



**LEANDRA HELENA DO NASCIMENTO GONÇALVES**

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E EXPRESSÃO DE  
PROTEÍNAS EM SEMENTES DE *Handroanthus*  
*serratifolia* SUBMETIDAS À SECAGEM**

**LAVRAS – MG**

**2013**

**LEANDRA HELENA DO NASCIMENTO GONÇALVES**

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM  
SEMENTES DE *Handroanthus serratifolia* SUBMETIDAS À SECAGEM**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

**LAVRAS - MG**

**2013**

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

Gonçalves, Leandra Helena do Nascimento.

Qualidade fisiológica e expressão de proteínas em sementes de  
*Handroanthus serratifolia* submetidas à secagem / Leandra Helena  
do Nascimento Gonçalves. – Lavras : UFLA, 2013.

70 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Édila Vilela de Rezende Von Pinho.

Bibliografia.

1. Ipê amarelo. 2. Isoenzimas. 3. RTqPCR. 4. Enzimas. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 660.634

**LEANDRA HELENA DO NASCIMENTO GONÇALVES**

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM  
SEMENTES DE *Handroanthus serratifolia* SUBMETIDAS À SECAGEM**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2013.

Dr. João Almir Oliveira                      UFLA

Dr. Antonio Claudio Davide                UFLA

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho  
Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2013**

A Deus, por tudo de bom que me proporciona,

## **OFEREÇO**

Ao meu marido Wellington, companheiro e amigo, que esperou minha demora e suportou minha ausência. Que aceitou calar-se perante minha ira, mas não se privou de falar diante de meus erros. Que fingiu ausentar-se quando eu desejava a solidão e se fez presença alegre nos momentos difíceis. Que soube ser terra quando meus sonhos eram altos demais, e céu quando eu perdia as perspectivas. Que interpretou meus olhos todo o tempo e foi cúmplice em cada atitude. A você que dividiu comigo alegria, choro, sonho e paixão e foi sempre mais do que eu esperava. E ao meu filho, Mateus, a sementinha mais linda que já plantei...

## **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

A minha orientadora, Profa. Édila Vilela de Resende Von Pinho pela grande contribuição na minha formação, por me fazer compreender o verdadeiro sentido da palavra persistência, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação.

A todos do Setor de Sementes, pela constante disponibilidade e contribuição em minha formação profissional e pessoal, em especial aos professores João Almir Oliveira, Renato Mendes Guimarães e Maria Laene Moreira de Carvalho.

Aos membros da banca examinadora, Prof. João Almir Oliveira e Prof. Antônio Cláudio Davide, pelas valiosas contribuições.

Ao Prof. Anderson C. José, que através da sua coorientação contribuiu de forma significativa na condução dos experimentos.

À Sophia Mangussi, Iolanda Vilela, Rucyan Pereira, Luis Otávio, Tiago Oliveira, Manuela Rocha, pela grandiosa colaboração durante a execução dos trabalhos, por todo auxílio e dedicação na condução dos experimentos.

Às amigas Camila e Emanuelle, pela agradável convivência durante esses anos, pela amizade e bons momentos que passamos juntas.

Em especial à Heloísa, pelo conhecimento compartilhado, por não medir esforços, pelo empenho e por todas as horas dedicadas a este trabalho, por ter feito por mim, mais do que eu mesma.

As minhas grandes amigas, Dani e Jú que me apoiaram durante o tempo que estive de volta a Lavras. Ao meu Tio, Geraldo César e ao meu primo Anderson pelo incentivo e exemplo de vida.

E finalmente a minha grande e amada família, meus pais, Newton e Maria Helena por me darem uma base sólida de valores imprecindíveis à vida, minhas irmãs, Andréa e Adriana e meu irmão de coração “Juninho”, pela amizade, companheirismo e apoio. Aos meus sobrinhos por serem alegria constante na minha vida e a todos, primos, primas e tias que transformaram as dificuldades deste período em momentos descontraídos. Muito obrigada por fazerem parte da minha vida.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, MUITO OBRIGADA!

## RESUMO

Sementes de ipê-amarelo são consideradas ortodoxas, e dispõem de alguns mecanismos que auxiliam na tolerância à dessecação, a exemplo de proteínas resistentes ao calor e à presença de sistemas de proteção contra a produção de radicais livres. Para investigar o efeito da secagem na qualidade das sementes de ipê-amarelo coletadas com 28% teor de água utilizou-se dois métodos: secagem lenta (30°C) e secagem rápida (45°C) até atingirem teores de água iguais a 20%, 15%, 10% e 5%. A qualidade das sementes foi avaliada por meio dos testes de germinação, velocidade de germinação, emergência, velocidade de emergência, T50 e teor de água. Foi avaliada a expressão das proteínas resistente ao calor e das enzimas catalase (CAT), esterase (EST) e isocitrato liase. A expressão dos genes *sHSP17.5*, *CAT3* e *ICL6* foi quantificada por meio da técnica de *PCR* em tempo real. Tanto a secagem lenta quanto a rápida foram eficazes para a redução do teor de água, sendo gasto menor tempo na secagem rápida. Maiores valores de germinação e vigor foram obtidos em sementes com teor de água de 20%, submetidas à secagem rápida. Tanto na secagem lenta quanto na rápida, houve a indução de expressão de proteínas resistentes ao calor. Ocorreu variação no padrão eletroforético das enzimas catalase, esterase e isocitrato liase em sementes submetidas aos diferentes tratamentos. A expressão de proteínas em sementes de ipê-amarelo varia em função dos métodos de secagem e teores de água de sementes. A secagem de sementes de ipê-amarelo até os teores de água entre 15 e 10% compromete a qualidade fisiológica das mesmas.

Palavras-chave: Isoenzimas. Enzimas. *RTqPCR*. Ipê-amarelo.

## ABSTRACT

The yellow-ipe seeds are considered orthodox, and have some mechanisms that assist in desiccation tolerance, like heat-resistant proteins and the presence of protective systems against free radical production. For investigate the drying effect on the quality of yellow-ipe seeds collected with 28% water content was used two methods: slow drying (30 °C) and fast drying (45 °C) until water contents equal to 20%, 15%, 10% and 5%. Seed quality was assessed by germination test, speed germination, emergence, speed emergence, T50 and water content. It was assessed the heat-resistant proteins expression and catalase enzymes (CAT), esterase (EST) and isocitrate lyase. The expression genes sHSP17.5, CAT3 and ICL6 were quantified by PCR technique in real time. Both, the slow and fast drying were effective for the water content reduction, and less time spent in fast drying. Higher values of germination and vigor were obtained in seeds with a water content of 20%, subjected to fast drying. Both, the slow and fast drying, there was induction of protein expression resistant to heat. There was variation in the electrophoretic pattern of the catalase enzymes, esterase and isocitrate lyase in seeds subjected to different treatments. The proteins expression in yellow-ipe seeds varies depending on methods of drying and water content of seeds. The drying of yellow-ipe seeds until the water content between 15 and 10% compromises the physiological quality of them.

Keywords: Isoenzymes. Enzymes. RTqPCR. Yellow-ipe.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	12
2.1	Importância e características do ipê-amarelo .....	12
2.2	Desenvolvimento e qualidade de sementes .....	13
2.3	Tolerância de sementes à dessecação .....	14
2.4	Estudos de expressão gênica .....	19
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	23
3.1	Local e materiais .....	23
3.2	Teste de germinação .....	24
3.3	Índice de velocidade de germinação .....	25
3.4	Teste de emergência de plântulas .....	25
3.5	Tempo médio para ocorrência de 50% de germinação e emergência .....	26
3.6	Análise estatística .....	27
3.7	Avaliação de proteínas resistente ao calor .....	27
3.8	Avaliação da expressão das enzimas catalase, esterase e isocitrato liase .....	28
3.9	Análise da expressão de proteínas por meio da técnica de <i>qRT-PCR</i> .....	28
3.10	Extração e purificação do <i>RNA</i> .....	29
3.10.1	Transcrição reversa para síntese do <i>cDNA</i> .....	29
3.10.2	Desenho dos <i>primers</i> .....	30
3.10.3	<i>PCR</i> em tempo real .....	31
3.10.4	Análise dos resultados .....	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
4.1	Avaliação dos testes físicos e fisiológicos .....	33
4.2	Análise de proteínas resistentes ao calor .....	40
4.3	Análise de enzimas .....	42
4.3.1	Expressão da enzima catalase .....	42
4.3.2	Expressão da enzima esterase .....	44
4.3.3	Expressão da enzima isocitrato liase .....	47
4.4	Expressão gênica avaliada pela técnica de <i>RTqPCR</i> .....	48
5	CONCLUSÕES .....	56
	REFERÊNCIAS .....	57
	ANEXOS .....	70

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, *Handroanthus serratifolia* tem sido estudada por ser uma espécie de alto valor econômico, ornamental, medicinal e ambiental. A propagação de *H. serratifolia* é feita por sementes, que são produzidas em grande quantidade, porém, sua exploração indiscriminada tem levado à diminuição de populações dessa espécie.

Nesse contexto, a produção de sementes de ipê-amarelo com alta qualidade é importante para a formação de mudas para reflorestamento, arborização urbana, produção de madeira, entre outras aplicações.

As sementes de *H. serratifolia* são consideradas ortodoxas, ou seja, apresentam tolerância à dessecação, podendo ser desidratadas para o armazenamento, embora apresentem nessas condições, variações na porcentagem de germinação.

A tolerância à dessecação tem sido atribuída a um conjunto de mecanismos que envolvem dentre vários fatores a síntese de açúcares, presença de sistemas de proteção contra a produção de radicais livres durante a dessecação e a produção de proteínas resistentes ao calor.

A resposta à desidratação de sementes ortodoxas é influenciada pela taxa de secagem, assim como a tolerância à dessecação de tecidos vegetativos. Maior tolerância à dessecação das sementes é observada na secagem lenta, presumivelmente devido ao tempo concedido para a indução e operação dos mecanismos de proteção. A secagem rápida impede os processos de recuperação, sendo necessário mais tempo para os reparos na reidratação.

A expressão de proteínas resistentes ao calor de diversas classes tem sido um dos mecanismos mais estudados na adaptação dos organismos à condição de estresse. Essas proteínas são altamente conservadas e participam de vários processos celulares em diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento,

a exemplo do grupo de proteínas conhecidas como *LEA* (*Late Embryogenesis Abundant*) que são codificadas por genes expressos durante as fases de maturação e secagem de sementes.

Estudos relacionados ao mecanismo de tolerância à dessecação em sementes florestais, em nível molecular são escassos. Por meio de técnicas moleculares é possível o entendimento de características bioquímicas associadas à tolerância à dessecação e a qualidade de sementes.

Dessa forma, o estudo da expressão gênica em sementes submetidas a diferentes métodos de secagem, é importante na busca de novas tecnologias, visando à produção de sementes de alta qualidade.

