, 30% e 8% de conteúdo de água, os cortes foram feitos com lâmina, a mão e transferidos para uma placa, contendo hipoclorito de sódio 1% por 20 minutos e lavados em água destilada, 3 vezes por 5 minutos. Posteriormente, os cortes foram transferidos e deixados por 40 segundos em uma placa contendo uma gota de água destilada e uma de Safrablau. Após estes procedimentos, as amostras foram lavadas novamente, dispostas em lâminas com água glicerizada e observadas em microscópio óptico de luz. A avaliação dos danos foi realizada pela detecção de alterações na parede celular.

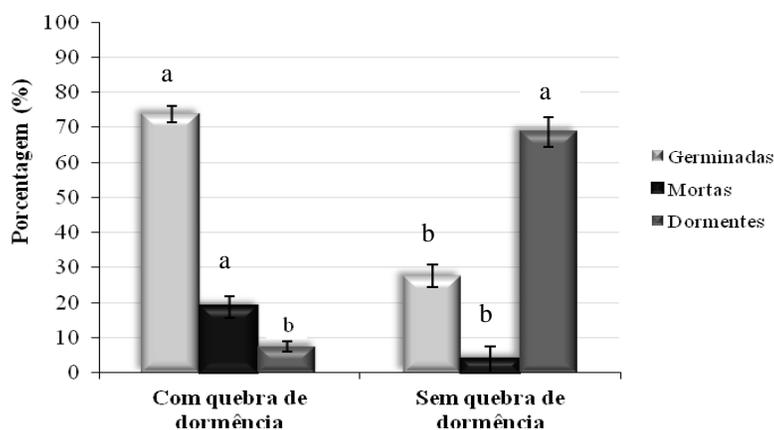
## 2.9 Análise Estatística

Os dados de germinação foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro Wilk e, quando constatada ausência de normalidade ( $p < 0,05$ ), os mesmos foram convertidos para  $\sqrt{x}$ . Dados normais (ou normalizados) foram avaliados pela análise de variância e, quando observada diferença entre os tratamentos pelo teste F, foi realizado teste de comparação de médias de Scott-Knott ou Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados não normalizados, mesmo após a conversão, foram analisados por meio de modelos lineares generalizados (GLM) e, quando verificada diferença entre os tratamentos pelo teste Chisq, realizou-se o teste de Scott-Knott.

### 3. Resultados e Discussão

No intuito de caracterizar o lote de sementes de *Peltophorum dubium*, estas foram avaliadas quanto à porcentagem de sementes germinadas, mortas e dormentes, quando realizado ou não o tratamento pré - germinativo para superação da dormência. Este consistiu em imersão em água quente (96°C), sendo as sementes, posteriormente, deixadas em repouso na mesma água por 24 horas (OLIVEIRA; DAVIDE; CARVALHO, 2003; GUIMARÃES et al., 2011).

Foram consideradas germinadas ou plântulas normais aquelas com sistema radicular desenvolvido e primeiro par de folhas visível; plântulas anormais, quando germinaram e não formaram plântulas normais; dormentes as que não germinaram nem deterioraram até o final do teste, permanecendo intactas; e mortas as sementes que não germinaram, não permaneceram duras e mostraram-se amolecidas e/ou atacadas por microorganismos. Os resultados estão apresentados na figura 1 e mostram a eficiência do tratamento pré - germinativo em sementes desta espécie.



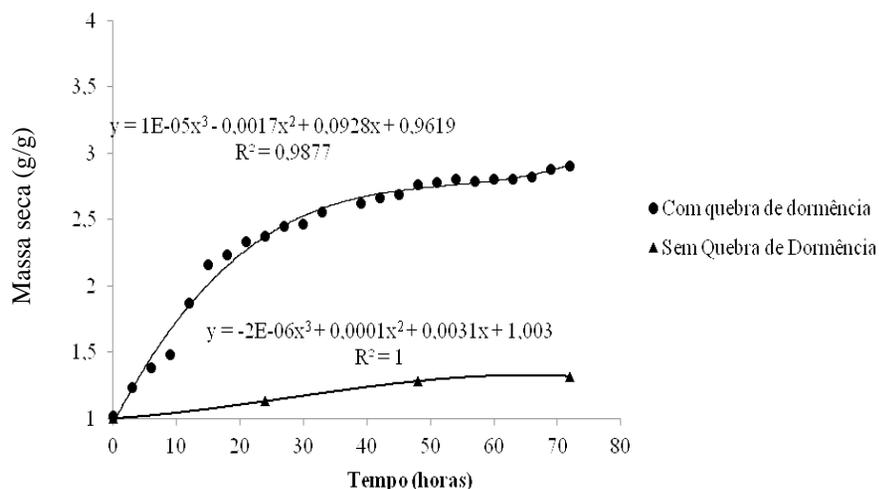
**Figura 1.** Porcentagem de germinação de sementes de *Peltophorum dubium* submetidas ou não ao tratamento pré-germinativo de quebra de dormência.

Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Houve baixa germinação das sementes que não passaram por tratamento para superação da dormência (30%) e aumento da germinação para 74%, quando da imersão destas em água, valores estes que diferiram, estatisticamente, entre si. Observa-se que a impermeabilidade tegumentar é o mecanismo de dormência mais comum entre as leguminosas e caracteriza-se pela dificuldade de absorção de água pela semente, o que a impede de iniciar a hidratação e, conseqüentemente, restringe os processos físicos e as reações metabólicas básicas da germinação (BORGES et al., 2004). Sendo assim, é necessário o emprego de técnicas, variáveis entre diferentes espécies, apropriadas para superação desta condição.

Diferentes métodos para superação da dormência, como escarificação mecânica e química (SALERNO; SCHALLENBERGER; STUKER, 1996; PIROLI et al., 2005) podem ser utilizados com eficiência para sementes de *Peltophorum dubium*. Entretanto o alto percentual germinativo e a praticidade do uso da imersão em água quente, quando há necessidade de emprego em larga escala, justificam a utilização desta técnica para este trabalho.

Quando sementes quiescentes são hidratadas, os processos preparatórios para germinação são iniciados e na figura 2 pode ser observado o padrão de absorção de água pelas sementes de *Peltophorum dubium* no qual se verificou clara distinção entre as curvas de embebição obtidas com base em sementes intactas e daquelas obtidas após o tratamento pré-germinativo.



**Figura 2.** Curva de embebição de sementes de *Pelthoporum dubium*, com e sem tratamento pré-germinativo, a 25° C e fotoperíodo de 12 horas. Quando realizada a superação da dormência tegumentar, a protrusão radicular acontece após 72 horas de embebição.

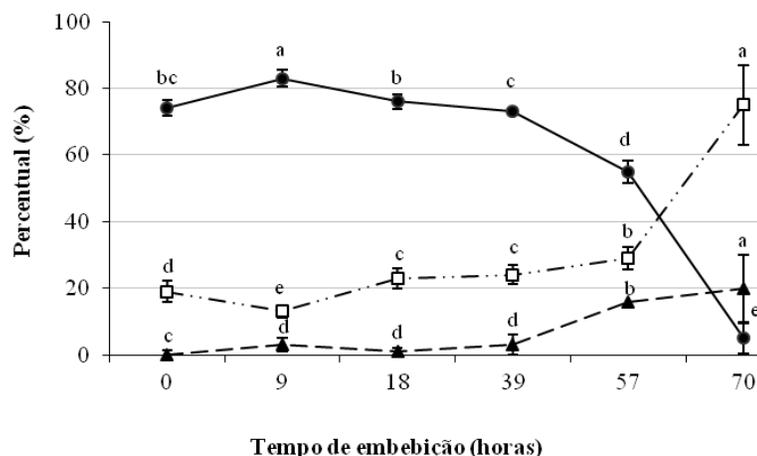
A quantidade de água absorvida pela semente, durante a germinação, depende de características da própria semente, como composição química, teor de umidade inicial e constituição do tegumento e de fatores ambientais. Entretanto, para grande parte das espécies estudadas, o processo de embebição segue um padrão trifásico em que a fase inicial, ou fase I, é caracterizada pela rápida absorção da água, ocorrendo tanto em sementes viáveis como inviáveis, em consequência da diferença do potencial hídrico existente entre a semente e o substrato. Nesta fase observam-se os primeiros sinais da reativação do metabolismo, ocorrendo o aumento da atividade respiratória, a ativação de enzimas e a síntese de proteínas considerando o RNAm armazenado ao final do processo de maturação. A fase II é a mais longa do processo, quando a semente

praticamente não absorve água e na qual ocorre a preparação para germinação, por meio da degradação das substâncias de reserva, gerando energia para a retomada do crescimento do embrião. Já a fase III é marcada pela retomada do crescimento da radícula e caracterizada pelos processos de alongação e divisão celular (BEWLEY; BLACK, 1994).

Para sementes de *Peltophorum dubium* intactas, o incremento nos valores de massa seca foi muito pequeno nas 72 horas de embebição e, como citado anteriormente, esse fato está relacionado à dormência imposta pelo tegumento que impede, ou dificulta, a absorção de água pelas sementes.

Com relação às sementes submetidas à quebra de dormência, houve incremento intenso de massa seca nas primeiras 20 horas de embebição. Como amplamente descrito para Fase I, foi observado aumento significativo da massa seca de sementes de *Peltophorum dubium* durante as primeiras 15 horas do início da absorção, reduzindo e estabilizando estes valores durante as próximas 55 horas, caracterizando a fase II. As sementes de *Peltophorum dubium* iniciaram a fase III do processo de germinação após 72 horas de embebição, quando foi observada a protrusão radicular.

Com base nestes resultados, foram selecionados diferentes tempos de embebição para avaliação da perda da tolerância à dessecação, durante a germinação, sendo eles: 9, 18, 39, 57 e 72 horas. O percentual de sobrevivência, mortalidade e plântulas anormais estão dispostos na figura 3 e pode-se afirmar que há uma correlação inversa entre os diferentes tempos de embebição e a sobrevivência de sementes de *Peltophorum dubium*, quando embebidas, secas em sílica gel e reidratadas.



**Figura 3.** Perda da tolerância à dessecação em sementes de *Peltophorum dubium*, submetidas a diferentes períodos de embebição e posterior desidratação em sílica gel e reidratação. Plântulas normais (●), Sementes mortas (□) e Plântulas anormais (▲).

Médias seguidas da mesma letra, dentro de cada parâmetro avaliado, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

**Nota-se** que sementes ortodoxas adquirem tolerância à dessecação durante o desenvolvimento e que esta capacidade diminui, em geral, com o decorrer das fases I e II de embebição, sendo totalmente perdida na fase III (BEWLEY; BLACK, 1994). Esta afirmação ratifica os resultados obtidos no presente trabalho, pois a secagem ao teor de água inicial após 9, 18 e 39 horas de embebição pouco reduziu a porcentagem de formação de plântulas normais, que se manteve em torno de 75%. Conforme pode ser observado na figura 2, os referidos tempos abrangem a fase I e parte da fase II de embebição.

Já após 57 horas de embebição (correspondente a metade da fase II), a porcentagem de germinação caiu, significativamente, para 55% e houve

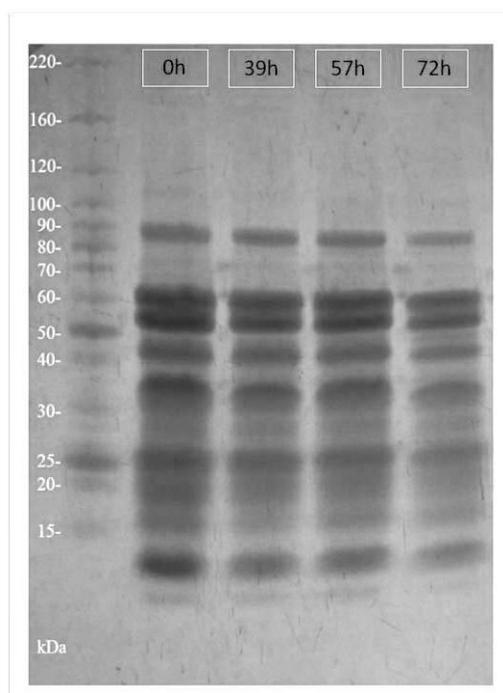
aumento na porcentagem de sementes mortas (29%) e de plântulas anormais (16%). Para sementes embebidas por 72 horas, momento da protrusão radicular, foi constatada sobrevivência praticamente nula (5%). Mediante estudos são mostrados que, uma vez alcançada a protrusão radicular, as sementes ortodoxas perdem rapidamente sua tolerância à desidratação (Leprince et al., 1994), pois a protrusão da raiz primária marca um “ponto sem retorno” para a semente, que se encontra envolvida com a germinação e com o desenvolvimento da plântula (CASTRO; BRADFORD; HILHORST, 2004).

Com base nos resultados da perda da tolerância à dessecação e a conseqüente mortalidade das sementes, foram selecionados tempos de embebição correspondentes aos tempos 0h, 39h, 57h e 72h, para avaliação do padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor e atividade do sistema antioxidante da enzima catalase.

Um dos mecanismos mais estudados, na adaptação dos organismos à condição de estresse, é a indução das chamadas proteínas resistentes ao calor (PRC), que incluem várias famílias de proteínas conservadas, como as proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) e HSP (Heat-Shock Proteins).

Observa-se que, durante a maturação das sementes, ocorrem mudanças na natureza das proteínas sintetizadas e a dessecação natural de sementes em desenvolvimento é caracterizada pelo acúmulo de um grupo particular de mRNAs e proteínas LEA relacionadas. Os mRNAs de proteínas LEA aparecem em tecidos embrionários, no começo da dessecação e tornam-se as mais prevalentes no estado seco, declinando, progressivamente, várias horas após embebição da semente (BAKER et al., 1988; GALAU, JAKOBSEN; HUGHES, 1991). Estas proteínas, também, acumulam-se em outras partes da planta, quando sujeitas à perda de água ou outros tipos de estresses ambientais, como também em resposta ao ácido abscísico.

Em sementes de *Peltophorum dubium* o perfil eletroforético apresentado na Figura 4 revela a presença de proteínas resistentes ao calor com forte intensidade das bandas nas sementes secas. Padrões como esse são observados em sementes ortodoxas e/ou intermediárias, durante as fases finais do desenvolvimento, sendo frequentemente associados à aquisição de tolerância à dessecação. Resultados semelhantes foram encontrados, por exemplo, para sementes de *Zea mays* (BOSTOCK; QUATRANO apud LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993), *Coffea arabica* (GUIMARÃES et al., 2002) e *Anadenanthera pavonina* (SOARES, 2012). Em estudo com sementes recalcitrantes da espécie *Cryptocarya aschersoniana*, Tonetti (2013) constatou-se que, no momento da dispersão, as proteínas de choque térmico estão praticamente ausentes e, à medida que a semente é submetida à dessecação, a síntese das mesmas é intensificada, indicando que, com o início da secagem, algum sistema de proteção é ativado.



**Figura 4.** Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor extraídas de radículas de sementes de *Peltophorum dubium* ao longo da embebição (0h, 39h, 57h e 72h).

O aumento da sensibilidade à dessecação em sementes de *Peltophorum dubium* coincidiu com a redução dos níveis de todos os grupos de PRC. Em estudo com sementes de *Anadenanthera pavonina* (SOARES, 2012), *Sesbania virgata* (COSTA, 2012) e *Medicago truncatula* (BOUDET, 2006) foi evidente a similar redução na intensidade das bandas com o decorrer do processo de embebição e perda da tolerância à dessecação, fornecendo subsídios para a hipótese de que estas proteínas estão envolvidas neste processo. Tem sido observado, também, incremento na quantidade de HSP durante o condicionamento fisiológico de sementes (RAJJOU; DEBEAUJON, 2008; VARIER; VARI; DADLANI, 2010). Foi sugerido que a função destas pode

estar relacionada com a manutenção da correta estrutura terciária de certas proteínas (COOPER, 1997). Assim, como o estresse promove a desnaturação e a agregação de proteínas, uma maior síntese de HSP, por exemplo, ajudaria a proteger essas proteínas, durante o estresse osmótico, que ocorre após a desidratação da célula (ZHU; HASEGAWA; BRESSAN, 1997).