Sendo assim, objetivou-se na presente pesquisa avaliar a qualidade fisiológica e expressão de proteínas em sementes de *Handroanthus serratifolia* submetidas à secagem.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Importância e características do ipê-amarelo

O ipê-amarelo, também conhecido como, pau-d'arco-amarelo, piúva-amarela, ipê- ovo-de-macuco, tamurá-tuíra, ipê-pardo, ipê-do-cerrado e opa, é uma espécie arbórea pertencente à família *Bignoniaceae*. Durante algum tempo, os ipês foram classificados no gênero *Tabebuia*, porém estudos de filogenia molecular realizados por Olmstead e Grose (2007), incluíram essas espécies em *Handroanthus* sp, sendo agora *Handroanthus serratifolia* o nome científico para o ipê-amarelo antes chamado *Tabebuia serratifolia*.

O ipê-amarelo possui interesse econômico madeireiro, ornamental e medicinal. A madeira é empregada em marcenaria, construções pesadas e estruturas externas, tanto civis quanto navais. A exuberância durante o florescimento faz com que essa espécie seja utilizada na arborização de ruas, praças, parques e avenidas (LORENZI, 2008).

Sendo o ipê-amarelo uma árvore do tipo caducifólia, sua folhagem é renovada anualmente; as folhas caem no inverno e aparecem logo após a floração, que ocorre no período de julho a outubro. Os frutos amadurecem no período de outubro a dezembro, produzindo grande quantidade de sementes leves e aladas, que são dispersas rapidamente (LORENZI, 1992).

Várias espécies do gênero *Tabebuia* contêm na casca e no cerne do caule quantidades variáveis do lapachol, e outras substâncias similares, dotadas de forte atividade bactericida (PARK et al., 2005), fungicida (PORTILLO et al., 2001), antiofídica (NÚÑEZ et al., 2004) e antitumoral (CHENNA et al., 2001).

Há dificuldades no processo de obtenção das sementes do ipê-amarelo, *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nich., em virtude das características morfológicas, pois trata-se de uma árvore que mede até cerca de 25 m de altura, tronco ereto e

cilíndrico, de 60-80 cm de diâmetro, frutos deiscentes com sementes aladas, ocorrendo anos de baixa ou nenhuma produção de sementes. O curto período de viabilidade das sementes e sua floração anual são também fatores que limitam a manutenção de sementes, o que, conseqüentemente, limita a produção de mudas em viveiros em diferentes épocas do ano (SOUZA et al., 2005).

## 2.2 Desenvolvimento e qualidade de sementes

O processo de desenvolvimento ou maturação de sementes é controlado geneticamente e envolve uma seqüência ordenada de alterações morfológicas, físicas, fisiológicas e bioquímicas que ocorrem a partir da fecundação do óvulo e prosseguem até o momento em que as sementes se desligam fisiologicamente da planta, ou seja, quando atingem a maturidade fisiológica (BELTRATI; PAOLI, 2003).

Em *Tabebuia serratifolia* a maturidade fisiológica das sementes é alcançada aos 53 dias após a antese, com teor de água em torno de 30% coincidindo com o acúmulo máximo de matéria seca, germinação e índice de velocidade de germinação, além de decréscimo no teor de polifenóis e maior expressão de proteínas resistentes ao calor e ao início da abertura dos frutos (CARVALHO et al., 2008).

O desenvolvimento das sementes ortodoxas é geralmente separado em três estágios distintos, sendo o estágio I correspondente à histodiferenciação, onde ocorre a formação do eixo embrionário, cotilédone (s) e o endosperma triploide. No estágio II, há expansão celular, deposição de reservas nas células e alterações nas membranas. O acúmulo de matéria seca é intensificado a seguir, inclusive com a produção de proteínas do tipo *LEA - Late Embryogenesis Abundant*, até atingir o valor máximo, iniciando-se lentamente a desidratação, concomitante ao acúmulo de reservas. O estágio III corresponde à secagem até

que as sementes atinjam o ponto de equilíbrio com a umidade relativa do ar. Em espécies ortodoxas, essa etapa é caracterizada pela desidratação máxima da semente, paralelamente à redução dos níveis de ácido abscísico e organização do sistema de membranas (MARCOS FILHO, 2005).

Em espécies florestais nativas é comum a ocorrência de sementes com baixa longevidade natural, como foi observado por Silva et al. (2011) em sementes de *T. serratifolia* que quando armazenadas em condição ambiental, sujeitas às variações nos teores de água e temperatura, obtiveram germinação nula aos nove meses. Sabe-se que a secagem quando avaliadas as peculiaridades das espécies, pode aumentar o potencial de armazenabilidade de sementes. Ressalta-se que sementes de ipê são classificadas como ortodoxas, pois toleram a dessecação.

### **2.3 Tolerância de sementes à dessecação**

A tolerância à dessecação pode ser definida como a capacidade das sementes de sobreviverem à remoção de parte da água celular sem provocar danos irreversíveis, permitindo a sobrevivência em condições extremas do ambiente e a permanência em um estado de animação suspensa durante longos períodos de tempo (LEPRINCE; BUITINK, 2010). Acredita-se que a tolerância à dessecação não pode ser atribuída a um simples mecanismo de proteção; ao contrário, parece ser um fenômeno multifatorial em que cada componente é igualmente crítico, agindo em sinergismo e controlado pelo genoma (LEPRINCE; HENDRY; McKERSIE, 1993).

De acordo com Roberts (1973), as sementes podem apresentar dois tipos de comportamento distintos em relação à tolerância à dessecação. As sementes ortodoxas (anidrobióticas) são aquelas que podem ser desidratadas até o valor final de cerca de 5% de água e armazenadas a -18°C. Hoekstra, Golovina e

Buitink (2001) designaram como anidrobióticas as sementes que apresentam elevado grau de sobrevivência em ambientes sem a presença de água.

As sementes recalcitrantes (não anidrobióticas), em contraste às ortodoxas, não passam por um período de secagem durante seu desenvolvimento, sendo dispersas com grau elevado de umidade, uma vez que são sensíveis à dessecação, tanto antes como após a dispersão e, portanto, têm longevidade muito limitada. Além disso, muitas sementes recalcitrantes, particularmente as de origem tropical, são também sensíveis a baixas temperaturas, não podendo ser armazenadas abaixo de 15°C (PAMMENTER; BERJAK, 1999).

Uma terceira categoria de sementes, denominada “intermediária” foi proposta por Ellis, Hong e Roberts (1990). Tais sementes se caracterizam pelo comportamento intermediário pós-dispersão, isto é, são relativamente tolerantes à dessecação, mas não suportam a remoção de água a níveis tão baixos quanto às sementes ortodoxas, podendo geralmente ser armazenadas por períodos de tempo intermediários.

As sementes de *Tabebuia serratifolia* não apresentam dormência e são consideradas ortodoxas, ou seja, toleram à dessecação a baixos teores de água (3% a 7%), sem danos a sua viabilidade, o que permite o seu armazenamento em câmaras frias com temperaturas abaixo de zero (DEGAN et al., 2001).

As sementes ortodoxas geralmente não só toleram a dessecação, mas provavelmente, dependem dela para redirecionar os processos metabólicos do desenvolvimento em direção à germinação. Essas diferenças no comportamento das sementes podem ser consideradas como resultado do processo de seleção natural, em concordância com as condições do meio em que as espécies evoluíram. O baixo teor de água das sementes, nesse caso, além de limitar a germinação é fundamental para reduzir a deterioração das mesmas (GEMAQUE et al., 2005). A tolerância à dessecação dessas sementes em relação às

recalcitrantes é uma característica vantajosa e muito bem empregada pelo homem no armazenamento das sementes.

A habilidade das células de sementes ortodoxas sobreviverem à dessecação e envolve a síntese de proteínas conhecidas como *LEA*, produzidas na embriogênese tardia, o acúmulo de açúcares solúveis e a presença de antioxidantes, que permitem que o citoplasma atinja o chamado estado vítreo (BERJAK, 2006).

Estresses abióticos geralmente causam disfunção em proteínas e enzimas. As chaperonas moleculares têm como função auxiliar no dobramento de cadeias polipeptídicas nascentes, no redobrimento de proteínas desnaturadas e prevenir a agregação de partes proteicas, cujas superfícies hidrofóbicas estão expostas, o que prejudica o dobramento, contribuindo assim para a homeostase celular em condições de seca. Muitas chaperonas moleculares são proteínas envolvidas na resposta a estresses e muitas delas foram originalmente identificadas como *HSPs* (“*Heat-Shock Proteins*”) (LINDQUIST; CRAIG, 1988). As principais famílias de *HSPs*/chaperonas reconhecidas são: *HSP70*, chaperoninas, *HSP90*, *HSP100* e *sHSP* (“*small*” *HSP*). As diferentes classes de *HSPs*/chaperonas cooperam na proteção celular e apresentam complementaridade e algumas vezes sobreposição de funções na proteção de proteínas contra o estresse (WANG; VINOGRAD; ALTMAN, 2004).

O grupo de proteínas chamadas *LEA*, como o próprio nome sugere são acumuladas em sementes durante a fase de maturação, quando é requerida a tolerância à dessecação (CLOSE, 1996). Diversos estudos têm demonstrado que as proteínas *LEA* também se acumulam em tecidos vegetativos durante períodos de seca, o que reforça a função dessas proteínas na proteção contra a dessecação (PORCEL et al., 2005). Essas proteínas apresentam compostos como glicina e outros aminoácidos hidrofílicos, capazes de permanecer solúveis a elevadas temperaturas, seu tamanho pode variar de 8 a 77 KDa e podem ou não

apresentar carga. Quando em solução aquosa, são intrinsecamente desestruturadas, porém têm a habilidade de se tornarem mais ordenadas e estáveis ao longo do processo de desidratação (HAND et al., 2011). Durante a desidratação celular, essas proteínas representam uma importante função na manutenção estrutural de outras proteínas, vesículas, endomembranas, e no sequestro de íons, como o cálcio, na retenção de água, e como chaperonas moleculares (CLOSE, 1996).

Algumas proteínas *LEA* têm a capacidade de estabilizar enzimas sob condições de estresse, como a lactato desidrogenase, malato desidrogenase, fumarase, redonase, catalase e citrato sintetase (HUNDERTMARK; HINCHA, 2008).

O processo de dessecação induz à acumulação de espécies de radicais livres associadas à peroxidação de lipídeos (NTULI et al., 2011). De acordo com Dat et al. (1998) o estresse causado por calor estimula a geração de  $H_2O_2$  em plantas levando ao acúmulo de EROs (Espécies Reativas ao Oxigênio). Em estudos recentes tem sido observado que a perda da viabilidade de sementes durante a secagem é acompanhada por um aumento na peroxidação de lipídeos e acúmulo de radicais livres, sendo necessária uma eficiente atividade da catalase. A enzima CAT possui a função de eliminar o  $H_2O_2$  produzido na fotorrespiração e na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. Durante o estresse oxidativo os peroxissomos aumentam em quantidade e assim maior quantidade CAT fica disponível para combater o aumento na produção de EROs (MITTLER, 2002).