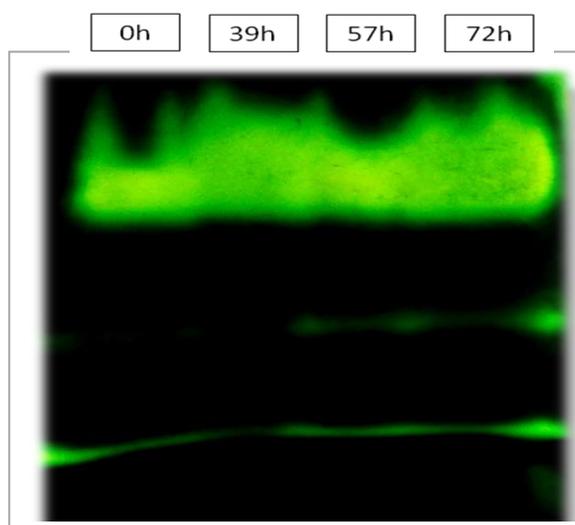
A redução na disponibilidade das PRCs, após 72 horas de embebição, momento no qual é detectada a perda da tolerância à dessecação para esta espécie, pode ter contribuído para incapacidade das sementes em estudo tolerarem a desidratação e os danos causados pela secagem. Verifica-se que as propriedades da superfície das moléculas, especialmente das proteínas, são modificadas pela quantidade de água associada e as modificações na atividade metabólica da semente, em resposta a variações do teor de água, parecem estar associadas a alterações discretas nas propriedades físicas da água (MARCOS FILHO, 2005; VERTUCCI; FARRANT, 1995).

Diversos autores verificaram que a aplicação de tratamentos, após o condicionamento, por exemplo, incubação em altas temperaturas, tratamentos com ácido abscísico, tipo de secagem, dentre outros, podem induzir à síntese de proteínas de choque térmico e LEAs (BUTLER et al., 2009; GURUSINGHE; POWELL; BRADFORD, 2002). Dessa forma, estudos desta natureza são de suma importância para incrementar o vigor e reduzir o ritmo da queda da longevidade das sementes durante o armazenamento.

Outra consequência descrita durante a dessecação é que esta induz o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), dentre elas os chamados radicais livres (LEPRINCE et al., 1994; NTULI et al., 2011), considerados tóxicos às células e capazes de danificar constituintes celulares, por meio da despolimerização de ácidos nucleicos, desnaturação de proteínas e peroxidação dos lipídios da membrana plasmática (KRANNER et al., 2010). Segundo Contreras-Porcía et al. (2011), a tolerância à retirada de água pode ser

relacionada, ao menos em parte, à habilidade de as sementes eliminarem o excesso destas espécies reativas de oxigênio. Isto ocorre pela ação de enzimas que integram o chamado sistema de defesa antioxidativo, conhecido como enzimas removedoras de radicais livres, como a superóxido dismutase, catalase e as peroxidases (SPANÒ et al., 2011; GILL; TUTEJA, 2010; PAMMENTER; BERJAK, 1999).

Para sementes de *Peltophorum dubium*, o referido sistema antioxidante foi avaliado por meio da ação da enzima catalase. Vale ressaltar que não foi possível a extração das enzimas superóxido dismutase e peroxidase. Os protocolos aplicados e as alterações feitas nos mesmos não foram eficientes para avaliação do padrão enzimático destas. Os resultados da atividade da catalase (CAT) encontram-se na Figura 5.



**Figura 5.** Atividade da enzima antioxidante catalase em radículas de sementes de *Peltophorum dubium* embebidas por 39, 57 e 72 horas.

A intensidade da banda visualizada para o controle (0 hora) foi, consideravelmente, menor em relação aos demais tempos de embebição, mostrando-se constante posteriormente. Chen e Arora (2011) comentam que a atividade do sistema antioxidante pode ser reduzida nos estágios iniciais da germinação e, segundo Bailly (2004), com a hidratação da semente e início dos processos preparatórios, para a germinação, há acréscimo da atividade respiratória intensificando a produção de radicais livres.

Os organismos têm vários mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos que podem reduzir estresse oxidativo por remover espécies nocivas de oxigênio. Dentre estas defesas, é conhecida a ação da enzima CAT, que converte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a oxigênio e água. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode facilmente se difundir pelo sistema biológico de membranas podendo, portanto, causar estresse oxidativo fora do local de formação. Apesar de o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ser um oxidante relativamente estável e não altamente reativo, algumas biomoléculas, como determinadas proteínas, são diretamente sensíveis ao mesmo (SCANDALIOS; GUAN; POLIDOROS, 1997).

As catalases podem ser divididas em três classes: catalases da classe 1 removem o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido durante a fotorespiração em tecidos fotossintéticos; catalases da classe 2 são produzidas em tecidos vasculares e podem exercer uma função de lignificação, mas sua exata função biológica permanece desconhecida; e na classe 3 estão as catalases presentes, abundantemente, em sementes e plantas jovens, e cuja atividade está relacionada à remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

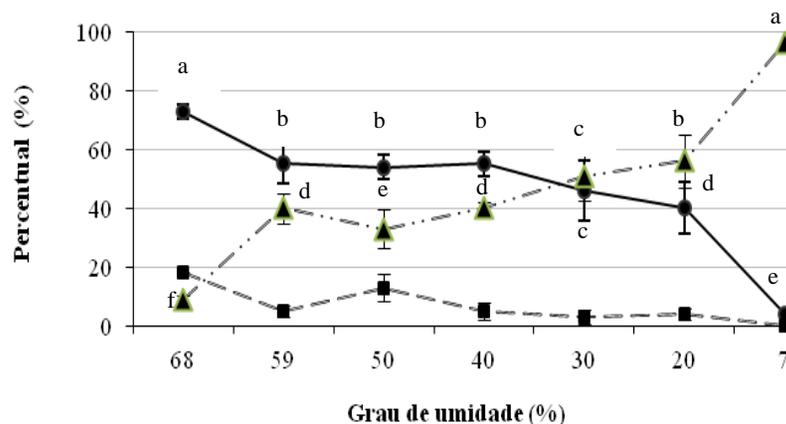
Embora o acréscimo na atividade desta enzima seja frequentemente correlacionado com a capacidade das sementes minimizarem danos causados pela dessecação, para *Pelthoporum dubium*, o referido aumento não foi suficiente para manter a TD em sementes desta espécie.

Foi descrita a incapacidade dos tecidos das sementes sensíveis à dessecação efetuarem a adequada proteção contra eventos oxidativos, consequentes do metabolismo desorganizado existente durante a desidratação e o armazenamento (LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993). Entretanto, nota-se, também, que, para a manutenção dos níveis das EROs nas células, é necessário que um conjunto de enzimas, como superóxido dismutase, peroxidase e catalase, atuem de forma conjunta e integrada (MITTLER, 2002). Assim, o conhecimento de possíveis falhas nas demais enzimas que compõem o sistema antioxidante das células pode fornecer informações mais precisas no que se refere à ação destas e manutenção da tolerância à dessecação em sementes de *Peltophorum dubium*.

Walters et al. (2000) consideraram que, para tolerar a desidratação, a semente necessita de diferentes sistemas de proteção a cada nível de remoção de água e, dessa forma, teria seu grau de tolerância condicionado ao tipo de água removida em cada etapa e a presença desses sistemas, já que a dessecação causa diversos estresses subcelulares e as plantas respondem a eles de forma variada, dependente do tecido ou órgão considerado e de características adaptativas (PEÑA-VALDIVIA et al., 2010).

Exemplos dessas perturbações é o estresse mecânico, associado ao dobramento da parede celular em resposta à redução do volume; o estresse oxidativo, em virtude da 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 et al., 1996).

A secagem gradual das sementes embebidas reduziu a capacidade das mesmas de formarem plântulas normais após a reidratação (Figura 6).



**Figura 6.** Comportamento de sementes de *Peltophorum dubium* embebidas por 72 horas e submetidas a diferentes níveis de secagem em sílica gel por 72 horas, seguidos por reidratação. Sementes que retomaram o crescimento e originaram plântulas normais (●); sementes que não retomaram o crescimento (▲) e sementes que retomaram o crescimento, mas originaram plântulas anormais (■).

Médias seguidas da mesma letra, dentro de cada parâmetro avaliado, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Quando embebidas por 72 horas as sementes de *Peltophorum dubium* atingem 68% de teor de água e, após a remoção de água até 40%, foi observado um decréscimo de, aproximadamente, 20% na sobrevivência das mesmas. Esta corresponde à água tipo 5, superior a 41%, que apresenta características de uma solução diluída, não se liga às macromoléculas e pode ser considerada água livre (VILLELA; MARCOS FILHO, 1998). Embora a remoção deste tipo de água, considerada não fundamental até mesmo para sementes recalcitrantes (CASTRO; BRADFORD; HILHORST, 2004), tenha ocasionado queda na porcentagem de

sobrevivência, um alto percentual de sementes, 55%, foi capaz de retomar o crescimento e originar plântulas normais.

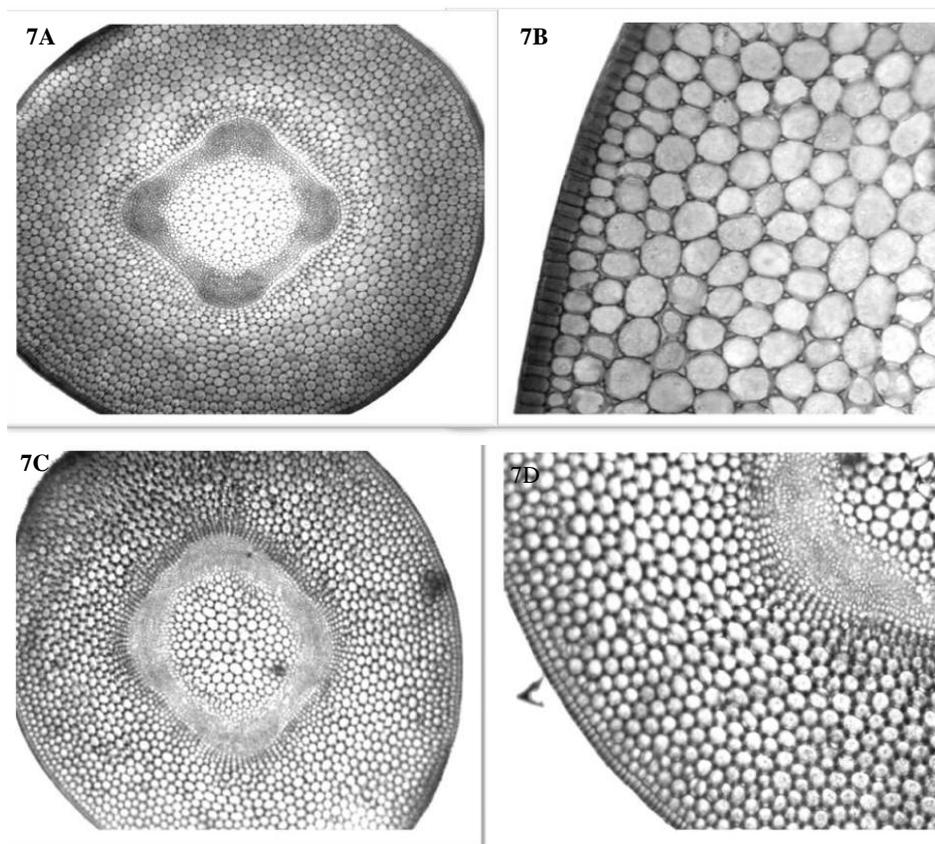
Verifica-se que a essência da tolerância à dessecação se manifesta por meio da habilidade em promover a reversão de efeitos baseada na reidratação da semente (MARCOS FILHO, 2005) e, para sementes da espécie em estudo, foi observado um decréscimo nesta capacidade durante as secagens a 30% e 20% de água. Quando secas ao grau de umidade inicial, 7%, a capacidade de sobrevivência foi completamente perdida já que a secagens a estes níveis promoveram 95% de mortalidade.

É notório que diferentes estruturas da semente não perdem a tolerância à dessecação simultaneamente, sendo observada maior sensibilidade na região da raiz primária como já descrito em outros trabalhos (REISDORPH; KOSTER, 1999; FARIA et al., 2005). Portanto, eixos embrionários são seguramente utilizados como modelo experimental, para avaliação de alterações ocorridas durante a perda da TD (DELTOUR; BARSY, 1985; FARIA et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2011) e neste estudo, para detecção de danos por secagem por análise estrutural, amostras de radículas de *Peltophorum dubium* foram coletadas ao longo da secagem em estágios pré-determinados em virtude dos resultados obtidos e descritos no item anterior. Os pontos selecionados foram controle (ou seja, sementes embebidas por 72 horas, mas não submetidas à secagem), 59%, 20% e 8% de conteúdo de água.

Danos estruturais podem concorrer para redução da capacidade germinativa e conseqüente aumento na mortalidade das sementes. As análises microscópicas, efetuadas em eixos embrionários de sementes de *Peltophorum dubium* precedidas, ou não, de secagem, elucidam que a transição do estágio de tolerância para sensibilidade à dessecação foi acompanhada por mudanças na configuração da membrana plasmática. A integridade da referida membrana é essencial para manutenção da viabilidade de sementes. A mesma mantém a

integridade celular e delimita a fronteira entre os meios intracelular e extracelular, constituindo uma barreira seletiva, por meio da qual se processam trocas de substâncias e energia entre a célula e o meio exterior. A membrana celular funciona, também, como um sensor, permitindo à célula modificar-se em resposta a diversos estímulos ambientais. Entretanto, com a secagem, estas sofrem um processo de desorganização estrutural, estando tanto mais desorganizadas, quanto menor for o grau de umidade das sementes e, conseqüentemente, verifica-se um grau maior de lixiviação de eletrólitos do interior das células para o meio externo, descontrole de trocas hídricas e completa descompartimentalização celular (BEWLEY; BLACK, 1985; CORRÊA; AFONSO JÚNIOR, 1999; SANTOS; FERREIRA; ÁQUILA, 2004).

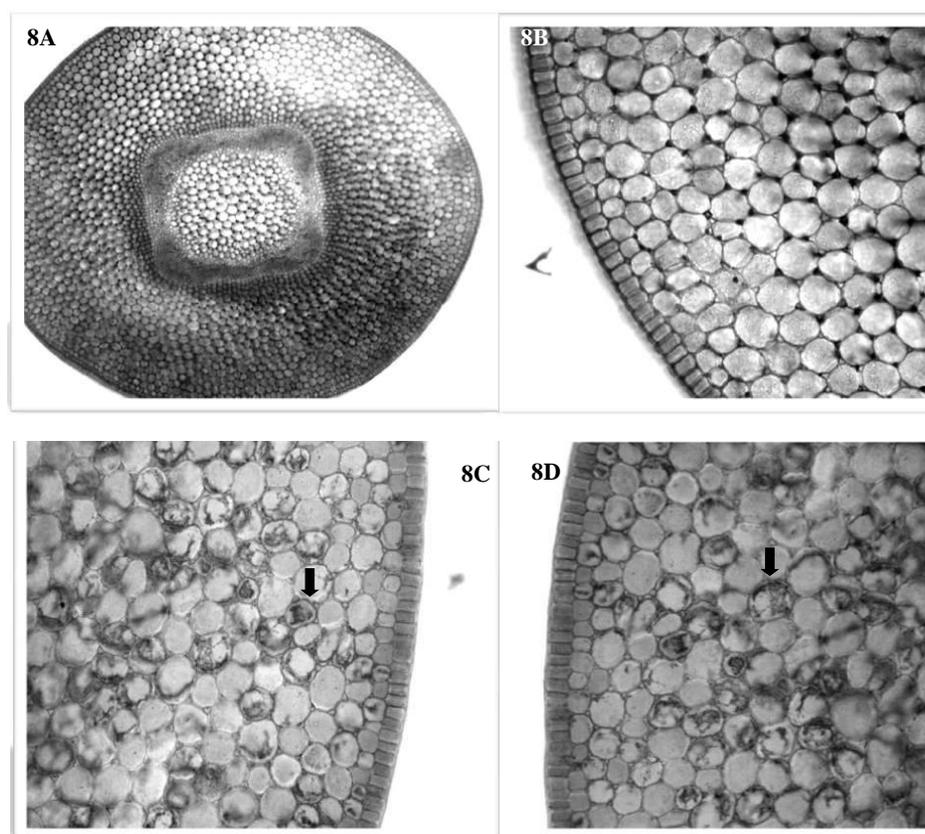
As figuras 7A, 7B, 7C e 7D mostram imagens referentes ao controle e a sementes embebidas por 72 horas, precedidas por secagem a 60% de teor de água, respectivamente. Para ambos os casos não foram verificadas alterações morfológicas, que indica a manutenção de sua integridade. Embora tenha havido redução de 15% na sobrevivência de sementes embebidas e precedidas de secagem a 60% de umidade, não se pode atribuir essa redução a alterações nas membranas celulares.