Outro grupo importante na manutenção da qualidade de sementes, segundo Aung e McDonald (1995), são as esterases. Esse grande grupo de enzimas hidrolíticas libera ácidos graxos dos lipídeos, os quais são usados na  $\beta$ -oxidação, como fonte de energia para os eventos germinativos.

Considerando que as sementes nem sempre são coletadas com teores de água compatíveis com os exigidos para o seu armazenamento, a secagem torna-se uma operação importante.

A suscetibilidade das sementes aos danos por secagem é função das condições de secagem, uma vez que as partes vitais do eixo embrionário (radícula, hipocótilo e plúmula) estão situadas sob um tegumento pouco espesso, que praticamente não lhe oferece proteção (FRANÇA NETO; HENNING, 1984). Em função desses fatores, as sementes respondem diferentemente ao processo de secagem, ou seja, à temperatura, ao tempo de exposição a ela e à velocidade de secagem (ROSA, 2000).

O fluxo de ar é um fator importante a ser considerado, particularmente na secagem com ar aquecido, fluxos inferiores a  $6 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{t}^{-1}$  podem prolongar excessivamente o tempo de secagem, enquanto que acima de  $20 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{t}^{-1}$ , podem tornar o processo antieconômico (VILELA; PESKE, 2003; NEVES et al., 2005).

Embora a secagem lenta em estágio apropriado pareça acentuar a capacidade germinativa, existem outros fatores que poderiam inibi-la, como baixos potenciais hídricos, altas concentrações de ABA, tecidos que circundam o embrião, impossibilitando, assim, a avaliação da tolerância à dessecação pela capacidade germinativa (LEPRINCE; HENDRY; McKERSIE, 1993).

Sementes secadas lentamente, por vários dias, continuam a metabolizar e desenvolver-se até que um nível crítico de teor de água seja alcançado, conseqüentemente, a tolerância à dessecação pode aumentar durante esse lento processo de secagem e sua avaliação não corresponderá ao estágio de desenvolvimento em que se encontrava a semente antes do início da secagem. Embora a secagem lenta seja utilizada como um método para simular a dessecação tal qual ocorre na maturação, a secagem rápida é a forma mais

adequada para avaliar o grau de tolerância à dessecação em um estágio específico do desenvolvimento (PAMMENTER et al., 1991).

Por meio de estudos de expressão de genes relacionados ao processo de tolerância à dessecação é possível avaliar métodos de secagem e associá-los à qualidade fisiológica de sementes.

#### **2.4 Estudos de expressão gênica**

O rápido desenvolvimento das tecnologias de genômica tem gerado expectativas sobre o conhecimento de vias regulatórias e genes que controlam a tolerância à dessecação. Por meio da compreensão desses mecanismos espera-se benefícios como a produção de culturas mais tolerantes a estresses abióticos e ferramentas para melhor preservar a biodiversidade genética *ex situ*.

Os projetos Genoma estão tendo um papel essencial no conhecimento da estrutura do genoma de várias espécies, entretanto, a simples informação de todas as sequências de bases que compõe um genoma não garante a revelação da função e dos mecanismos de controle da expressão de todos os genes presentes no organismo.

A variação da regulação gênica mostra-se um mecanismo importante em sementes, em função da complexidade dos fatores que interferem na qualidade das mesmas.

Muitos eventos relacionados ao crescimento, desenvolvimento de plantas ou até mesmo em resposta a vários estímulos são resultantes da alteração na expressão gênica. A determinação qualitativa e quantitativa dos níveis de transcritos de células vegetais permite que genes, diferencialmente expressos possam ser identificados, e conseqüentemente, sua função metabólica pode ser investigada (KUHN et al., 2001).

Uma importante aplicação desses estudos relata a identificação de genes de estresses induzidos que podem revelar funções essenciais ou importantes com um efeito na tolerância ou nas reações de defesa contra a perda de água (TALAMÈ et al., 2007).

Os mecanismos moleculares de resposta à dessecação começam com a percepção do sinal de estresse (XIONG; SCHUMAKER; ZHU, 2002). Os modelos de percepção estabelecidos para vegetais superiores sugerem algumas hipóteses para o início da sinalização em nível molecular. Alterações na conformação de membranas celulares devido à perda de turgor provocariam mudanças em canais de transporte ativados por pressão, modificações na conformação ou na justaposição de proteínas sensoriais, embebidas nas membranas celulares, ou alterações na continuidade entre a parede celular e a membrana plasmática (NEPOMUCENO et al., 2001).

Devido à perda de pressão da parede, complexos enzimáticos ativados pelas alterações mencionadas, iniciariam uma série de eventos moleculares levando a indução da expressão de várias categorias de genes (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007). 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 *LEA*, osmoprotetores e o segundo grupo estaria envolvido nos mecanismos de sinalização e de regulação da expressão gênica muito bem representado por fatores de transcrição (BRAY, 2004).

Os organismos, quando submetidos à temperatura elevada, reagem a esse estresse, induzindo a expressão de genes, que na sua maioria interrompem ou atenuam a sua expressão. Um grupo específico de genes, chamado *HS* genes

(*heat shock*), é rapidamente induzido em níveis elevados sob condições de estresse (GURLEY, 2000).

Os mecanismos de defesa envolvidos no processo de tolerância à dessecação parecem ser muito similares em todo reino vegetal, o que indica ocorrência de etapas comuns nas rotas de sinalização molecular (KASUGA et al., 2004; LAN et al., 2005). Portanto, estudos que vêm sendo desenvolvidos em espécies modelos, como *Arabidopsis* e tabaco, na tolerância à dessecação ou em outros tipos de estresses, podem auxiliar na identificação de genes com função-chave nos mecanismos de defesa em várias espécies.

De acordo com Santos (2010) o método utilizado para realizar a secagem pode influenciar a expressão de genes associados ao processo oxidativo, a exemplo de genes que codificam a enzima catalase.

O desenvolvimento de técnicas como a *PCR* quantitativo em tempo real (*RT-qPCR*), permite a quantificação dos níveis de *RNA*m de genes de interesse em diferentes condições (BUSTIN, 2002).

O *qPCR* difere da *PCR* convencional pela mensuração do produto da *PCR* amplificado em cada ciclo da reação. Na prática, uma câmera de vídeo grava a luz emitida por sondas fluorogênicas ou por agentes intercalantes de fitas duplas de *DNA*, como o *SYBR Green*, que é incorporado dentro dos novos produtos amplificados. Assim, o *qPCR* permite que a amplificação seja acompanhada em tempo real, durante a fase exponencial da corrida, fazendo com que a quantidade de material inicial seja determinada precisamente. Comparado com outras técnicas, essa permite a detecção de um dado ácido nucleico alvo de maneira rápida, específica e muito sensível (GACHON; SAINDRENAN, 2004).

A quantificação é a característica mais importante do *qPCR*. A quantificação absoluta é calculada com auxílio de uma curva padrão. A quantificação relativa pode ser deduzida considerando diferenças de *Ct* (*cicle*

*threshold*) entre as amostras e padrões de expressão constitutiva (BUSTIN, 2000). Comparada com o *PCR* clássico, uma das principais vantagens do *qPCR* é a rapidez em fornecer dados confiáveis. É altamente sensível na detecção de *DNA* ou *RNA* devido à combinação de amplificação realizada pelo passo de *PCR* e o sistema de detecção. Em qualquer caso a especificidade do processo pode ser checada depois da completa corrida de *PCR*, por gel de eletroforese, curva de dissociação e dados de sequenciamento. É uma técnica muito conveniente para estudos com limitada quantidade de material inicial ou para avaliar a expressão de um grande número de genes com quantidades mínimas de *RNA* (FREEMAN; WALKER; VRANA, 1999).

Nas reações de *RT-qPCR*, para análise de quantificação relativa é necessário utilizar um gene normalizador, que deve ser um gene constitutivo e não variar diante das condições experimentais, como por exemplo, *mal8S*, *b-actina*, *tubulina* e *gapdh*, que serve para normalizar os dados da reação (WALL; EDWARDS, 2002).

A expressão relativa do gene em estudo é determinada por comparação com a expressão de um ou mais genes constitutivos, ou seja, genes necessários à manutenção da célula, cuja expressão gênica não deverá variar significativamente nem entre células de diferentes tecidos nem com as condições experimentais. No entanto, estudos demonstram que a expressão dos genes constitutivos pode, de fato, variar em parte porque podem desempenhar na célula outras funções para além das relacionadas com o metabolismo basal (JAIN et al., 2006).

Na pesquisa básica, o *qPCR* tem sido amplamente empregado na quantificação de transcritos específicos (*RT-qPCR*), na análise de famílias multigênicas. Diante do exposto a técnica de *PCR* em tempo real pode ser utilizada para se estudar a expressão de genes associados à qualidade fisiológica das sementes, a exemplo dos envolvidos na tolerância à dessecação.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local e materiais

A pesquisa foi realizada no viveiro de espécies florestais do Departamento de Ciências Florestais e no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. Essa região apresenta clima tipo Cwb da classificação de Koppen. A temperatura média anual é de 19,4°C e a pluviosidade se distribui, principalmente de outubro a abril, com valores anuais de 1529,7 mm.

Os frutos de ipê-amarelo foram coletados de 13 árvores localizadas no *campus* da Universidade Federal de Lavras (UFLA), após iniciarem a deiscência. A coleta foi realizada com auxílio de um podão e os frutos amparados sobre lona plástica, de forma a não ter contato com o solo. As sementes foram removidas manualmente pela secção longitudinal e ligeira torção dos frutos e homogeneizadas em saco de aniagem, formando um lote único.

Após extração das sementes, o teor de água inicial foi avaliado pelo método de estufa a  $105\pm 3^{\circ}\text{C}$  por 17 horas (BRASIL, 2009).

As sementes foram secadas em secadores experimentais, regulados à 30°C, secagem lenta e 45°C, secagem rápida. Cada secador constitui-se de uma base, quatro gavetas empilháveis dotadas de encaixes especiais e um tampo. Cada base, de 61 x 61 x 61 cm, abriga um conjunto de resistências elétricas, fonte de calor, com capacidade de 3400kW, cuja temperatura é controlada por um termostato industrial microprocessado, marca Digimec, modelo BTC-9090. Do lado externo da base, existe um ventilador centrífugo, ligado a um motor de 0,25kW, 115V, capaz de elevar 196 litros/segundo a 7,6 cm de pressão estática. Cada gaveta possui dimensão de 61 x 61 x 15,2 cm e a sua base é constituída de

uma malha de ferro que permite a livre passagem do ar de secagem. O fluxo de ar de aproximadamente  $15 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{t}^{-1}$ , foi ajustado por meio de uma porta graduada deslizável e fixada na entrada. Os teores de água foram monitorados pela equação  $mf = mi(100-tai)/(100-taf)$ , onde  $mf$  é a massa final das sementes necessária para alcançar o teor de água final esperado ( $taf$ ). A massa inicial e o teor de água inicial antes da secagem são representados por  $mi$  e  $tai$ , respectivamente. Durante o processo de secagem as sementes foram revolvidas e a secagem foi interrompida quando as sementes atingiram os teores de água de 20%; 15%; 10% e 5%. Como testemunha foi utilizada sementes sem secagem, com teor de água 28%. O teor de água das sementes de todas as amostras foi confirmado pelo método estufa a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  por 17 horas (BRASIL, 2009).

A qualidade das sementes submetidas aos diferentes métodos de secagem foi avaliada por meio de testes de germinação e vigor e teor de água. Foi avaliado ainda o padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor e das enzimas catalase (CAT), esterase e isocitrato liase. Também foi avaliada a expressão dos genes *sHSP17.5*, isocitrato liase (*ICL6*), catalase (*CAT3*) por meio de *PCR* em tempo real.

Para a avaliação da expressão dos genes foi retirada uma amostra antes do processo de secagem que constitui a testemunha e durante o processo de secagem, foram retiradas amostras quando as sementes atingiam 20%, 15%, 10% e 5% de teor de água sob secagens lenta e rápida. As sementes foram armazenadas em “*deep freezer*” a  $-86^\circ\text{C}$ , até a realização das análises de proteínas e isoenzimáticas.

### **3.2 Teste de germinação**

Realizou-se o teste de germinação com oito repetições de 25 sementes por tratamento distribuídas uniformemente, tendo como substrato papel do tipo

germitest, na forma de rolo, umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes seu peso. Os rolos foram mantidos em germinador com temperatura regulada para 25°C. As contagens foram efetuadas aos sete (Germinação aos sete dias) e 14 dias após a sementeira, sendo efetuadas as avaliações da protrusão radicular (emissão de radícula).

### **3.3 Índice de velocidade de germinação**

O índice de velocidade de germinação foi avaliado juntamente com o teste de germinação, sendo as avaliações realizadas de 3 em 3 dias a partir do dia em que surgiram as primeiras plântulas normais no teste de germinação. O índice de velocidade de germinação foi calculado segundo a expressão proposta por Edmond & Drapala (1958).

### **3.4 Teste de emergência de plântulas**

Para a avaliação da emergência de plântula foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes distribuídas em bandejas contendo areia esterilizada. As bandejas foram mantidas em sala de crescimento a 30 °C e as avaliações foram diariamente a partir do início da emergência de plântulas, computando-se o número de plântulas emersas até a estabilização do estande. Foram consideradas emersas as plântulas com as folhas cotiledonares acima do solo. Para o cálculo do índice de velocidade de emergência, utilizou-se a fórmula proposta por Edmond & Drapala (1958):

$$VE = \frac{(N_1 E_1) + (N_2 E_2) + \dots + (N_n E_n)}{E_1 + E_2 + \dots + E_n}$$

Em que:

VE = velocidade de emergência (em dias);

$E_1, E_2, E_n$  = número de plantas normais emergidas na primeira, segunda e última contagem;

$N_1, N_2, N_n$  = número de dias da primeira, segunda e última contagem, em relação à sementeira.

Também foi realizada a avaliação da emergência de plântulas em condições ambientais, utilizando-se quatro repetições de 50 sementes distribuídas em canteiros, sendo realizadas avaliações diárias a partir do início da emergência de plântulas até a estabilização.

### 3.5 Tempo médio para ocorrência de 50% de germinação e emergência

O T<sub>50</sub> foi realizado juntamente com as testes de germinação e emergência, de acordo com a fórmula adotada por Guimarães (2000):

$$T_{50} = [(G - G_1) I / G_2 - G_1] + T$$

Em que:

T<sub>50</sub> = tempo para a ocorrência de 50% da germinação;

G = metade do valor máximo de germinação;

G<sub>1</sub> = valor de germinação igual ou imediatamente inferior a G;

G<sub>2</sub> = valor de germinação imediatamente superior a G;

I = intervalo entre as contagens;

T = tempo para a ocorrência de G<sub>1</sub>.

### 3.6 Análise estatística

Para a análise dos resultados das avaliações da qualidade fisiológica foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial [(2x4) + controle] sendo, dois métodos de secagem (secagem lenta, 30°C e secagem rápida 45°C), quatro teores de água de sementes (20%, 15% , 10% e 5%) e o controle (Adicional) com 28% de teor de água. Utilizou-se o *software Assistat* Versão 7.5 Beta (FERREIRA, 2000) e as médias foram comparadas pelo teste de *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade. Por meio do mesmo *software*, utilizou-se o teste de *Dunnantt* para a comparação das médias da interação entre cada fator com a média das testemunhas também a 5% de probabilidade.

### 3.7 Avaliação de proteínas resistente ao calor

As sementes foram pesadas (100mg) com as asas e maceradas sem asas em almofariz, com nitrogênio líquido, colocadas em microtubos de 2 mL com 1800 µL de tampão de extração (50 mM tris-HCl-7,5; 500 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> , 1 mM PMSF) e agitadas em Vortex. O homogeneizado foi centrifugado a 14 000 rpm por 20 minutos a 4° C e o sobrenadante incubado em banho-maria a 80°C, por 10 minutos e novamente centrifugado. O sobrenadante foi vertido em microtubos e o *pellet* descartado. Para confecção do gel de eletroforese foram aplicados 60µL poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). Antes da aplicação no gel, foram adicionados aos tubos de amostra contendo 100 µL de extrato mais 57 µL de solução tampão da amostra (2,5mL de glicerol, 0,46g de SDS, 20mg de azul bromofenol e completado o volume para 20 mL de tampão de extração) e em seguida colocados em banho-maria com água em ebulição por 5 minutos. A corrida eletroforética foi realizada a 150V, por cerca de 6 horas. Após a migração eletroforética, os géis foram

corados em *coomassie blue* a 0,05%, conforme descrito por Alfenas et al. (1991), durante 18 horas e descorados em solução de ácido acético 10%.

### **3.8 Avaliação da expressão das enzimas catalase, esterase e isocitrato liase**

Para análise eletroforética das enzimas catalase, esterase e isocitrato liase as sementes foram trituradas na presença de PVP e nitrogênio líquido em cadinho de porcelana sobre gelo e posteriormente as amostras foram armazenadas à temperatura de -86°C.

Para a extração das enzimas, foi utilizado o tampão Tris HCL 0,2M pH 8,0 + (0,1% de mercaptoetanol), na proporção de 250µL por 100mg de sementes. O material foi homogeneizado em vortex e mantido *overnight*, em geladeira, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos, a 4°C.

A corrida eletroforética foi realizada em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 60 µL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética efetuada a 120 V por 5 horas.

Terminada a corrida, os géis foram revelados para as enzimas catalase, esterase e isocitrato liase, conforme Alfenas et al. (2006), com modificações.

### **3.9 Análise da expressão de proteínas por meio da técnica de *qRT-PCR***

A expressão de proteínas por meio da técnica de *qRT-PCR* foi dividida em quatro etapas: Extração e Purificação do *RNA*, Transcrição reversa para síntese do *cDNA*, *PCR* em tempo real, e análise dos resultados dos genes *sHSP17.5*, *ISO6* e *CAT3*.

### 3.10 Extração e purificação do RNA

Para a extração do RNA das sementes sem secagem (28%) e secas à 30°C e 45°C e com teores de água de 20%, 15%, 10% e 5%, foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e com a adição do reagente *Pure Link RNA Plant*<sup>®</sup> (*Invitrogen*), seguindo as especificações do manual do fabricante.

A integridade e pureza do RNA foram avaliadas em todas as etapas com a utilização da eletroforese em gel de agarose desnaturante (corados com SYBR<sup>®</sup> *Green II*, *Applied Biosystems*) e em espectrofotômetro (*NanoVue*). Foram separadas alíquotas para evitar o descongelamento diário do RNA estoque, evitando a sua degradação e contaminação.

Após as extrações dos ácidos nucleicos, as amostras foram tratadas com *DNase Free* para evitar qualquer contaminação com DNA. Para isso foi utilizado o *Kit DNase Turbo Free*<sup>®</sup> *AMBIOM* de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante.

Para comprovar a eficiência do tratamento com *DNase* foi realizada uma reação de *PCR* convencional. Como controle positivo foi utilizado uma amostra de DNA genômico de ipê. O *primer* utilizado foi o correspondente ao gene constitutivo 18s. Foi preparado um gel de agarose 1,5% e corado com brometo de etídeo para visualização das possíveis ampliações.

#### 3.10.1 Transcrição reversa para síntese do cDNA

Após o processo de extração e purificação, os RNAm foram utilizados como molde para a síntese de cDNA. Foi utilizado *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription cDNA*<sup>®</sup> da *Applied Biosystems*, segundo protocolo recomendado pelo fabricante. A eficiência da síntese de cDNA foi comprovada por meio de *PCR* convencional. Como controle positivo foi utilizada uma

amostra de *DNA* genômico de ipê, e utilizado o *primer* correspondente ao gene constitutivo 18s. Foi preparado um gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo para visualização das ampliações.

### 3.10.2 Desenho dos *primers*

Os genes-alvo foram baseados em diferentes proteínas, escolhidos por sua importância conhecida no processo de germinação e secagem em sementes, após revisão bibliográfica.

As sequências dos genes-alvo escolhidos foram encontradas por meio de busca no banco de dados no *GenBank*. Com base nessas sequências foram desenhados os *primers* utilizando-se o *software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems)*. As sequências dos *primers* estão representadas na Tabela 1. Foram utilizados como controle endógeno os genes da 18s e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).

Tabela 1 *Primers* utilizados na análise de *qRT-PCR*

<b>Gene</b>		<b>Sequência 5'-----3'</b>
<i>Small heat shock proteins (sHSP17.5)</i>	F	AGGGCTGAAGAAAGAGAAAGTCAGG
	R	TTTCCATCGCTGCCTTCACG
Isocitrato liase (ISO6)	F	GGGCATGAGCCGTGAAGA
	R	CAATGATGGGCTTCAAGTAATCAA
Catalase (CAT3)	F	TGACTGCCACACGATCATCTTC
	R	CGGGAGGCAGTGGGAAA
18s	F	TGACGGAGAATTAGGGTTCG
	R	CCTCCAATGGATCCTCGTTA
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)	F	ATGATGATGTGAAAGCAGCG
	R	TTTCAACTGGTGGCTGCTAC

(F) sequência do *primer forward* e (R) sequência do *primer reverse*

### 3.10.3 PCR em tempo real

A *qRT-PCR* foi realizada em aparelho de *real-time PCR Sistem 7500* (*Applied Biosystems*) utilizando o SYBR® *Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*) e as amostras de *cDNA* sintetizadas a partir do *RNA* extraído. As condições térmicas da reação foram 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, e finalizadas com 15 segundos a 95°C. Os dados foram coletados e armazenados no programa *7500 Fast Software* (Versão 2.1). Para cada reação, foram utilizados 1,0 µL de *cDNA*, 0,2 µL de cada *primer* e 5,0 µL de *Master Mix SYBR green UDG* com ROX (*Invitrogen*) para um volume final 10,0 µL/amostra. Controles negativos, compostos por água, e controles endógenos foram incluídos em todas as análises. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

A coleta de dados foi realizada por meio do *software* v. 2.0.1, do sistema *7500 de PCR em tempo real* (*Applied Biosystems*). Foi utilizado o método *Ct* comparativo para quantificação relativa, onde os *Ct's* (*Ciclo threshold*) das amostras foram normalizados usando os *Ct's* dos controles endógenos. Para isso, previamente foi realizado um experimento de validação, a fim de verificar que as eficiências de amplificação dos genes-alvo e endógenos são similares e próximas de 100%. As curvas padrão, para o teste de eficiência, para os genes em estudo foram geradas a partir das seguintes diluições: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 e 1:3125. Esse procedimento também permitiu a definição da melhor diluição do *cDNA* para ser utilizada em cada reação, que foi de 1:5.