**Figura 7.** Aspecto celular, observado por meio da microscopia de luz, de eixos embrionários de sementes de *Peltophorum dubium* submetidas a diferentes níveis de desidratação. 7A e 7B: sementes embebidas por 72 horas; 7C e 7D: sementes embebidas por 72 horas e secas a 60% de umidade.

Quando sementes embebidas por 72 horas foram secas a 20% e a 8% de umidade, as referidas alterações foram detectadas (Figura 8A, 8B, 8C e 8D) e corroboram com os resultados fisiológicos obtidos. A desidratação tem dois efeitos principais nas membranas (BLACK; PRITCHARD, 2002): 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 compartimentalização. O segundo, indireto e irreversível, refere-se 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 fosfolipídios sob condições de severa dessecação.



**Figura 8.** Radículas de sementes de *Peltophorum dubium* embebidas por 72 horas, submetidas à secagem e analisadas por meio da microscopia de luz. 8A e 8B: secagem a 20% de umidade. 8C e 8D: secagem a 8% de umidade; teor de água este em que foi observado 100% de mortalidade das sementes.

Para sementes secas a 20% de teor de água, pequenas alterações foram observadas nas membranas celulares. Estas se mostraram ligeiramente onduladas (figura 8B), o que é considerado um indicativo de início dos danos por secagem. Entretanto, esta pequena mudança na configuração da membrana não necessariamente resulta em perda completa da viabilidade podendo ser considerado, conforme citado anteriormente e descrito por Black e Pritchard (2002), como um dano reversível. Esta afirmação ratifica a sobrevivência de 40% das sementes de *Peltophorum dubium*, quando secas ao grau de umidade mencionado acima.

Para aquelas embebidas e desidratadas a 7% de umidade, a secagem levou à desestruturação irreversível das membranas e total mortalidade. Verificou-se, também, aglutinação de compostos, indicados pela seta nas figuras 8C e 8D, em grande parte das células, que pode ter acontecido em decorrência do vazamento do conteúdo de organelas celulares. Quando os mecanismos de proteção não conseguem fornecer o suporte necessário, os primeiros danos que ocorrem são alterações estruturais (BERJACK; PAMMENTER, 2000), que podem levar à redução da qualidade fisiológica das sementes ou à perda da viabilidade (LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993), conforme confirmado neste estudo.

#### 4. Conclusões

- ✓ Sementes de *Pelthophorum dubium* tornam-se sensíveis à dessecação durante o processo germinativo, com quase nulidade da sobrevivência após 72 horas de embebição, quando ocorre a protrusão radicular.
- ✓ A redução na expressão de proteínas resistentes ao calor (PRCs) correlaciona-se à perda da tolerância à dessecação.
- ✓ A atividade da enzima CAT aumentou com o avanço da embebição, não sendo suficiente, entretanto, para manter a TD durante a germinação.
- ✓ Os danos em membranas celulares de eixos embrionários de sementes de *Pelthophorum dubium* foram evidentes, com o uso da microscopia de luz, quando estas foram submetidas à secagem a níveis inferiores a 20% de teor de água.

## 5. Referências Bibliográficas

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de izoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: Editora da UFV, 1998.

ALMEIDA, F. A. C.; MORAIS, J. S. Efeito do beneficiamento, tipo de embalagem e ambiente de armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de amendoim. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 22, n. 2, p. 27-33, 1997.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 14, n. 2, p. 93-107, May 2004.

BAKER, D. et al. Reconstitution of SEC gene product-dependent intercompartmental protein transport. **Cell**, Cambridge, v. 54, n. 3, p. 335-344, 1988.

BERJACK, P.; PAMMANTER, N. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, nesp., p. 22-55, 2000.

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

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

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1985.

BIANCHETTI, A.; RAMOS, A. Comparação de tratamentos para superar a dormência de sementes de canafístula *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 4, p. 91-99, 1982.

BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. **Desiccation and survival in plants: drying without drying**. Wallingford: CABI, 2002.

BLACKMAN, S. A. et al. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n. 3, p. 868-874, July 1991.

BORGES, E. E. L. et al. Alterações fisiológicas em sementes de *Tachigalia multijuga* (Benth.) (mamoneira) relacionadas aos métodos para a superação da dormência. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 3, p. 317-325, maio/jun. 2004.

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**, Washington, v. 140, n. 4, p. 1418–1436, Aug. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNAD, 1992.

BUTLER, L. H., F. R. et al. Priming and re-drying improve the survival of mature seeds of *Digitalis purpurea* during storage. **Annals of Botany**, London, v. 103, n. 8, p. 1261-1270, June 2009.

CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 51-67.

CHEN, K.; ARORA, R. Dynamics of the antioxidant system during seed. osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). **Plant Science**, Shannon, v. 180, n. 2, p. 212-220, Feb. 2011.

CONTRERAS-PORCIA, L. et al. Identification of copper-induced genes in the marine alga *Ulva compressa* (Chlorophyta). **Marine Biotechnology**, New York, v. 13, n. 3, p. 544–556, June 2011.

COOPER, G. M. **The cell: a molecular approach**. Washington: ASM Press, 1997.

CORRÊA, P. C.; AFONSO JÚNIOR, P. C. Uso do teste de condutividade elétrica na avaliação dos danos provocados por diferentes taxas de secagem em sementes de feijão. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 1, n. 1, p. 21-26. 1999.

COSTA, M. C. D. **Armazenamento de plântulas de *Sesbania virgata***. 2012. 78 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

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

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; HOEKSTRA, F. A. Phase transitions and permeability changes in dry membranes during rehydration. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 21, n. 1, p. 77-91, Feb. 1989.

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

EFEOGLU, B. Heat shock proteins and heat shock response in plants. **G. U. Journal of Science**, Turkey, v. 22, n. 2, p. 67-75, 2009.

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, June 2005.

FARRANT, J. M. et al. Presence of dehydrin-like proteins and levels of abscisic acid in recalcitrant (desiccation sensitive) seeds may be related to habitat. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 6, n. 4, p. 175-182, Dec. 1996.

GALAU, G. A.; JAKOBSEN, K. S.; HUGHES, D. W. The control of overall expression in the embryo is reduced due to the late dicot embryogenesis and early germination. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, n. 81, p. 280-288, 1991.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 12, p. 909-930, Dec. 2010.

GUIMARÃES, C. C. et al. Avaliação da perda da tolerância à dessecação e da quantidade de DNA nuclear em sementes de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert durante e após a germinação. **Revista Brasileira de Sementes, Londrina**, v. 33, n. 2, p. 207-215, 2011.

GUIMARÃES, R. M. et al. Tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro (*coffea arabica* l.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 1, p. 128-139, jan./fev. 2002.

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

HENDRY, G. A. F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 3, n. 3, p. 141- 153, Sept. 1993.

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, Cambridge, v. 188, n. 3, p. 655-673, 2010.

LEPRINCE, O. et al. The involvement of respiration in free radical processes during loss of desiccation tolerance in germinating *Zea mays* L. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, n. 4, p. 1333-1339, Apr. 1994.

LEPRINCE, O.; BRONCHART, R.; DELTOUR, R. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea Mays* L.). **New Phytologist**, Cambridge, v. 116, p. 573-580, 1990.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 3, n. 3, p. 231-246, Sept. 1993.

LEVITT, J. Responses of plants to environmental stress. In: LEVITT, J. **Water, radiation, salt, and other stresses: volume 2**. New York: Academic Press, 1980. p. 240-287.

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

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405-409, Sept. 2002.

NEPOMUCENO, A. L. et al. Expression of heat shock protein and trehalose-6-phosphate synthase homologues induced during water deficit in cotton. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 14, n. 1, p. 11-20, Jan./Apr. 2002.

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 Biology**, Victoria, v. 53, n. 4, p. 270-280, Apr. 2011.

OLIVEIRA, L. M.; DAVIDE, A. C.; CARVALHO, M. L. M. Avaliação de métodos para quebra de dormência e para desinfecção de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 5, p. 1-8, 2003.

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

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, n. 4, p. 417-427, 2010.

PEREZ, S. C. J. G. A.; FANTI, S. C.; CASALI, C. A. Influência do armazenamento, substrato, envelhecimento precoce e profundidade de semeadura na germinação de canafístula. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 1, p. 57-68, 1999.

PIROLI, E. L. et al. Germinação de sementes de canafístula *Peltophorum dubium* (Spreng.) taub. tratadas para superação da dormência. **Colloquium Agrariae**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 13-18, set. 2005.

PITMAN, W. D. et al. Histological differences in moisture-stressed and nonstressed kleingrass forage. **Crop Science**, Madison, v. 23, p. 793-795, 1983.

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

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

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p.123-130, mar./abr. 2003.

SALERNO, A. R.; SCHALLENBERGER, T. C. H.; STUKER, H. Quebra da dormência em sementes de Canafístula. **Agropecuária Catarinense**, Santa Catarina, v. 9, n. 1, p. 9-11. 1996.

SANTOS, C. M. R.; FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Características de frutos e germinação de sementes de seis espécies de Myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 14, n. 3, p. 13-20, 2004.

SCANDALIOS, J. G.; GUAN, L.; POLIDOROS, A. Catalase in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. In: SCANDALIOS, J. G. (Ed.). **Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses**. Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. p. 343–406.

SOARES, G. C. M. S. **Perda da tolerância à dessecação em sementes de tento-carolina (*Adenantha pavonina* L.) durante a germinação**. 2012. 49 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

SPANÒ, C. et al. Responses to desiccation injury in developing wheat embryos from naturally and artificially dried grains. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 49, n. 4, p. 363-367, Apr. 2011.

SUN, W. Q.; KOH, D. C. K.; ONG, C. M. Correlation of modified water sorption properties with the decline of storage stability of osmotically-primed seeds of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 7, n. 4, p. 391-397, Dec. 1997.

TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. **Isozymes: developments in plant genetic and breeding**. New York: Elsevier, 1983.

TONETTI, O. A. O. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de *Cryptocarya aschersoniana* submetidas à secagem e ao armazenamento**. 2013. 89 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

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

VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. **Acquisition and loss of desiccation tolerance**. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 237-271.

VILLELA, F. A.; MARCOS FILHO, J. Estados energéticos e tipos de água na semente. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.20, n.2, p.317-321, 1998.

WALTERS, C. et al. Levels of recalcitrance in seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, nesp., p. 7-21, 2000.

ZHU, J.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Molecular aspects of osmotic stress in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 253-277, 1997.

## ARTIGO 2

### **Expressão de genes e variações de carboidratos solúveis durante a embebição e reindução da tolerância a dessecação em sementes de *Peltophorum dubium***

#### RESUMO

Um grande obstáculo enfrentado no estudo da recalcitrância é justamente o fato das sementes inclusas neste grupo perderem a viabilidade em curto período. A fim de contornar este entrave nas pesquisas, estresses moderados como secagem, tratamento osmótico, incubação em ácido abscísico e ou choque térmico, têm sido utilizados no intuito de restabelecer a tolerância à dessecação em sementes germinadas, facilitando estudos desta natureza. Neste trabalho foram quantificadas as alterações de carboidratos solúveis (glicose, estaquiase, rafinose, sacarose, frutose e trealose) e de expressão gênica, por meio da técnica de PCR em Tempo Real, durante o processo germinativo e de reindução da tolerância à dessecação em sementes de *Peltophorum dubium*. Os tempos de embebição utilizados foram 0h (controle), 39h, 57h e 72h, pré-determinados em virtude dos resultados obtidos nos ensaios de caracterização da perda da tolerância à dessecação durante a germinação. Já na tentativa de reinduzir a tolerância à dessecação foram testadas diferentes combinações de protocolos, sendo considerado como mais adequado a incubação das sementes germinadas em ABA 5  $\mu$ M, a 4°C, durante 3 dias. Durante o processo germinativo e consequente perda progressiva da tolerância à dessecação, foi observado um decréscimo nos valores dos açúcares rafinose, estaquiase e trealose, mostrando provável correlação com a tolerância à dessecação. Entretanto, o tratamento de reindução da tolerância à dessecação não foi capaz de alterar estes valores. Ambos os genes analisados nesta pesquisa, sendo eles MEDTR4G093060\_1 e MEDTR3G072000\_1 (descritos para proteínas de choque térmico e para enzima removedora de radicais livres superóxido dismutase, respectivamente) não evidenciaram alteração durante o processo germinativo. Porém, houve incremento significativo na expressão de ambos após o tratamento para reindução da tolerância à dessecação, indicando, assim, que estresses moderados podem acionar mecanismos de defesa nas plantas e que estes genes podem estar envolvidos com os mecanismos de tolerância à dessecação.

**Palavras-chave:** Reindução da tolerância à dessecação. Expressão gênica. Carboidratos solúveis. *Peltophorum dubium*.

## ARTICLE 2

### **Gene expression and changes in soluble carbohydrates during imbibition and re-induction of desiccation tolerance in *Peltophorum dubium* seeds**

#### ABSTRACT

The biggest obstacle faced in the study of recalcitrance is the fact that in this group seeds lose viability within a short period. In order to overcome this obstacle in the research, moderate stress as drying, osmotic treatment, incubation in abscisic acid, temperature shock, have been used in order to restore the desiccation tolerance in germinated seeds, facilitating studies of this nature. In this work we quantified the changes of soluble carbohydrates (glucose, stachyose, raffinose, sucrose, fructose and trehalose) and gene expression by PCR in Real Time during the germination process and re-induction of desiccation tolerance in *Peltophorum dubium* seeds. To the imbibition times were used 3h (control), 39h, 57h and 72h, determined based of the results obtained in the tests about characterization of the loss of desiccation tolerance during germination. Already in an attempt to reinduce tolerance to desiccation were tested different combinations of protocols, being considered as most appropriate incubation of seeds germinated in 5 mM ABA at 4 ° C for 3 days. During the germination process, and consequent progressive loss of desiccation tolerance was observed a decrease in the amounts of sugars raffinose, stachyose and trehalose, showing probable correlation with desiccation tolerance. However, treatment re- induction of desiccation tolerance was not able to alter these values. Two of the three genes examined in this study, namely MEDTR4G093060\_1 and MEDTR3G072000\_1 (described for heat shock protein and free radical remover enzyme superoxide dismutase, respectively) showed no change during germination, but there was significant increase in expression after treatment of both for re-induction of desiccation tolerance, thus indicating that moderate stress can trigger defense mechanisms in plants and that these genes may be involved in the mechanisms of desiccation tolerance .

**Keywords:** Reinduction of desiccation tolerance. Genes expression. Soluble carbohydrates. *Peltophorum dubium*.

## 1. Introdução

Durante o desenvolvimento das sementes vários eventos acontecem, dentre eles a aquisição da tolerância à desidratação (BEWLEY; BLACK, 1994). Diversas mudanças bioquímicas adaptativas ocorrem nas células das sementes para prepará-las para tolerar a perda de água de seus tecidos e, segundo Berjak, Dini e Pammenter (1984), é provável que um mecanismo genético atue no sentido de controlar o processo de tolerância à desidratação durante a maturação de sementes ortodoxas, as quais parecem ter suas origens em locais sujeitos à seca, que nem sempre são propícios à germinação. Porém, em sementes recalcitrantes, que tendem a ser originadas de locais úmidos, e, portanto, adequados ao processo germinativo continuamente, este mecanismo genético pode não estar presente, e caso esteja, não é funcional.

Em sementes ortodoxas, a sobrevivência à dessecação é adquirida durante a fase de acúmulo de reservas (KERMODE, 1990; PAMMENTER; BERJAK, 1999) e, aparentemente, os carboidratos solúveis estão diretamente relacionados com esse processo, principalmente, durante a maturação e o armazenamento das sementes (OBENDORF, 1997). Durante a desidratação, açúcares específicos podem prevenir os efeitos danosos da dessecação sobre as membranas formando ligações de hidrogênio e substituindo a água (PAMMENTER; BERJAK, 1999). Em 1986, uma abordagem foi introduzida por Burke para o entendimento dos efeitos da alta concentração de açúcares no interior das células, baseado na vitrificação. O aumento da viscosidade, decorrente da retirada de água, e consequente concentração dos açúcares, previnem a desnaturação e difusão de moléculas diminuindo a probabilidade de reações químicas.

Açúcares, também, podem interagir com as proteínas, evitando a mudança de sua conformação e, conseqüentemente, de sua função (LEPRINCE;

HENDRY; MCKERSIE, 1993). Estas proteínas são produzidas tanto por partes vegetativas das plantas submetidas a estresse como por sementes ortodoxas, durante a secagem de maturação, sendo associadas a diversas macromoléculas, evitando a desnaturação (PAMMENTER; BERJAK, 1999; BERJAK; PAMMENTER, 2008). Tecidos tolerantes têm sido caracterizados por apresentarem alta quantidade de sacarose e oligossacarídeos e ausência, ou reduzida quantidade de monossacarídeos redutores, como a galactose, manose, frutose e glicose (CHEN; BURRIS, 1990; LEPRINCE et al., 1995; KUO; VANMIDDLESWORTH; WOLF, 1998).

A compreensão dos mecanismos necessários para a tolerância à dessecação e suas redes de regulação pode ser aprimorado na busca de genes candidatos para melhorar a tolerância das sementes ao estado seco (RAMANJULU; BARTELS, 2002). Possivelmente, a identificação destes genes e seus produtos podem trazer novas ideias para traçar estratégias de produção sob estresses abióticos e destacar supostos centros envolvidos na regulação da sobrevivência de sementes no estado seco (MAIA et al., 2011). A expressão destes em genótipos tolerantes à dessecação pode, também, ser usada no estudo de mecanismos de tolerância à dessecação e para identificar outros genótipos com características similares, ou não. Diversos genes já foram identificados mostrando relação com a tolerância à dessecação, codificando moléculas importantes neste processo, como proteínas LEA, enzimas que atuam na degradação de açúcares ou antioxidantes (INGRAM; BARTELS, 1996), como *LEC1*, *LEC2*, *ABI3*, dentre outros (BÄUMLEIN et al., 1994; HARADA, 2001; PARCY et al., 1994).

Os produtos dos genes envolvidos na resposta ao estresse funcionam como osmoprotetores, detoxificantes celulares, proteínas de sinalização de estresse e de regulação transcricional, sendo classificados em dois grupos: o primeiro grupo inclui as proteínas funcionais, ou seja, que protegem diretamente

contra a dessecação, como proteínas de choque térmico e o segundo grupo estaria envolvido nos mecanismos de sinalização e regulação da expressão gênica muito bem representado por fatores de transcrição (BRAY, 2004).

Pesquisadores já demonstraram a possibilidade de aumentar tolerância à salinidade, resistência ao stress osmótico e oxidativo em plantas transformadas sendo, portanto, possível usar o poder combinado entre fisiologia vegetal, genômica e engenharia genética para avançar no sentido de desvendar a natureza complexa da tolerância a dessecação em sementes (MAIA, 2009). dados não publicados).

Observa-se que estudos, utilizando sementes sensíveis à dessecação, encontram diversos obstáculos, como a perda rápida da viabilidade no armazenamento. Em 1995, Bruggink e Van der Toorn demonstraram ser possível restaurar a tolerância à dessecação em sementes ortodoxas germinadas de *Cucumis sativus* e *Impatiens walleriana* e sugeriram que esta abordagem poderia servir como um sistema modelo adequado e confiável em estudos desta natureza. A técnica foi aplicada, com sucesso, para outras espécies, como *Medicago Truncatula* (BUITINK et al., 2003; BUITINK et al., 2006; FARIA et al., 2005), *Sesbania virgata* (MASETTO, 2008), *Tabebuia impetiginosa* (VIEIRA et al., 2010) e *Arabidopsis thaliana* (MAIA et al., 2011) por meio da aplicação de ácido abscísico exógeno e/ou de estresse osmótico moderado.

O aumento do conhecimento científico é em grande parte em razão do uso de organismos e sistemas modelo. Entretanto, similar importância deve ser dada aos estudos em espécies arbóreas nativas e/ou menos conhecidas, tais como a espécie tropical, *Peltophorum dubium*, utilizada neste estudo, a fim de exportar e ampliar o conhecimento dos complexos mecanismos envolvidos da tolerância à dessecação, também, em espécies selvagens.

Neste estudo foram quantificadas as alterações de carboidratos solúveis (glicose, estaquiase, rafinose, sacarose, frutose e trealose), durante o processo

germinativo e reindução da tolerância à dessecação, com vistas a relacionar essas variações com a sensibilidade/tolerância à dessecação. Foram utilizados, também, dados de expressão gênica, já disponíveis para a leguminosa *Medicago truncatula*, na tentativa de identificar genes compartilhados por esta e pela espécie alvo deste estudo (*Peltophorum dubium*) nos estádios de perda e reindução da tolerância à dessecação.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Material vegetal**

Frutos maduros de *Peltophorum dubium* foram coletados no Campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, sendo as sementes beneficiadas manualmente, com a quebra dos frutos e uso de peneiras para separação das mesmas. Após este processo, a retirada de impurezas presentes na amostra foi realizada com sopradores tipo South Dakota e General.

### **2.2 Germinação**

O tratamento pré-germinativo utilizado para quebra de dormência tegumentar foi realizado por meio de imersão das sementes em água quente (96°C) e deixadas em repouso na mesma água, fora do aquecimento, por 24 horas (OLIVEIRA; DAVIDE; CARVALHO, 2003; GUIMARÃES et al., 2011). Após a quebra de dormência tegumentar, 4 repetições de 25 sementes foram postas para germinar sobre papel (PEREZ; FANTI; CASALI, 1999), umedecido com água destilada até a saturação (BRASIL, 1992), em placas de petri e germinadores (Marconi tipo MA 400) a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. A avaliação foi realizada durante 20 dias.

### **2.3 Reindução da tolerância à dessecação**

Na tentativa de reinduzir a tolerância à dessecação em sementes de *Peltophorum dubium*, estas foram colocadas nas mesmas condições descritas no item 2.2 e amostradas após 72 horas de embebição, momento em que é detectada a perda da TD (GUIMARÃES et al, 2011).

Foram testados protocolos com diferentes concentrações de ácido abscísico (ABA 1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M e 50 $\mu$ M) e/ou polietileno glicol (PEG 1,7MPa), combinados em duas temperaturas (4°C ou 20°C) no escuro. Após o período mencionado acima, as sementes foram retiradas, lavadas em água corrente para a remoção dos resíduos de solução e secas sobre papel toalha, até que o excesso de água fosse eliminado. Posteriormente, a secagem foi realizada em dessecador, contendo uma camada de sílica gel ao fundo (8 % umidade relativa - UR) ou soluções saturadas de cloreto de lítio (LiCl; 12,5 % UR) e cloreto de cálcio (CaCl; 32 % UR), a 20°C. As soluções salinas, utilizadas para secagem, foram preparadas dissolvendo-se o sal específico em água, em quantidade suficiente para alcançar a saturação. A saturação foi confirmada pela formação de cristais no fundo dos recipientes.

Para os ensaios com sementes após 72 horas de embebição, foram utilizadas 4 repetições com 10 sementes cada e as combinações de métodos testados estão detalhados a seguir: ABA 1 $\mu$ M (20°C) e secagem em sílica gel; ABA 5 $\mu$ M (20°C) e secagem em sílica gel; ABA 50 $\mu$ M (20°C) e secagem em sílica gel; ABA 1 $\mu$ M + PEG 1,7 Mpa (20°C) e secagem em sílica gel; ABA 5 $\mu$ M + PEG 1,7 Mpa (20°C) e secagem em sílica gel; ABA 50 $\mu$ M + PEG 1,7 Mpa (20°C) e secagem em sílica gel; ABA 1 $\mu$ M (4°C) e secagem em sílica gel; ABA 5 $\mu$ M (4°C) e secagem em sílica gel; ABA 50 $\mu$ M (4°C) e secagem em sílica gel; ABA 1 $\mu$ M (20°C) e secagem em CaCl; ABA 5 $\mu$ M (20°C) e secagem em CaCl; ABA 50 $\mu$ M (20°C) e secagem CaCl; ABA 1 $\mu$ M (4°C) e secagem CaCl; ABA 1 $\mu$ M (20°C) e secagem em LiCl; ABA 5 $\mu$ M (20°C) e secagem em LiCl; ABA 50 $\mu$ M (20°C) e secagem LiCl. O tempo de incubação em ABA e de secagem, foi de 3 dias para ambos.

Após as referidas combinações de tratamentos de pré-secagem e desidratação, as sementes foram pré-umedecidas em ar úmido (100 % UR) por 24 horas a 25°C para prevenir danos causados pela embebição (CROWE;

CROWE; HOEKSTRA, 1989). A análise de sobrevivência foi realizada considerando as sementes que retomaram o crescimento e produziram plântulas normais.

#### 2.4 Estudo da expressão gênica durante a germinação e reindução da tolerância à dessecação

Para estes estudos foram selecionados genes com alteração na expressão de transcritos no estado sensível e tolerante à dessecação, dentre outros genes já descritos na literatura, totalizando, aproximadamente, 3 diferentes sequências similares, para confecção de primers degenerados. Os referidos genes selecionados foram aqueles descritos para proteínas resistentes ao calor (HSP e LEA) e enzimas removedoras de radicais livres (catalase e superóxido dismutase) conforme Tabela 1.

**Tabela 1.** Genes de interesse selecionados com base no aumento da expressão de transcritos no estado sensível e tolerante à dessecação, em sementes de *Medicago truncatula* para posterior averiguação de homologia em sementes de *Peltophorum dubium*, durante diferentes tempos de embebição e reindução da tolerância à dessecação.

<b>Proteínas Abundantes na Embriogênese Tardia (LEA)</b>	
<b>prob_id</b>	<b>seq_id</b>
Medtr_v1_016403	MEDTR3G034660_1
Medtr_v1_045826	MEDTR7G093170_1
Medtr_v1_020579	MEDTR3G117190_1
Medtr_v1_026336	MEDTR4G098480_1
TC87025	

TC86014	
<b>Enzima Superóxido Dismutase</b>	
<b>prob_id</b>	<b>seq_id</b>
Medtr_v1_017781	MEDTR3G072000_1
Medtr_v1_038925	MEDTR6G029200_1
Medtr_v1_046781	MEDTR7G113110_1
Medtr_v1_024973	MEDTR4G073040_1
<b>Enzima Catalase</b>	
	<b>seq_id</b>
Medtr_v1_038925	MEDTR6G029200_1
CAT1	CAT1
CAT2	CAT2
CAT3	CAT3
<b>Proteínas de Choque Térmico (HSP)</b>	
<b>prob_id</b>	<b>seq_id</b>
Medtr_v1_035086	MEDTR5G081530_1
Medtr_v1_027908	MEDTR4G130540_1
Medtr_v1_026081	MEDTR4G093060_1
TC85567	
<b>Outros</b>	
ABI3	
CDC2-like	
ACT2	

As sequências dos genes foram obtidas em bancos de dados específicos para *Medicago truncatula* (no caso, [www.genomeedu/blast/medicago.blast.htm](http://www.genomeedu/blast/medicago.blast.htm). e [www.jcvi.org/cgin/medicago/overview.cgi](http://www.jcvi.org/cgin/medicago/overview.cgi)) e, com base em regiões

conservadas entre esta espécie e outras, como *Glycine Max*, *Arabidopsis thaliana* e *Lotus japonicus*, encontradas no site do National Center for Biotechnology Information (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2013). Os primers degenerados foram desenhados com o auxílio do software Bibiserv Genefisher2 ([http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/cgi-bin/genefisher2\\_submit](http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/cgi-bin/genefisher2_submit)).

Foram selecionados apenas aqueles primers resultantes em amplicons com mais de 100pb e com temperaturas médias de hibridização em torno de 60 °C.

A avaliação da expressão de genes relacionados à tolerância à dessecação foi realizada, por meio de análise da abundância relativa de transcritos (RNA), para as quais foram amostradas 3 repetições de 10 eixos embrionários da espécie em estudo, para cada ponto definido como de interesse, sendo eles: 0h (controle), 39h, 72h e para o ponto no qual foi possível restabelecer a TD. Estes foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e mantidos em ultra- freezer (-80 °C) até o momento da extração.

Para a purificação do RNA, as amostras foram maceradas em dismembrador (Mo Bio 96 Well Plate Shaker/MM 400), foi utilizado o método do borato quente (WAN; WILKINS, 1994) e a qualidade do RNA obtido avaliada por eletroforese em gel de agarose, sendo, também, realizada a quantificação em espectrofotômetro. A extração de RNA foi feita com base em 3 repetições biológicas.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o *kit* IScript (Bio Rad, Hercules, CA, USA) e com o cDNA obtido foi feito o PCR convencional. Dos 21 genes testados, houve amplificação para 11 deles. Os produtos de PCR (fragmentos de DNA) obtidos foram separados em gel, por meio de eletroforese, isolados e purificados, com auxílio do kit Qiaquick Gel Extraction e clonados

em *pGEM-T Easy vector*. O uso dos kits seguiu as recomendações dos fabricantes.

Os produtos clonados foram enviados para sequenciamento na empresa Macrogen, em Amsterdam - The Netherlands (MACROGEN, 2013) e, de posse das referidas sequências, foram realizadas comparações pelo banco de sequências Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) disponível no site do National Center for Biotechnology Information (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2013). Aqueles fragmentos que apresentaram alto grau de homologia com genes descritos para *M. truncatula*, e outras espécies foram usados para a confecção de *primers* específicos, visando à próxima etapa da pesquisa, ou seja, o estudo da expressão gênica. Esta análise foi realizada utilizando-se a metodologia de RT-PCR quantitativo (PCR em tempo real) e para as reações foi utilizado o Kit Sybr Green (Invitrogen). As condições de reações seguiram as recomendações do fabricante.

Todos os primers foram, inicialmente, testados via RT-PCR, a especificidade da amplificação foi verificada pela análise das curvas de dissociação pelo software Bio-Rad IQ5 e a eficiência dos mesmos avaliada com auxílio do programa LinRegPCR, que possibilita o cálculo de um fator de normalização ao longo de vários genes de referência e melhora a precisão da normalização.

Quando considerados eficientes, as mudanças na expressão dos genes em relação ao controle (sementes frescas) com auxílio do software geNorm. Os resultados foram representados em gráficos.

Os genes de referência, utilizados para normalização dos dados obtidos na análise de expressão gênica, foram selecionados com base em revisão de literatura e optou-se por aqueles genes considerados estáveis, durante o desenvolvimento e germinação já descritos para as espécies *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max* e *Tulipa sp.* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Genes de referência testados para sementes de *Peltophorum dubium* durante diferentes tempos de embebição e reindução da tolerância a dessecação.

<b>Genes estáveis durante a germinação em <i>Solanum lycopersicum</i> e <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	
<b>Código</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
At3g25800	Dekkers et al. 2012
At2g28390	
At1g33520	
At2g18390	
At5g25760	
At2g90208	
At4g02080	
At2g20000	
<b>Genes estáveis durante a germinação de sementes</b>	
<b>Código</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
At3g54660	Dekkers et al, 2012
At4g33250	
At4g31180	
At3g59990	
<b>Genes estáveis durante a germinação e desenvolvimento em <i>Glycine Max</i></b>	
<b>Código</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
60S	
TUB4	Li et al, 2012
EF1b	Li et al, 2012
ACT11	Li et al, 2012
18S	

UBQ10	Li et al, 2012
<b>Genes estáveis durante a germinação em <i>Tulipa sp.</i></b>	
<b>Código</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
18S	Leeggangers, M. 2012 (dados não publicados)
Fator de Elongação	
Actina	

Os genes selecionados foram avaliados por meio de PCR convencional e, de forma semelhante ao que foi feito para os genes de interesse, os produtos de PCR dos genes de referência amplificados separados em gel por eletroforese, isolados e purificados, com auxílio do kit Qiaquick Gel Extraction e clonados em *pGEM-T Easy vector*. A eficiência e estabilidade foram determinadas com auxílio dos softwares LinRegPCR e geNorm e as análises comparativas de expressão gênica entre *Peltophorum dubium* e *Medicago truncatula* realizadas no Laboratory of Plant Physiology - Wageningen University (Holanda).

### **2.5 Quantificação de carboidratos solúveis durante a embebição e reindução da tolerância à dessecação em sementes de *Peltophorum dubium***

Para os pontos definidos como pontos de interesse (3h, 39h, 57h e 72h), considerando os resultados de perda e reindução da tolerância à dessecação, a extração de açúcar foi feita utilizando 3 repetições de 20 mg de eixo embrionário de sementes da espécie em estudo.