### 3.10.4 Análise dos resultados

As amostras correspondentes às sementes não submetidas à secagem foram consideradas como sendo amostras calibradoras. Para a quantificação da

expressão gênica pela técnica de *PCR* em tempo real, os valores obtidos correspondentes aos níveis de *mRNA's* das amostras foram comparados relativamente aos valores dos níveis de *mRNA's* dos controles. Os dados brutos foram analisados por meio do programa *7500 Software SDS* (Versão 2.0.1). Para calcular o nível de expressão dos genes de interesse foram considerados: *Ct* (aumento exponencial do produto de *PCR*) do gene-alvo e controle endógeno,  $\Delta Ct = Ct \text{ (amostra)} - Ct \text{ (controle endógeno)}$  e o  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (amostra)} - \Delta Ct \text{ (calibrador)}$ . Em seguida o nível de expressão foi calculado pela fórmula:  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação dos testes físicos e fisiológicos

O teor de água das sementes no final do processo de secagem e o tempo gasto nessa operação são representados na Tabela 2. Para os métodos de secagem lenta e rápida, a secagem das sementes foi realizada até alcançarem teores de água de 20%, 15%, 10% e 5%.

Tabela 2 Teor de água e tempo de secagem final das sementes de *H. serratifolia* de acordo com o método de secagem

Teor de água final	Método de secagem	
	Lenta (30°C)	Rápida (45°C)
20%	1h 13 min	53 min
15%	2h 53 min	1h 25 min
10%	3h 53 min	2h 10 min
5%	6h 15 min	3h 16 min

Menor tempo de secagem foi observado na secagem (45°C) independentemente do teor de água final das sementes. Ressalta-se que o tempo gasto para a redução do teor de água até 5% foi o dobro na secagem lenta (30°C), quando comparada à secagem rápida. Zonta (2011) ao secar sementes de Pinhão Manso também observou redução no tempo de secagem com o aumento da temperatura. Resultados semelhantes foram encontrados por Ullmann (2010).

Em relação aos resultados dos testes de germinação e vigor foi observado efeito significativo para o índice de velocidade de germinação (IVG), índice de velocidade de emergência (IVE), porcentagem de emergência de plântulas, estande inicial de plântulas, tempo médio de emergência (T50) e emergência de plântulas em campo (Tabela 1A).

Os maiores valores de germinação foram observados em sementes de ipê- amarelo submetidos à secagem rápida independentemente do teor de água das sementes (Tabela 3).

Tabela 3 Germinação de sementes de *H. serratifolia* submetidas à secagem lenta (30°C) e rápida (45°C)

Secagem	Germinação
Lenta	87 b
Rápida	94 a
CV(%)	5,38

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade

Em algumas espécies tem sido relatada maior germinação quando utilizado um processo de secagem rápido, a exemplo dos resultados obtidos por Zonta (2011) para sementes de pinhão manso. As sementes secadas lentamente, provavelmente pelo fato de permanecerem por um período mais longo com alto teor de água, apresentam processo de deterioração acelerado, levando à perda da capacidade germinativa. Resultados semelhantes foram encontrados por (NERY, 2005), em sementes de ipê com 80% de umidade que apresentaram 20% de germinação. De acordo com Gemaque (1999), isso sugere que a perda no teor de água é um pré-requisito para a síntese de novas enzimas e proteínas, as quais podem participar no processo metabólico ou nos processos que permitam o crescimento dessa espécie.

Avelar (2011) afirma que a temperatura máxima para a secagem segura de sementes depende da espécie, mas geralmente varia de 35 a 45°C, sendo que, para sementes parcialmente secas, essa temperatura pode ser mais elevada. Barbedo et al. (1998) submeteram sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) à secagem em estufas reguladas a 40 e 50° C, reduzindo teor de água até 8%, e não constataram efeito da temperatura de secagem sobre a germinação das sementes.

Segundo Aguiar (1995), para reduzir o teor de água das sementes de ipê em níveis adequados ao seu armazenamento, geralmente tem sido efetuada a secagem em estufa, com temperatura variando de 40 a 45 °C (CARNEIRO; AGUIAR, 1993). Entretanto, Miyasaki e Cândido (1978) e Pinto, Sader e Barbosa (1986) verificaram que as sementes de ipê são sensíveis à secagem em estufa, principalmente quando o período de secagem é prolongado, resultando em rápida perda da capacidade germinativa e do vigor.

Quanto ao efeito da secagem sobre o vigor das sementes, verificou-se que dentre os métodos de secagem utilizados, a secagem rápida promoveu a maior porcentagem de germinação na primeira contagem (81%), independente do grau de umidade da semente (Tabela 4), assim como os resultados da germinação (Tabela 3).

Tabela 4 Primeira contagem na germinação de sementes de *H. serratifolia* submetidas à secagem lenta, rápida

Secagem	Primeira contagem
Lenta	70 b
Rápida	81 a
CV(%)	10,22

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade

O teste de primeira contagem de germinação, geralmente é utilizado como um teste de vigor, devido à sua simplicidade e por ser conduzido juntamente com o teste de germinação. A velocidade de germinação pode ser utilizada para identificar variações entre lotes de sementes, com diferentes níveis de qualidade, com emergência mais rápida em campo ou em estufa, minimizando assim as condições adversas que ocorrem durante a germinação e estabelecimento de plântulas (STEINER et al., 2009).

Pela análise da primeira contagem na germinação em rolo, observa-se nas sementes submetidas à secagem, independente do método, que houve

redução da porcentagem de germinação em sementes com 10% de teor de água (Tabela 5). Essa diferença pode ser atribuída a danos provocados pela secagem, que leva as sementes a sofrerem mudanças físicas, provocadas por mudança de temperatura e umidade, que ocasionam expansão, contração e alterações na densidade e porosidade.

Tabela 5 Primeira contagem na germinação de sementes de *H. serratifolia* com diferentes teores de água

Teor de água	Primeira contagem
20	79 a
15	79 a
10	68 b
5	76 a
CV (%)	10,22

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade

Observa-se ainda que tanto na secagem lenta quanto na rápida, o índice de velocidade de germinação foi semelhante em todos os teores de água, não diferindo do controle, exceto nas sementes com teor de água de 10% na secagem lenta (Tabela 6). Novamente a secagem das sementes até 10% de teor de água demonstra-se prejudicial, propiciando o aumento do número de dias para a germinação.

Tabela 6 Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *H. serratifolia* submetidas à secagem lenta, rápida e tratamento controle

SECAGEM	Teor de água das sementes (%)			
	20	15	10	5
Lenta	7a	7a	8 □	7a
Rápida	6a	7a	7a	7a
Controle	6a			
CV(%)	5,68			

□ Médias diferem da testemunha, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de *Dunnnett*

A rapidez e uniformidade da germinação são características desejáveis, pois quanto mais tempo a plântula permanece nos estádios iniciais de desenvolvimento mais fica sujeita às condições adversas do ambiente, inclusive suscetíveis ao ataque de fungos, frequentemente presentes em sementes de ipê (BOTELHO; MORAES; MENTEN, 2008).

Os menores períodos para a emergência de plântulas ocorreram em sementes não submetidas à secagem (controle com 28%), não diferindo dos tratamentos com teor de água igual a 20% e 15% na secagem rápida (Tabela 7).

Tabela 7 Índice de velocidade de emergência de plântulas (IVE) oriundas de sementes de *H. serratifolia* submetidas à secagem lenta, rápida e sem secagem (Controle)

SECAGEM	Teor de água das sementes (%)			
	20	15	10	5
Lenta	7 bA □	7 bA □	7 bA □	7 bA □
Rápida	6 aA	6 aA	7 bB □	7 bB □
Controle	6			
CV(%)	5,52			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade. □ Médias diferem da testemunha, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de *Dunnnett*

As sementes com teores de água mais elevado tendem a germinar mais rápido porque demanda menos tempo no processo de embebição, o que reflete no índice de velocidade de emergência.

Foi observada a redução da porcentagem de emergência das plântulas quando as sementes foram submetidas à secagem rápida com grau de umidade de 15% (Tabela 8). Esse comportamento foi similar ao encontrado por Gentil (1999) que ao realizar secagem de sementes de café, à temperatura de 30° C, observou inferioridade no desempenho das sementes com 16% de umidade em relação às que apresentavam 10% e 34%.

Tabela 8 Estimativa dos valores de porcentagem de emergência de plântulas oriundas de sementes de *H. serratifolia* submetidas à secagem lenta, rápida e sem secagem (Controle)

SECAGEM	Teor de água das sementes (%)			
	20	15	10	5
Lenta	96 bA	99 aA	100 aA	97 aA
Rápida	100 aA	95 bB	98 aA	98 aA
Controle	96			
CV(%)	2,56			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade

Nos testes de vigor, estande inicial (Tabela 9) e T50 (Tabela 10), observou-se os maiores valores de vigor em sementes não submetidas à secagem.

Tabela 9 Teste estande inicial em bandeja de plântulas oriundas de sementes de *H. serratifolia* submetidas à secagem lenta, rápida e sem secagem (Controle)

SECAGEM	Teor de água das sementes (%)			
	20	15	10	5
Lenta	8□	7□	10□	8□
Rápida	11□	20□	17□	11□
Controle	48			
CV(%)	12,04			

Médias diferem da testemunha, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de *Dunnett* (□)

O fato das plântulas emergirem de forma rápida pode ser interpretado como uma estratégia da espécie de se estabelecer no ambiente o mais rápido possível, aproveitando as condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento do novo indivíduo (BORGHETTI; FERREIRA, 2004).

As sementes do tratamento controle com 28% do teor de água germinaram em menor tempo, 9 dias (Tabela 10). Desse modo, uma emergência mais rápida pode beneficiar, não só o vigor da plântula, como a formação da muda.

De acordo com Abreu e Garcia (2005), o tempo médio de emergência é um índice que avalia a rapidez de ocupação de uma espécie em seu ambiente.

As sementes de ipê-amarelo, mesmo sendo consideradas ortodoxas, sofrem influencia negativa da secagem, independente do método de secagem, interferindo na qualidade fisiologica das mesmas.

Tabela 10 Tempo médio de emergência (T50) de plântulas oriundas de sementes de *H. serratifolia* submetidas à secagem lenta, rápida e sem secagem (Controle)

SECAGEM	Umidade das sementes (%)			
	20	15	10	5
Lenta	12 □	11 □	11 □	12 □
Rápida	11 □	11 □	10 □	11 □
Controle	9			
CV(%)	4,48			

Médias diferem da testemunha, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de *Dunnnett* (□).

Ao contrário dos resultados obtidos nos testes conduzidos em condições favoráveis de germinação e emergência, maiores porcentagens de emergência de plântulas em campo, em relação ao controle, foram observadas nas sementes com 15 e 10% de teor de água independente da secagem e a 5% de teor de água secagem lenta (Tabela 11).

Tabela 11 Teste de emergência de plântulas em canteiro de plântulas oriundas de sementes de *H. serratifolia* submetidas à secagem lenta, rápida e sem secagem (Controle)

SECAGEM	Umidade das sementes (%)			
	20	15	10	5
Lenta	86	93 □	95 □	93 □
Rápida	84	94 □	92 □	86
Controle	78			
CV(%)	9,02			

Médias diferem da testemunha, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de *Dunnnett* (□).

Esses resultados podem ser atribuídos às condições adversas impostas pelo meio. As sementes com teor de água mais elevado estão propícias à ação de micro organismos presente no solo, o que pode afetar a germinação e consequentemente a emergência.

Vale ressaltar que nesse teste ocorreram irrigações diárias com intuito de aproximar às condições de produção de mudas em viveiro.

#### 4.2 Análise de proteínas resistentes ao calor

Os padrões eletroforéticos das proteínas resistentes ao calor das sementes submetidas à secagem lenta (30°C) e rápida (45°C) estão representados na Figura 1.

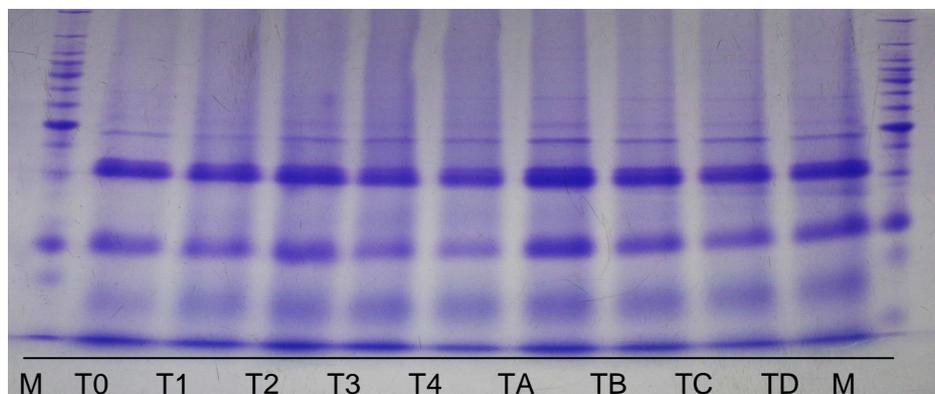


Figura 1 Padrão eletroforético de Proteínas Resistentes ao Calor em sementes de ipê- amarelo submetidas à secagem lenta (30°C), umidades T1-20%, T2-15%, T3-10%,T4-5%; secagem rápida (45°C), umidades: TA-20%, TB-15%, TC-10%,TD-5% e sem secagem, umidade T0-28% , M-Marcador de peso molecular de proteína. UFLA, Lavras, 2013

Observa-se presença de bandas características de proteína resistente ao calor em sementes submetidas aos diferentes tratamentos, demonstrando tolerância à dessecação, independentemente do método de secagem utilizado. É possível que algumas *LEA* proteínas tenham duplo papel durante o ciclo de vida vegetal, e funcionem como uma proteína de armazenamento durante a germinação, e também na tolerância à dessecação durante o desenvolvimento da semente (MANFRE et al., 2009). Entre as secagens lenta e rápida, maior expressão de proteínas resistentes ao calor foi observada em sementes submetidas à secagem rápida (TA, TB, TC e TD). Isso sugere que a temperatura de 45% C pode ter induzido à expressão dessas proteínas em sementes de ipê.

As proteínas resistentes ao calor têm sido relacionadas como um dos mecanismos desenvolvidos pelas sementes para proteger e reparar estruturas celulares expostas à dessecação e posterior embebição. Segundo Boucher et al. (2010) uma característica importante da sobrevivência no estado seco é a capacidade de proteger as membranas em fase de transição, impedindo a perda

da integridade. Esse papel tem sido atribuído às proteínas resistentes ao calor, como as *heat shocks*, deidrininas e proteínas *LEA*. Essa capacidade de proteção é possível devido à sua característica altamente hidrofílica que parece estar ligada a sua ocorrência em estruturas celulares específicas (MACHEREL et al., 2007).

### **4.3 Análise de enzimas**

#### **4.3.1 Expressão da enzima catalase**

As sementes com maior teor de água (T0) e as que não foram submetidas à secagem não apresentaram atividade da catalase (Figura 2). Nas sementes úmidas, os mecanismos de reparo, que incluem as enzimas removedoras de radicais livres, como a catalase, não são acionados, o que foi comprovado pela falta de atividade dessa enzima nas sementes que não foram submetidas à secagem (Figura 2). Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Veiga (2010) em sementes de café.

À medida que essas sementes foram secadas nota-se aumento da atividade da catalase, demonstrando que a secagem lenta afeta a qualidade dessas sementes. Segundo Leprince et al. (2000), sementes ortodoxas passam por uma baixa regulação do metabolismo durante os primeiros estágios de dessecação, o que pode limitar a formação de EROS por determinados períodos de tempo, mas não evitá-la totalmente.

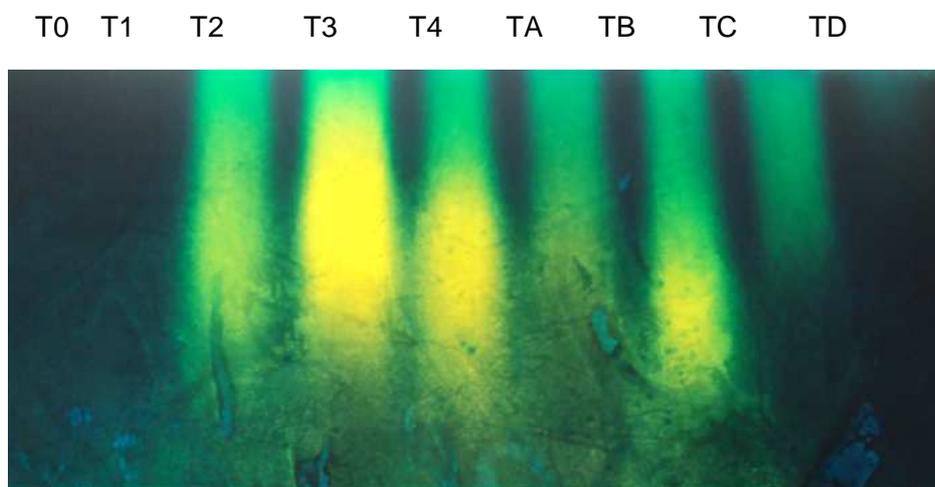


Figura 2 Expressão da catalase (CAT) em sementes de ipê-amarelo submetidas à secagem lenta (30°C), umidades T1-20%, T2-15%, T3-10%,T4-5%; secagem rápida (45°C), umidades: TA-20%, TB-15%, TC-10%,TD-5% e sem secagem, umidade T0-28%. UFLA, Lavras, 2013

Maior atividade da enzima catalase foi observada em sementes submetidas à secagem lenta (T2, T3 e T4). Nesses tratamentos, as sementes permaneceram por período maior em níveis de hidratação que permitem a ocorrência de reações deteriorativas, inclusive às provocadas por radicais livres, podendo causar danos oxidativos (PAMMENTER et al., 1998). Esse fato pode ser comprovado por meio do tempo gasto para atingir os teores de água desejados descritos na Tabela 2.

Esses resultados podem ser comparados aos observados no teste de germinação (Tabela 3), e no teste de primeira contagem de germinação (Tabela 4), nos quais foram observados valores inferiores aos observados nos tratamentos cujas sementes foram submetidas à secagem rápida.

Danos provocados pela dessecação têm sido relacionados com a formação de espécies reativas ao oxigênio (EROS) como um resultado do

metabolismo desequilibrado. As ERO'S reagem com macromoléculas celulares, por exemplo, proteínas e lipídeos, causando danos e perturbações da função das células. Na deterioração das sementes, há aumento na peroxidação de lipídeos, a qual resulta em danos à membrana e geração de subprodutos tóxicos (SCHWEMBER; BRADFORD, 2010).

Provavelmente, o aumento na atividade da catalase observada nas sementes com teor de água de 15% submetidas à secagem rápida (Figura 2), deve-se a um dano provocado pela dessecação. Em sementes submetidas a esse tratamento foi observada menor porcentagem de emergência de plântulas (Tabela 8).

O estresse oxidativo causado é combatido por um complexo sistema de defesa antioxidante, relacionado ao aumento da produção e ativação de metaloenzimas, dentre as quais encontra-se a catalase (CAT), um tipo de peroxidase bastante ativa que remove peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), extremamente tóxico à célula, através da sua conversão em água ( $H_2O$ )+O (FAGAGNA, 2008; SCANDALIOS, 2005 ). Durante o processo de deterioração das sementes, ocorre decréscimo na atividade dessa enzima, pela sua inativação progressiva ou redução e paralisação de sua síntese (MARCOS FILHO, 2005). Segundo Demirkaya, Dietz e Sivritepe (2010), a diminuição geral na atividade da CAT na semente diminui a capacidade respiratória, reduzindo o fornecimento de energia (ATP) e assimilados, para a germinação da semente.

#### **4.3.2 Expressão da enzima esterase**

Bandas características da enzima esterase (Figura 3) podem ser observadas em todos os tratamentos. Foi observada maior atividade dessa enzima em sementes submetidas à secagem lenta e ainda entre esses tratamentos

é possível observar o surgimento de isoformas que diferenciam as sementes secadas até os teores de água de 15% e 10%.

O padrão enzimático da esterase observado em sementes de ipê-amarelo submetidos à secagem é similar ao encontrado por Santos (2010) em sementes de café, que trabalhou com diferentes tipos de secagem e teores de água nas sementes, nas quais também é possível observar diferença na intensidade das bandas entre os tratamentos.