Os referidos embriões foram removidos manualmente com auxílio de lâminas de aço, secos em liofilizador durante 48 horas, macerados com auxílio de dismembrador (Mo Bio 96 Well Plate Shaker/MM 400) e pesados. Ao

macerado foi adicionado 1 mL de metanol 80% com 400 mg/L de melezitose (padrão interno). As amostras foram incubadas a 76°C, durante 15 minutos e, posteriormente, o metanol remanescente foi evaporado em evaporador rotatório (Automatic Environmental SpeedVac System AES 1010), a 30°C, durante 3 horas, para concentração do sobrenadante. O material foi ressuspensionado em 1 mL de água miliQ e misturado em vortex, sendo considerado como extrato bruto.

Para a análise quantitativa de açúcares, obtida pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), o extrato bruto foi diluído 10 vezes em água miliQ. Estas foram realizadas em cromatógrafo Dionex modelo DX-300, utilizando coluna CarboPac PA- 1. Foi injetado um volume de 20 µL com tempo de análise de 40 minutos por amostra. Os resultados foram expressos em mg por grama de massa seca.

## **2.6 Análise Estatística**

Os dados de expressão gênica e quantificação de açúcares foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro Wilk e, quando constatada ausência de normalidade ( $p < 0,05$ ), foram convertidos para  $\sqrt{\log_{10}(x)}$ . Dados normais (ou normalizados) foram avaliados por análise de variância e quando constatada diferença entre os tratamentos pelo teste F, foi realizado teste de comparação de médias de Scott-Knott ou Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados não normalizados, mesmo após a conversão, foram analisados por meio de modelos lineares generalizados (GLM) e, quando constatada diferença entre os tratamentos pelo teste Chisq, realizou-se o teste de Scott-Knott.

Ainda para a apresentação dos dados de expressão gênica, os mesmos foram convertidos para mudança relativa e para tal adotou-se o tempo 0 (sementes sem embebição) como amostra calibradora e os demais tratamentos

foram divididos pelo valor desta, sabendo-se, assim, quantas vezes o gene aumentou ou diminuiu a expressão em relação à amostra calibradora.

### 3. Resultados e Discussão

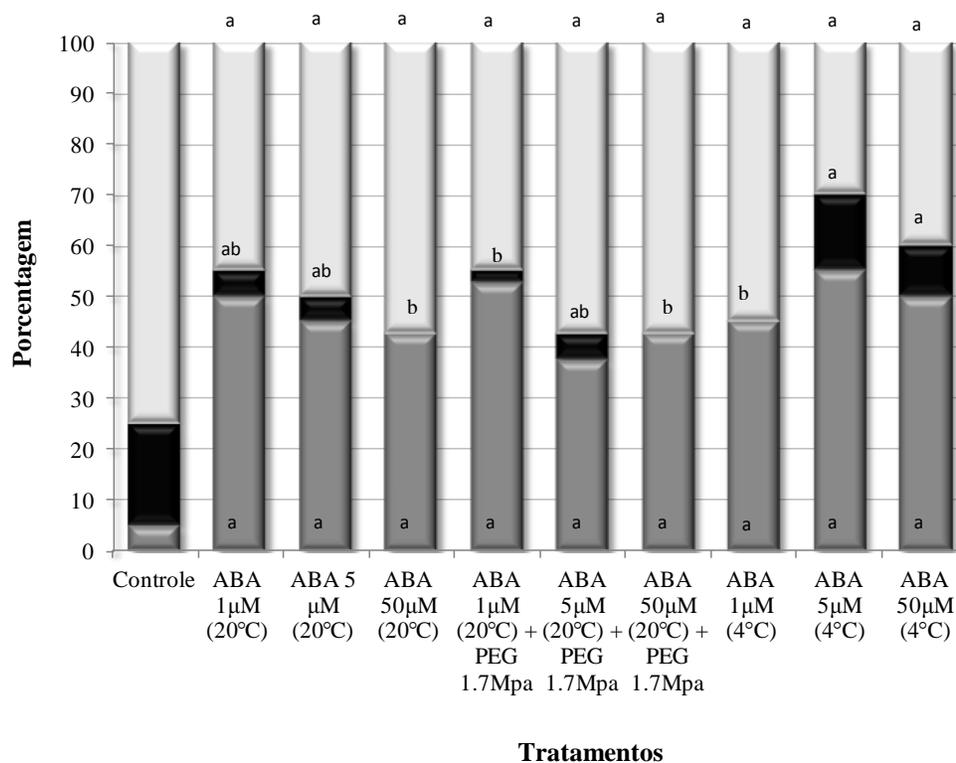
Conforme descrito no artigo anterior, em sementes de *Peltophorum dubium* embebidas por 72 horas foi constatada sobrevivência praticamente nula (5%) quando estas foram secas por 3 dias em sílica gel. Nota-se que uma vez alcançada a protrusão radicular, as sementes ortodoxas perdem rapidamente sua tolerância à desidratação (LEPRINCE et al., 1995), pois a protrusão da raiz primária marca um “ponto sem retorno” para a semente, que se encontra envolvida com a germinação e com o desenvolvimento da plântula (CASTRO; BRADFORD; HILHORST, 2004).

Entretanto, a tolerância à dessecação pode ser reestabelecida em sementes germinadas, ou em germinação, podendo servir como um modelo conveniente para estudos desta natureza (BRUGGINK; VAN DER TOORN, 1995; BUITINK et al., 2003; FARIA et al., 2005; VIEIRA et al., 2010; MAIA et al., 2011). Estes, dentre outros autores, demonstraram a exequibilidade desta técnica, com aplicação de ácido abscísico (ABA) em diferentes concentrações e/ou de estresse osmótico moderado, por exemplo, com emprego de polietileno glicol (PEG). De acordo com Buitink et al. (2003), este restabelecimento só é possível durante uma pequena janela de desenvolvimento após a germinação, pois quando as radículas crescem acima de certo comprimento, a TD pode não ser completamente readquirida. Possivelmente, a aquisição de uma maior tolerância ao estresse causado pela desidratação leve sirva para permitir que mudas se adaptem rapidamente às condições adversas durante as fases iniciais de estabelecimento, garantindo sua sobrevivência.

Além de auxiliar na compreensão dos mecanismos que regem a tolerância e sensibilidade à dessecação, estes tratamentos podem, ainda, fornecer informações sobre similares efeitos em sementes recalcitrantes recém colhidas

reduzindo, parcialmente, a sensibilidade à dessecação e/ou incrementando o tempo de armazenamento.

Com intuito de definir as condições necessárias para o restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Peltophorum dubium*, e com base nos resultados referentes à sua perda, diferentes protocolos foram testados (Figuras 1 e 2). Todos os tratamentos foram aplicados em sementes com 72 horas de embebição.



**Figura 1.** Efeito de diferentes tratamentos para reindução da tolerância à dessecação na porcentagem de sobrevivência (barra cinza clara), de plântulas anormais (barra preta) e de sementes mortas (barra branca) de *Peltophorum dubium* embebidas por 72 horas e posteriormente desidratadas em sílica gel durante 3 dias. O controle corresponde às sementes secas sem tratamento prévio. Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Pelos dados obtidos, é possível observar que todos os tratamentos utilizando somente ABA, em diversas concentrações, ou ABA + PEG (1,7Mpa), permitiram resultados positivos na reindução da tolerância à dessecação. As sementes de *Peltophorum dubium* embebidas por 72 horas, que anteriormente

não sobreviveram à secagem, quando tratadas com as soluções mencionadas no gráfico, apresentaram índices satisfatórios de tolerância à dessecação (próximos de 50%), mesmo com a redução do grau de umidade para 7%.

Tratamentos de restrição hídrica utilizando PEG e/ou PEG+ABA têm sido empregados em diversos estudos de reindução da TD em plântulas (BUITINK et al., 2003; BUITINK et al., 2006; FARIA et al., 2005; LEPRINCE et al., 1995; LEPRINCE et al., 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, que varia de acordo com a espécie.

Buitink et al. (2006) e Boudet et al. (2006), usaram o restabelecimento da TD em sementes de *Medicago truncatula*, pela indução de estresse osmótico suave (PEG, -1,5 MPa), para identificar transcriptomas e proteomas associados à TD. Em trabalho com sementes de *Arabidopsis thaliana*, Maia et al (2011) mostraram, por análise do transcriptoma, que a incubação em PEG (-2.5 MPa) reinduz os mecanismos necessários para a expressão da TD. Trabalho semelhante foi desenvolvido por Rodrigues et al. (2005) que, após restabelecer a TD em sementes germinadas de *Bauhinia forficata* demonstrou, por meio de eletromicrografias de varredura, que durante a secagem em sílica, sem incubação em PEG (-1,4MPa), ocorre perda na conformação das células, o que não acontece quando as sementes germinadas são incubadas previamente nesta solução. A utilização de diferentes concentrações de PEG, que geram potenciais osmóticos variados, pode provocar estresses moderados e gerar um estímulo positivo nas sementes.

Contudo, vale ressaltar que em trabalho anterior com sementes da espécie foco deste estudo, a incubação somente em PEG, em diversas concentrações, não foi suficiente para restabelecer a TD (GUIMARÃES, 2009. Dados não publicados). Resultado semelhante foi encontrado por Vieira et al.

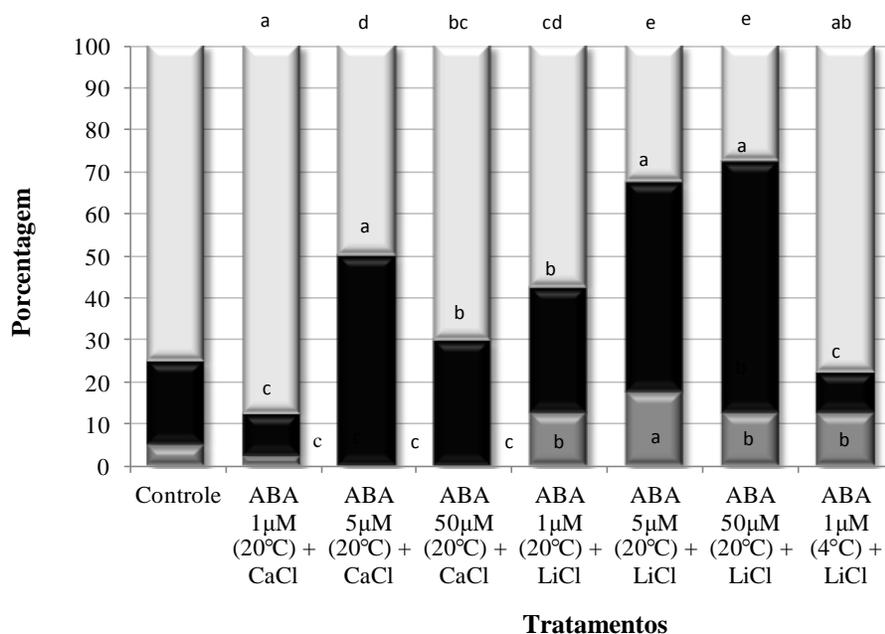
(2010), em trabalho com *Tabebuia impetiginosa*. O autor demonstrou que, após um determinado tempo de embebição, somente a aplicação de ABA + PEG surtiu efeito benéfico para reindução da TD, resultado este que não pôde ser conseguido apenas com a utilização de PEG. Portanto, o estímulo provocado com aplicação unicamente de PEG pode não ser suficiente no tratamento para algumas espécies, sendo necessária a utilização de ABA.

A percepção da influência do ABA na secagem das sementes foi anteriormente descrita quando autores relataram que sementes de mutantes deficientes ou insensíveis a este hormônio não secam na planta mãe, sendo, assim, incapazes de tolerar a secagem (KOORNEEF et al., 1989; MEURS et al., 1992). ABA pode estar presente em vários tecidos das sementes e o aumento do seu teor coincide com a fase de aquisição da tolerância à dessecação. Um exemplo prático da influência do ácido abscísico na tolerância à dessecação foi demonstrado por Lida et al. (2005), ao tratar embriões somáticos de cenoura com ABA, o que permitiu a germinação após o processo de secagem e reidratação. Quando não aplicado o regulador vegetal, os embriões não resistiram à dessecação. Há relatos, também, de que proteínas relacionadas à TD, como HSPs e LEA, respondem positivamente a este hormônio (BEWLEY et al.; 2013); que em plantas de ressurreição a aplicação de ABA exógeno induz a expressão de genes diferenciados (GAFF; OLIVER, 2013; BARTELS, 2001); e que embriões somáticos de *Medicago sativa* somente se mostraram tolerantes à dessecação e mantiveram a membrana celular íntegra quando tratados com ABA (SREEDHAR et al., 2002).

Adicionalmente, em trabalho com sementes de *Tabebuia impetiginosa*, Martins et al. (2009), demonstraram que a participação de ABA no processo de reindução da TD está relacionada, também, com a promoção da interrupção do ciclo celular. A adição de fluridona, um conhecido inibidor da ação de ABA, além de proporcionar uma redução drástica na porcentagem de reindução da TD

em plântulas da referida espécie, também, induziu à interrupção do ciclo celular em G1, e a maior proporção de células nesta fase confere maior TD, segundo Deltour e Barsy (1985) e Bino et al. (1993). O acúmulo de células em G1 pode ser entendido como um mecanismo de manutenção da TD, pois há evidências de que as células nas fases S, G2 e M são mais sensíveis a fatores estressantes e podem apresentar alterações na morfologia dos cromossomos e no padrão de divisão celular (DELTOUR; BARSY, 1985; SLIWINSKA, 2003).

Embora não tenha sido observada diferença estatística nos resultados de reindução da TD entre os tratamentos pré-secagem, no que se refere à secagem direta com utilização de sílica, cloreto de lítio (LiCl) ou cloreto de cálcio (CaCl), alterações na porcentagem de sobrevivência foram observadas (Figura 2). O uso de sílica, para este estudo considerado como a secagem mais rápida dentre os demais tratamentos, promoveu taxas de sobrevivência das radículas em torno de 50%, enquanto que quando foi utilizado LiCl ou CaCl estes valores não passaram de 15%.



**Figura 2.** Efeito de diferentes tratamentos para reindução da tolerância à dessecação na porcentagem de sobrevivência (barra cinza claro), plântulas anormais (barra preta) e de sementes mortas (barra branca) de *Peltophorum dubium* embebidas por 72 horas e posteriormente desidratadas em diferentes sais (mencionados no gráfico) durante 3 dias. O controle corresponde às sementes secas sem tratamento prévio.

Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

A velocidade de secagem influencia a resposta de sementes recalcitrantes à dessecação. Sementes ou eixos excisados que passam pelo processo de secagem rápida, utilizando sílica gel, por exemplo, podem sobreviver a baixos conteúdos de água se comparados com a secagem realizada em ambiente com elevada umidade relativa (PAMMENTER; BERJAK, 2000). Ou seja, em determinados casos, a secagem lenta pode ser mais prejudicial do

que a rápida envolvendo diferentes processos deteriorativos (BEWLEY et al., 2013). De acordo com Berjak e Pammenter (2013), o efeito da secagem rápida na facilitação da sobrevivência em maior grau de desidratação é em virtude do fato de que em sementes recalcitrantes, embriões/eixos embrionários são metabolicamente ativos.

Na secagem lenta as sementes permanecem por longo período em graus de umidade intermediários, se comparada com a secagem rápida, ocasionando maior acúmulo de danos. O material desidratado rapidamente pode perder a viabilidade pela ação de processos biofísicos que atuam em sementes mais secas, diferentemente do que ocorre nas recalcitrantes (PAMMENTER; VERTUCCI; BERJAK, 1991; BERJAK; VERTUCCI; PAMMENTER, 1993; PAMMENTER et al., 1998; PAMMENTER; BERJAK, 2000; MARCOS FILHO, 2005; BERJAK; PAMMENTER, 2013).