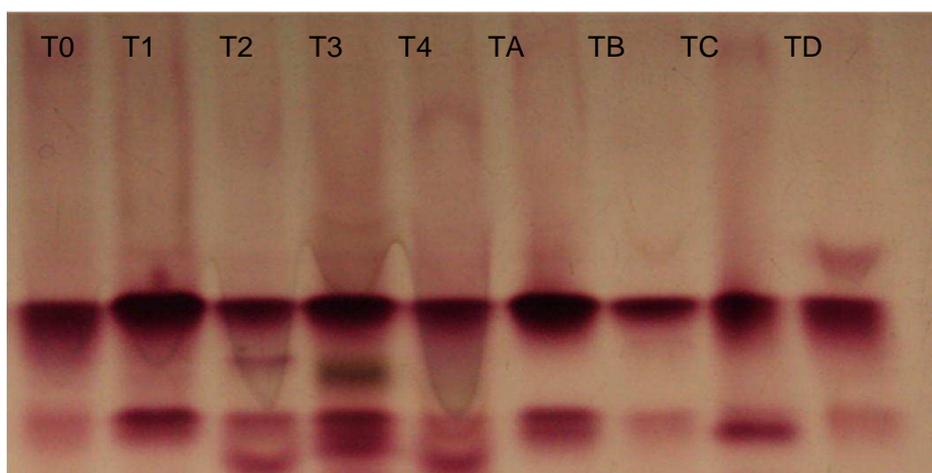


Figura 3 Expressão da esterase (EST) em sementes de ipê-amarelo submetidas à secagem lenta (30°C), umidades T1-20%, T2-15%, T3-10%, T4-5%; secagem rápida (45°C), umidades: TA-20%, TB-15%, TC-10%, TD-5% e sem secagem, umidade T0-28%. UFLA, Lavras, 2013

Quando a água é removida das sementes durante o processo de secagem podem ocorrer processos degradativos, mediados por radicais livres, provavelmente consequentes de uma desorganização metabólica em conteúdos intermediários de água, o que leva a perda da integridade estrutural das membranas, já que a água está associada às superfícies macromoleculares, mantendo sua integridade (PAMMENTER; BERJAK, 1999).

As alterações no padrão dessa enzima podem estar associadas a eventos deteriorativos. Assim como descrito anteriormente para a catalase nas mesmas condições, a permanência dessas sementes no processo de secagem por um período mais longo pode ter provocado danos às membranas.

De acordo com [Silva et al. \(2001\)](#) possivelmente a esterase é uma enzima bastante sensível, sendo o perfil eletroforético muito alterado, principalmente por interferência de fatores externos. Essa enzima está envolvida na hidrólise de ésteres e também no metabolismo de lipídeos, sendo a peroxidação de lipídeos um evento associado a danos de membranas das sementes, podendo levar à redução na germinação das sementes (BASAVARAJAPPA; SHETTY; PRAKASH, 1991). Esses resultados corroboram com os observados no teste de germinação e no teste de primeira contagem de germinação, nos quais foram observados menores valores de germinação em sementes submetidas à secagem lenta (Tabela 3 e 5).

Ainda relacionando a expressão da esterase aos testes fisiológicos observa-se menor velocidade de germinação em sementes submetidas à secagem lenta com 10% de teor de água, coincidindo com maior atividade da enzima em sementes submetidas a esse tratamento. Porém, para a emergência em campo maiores valores foram observados em sementes submetidas à secagem lenta, com teor de água de 10%. Essa divergência de resultados para um mesmo tratamento, considerando diferentes testes, pode ser explicada pela dupla função que a esterase pode desempenhar, dependendo do nível de deterioração, sendo acumulada antes do processo de deterioração para prevenir a ação de radicais livres, mas também pode apresentar altos níveis em estádios mais avançados de deterioração.

Na secagem rápida é possível observar maior atividade dessa enzima em sementes com teores de água de 20% e 10%.

### **4.3.3 Expressão da enzima isocitrato liase**

Com relação à expressão da enzima isocitrato liase por meio da técnica de eletroforese foi possível identificar apenas bandas de baixo peso molecular (Figura 4).

No tratamento controle que consiste de sementes sem secagem não foi possível detectar atividade dessa enzima. Nos tratamentos submetidos à secagem lenta nota-se maior expressão da isocitrato liase nas sementes com teor de água igual a 20%, seguida da de 10%.

Já para a secagem rápida maior expressão foi observada nas sementes com teor de água igual a 15%, resultado que pode estar relacionado ao vigor das sementes, uma vez que em sementes nessa condição observou-se valores significativos para índice de velocidade de emergência (Tabela 7) e estande inicial em bandeja (Tabela 9). Resultados semelhantes foram obtidos por Pereira et al. (2012) para sementes de pimenta habanero em diferentes estádios de desenvolvimento.

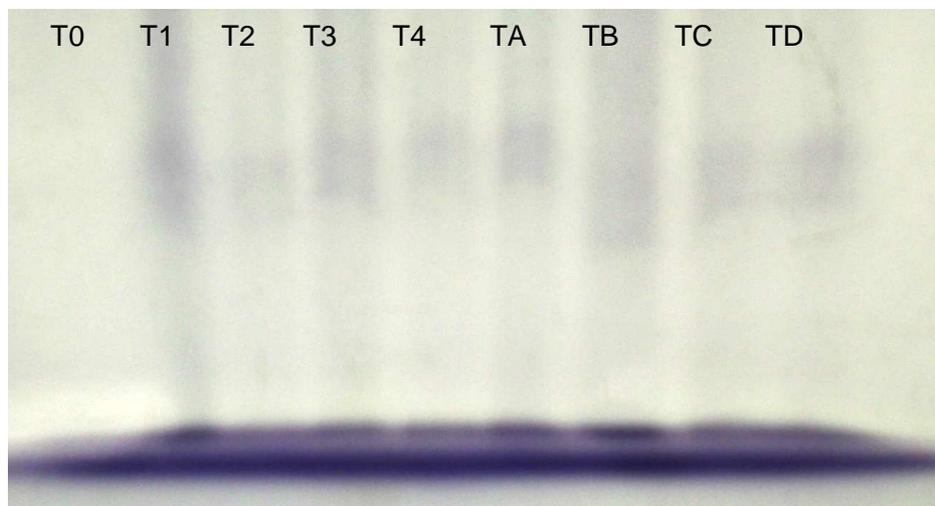


Figura 4 Expressão da isocitrato liase (ISO) em sementes de ipê-amarelo submetidas à secagem lenta (30°C), umidades T1-20%, T2-15%, T3-10%,T4-5%; secagem rápida (45°C), umidades: TA-20%, TB-15%, TC-10%,TD-5% e sem secagem, umidade T0-28%. UFLA, Lavras, 2013

#### 4.4 Expressão gênica avaliada pela técnica de *RTqPCR*

A extração com o reagente *PureLink Plant RNA* gerou *RNA*'s totais com alta qualidade, íntegros e livres de impurezas.

Após amplificação utilizando os *primers* do gene constitutivo foi observada alta viabilidade dos *cDNA*'s construídos. Ressalta-se ainda que não foram observadas bandas inespecíficas ou dímeros de *primers* por meio da curva de dissociação realizada para cada tratamento.

Por meio dos resultados obtidos pela expressão dos genes, por *PCR* em tempo real, associados à codificação da proteína resistente ao calor *sHSP17.5* e das enzimas catalase (CAT) e isocitrato liase (ICL) em sementes de ipê-amarelo nota-se, de maneira geral, variação na expressão desses genes em todos os tratamentos, independente do método de secagem.

Maior expressão do gene *sHSP17.5* foi observada em sementes submetidas à secagem rápida em relação à observada em sementes não submetidas à secagem com 28% de teor de água.

Para secagem lenta a expressão desse gene foi maior nas sementes com teores de água mais altos (20 e 15%), quando comparadas às sementes não submetidas à secagem com teor de água de 28%.

Em sementes submetidas à secagem lenta e com teores de água mais baixos (10 e 5%), a expressão desse gene foi menor em relação à testemunha (28%), utilizada como calibrador.

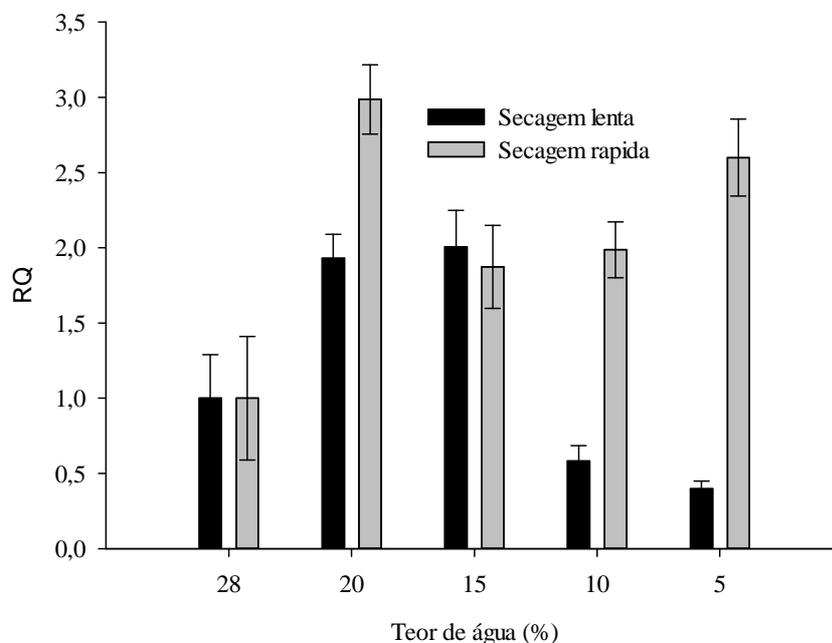


Gráfico 1 Perfil da expressão quantitativa relativa do gene *sHSP17.5* em sementes de ipê-amarelo com teor de água de 28% (testemunha) e sementes submetidas à secagem lenta e rápida, com teor de água igual a 20%, 15%, 10% e 5%

Os valores de expressão do gene *sHSP17.5* obtidos pela quantificação relativa nas sementes submetidas à secagem rápida nos tratamentos com teor de água de 20 e 5%, onde se tem as máximas expressões são maiores que os observados na secagem lenta. E menor expressão desse gene foi observada na secagem lenta a 5%.

Possivelmente, a secagem rápida induziu a expressão do gene *sHSP17.5* como pode ser observado nos valores da quantificação relativa comparado aos valores obtidos para a testemunha, sem secagem. Esse comportamento também pode ser observado no padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor

(Figura 1), que apresentou maior expressão nos tratamentos TA (secagem rápida, 20% teor de água) e TD (secagem rápida, 5% teor de água).

As proteínas de choque térmico são divididas em proteínas de baixo peso molecular de aproximadamente 15-28 kDa (*sHSPs*) e proteínas de elevado peso molecular de mais de 30 kDa (*HMM HSPs*); *sHSPs* foram descobertas como produtos de genes cuja expressão é induzida pelo calor e outras formas de estresse abiótico (JOSÉ et al., 2005).

Em sementes de *Magnolia ovata*, José et al. (2009) encontraram resultado distinto ao encontrado nas sementes de ipê-amarelo para a expressão do gene *sHSP17.5*, que apresentaram o mesmo comportamento após a secagem a conteúdos de água diferentes, não mostrando portanto, qualquer relação com a secagem.