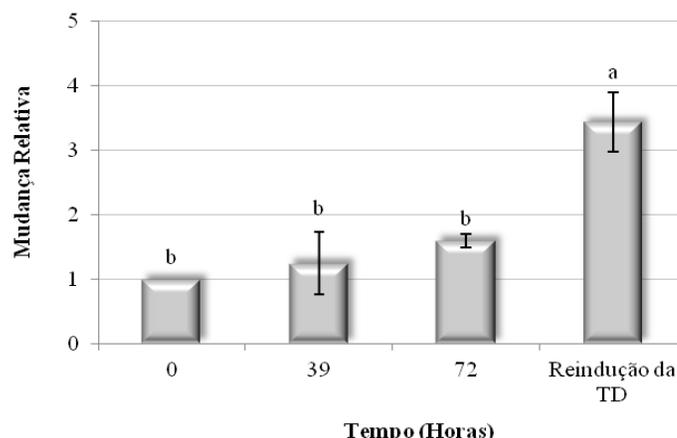
A temperatura inicialmente utilizada durante a incubação foi de 20°C e, embora a sobrevivência tenha ficado igualmente em torno de 50%, esta não foi considerada adequada por não inibir o crescimento da radícula. Este entrave foi solucionado diminuindo-se a temperatura de incubação para 4°C. Conforme pode ser observado na figura 4, foi constatada diferença estatística entre a porcentagem de plântulas anormais nos diferentes tratamentos, contudo, para os demais parâmetros avaliados (no caso sobrevivência e mortalidade) não foi observada diferença estatística. Assim, o protocolo selecionado para as análises moleculares baseadas na reindução de tolerância à dessecação em sementes de *Peltophorum dubium* foi incubação em ácido abscísico 5µM por 72 horas a 4°C .

Estudos relacionados à expressão de genes, associados com a tolerância à dessecação, têm sido utilizados na tentativa de compreender os mecanismos que levam à sensibilidade de sementes recalcitrantes, após secagem. Foi proposto que, como uma consequência da evolução dentro de diferentes ambientes, genes para TD em espécies que produzem sementes recalcitrantes,

podem ter sido perdidos ou são permanentemente reprimidos (BERJAK; PAMMENTER, 2008).

Entretanto, uma das dificuldades no estudo destes genes é relacionar os transcritos com os eventos aos quais estão vinculados, pois, em sementes, eventos metabólicos podem estar envolvidos a estádios do desenvolvimento ou, também, em resposta a outros estresses. Assim, apesar dos numerosos estudos sobre a aquisição da TD, durante o desenvolvimento e sobre reindução da TD em sementes germinadas, poucos deles têm sido capazes de "filtrar" os mecanismos que não estão diretamente associados com TD, mas são acoplados a outras vias de desenvolvimento concomitantes (MAIA, 2011).

A expressão dos genes verificados, durante a germinação e reindução da tolerância à dessecação em sementes de *Peltophorum dubium*, foram avaliados para proteínas de choque térmico (HSP) e para enzima removedora de radicais livres superóxido dismutase (SOD). Para sementes de *Peltophorum dubium*, a mudança relativa na expressão do gene descrito para a superóxido dismutase (MEDTR3G072000\_1) está representada na Figura 3.



**Figura 3.** Mudança na abundância relativa de mRNA do **Gene** MEDTR3G072000\_1 (descrito para enzima removedora de radicais livres **Superóxido Dismutase**) durante diferentes tempos de embebição (controle, 39 e 72 horas) e reindução da tolerância à dessecação (com tratamento em ABA 5 $\mu$ M, a 4°C, durante 3 dias) em sementes de *Peltophorum dubium*.

Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Verifica-se que a dessecação induz o acúmulo de espécies de radicais livres, tóxicos às células e capazes de danificar constituintes celulares, e que a tolerância à retirada de água pode ser relacionada, ao menos em parte, à capacidade de as sementes eliminarem o excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) (CONTRERAS-PORCIA et al., 2011). A referida enzima integra o chamado sistema de defesa contra eventos oxidativos, consequentes do metabolismo desorganizado existente durante a desidratação e o armazenamento. As SOD são capazes de catalisar a formação de peróxido de hidrogênio com base em radicais superóxidos, eliminando-os e livrando a célula do processo oxidativo (MCDONALD, 1999). Elucidando, em estudo com grãos de trigo, Pukacka e Ratajczak (2005) constataram aumento do teor de peróxido de

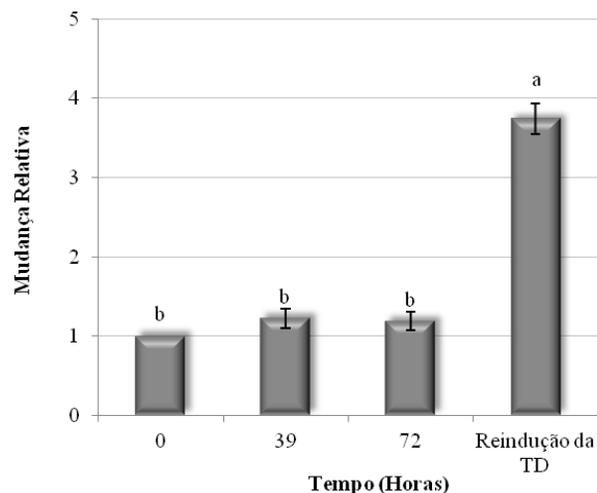
hidrogênio durante o armazenamento a seco e este foi fortemente correlacionado com a diminuição na porcentagem de germinação.

De acordo com a figura 3, pode-se afirmar que, para sementes de *Peltophorum dubium*, não houve alteração significativa dos transcritos do gene MEDTR3G072000\_1 durante a germinação. Entretanto, após a reindução da TD, a expressão deste foi, aproximadamente, três vezes maior em relação ao controle e aos demais tratamentos. Esse aumento pode ser explicado como uma resposta à aplicação de ABA e/ou ao estresse causado pela baixa temperatura.

Bartels e Salamini (2001) descreveram que a incubação das plantas e calos de *Craterostigma plantagineum* em ácido abscísico induz a expressão de genes que são ativados somente durante a desidratação. Especificamente, no tecido do calo, ABA é necessário para induzir os genes necessários para a manifestação da tolerância à dessecação. Um antioxidante induzido pelo estresse foi identificado na planta de ressurreição *Xerophyta viscosa* em trabalho realizado por Mowla et al. (2002). Illing et al. (1992) mostraram que a maioria dos antioxidantes analisados, incluindo a enzima superóxido dismutase, são ativados em condições de estresse abiótico (como frio, estresse osmótico, salino ou hídrico) em tecidos tolerantes e sensíveis à dessecação. Outros autores citam, ainda, que mutantes ABA-deficientes e ABA-insensíveis não são capazes de secar na planta mãe, sendo, assim, incapazes de tolerar a secagem (KOORNEEF et al., 1989; MEURS et al., 1992).

Em plantas de *Arabidopsis*, a expressão do gene PRX 2-CYS, descrito para o sistema antioxidante, é regulada positivamente em resposta ao estresse salino e em resposta à infecção por agente patógeno (ROUHIER et al., 2004; CHARLTON et al., 2005). A indução de genes relacionados à via antioxidante foi relatado, também, em plantas de ressurreição, como *Sporobolus stapfianus* (NEALE et al., 2000) e *Xerophyta humilis*, durante a dessecação (COLLETT et al., 2004).

Já para as proteínas de choque térmico (HSP), um dos genes que codifica para esta proteína foi alvo deste estudo, MEDTR4G093060\_1, e a expressão relativa deste está disposta na Figura 4, a seguir. As HSP são um grupo de produtos de genes usualmente encontrados em plantas submetidas ao déficit hídrico (JOSHI; NGUYEN, 1996). Algumas famílias funcionam ligando-se às regiões não dobradas das cadeias peptídicas, sugerindo que sua função possa estar relacionada com a manutenção da correta estrutura terciária de certas proteínas, preservando ou reparando estas estruturas, durante a desidratação ou reidratação (HELM; ABERNETHY, 1990; COOPER, 1997; EFEOGLU, 2009). Assim, como o estresse promove a desnaturação e a agregação de proteínas, uma maior síntese de HSP ajudaria a proteger outras proteínas durante o estresse osmótico (ZHU; LI; LUI, 1997).



**Figura 4.** Alteração na abundância relativa de mRNA do **Gene MEDTR4G093060\_1** (descrito para **Proteína de Choque Térmico**) durante diferentes tempos de embebição (controle, 39 e 72 horas) e reindução da tolerância à dessecação (com tratamento em ABA 5 $\mu$ M, a 4°C, durante 3 dias) em sementes de *Peltophorum dubium*.

Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Assim como observado para o transcrito do gene mencionado anteriormente (MEDTR3G072000\_1, descrito para enzima removedora de radicais livres superóxido dismutase) não foi constatada variação significativa dos transcritos do gene MEDTR4G093060\_1 durante a germinação. Contudo, após a reindução da TD, novamente houve incremento na abundância relativa dos transcritos, o que corrobora com a afirmação de Bewley et al. (2013) de que proteínas de choque térmico, respondem positivamente ao ABA.

Em culturas embriogênicas somáticas de *Picea glauca*, a inclusão de PEG ao meio de maturação, também, contribui para o aumento dos níveis de transcrição de vários genes relacionados ao estresse, assim como para aqueles descritos para HSPs (STASOLLA et al., 2003). Wehmeyer e Vierling (2000) concluíram que o emprego de estresse térmico para amadurecer embriões de *Arabidopsis* induziu a expressão de HSP17.4 e Faria et al. (2005), em estudo com sementes de *M. truncatula*, observaram que a expressão de sHSP18.2 caiu para níveis cerca de 250 vezes mais baixos, quando as radículas atingiram 3 mm de comprimento e subsequente perda da TD. Após incubação em PEG, durante 3 dias, os níveis de expressão gênica foram restaurados, para os mesmos níveis das sementes secas.

Assim, ambos os resultados sugerem que a incubação em ABA, conjuntamente com baixa temperatura, acionou parte do sistema de defesa nestas sementes, contribuindo para o restabelecimento da tolerância à dessecação. O ácido abscísico é conhecido por desempenhar um importante papel de coordenação na ativação de genes de tolerância em resposta à dessecação. Uma importante aplicação desses estudos relata a identificação de genes estresses-induzidos que podem revelar funções essenciais ou importantes com um efeito na tolerância ou nas reações de defesa contra a perda de água (TALAME et al., 2007).

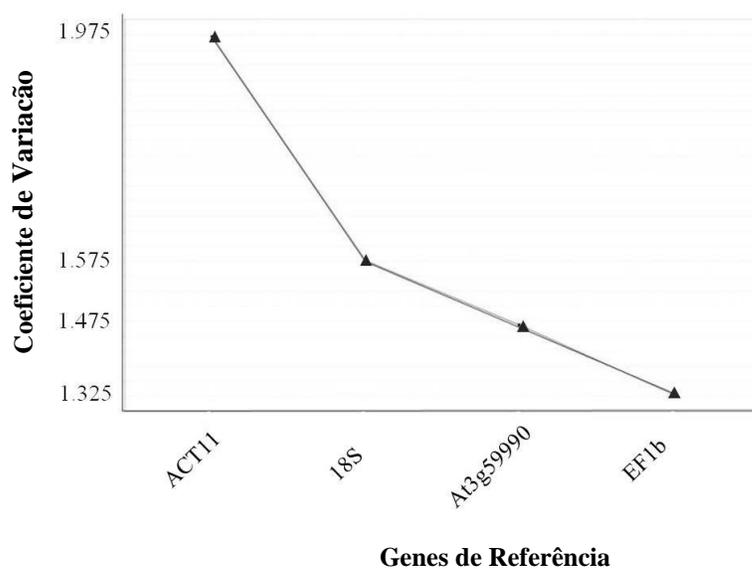
De acordo com trabalho de Buitink et al. (2003), em paralelo com o restabelecimento da TD, genes regulados positivamente são comparáveis com aqueles envolvidos nos estádios tardios de maturação de sementes e, concomitantemente, acontece, também, uma repressão massiva de genes pertencentes a várias classes. Assim, de acordo com os autores, o restabelecimento da TD em sementes germinadas parece contribuir para um retorno parcial ao estado de repouso antes da germinação.

Na inexistência de um banco de dados descrito para *Peltophorum dubium*, foram testados diversos genes de referência, utilizados como normalizadores, já descritos para as espécies *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Tulipa sp.* Dos genes de referência testados houve amplificação para 14 deles (Tabela 3).

**Tabela 3.** Genes de referência testados e amplificados para sementes de *Peltophorum dubium* durante diferentes tempos de embebição (controle, 39 e 72 horas) e reindução da tolerância à dessecação.

<b>Genes estáveis durante a germinação em <i>Solanum lycopersicum</i> e <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	
<b>Código</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
At2g28390	Dekkers et al, 2012
At2g90208	
At2g20000	
<b>Genes estáveis durante a germinação de sementes</b>	
<b>Código</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
At3g54660	Dekkers et al, 2012
*At3g59990	
<b>Genes estáveis durante a germinação e desenvolvimento em <i>Glycine Max</i></b>	
<b>seq_id</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
60S	
TUB4	Li et al, 2012
*EF1b	Li et al, 2012
ACT11	Li et al, 2012
*18S	
UBQ10	Li et al, 2012
<b>Genes estáveis durante a germinação em <i>Tulipa sp.</i></b>	
<b>seq_id</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
18S	Leeggangers, M. 2012 (dados não publicados)
Fator de Elongação	
Actina	

Após análise de eficiência, com auxílio do software Bio-Rad iQ5 e LinRegPCR, 4 dos 14 genes amplificados foram considerados eficientes e 3 deles, baseados nos menores coeficientes de variação (medida da variação de expressão gênica), utilizados como normalizadores, conforme consta na Figura 5.

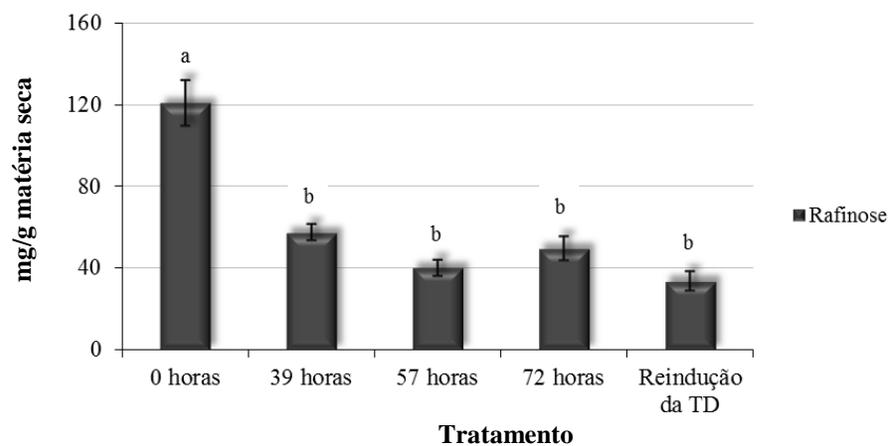


**Figura 5.** Coeficiente de variação dos genes de referência, ACT11 (actina), 18S, At3g59990 e EF1b (fator de alongação), da esquerda pra direita, utilizados como normalizadores em PCR-RT para sementes de *Peltophorum dubium* durante diferentes tempos de embebição (controle, 39 e 72 horas) e reindução da tolerância à dessecação.

Nos mesmos pontos em que foram realizadas as análises referentes às alterações na abundância relativa de mRNAs, foram quantificadas, também, as variações absolutas nos teores dos chamados carboidratos solúveis, dentre eles, glicose, frutose, sacarose, estaquiose, trealose e rafinose.

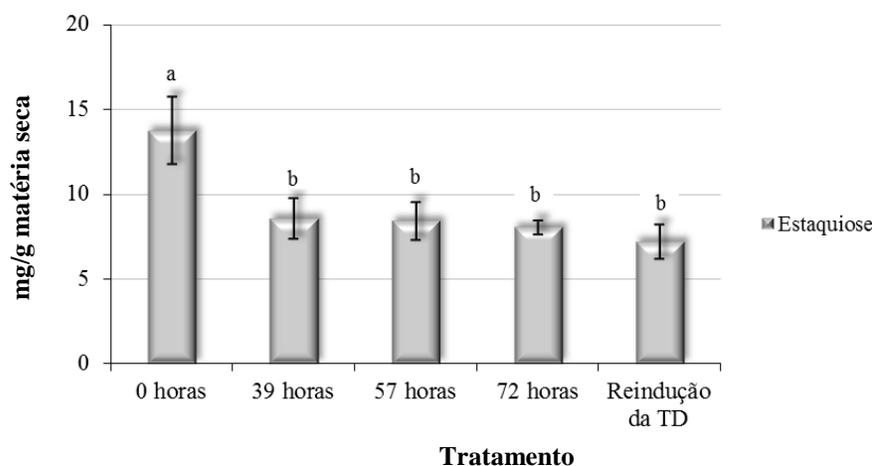
Os carboidratos solúveis são importantes componentes envolvidos na tolerância à dessecação. Estes compostos apresentam característica hidrofílica e, durante a perda de água pela semente, agem como moléculas osmoprotetoras, substituindo a água e evitando que ocorram danos à membrana durante a embebição (KOSTER; LEOPOLD, 1988; PAMMENTER; BERJAK, 1999).

Em sementes, assumem importante papel os oligossacarídeos da família rafinósica (RFOs), que incluem a rafinose, estaquiose e verbascose. Foi relatado aumento considerável destes açúcares, ao final da maturação em sementes ortodoxas e este processo tem sido associado com a tolerância à dessecação, sugerindo a participação dos RFOs na manutenção da integridade das membranas durante o processo de dessecação (HOEKSTRA et al., 1994) e na vitrificação do citoplasma. A quantificação de rafinose e estaquiose, em sementes de *Peltophorum dubium*, pode ser observada nas Figuras 6 e 7, a seguir.



**Figura 6.** Variação absoluta do teor de **rafinose** (mg/g matéria seca) durante diferentes tempos de embebição (controle, 39, 57 e 72 horas) e reindução da tolerância à dessecação (com tratamento em ABA 5 $\mu$ M, a 4°C, durante 3 dias) em sementes de *Peltophorum dubium*.

Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 7.** Variação absoluta do teor de **estaquiase** (mg/g matéria seca) durante diferentes tempos de embebição (controle, 39, 57 e 72 horas) e reindução da tolerância à dessecação (com tratamento em ABA 5 $\mu$ M, a 4°C, durante 3 dias) em sementes de *Peltophorum dubium*.

Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Conforme constatado nas figuras anteriores, foram encontrados altos valores de rafinose e estaquiase, indicando que houve acúmulo destes ao final da maturação nas sementes da espécie em estudo. Em pesquisa com ervilha, Peterbauer e Richter (2001), também, relataram acúmulo de RFOs ao final do processo de maturação das sementes e Corbineau et al. (2000), trabalhando com a mesma espécie, correlacionaram a aquisição da tolerância à dessecação com acúmulo de rafinose e estaquiase. Para sementes de soja, ervilha e milho, Koster e Leopold (1988) observaram alta correlação entre tolerância à secagem e a composição de açúcares solúveis, principalmente, rafinose e estaquiase. A

redução destes açúcares na espécie, foco deste estudo, sugere uma correlação direta entre estes açúcares e a TD.

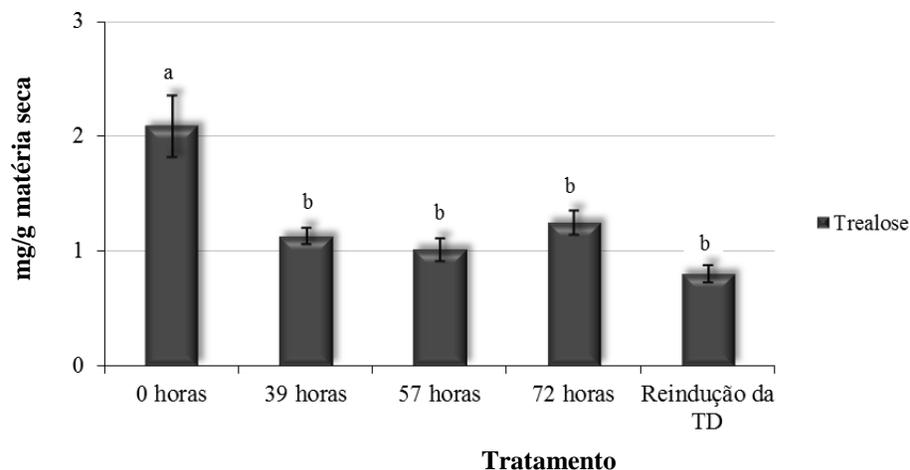
Ao estimarem a tolerância à dessecação das espécies *Acer platanoides* e *Acer pseudoplatanus*, Pukacka e Wojkiewicz (2002) verificaram que, em sementes de *Acer platanoides*, consideradas tolerantes à dessecação, a concentração de rafinose e estaquiase aumentaram, significativamente, durante a maturação. Já nas sementes de *Acer pseudoplatanus*, intolerantes à secagem, foi observado que as concentrações desses mesmos carboidratos são reduzidas com a maturação, estabelecendo uma correlação entre a concentração desses oligossacarídeos e o estabelecimento da tolerância à dessecação nestas espécies.

Tanto para os conteúdos de rafinose quanto para estaquiase, com o início do processo germinativo de sementes de *Peltophorum dubium* foi constatada queda significativa, de aproximadamente, 50%, após 39 horas de embebição. Kuo, Vanmiddlesworth e Wolf (1998) verificaram que, em sementes de soja, durante a germinação, acontece a conversão de óleos e oligossacarídeos solúveis em monossacarídeos, para serem utilizados na rápida expansão do eixo embrionário. Em eixos de sementes de *Erythrina speciosa* e *Caesalpinia echinata*, também, houve redução de rafinose e estaquiase durante a embebição (MELLO et al., 2010).

Os oligossacarídeos da série rafinósica são formados por até 10 monossacarídeos, em que um resíduo de sacarose está unido a um, dois ou três resíduos de galactose para formar, respectivamente, rafinose, estaquiase e verbascose (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002; KERBAUY, 2008). São carboidratos pré-formados nas sementes, durante o desenvolvimento e os primeiros a serem degradados, durante a germinação, assim como observado para sementes de *Peltophorum dubium*. Isso em virtude do fato de o processo germinativo envolver o reparo de algumas estruturas que podem ter sido comprometidas, durante a fase de secagem, e estes eventos demandam um gasto

de energia considerável. Assim, as sementes armazenam quantidades significativas de compostos de reserva que servirão como fonte de energia para manter esses processos metabólicos, bem como para a manutenção e o desenvolvimento do embrião até que este se torne uma plântula capaz de se manter de forma autotrófica (BUCKERIDGE et al., 2004).

Igualmente ao observado para os teores de rafinose e estaquiose, o conteúdo do dissacarídeo trealose diminuiu, cerca de 50%, ao longo do processo germinativo (Figura 8).



**Figura 8.** Quantificação de **trealose** (mg/g matéria seca) durante diferentes tempos de embebição (controle, 39, 57 e 72 horas) e reindução da tolerância à dessecação (com tratamento em ABA 5 $\mu$ M, a 4°C, durante 3 dias) em sementes de *Peltophorum dubium*.

Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

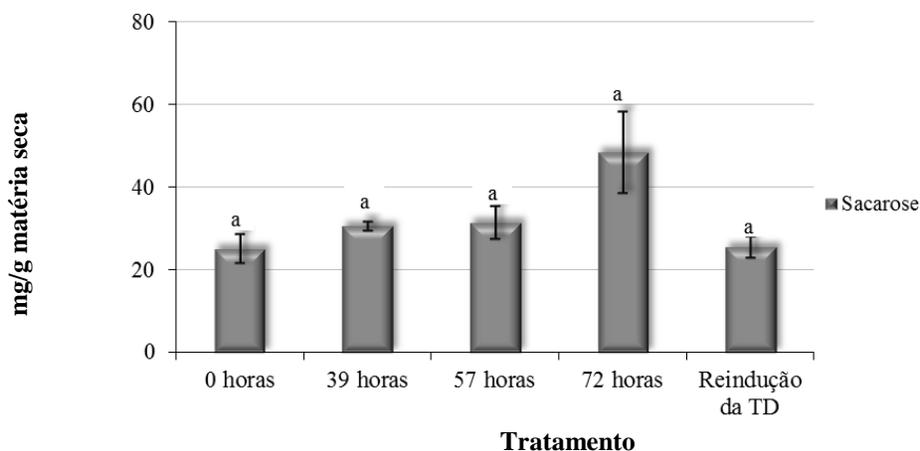
Foi constatado que a trealose tem um papel fundamental na tolerância à dessecação em leveduras e em outros organismos tolerantes à dessecação, já que

a molécula deste açúcar tem estrutura apropriada para a interposição entre os grupos polares dos fosfolipídios de membranas enquanto ocorre a perda de água (CROWE; CROWE; HOEKSTRA1989). Em embriões de *Arabidopsis*, Eastmond et al. (2002) concluíram que a trealose é essencial durante o processo de desenvolvimento.

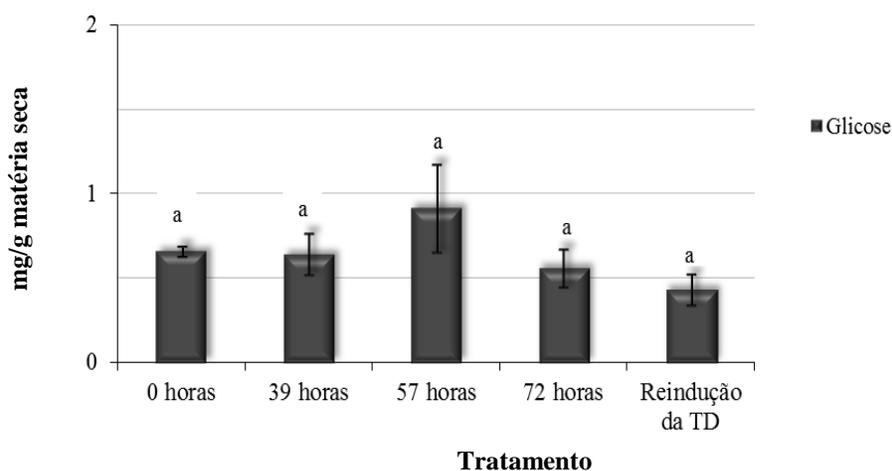
Entretanto, existem poucos estudos conclusivos no que se refere ao verdadeiro papel deste açúcar nas sementes, principalmente, por estes serem encontrados, geralmente, em baixas concentrações (CROWE; CROWE; HOEKSTRA1989; GODDIJN; SMEEKENS, 1998; GODDIJN; VAN DUN, 1999), conforme, também, foi encontrado nas sementes de *P. dubium* (Figura 8).

Como foi observada redução nos níveis de rafinose, estaquiose e trealose, concomitantemente com a perda da TD em *Peltophorum dubium*, provavelmente, estes açúcares atuaram como moléculas osmoprotetoras, durante a secagem que ocorre ao final do processo de maturação, quando as sementes eram, ainda, tolerantes à dessecação. A redução nos níveis destes, possivelmente, foi um dos fatores que contribuíram para a sensibilidade à dessecação nesta espécie, durante a germinação, como consequência da redução nos teores destes produtos.

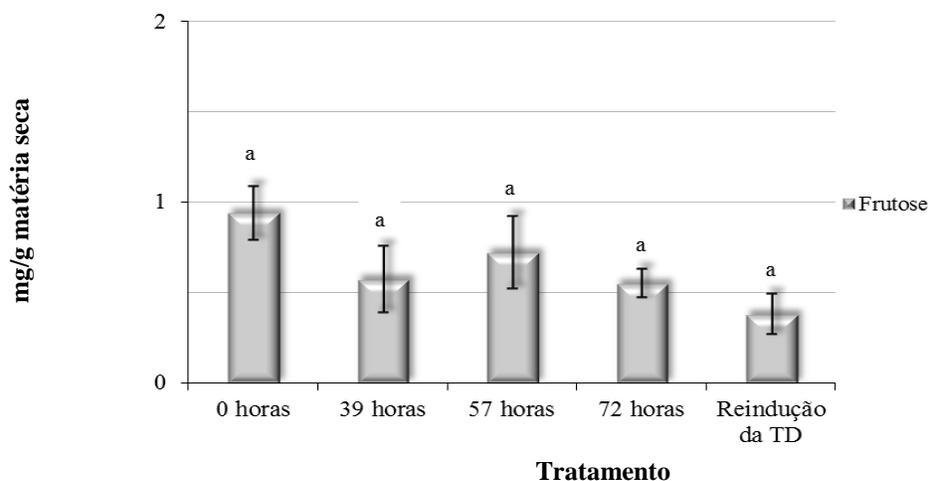
No que se refere aos teores de sacarose e para glicose e frutose, dispostos nas figuras 9, 10 e 11, não foram observadas alterações significativas durante os diferentes tempos de embebição (controle, 39, 57 e 72 horas) e reindução da tolerância à dessecação.



**Figura 9.** Quantificação de **sacarose** (mg/g matéria seca) durante diferentes tempos de embebição (controle, 39, 57 e 72 horas) e reindução da tolerância à dessecação (com tratamento em ABA 5 $\mu$ M, a 4°C, durante 3 dias) em sementes de *Peltophorum dubium*.



**Figura 10.** Variação absoluta do teor de **glicose** (mg/g matéria seca) durante diferentes tempos de embebição (controle, 39, 57 e 72 horas) e reindução da tolerância à dessecação (com tratamento em ABA 5 $\mu$ M, a 4°C, durante 3 dias) em sementes de *Peltophorum dubium*.



**Figura 11.** Quantificação de **frutose** (mg/g matéria seca) durante diferentes tempos de embebição (controle, 39, 57 e 72 horas) e reindução da tolerância à dessecação (com tratamento em ABA 5 $\mu$ M, a 4°C, durante 3 dias) em sementes de *Peltophorum dubium*.

Para os três gráficos anteriores, médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

A sacarose é um açúcar abundante em sementes tolerantes à dessecação e, em estudos de estresse hídrico em plantas, foi averiguado que este conteúdo aumenta em resposta à dessecação dos tecidos (ILING et al., 1992). Tratamentos de estresse osmótico em sementes causaram rápido incremento deste açúcar sugerindo que este aumento é uma resposta ao estresse, agindo como protetor celular (BLACK et al., 1999; BUITINK et al., 2003).

No entanto, autores relatam, também, alta concentração de sacarose durante o desenvolvimento de sementes recalcitrantes, por exemplo, *Quercus robur* (FINCH-SAVAGE et al., 1993) e *Quercus alba* (CONNOR; SOWA, 2003), sugerindo, assim, que a tolerância à dessecação não ocorreria apenas em

razão da presença deste (FARRANT; PAMMENTER; BERJAK, 1993). Fato igualmente observado por Rodrigues et al. (2005) para as sementes de *Syagrus coronata*, onde o aumento de sacarose não evitou os efeitos da dessecação na viabilidade das sementes.

De forma semelhante, como não houve oscilação nos teores de sacarose tanto durante a embebição quanto após o tratamento com ABA, aparentemente este dissacarídeo não se relaciona à tolerância e sensibilidade à dessecação em sementes de *Peltophorum dubium*. De acordo com Kigel e Galili (1995), a sacarose é um açúcar importante para a formação de vidro, entretanto, dependendo da concentração, não é estável e tende a cristalizar, não formando vidro. Foi descrito que a maneira de atenuar esta cristalização é a presença de oligossacarídeos da série rafínósica, que podem prevenir a cristalização da sacarose, fornecendo proteção às células (LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993; JOSÉ; PINHO; DIAS, 2006). Contudo, a identificação de cada componente citoplasmático, que pode contribuir para a formação do estado viscoso, é, ainda, um desafio para a compreensão da tolerância à dessecação das sementes (BUTINK; LEPRINCE, 2004), variando entre espécies.

Zhu, Li e Lui (2006), ao examinarem os conteúdos de determinados açúcares em sementes de arroz, durante o desenvolvimento, constataram elevados níveis de glicose e frutose inicialmente, com posterior redução gradual, ao passo que o nível de sacarose aumentou. Estes autores concluíram que o tempo necessário para a aquisição da TD estava intimamente associado com o rápido acúmulo de sacarose e diminuição dos monossacarídeos.

Foi relatado que, em sementes recalcitrantes, a concentração de monossacarídeos pode ser maior do que as descritas para sementes ortodoxas (STEADMAN; PRITCHARD; DEY, 1996; FARNSWORTH, 2000), como no caso de *Landolphia kirkii* Dyer (BERJAK; VERTUCCI; PAMMENTER, 1993) e *Avicennia marina* L. (FARRANT; PAMMENTER; BERJAK, 1993). Estes

açúcares estão envolvidos como promotores de produtos de reação que estimulam a respiração favorecendo, concomitantemente, a formação de radicais livres (KOSTER; LEOPOLD, 1988; LEPRINCE et al., 1995). A presença destes açúcares, em altas concentrações nos tecidos, tende a favorecer a sensibilidade à dessecação (KOSTER; LEOPOLD, 1988; HOEKSTRA et al., 1994).

Os resultados descritos corroboram com os deste estudo, já que os baixos valores dos monossacarídeos em sementes secas de *Peltophorum dubium* é característico de sementes ortodoxas. Os valores de sacarose foram relativamente altos, quando comparados aos dos monossacarídeos, e não decresceram a medida que as sementes foram tornando-se sensíveis à dessecação. Entretanto, como não foi observado aumento nos conteúdos de glicose e frutose, ao longo da perda da tolerância à dessecação, estes não podem ser considerados como uma das causas da sensibilidade à dessecação durante a germinação para este caso específico.

Em alguns estudos de reindução da tolerância à dessecação, foi observado o acúmulo de determinados açúcares, principalmente dissacarídeos e oligossacarídeos após tratamento de estresse osmótico. Em sementes de trigo foi observado incremento de sacarose, rafinose e dehidrinas (BLACK et al., 1999); para sementes de *Caesalpinia echinata* o aumento no conteúdo de sacarose em sementes incubadas em PEG sugere que o fator responsável pelo estresse osmótico causou o incremento particularmente rápido desse açúcar. No que se refere ao tratamento de reindução da TD com incubação em ABA, a 4°C, não foi observado incremento nos níveis para nenhum dos açúcares estudados em sementes de *Peltophorum dubium*. Como a aplicação deste regulador vegetal foi capaz de reinduzir a TD nesta espécie para 50% de sobrevivência, possivelmente, a emprego deste acionou outros mecanismos que foram capazes de reverter o processo de sensibilidade para o de tolerância à dessecação.

#### 4. Conclusões

- ✓ Sementes de *Pelthophorum dubium* tornam-se sensíveis à dessecação durante o processo germinativo, com nulidade da sobrevivência após 72 horas de embebição (quando ocorre a protrusão radicular) seguida de dessecação e reidratação.
- ✓ Todas as combinações de protocolos utilizados na tentativa de reinduzir a tolerância à dessecação em sementes de *Peltophorum dubium* foram eficientes, elevando os valores de 5% para 50% de sobrevivência, aproximadamente, sendo considerado como mais adequada a incubação das sementes germinadas em ABA 5  $\mu$ M, a 4°C, durante 3 dias.
- ✓ Durante o processo germinativo e consequente perda progressiva da tolerância à dessecação, foi observado um decréscimo nos valores dos açúcares rafinose, estaquiose e trealose, sugerindo provável correlação destes com a perda da tolerância à dessecação.
- ✓ O tratamento de reindução da tolerância à dessecação não foi capaz de alterar os níveis dos açúcares estudados (glicose, sacarose, frutose, estaquiose, trealose e rafinose).
- ✓ Para nenhum dos dois genes estudados, descritos para proteínas de choque térmico e para enzima removedora de radicais livres (superóxido dismutase), foi constatada alteração na expressão durante o processo germinativo.

- ✓ Houve incremento significativo na expressão dos dois genes analisados nesta pesquisa, sendo eles MEDTR4G093060\_1 e MEDTR3G072000\_1 (descritos para proteínas de choque térmico e para enzima removedora de radicais livres superóxido dismutase, respectivamente) após o tratamento para reindução da tolerância à dessecação indicando, assim, que estresses moderados e a adição de ABA podem acionar mecanismos de defesa nas plantas e que estes genes podem estar envolvidos com os mecanismos de tolerância à dessecação.

## 5. Referências Bibliográficas

BARTELS, D. Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, n. 7, p. 284–286, 2001.

BARTELS, D.; SALAMINI, F. Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*: a contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, n. 4, p. 1346–1353, Dec. 2001.

BÄUMLEIN, H. et al. The *FUS3* gene of *Arabidopsis thaliana* is a regulator of gene expression during late embryogenesis. **Plant Journal**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 379-387, Sept. 1994.

BERJAK, P.; DINI, M.; PAMMENTER, N. W. Possible mechanisms underlying the differing dehydration responses in recalcitrant and orthodox seeds: desiccation-associated subcellular changes in propagules of *Avicennia marina*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 12, n. 3, p. 365-384, 1984.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, London, v. 101, n. 2, p. 213-228, Aug. 2008.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Plant Physiology**, Washington, n. 4, p. 478, Nov. 2013.

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

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

BEWLEY, J. D. et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Springer, 2013.

BINO, R. J. et al. Flow cytometric determination of nuclear replication stages in seed tissues. **Annals of Botany**, London, v. 72, n. 2, p. 181-187, Sept. 1993.

BLACK, M. et al. Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. **Plant Physiology**, Washington, v. 120, n. 2, p. 463–471, June 1999.

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**, Washington, v. 140, n. 4, p. 1418–1436, Aug. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNAD, 1992.

BRAY, E. A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 407, p. 2331–2341, Sept. 2004.

BRUGGINK, T.; VAN DER TOORN, P. Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 5, n. 1, p. 1–4, Mar. 1995.

BUCKERIDGE, M. S. Acúmulo de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Ed.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 324–372.

BUITINK, J. et al. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 13, n. 4, p. 273–286, Dec. 2003.

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. **Plant Journal**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 735–750, Sept. 2006.

BUITINK, J.; LEPRINCE, O. Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. **Cryobiology**, Rockville, v. 48, n. 3, p. 215–228, June 2004.

BURKE, M. J. The glassy state and survival of anhydrous biological systems. In: LEOPOLD, A. C. (Ed.). **Membranes, metabolism and dry organisms**. Ithaca: Cornell University Press, 1986. p. 358–363.

CARVALHO, A. L. B.; PELACANI, C. R.; LEDO, C. A. da S. Influência do armazenamento nos teores de açúcares solúveis totais e redutores em sementes de *Syagrus coronata* (Martius) Beccari (Arecaceae). **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 5, n. 2, p. 72-75, 2005.

CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 51-67.

CHARLTON, W. et al. Salt-induced expression of peroxisome-associated genes requires components of the ethylene, jasmonate and abscisic acid signaling pathways. **Plant, Cell & Environment**, Dordrecht, v. 28, n. 4, p. 513-524, Apr. 2005.

CHEN, Y.; BURRIS, J. S. Role of carbohydrates in desiccation tolerance and membrane behavior in maturing maize seed. **Crop Science**, Madison, v. 30, n. 5, p. 971-975, 1990.

COLLETT, H. M. et al. Photo-synthetic genes are differentially transcribed during the dehydration-rehydration cycle in the resurrection plant, *Xerophyta humilis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 392, p. 2543-2595, Nov. 2004.

CONNOR, K. F.; SOWA, S. Effects of desiccation on the physiology and biochemistry of *Quercus alba* acorns. **Tree Physiology**, Victoria, v. 23, n. 16, p. 1147-1152, June 2003.

COOPER, G. M. **The cell: a molecular approach**. Washington: ASM Press, 1997.

CORBINEAU, F. et al. Effects of dehydration conditions on desiccation tolerance of developing pea seeds as related to oligosaccharide content and cell membrane properties. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 10, n. 3, p. 329-339, Sept. 2000.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; HOEKSTRA, F. A. Phase transitions and permeability changes in dry membranes during rehydration. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 21, n. 1, p. 77-91, Feb. 1989.

- DEKKERS, B. J. W. et al. Identification of reference genes for RT-qPCR expression analysis in *Arabidopsis* and tomato seeds. **Plant & Cell Physiology**, Wageningen, v. 53, n. 1, p. 28–37, 2012.
- DELTOUR, R.; BARSY, T. Nuclear activation during early germination of the higher plant embryo. **Journal of Cell Science**, London, v. 75, n. 1, p. 43-83, Apr. 1985.
- EASTMOND, P. J. et al. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for arabidopsis embryo maturation. **Plant Journal**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 225-235, Jan. 2002.
- EFEOGLU, B. Heat shock proteins and heat shock response in plants. **G. U. Journal of Science**, Turkey, v. 22, n. 2, p. 67-75, 2009.
- 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, June 2005.
- FARNSWORTH, E. The ecology and physiology of viviparous and recalcitrant seeds. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 31, p. 107-138, Nov. 2000.
- FARRANT, M. J.; PAMMENTER, W. N.; BERJAK, P. Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation-sensitive (recalcitrant) seed of *Avicennia marina* and desiccation tolerant types. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 3, n. 1, p. 1-13, Mar. 1993.
- FINCH-SAVAGE, W. E. et al. Embryo water status and loss of viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. In: COME, D.; CORBINEAU, F. (Ed.). **Proceedings of the fourth international workshop on seeds: basic and applied aspects of seed biology**. Paris: ASFIS, 1993. p. 723-730.
- GAFF, D. F.; OLIVER, M. The evolution of desiccation tolerance in angiosperm plants: a rare yet common phenomenon. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 40, n. 4, p. 315–328, 2013.
- GODDIJN, O. J. M.; SMEEKENS, S. Sensing trehalose biosynthesis in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 143-146, Apr. 1998.

GODDIJN, O. J. M.; VAN DUN, K. Trehalose metabolism in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 4, n. 8, p. 315-319, Aug. 1999.

GUIMARÃES, C. C. et al. Avaliação da perda da tolerância à dessecação e da quantidade de DNA nuclear em sementes de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert durante e após a germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 207-215, 2011.

HARADA, J. J. Role of *Arabidopsis* *LEAFY COTYLEDON* genes in seed development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 158, n. 4, p. 405-409, 2001.

HELM, K. W.; ABERNETHY, R. H. Heat shock proteins and their mRNAs in dry and early imbibing embryos of wheat. **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, n. 4, p. 1626-1633, Aug. 1990.

HOEKSTRA, F. A. et al. Changes in soluble sugar in relation to desiccation tolerance in cauliflower seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 4, n. 2, p. 143-147, June 1994.

IIDA, Y. et al. Effects of abscisic acid on the induction of desiccation tolerance in carrot somatic embryos. comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. **Integrative and Comparative Biology**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 771-787, Nov. 2005.

ILLING, N. et al. The signature of seeds in esurrection plants: a molecular and physiological. **Physiology**, London, v. 45, n. 5, p. 356-360, Nov. 1992.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 377-403, June 1996.

JAIN, M. et al. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 345, n. 2, p. 646-651, June 2006.

JOSÉ, S. C. B. R.; PINHO, É. V. R. V.; DIAS, M. A. G. S. Açúcares e tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 60-68, 2006.

JOSHI, C. P.; NGUYEN, H. T. Differential display-mediated rapid identification of different members of a multigene family, HSP16.9 in wheat. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 31, n. 3, p. 575-584, June 1996.

KERMODE, A. R. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 155-195, 1990.

KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995.

KOORNNEEF, M. et al. In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Washington, v. 90, n. 2, p. 463-469, June 1989.

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

KUO, T. M.; VANMIDDLESWORTH, J. F.; WOLF, W. J. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Amsterdam, v. 36, p. 32-36, 1998.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. In: LEHNINGER, A. L. (Ed.). **Principles of biochemistry**. New York: Worth Publishers, 2002. p. 375-402.

LEPRINCE, O. et al. The expression of desiccation-induced damage in orthodox seeds is a function of oxygen and temperature. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 94, n. 2, p. 233-240, June 1995.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 3, n. 4, p. 231-246, Dec. 1993.

LI, Q. et al. Validation of reference genes for real-time quantitative PCR normalization in soybean developmental and germinating seeds. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, n. 10, p. 1789-1798, Oct. 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-CT\Delta\Delta}$ -method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MACROGEN. Disponível em: <<http://www.macrogen.com/eng>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

MAIA, J. et al. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds and its associated transcriptome. **PlosOne**, Califórnia, v. 6, n. 12, e29123, Dec. 2011.

MARTINS, L. et al. Armazenamento de sementes de ipê-branco: teor de água e temperatura do ambiente. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 3, p. 775-780, 2009.

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.

MCDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessments. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 27, n. 1, p. 177-237, Jan./Apr. 1999.

MELLO, J. I. de O. et al. Reserve carbohydrates and lipids from the seeds of four tropical tree species with different sensitivity to desiccation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 4, p. 889-899, July/Aug. 2010.

MEURS, C. et al. Role of abscisic acid in the induction of desiccation tolerance in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Washington, v. 98, n. 4, p. 1484-1493, Apr. 1992.

MOWLA, S. B. et al. A novel stress-inducible antioxidant enzyme identified from the resurrection plant *Xerophyta viscosa*. **Planta**, Berlin, v. 215, n. 5, p. 716-726, Sept. 2002.

NARSAI, R. et al. Defining reference genes in *Oryza sativa* using organ, development, biotic and abiotic transcriptome datasets. **BMC Plant Biology**, London, v. 10, p. 56, Jan. 2010.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

NEALE, A. D. et al. The isolation of genes from the resurrection grass *Sporobolus stapfianus* which are induced during severe drought stress. **Plant, Cell & Environment**, Dordrecht, v. 23, n. 3, p. 265-277, 2000.

OBENDORF, R. L. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 7, n. 2, p. 63-74, June 1997.

OLIVEIRA, L. M.; DAVIDE, A. C.; CARVALHO, M. L. M. Avaliação de métodos para quebra de dormência e para desinfecção de sementes de canafistula *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 5, p. 1-8, 2003.

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

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Some thoughts on the evolution and ecology of recalcitrant seeds. **Plant Species Biology**, London, v. 15, n. 2, p. 153-156, Aug. 2000.

PAMMENTER, N. W. et al. The time factor during dehydration of non-orthodox (recalcitrant) seeds: effects of differential drying rates on viability retention of *Ekebergia capensis*. **Seed Science Research**, Cambridge, n. 8, p. 463-471, 1998.

PAMMENTER, N. W.; VERTUCCI, C. W.; BERJAK, P. Homeohydrous (recalcitrant) seeds: dehydration, the state of water and viability characteristics in *Landolphia kirkii*. **Plant Physiology**, Washington, v. 96, n. 4, p. p. 1093-1098, Aug. 1991.

PARCY, F. et al. Regulation of gene expression programs during Arabidopsis seed development: roles of the *ABI3* locus and of endogenous abscisic acid. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, n. 11, p. 1567-1582, Nov. 1994.

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, n. 4, p. 417-427, 2010.

PEREZ, S. C. J. G. A.; FANTI, S. C.; CASALI, C. A. Influência do armazenamento, substrato, envelhecimento precoce e profundidade de semeadura na germinação de canafístula. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 1, p. 57-68, 1999.

PETERBAUER, T.; RICHTER, A. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 11, n. 3, p. 185–187, Sept. 2001.

PUKACKA, S.; RATAJCZAK, E. Production and scavenging of reactive oxygen species in *Fagus sylvatica* seeds during storage at varied temperature and humidity. **Plant Physiology**, Washington, v. 162, n. 8, p. 873-885, Aug. 2005.

PUKACKA, S.; WÓJKIEWICZ, E. Carbohydrate metabolism in Norway maple and sycamore seeds in relation to desiccation tolerance. **Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 159, n. 3, p. 273–279, 2002.

RAMANJULU S.; BARTELS, D. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 141–151, Feb. 2002.

RODRIGUES, M. O. C. et al. Influência do armazenamento nos teores de açúcares solúveis totais e redutores em sementes de *Syagrus coronata* (Martius) Beccari (Arecaceae). *Sitientibus Série Ciências Biológicas*, v.5, n.2, p.72-75, 2005.

RODRIGUES, M. O. de S. et al. Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. **Annals of Botany**, London, v. 77, n. 6, p. 667-674, June 1996.

ROUHIER, N. et al. Poplar Peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, n. 3, p. 1027-1038, Mar. 2004.

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

SREEDHAR, L. et al. In vivo characterization of the effects of abscisic acid and drying protocols associated with the acquisition of desiccation tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. **Annals of Botany**, London, v. 89, n. 4, p. 391-400, Apr. 2002.

STASOLLA, C. et al. Transcript profiles of stress-related genes in developing white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos cultured with polyethylene glycol. **Plant Science**, Limerick, v. 165, n. 4, p. 719-729, Oct. 2003.

STEADMAN, K. J.; PRITCHARD, H. W.; DEY, P. M. Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. *Annals of Botany*, London, v. 77, n. 6, p. 667–674, 1996.

TALAMÈ, V. et al. Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 2, p. 229–240, 2007.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT–PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, June 2002. RESEARCH0034.

VIEIRA C. V. et al. Stress-associated factors increase after desiccation of germinated seeds of *Tabebuia impetiginosa* Mart. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 62, n. 3, p. 257–263, Dec. 2010.

WAN, C. H.; WILKINS, T. A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Analytical Biochemistry**, New York, v. 223, n. 1, p. 7–12, 1994.

WEHMEYER, N.; VIERLING, E. The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 4, p. 1099–1108, Apr. 2000.

ZHU, C.; LI, L. P.; LUI, X. Changes in sugars during rice seed desiccation. **Russian Journal of Plant Physiology**, Russia, v. 53, n. 2, p. 198–204, Mar. 2006.