É importante ressaltar que outros fatores, além das proteínas resistentes ao calor também podem influenciar na tolerância à dessecação. Os efeitos negativos da dessecação na sobrevivência das células e tecidos estão correlacionados a vários fatores, dentre eles o desarranjo do citoesqueleto e falhas na operação de sistemas eliminadores de radicais livres (GARNCZARSKA; BEDNARSKI; JANCELEWICZ, 2009).

Para o gene *CAT3* (Gráfico 2), associado à codificação da enzima catalase, a expressão quantitativa relativa em sementes de ipê-amarelo foi maior que a da testemunha em todos os tratamentos, tanto na secagem lenta quanto na rápida.

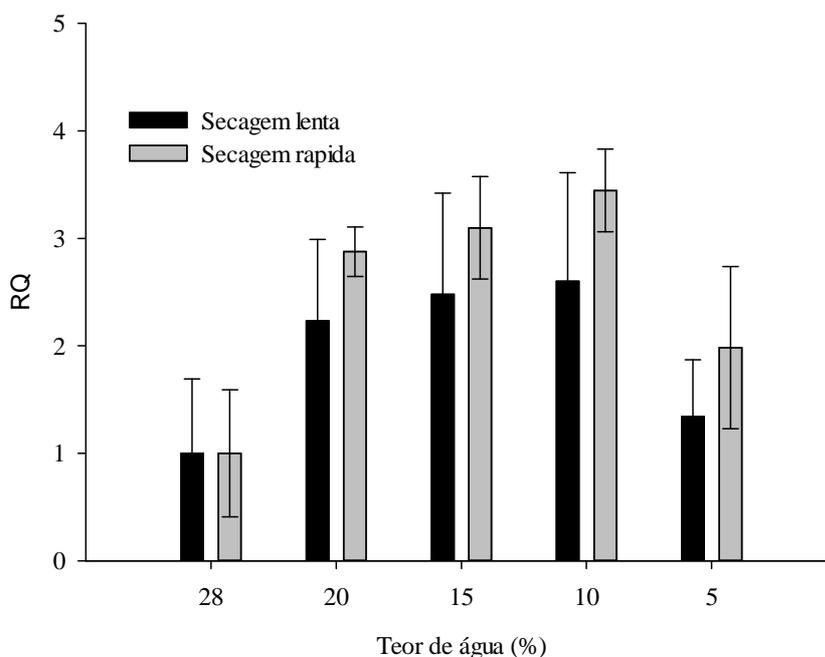


Gráfico 2 Perfil da expressão quantitativa relativa do gene catalase (CAT3) em sementes de ipê-amarelo com teor de água de 28% (testemunha) e sementes submetidas à secagem lenta e rápida, com teor de água igual a 20%, 15%, 10% e 5%

Nas secagens lenta e rápida observa-se aumento da expressão do gene CAT3 à medida que o teor de água das sementes é reduzido para 20, 15 e 10%. Já em sementes secas até 5% de teor de água a expressão desse gene é reduzida.

Assim como observado para o gene *sHSP17.5*, a secagem rápida parece ter induzido a expressão do gene CAT3, embora não tenha sido observada diferença na expressão desse gene em sementes submetidas à secagem lenta e rápida com teores de água de 20, 15 e 10%.

Provavelmente, o aumento na expressão desse gene é uma forma de proteção das sementes para responderem mais rapidamente ao estresse

provocado pela secagem. No entanto, quando ocorre redução na produção desses transcritos, como observado no teor de água 5%, pode-se fazer relação ao gasto desnecessário de energia metabólica. Esses resultados podem ajudar a entender porque não ocorreu atividade da isoenzima catalase nos tratamentos a 28% sem secagem e 5% de teor de água, secagem rápida (Figura 2).

Os resultados da *PCR* tempo real para o gene *CAT3* seguem o padrão encontrado nas análises isoenzimáticas, no entanto, a presença do transcrito não implica que o respectivo produto polipeptídico esteja sendo traduzido na mesma proporção e mesmo que esteja sendo traduzido proporcionalmente.

No Gráfico 3 são representados os resultados das análises de quantificação relativa para o gene isocitrato liase (*ICL6*) em sementes de ipê-amarelo. Considerando os valores absolutos, a expressão desse gene aumenta com a secagem em relação ao controle quando as sementes foram secadas até os teores de água igual a 20, 15 e 10%, com redução da expressão em sementes secas até 5% de teor de água.

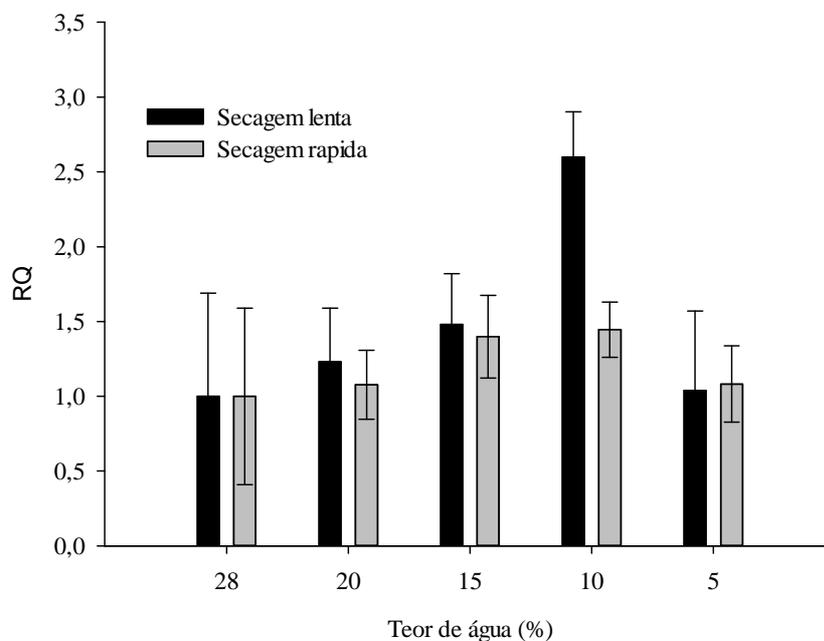


Gráfico 3 Perfil da expressão quantitativa relativa do gene isocitrato liase (ICL6) em sementes de ipê-amarelo com teor de água de 28% (testemunha) e sementes submetidas à secagem lenta e rápida, com teor de água igual a 20%, 15%, 10% e 5%

Nota-se que o padrão de expressão do gene ICL6 é semelhante ao do gene CAT3, em valores absolutos. Provavelmente essa enzima pode ter sido ativada para atuar na quebra de lípidos durante a sua peroxidação, consequência do estresse provocado pela secagem.

Comparando-se todos os tratamentos avaliados observa-se expressão significativa do gene ICL6 em sementes submetidas à secagem lenta e com 10% de teor de água (Gráfico 3).

A expressão do gene que codifica a proteína isocitrato-liase foi estudada em sementes de café fresco e durante a secagem, utilizando-se a técnica *RT-PCR* com oligonucleotídeos específicos (SELMAR et al., 2001). Esses autores

observaram uma quantidade maior de transcritos em sementes de cafeeiro durante o processo de secagem e baixos níveis de expressão em sementes frescas.

A isocitrato-liase é uma enzima-chave na regulação do ciclo do glioxilato e envolvida no metabolismo de lipídios armazenados nas sementes oleaginosas, e no desenvolvimento das atividades no glioxissomos. A atividade dessa enzima aumenta durante a germinação das sementes, obtendo-se valores máximos quando ocorre o máximo da proporção de lipídios degradados e na síntese de sacarose (BEWLEY; BLACK, 1994). Nesse ciclo, os lipídios insolúveis das sementes se transformam em açúcares solúveis (sacarose), os quais são facilmente deslocados para os meristemas radiculares e apicais (CIONI; PINZAUTI; VANNI, 1981).

Os lipídeos são materiais de reserva que fornecem energia ao processo germinativo através da conversão em sacarose, pelo ciclo do glioxilato (MARTINS et al., 2000).

Em análise da constituição química das sementes de ipê-amarelo realizada por Freitas et al. (1979) observou-se uma composição média de 8,36% de carboidratos, 7,0% de proteínas e 28,68% de óleo.

Diante do exposto ao comparar os resultados de expressão do gene ICL6 e dos resultados observados nos testes fisiológicos em sementes submetidas à secagem lenta e com 10% de teor de água, infere-se que pode ter ocorrido a oxidação de lipídeos em sementes submetidas a essas condições.

## **5 CONCLUSÕES**

A expressão de proteínas em sementes de ipê-amarelo varia em função dos métodos de secagem e teores de água de sementes.

A secagem de sementes de ipê-amarelo nos teores de água intermediários (15 e 10%) compromete a qualidade fisiológica das mesmas.

## REFERÊNCIAS

ABREU, M. E. P.; GARCIA, Q. S. Efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de quatro espécies de *Xyris* L. (Xyridaceae) ocorrentes na Serra do Cipó, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 19, n. 1, p. 149-154, 2005.

ALFENAS, A. C.; PETRES, I.; BRUCE, W.; PASSADOS, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: UFV, 242 p, 1991.

AGUIAR, I. B. Conservação de sementes. In: SILVA, A.; PIÑA- RODRIGUES, F. C. M; FIGLIOLIA, M. B. **Manual técnico de sementes florestais**. São Paulo: Instituto Florestal, 1995. p. 33-44. (Registros, 14).

ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 627 p.

AUNG, U. T.; MCDONALD, M. B. Changes in esterase activity associated with peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed deterioration. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 23, n. 1, p. 101-111, Jan./Apr. 1995.

AVELAR, S. A. G. et al. Secagem estacionária de sementes de soja com ar desumidificado por resfriamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 454-462, 2011.

BARBEDO, C. J. e MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botânica Brasílica**. São Paulo, v.12, n.2, p. 145-164, 1998.

BARBEDO, C. J.; MARCOS FILHO, J.; NOVEMBRE, A. D. L. C. Condicionamento osmótico e armazenamento de sementes de cedro-rosa

(*Cedrela fissilis* Vell.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 19, p. 355-361, 1997.

BASAVARAJAPPA, B. S.; SHETTY, H. S.; PRAKASH, H. S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 19, n. 2, p. 279-286, 1991.

BELTRATI, C. M.; PAOLI, A. A. S. Semente. In: APPEZZATO DA GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, Viçosa, 2003. p. 399-424.

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

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

BORGHETTI, F.; FERREIRA, A. G. Interpretação de resultados de germinação. In: FERREIRA, A. G.; BORGHERETTI, F. (Org.). **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 209-222.

BOTELHO, L. B.; MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeito na germinação e transmissão para as plântulas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 343-348, 2008.

BOUCHER, V. et al. MtPM25 is an atypical hydrophobic late embryogenesis-abundant protein that dissociates cold and desiccation-aggregated proteins. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 418-430, Mar. 2010.

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, 2004.

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

BUCKERIDGE, M. S. et al. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, p. 141-156, 2000.

BUSTIN, S. A. Quantitation of mRNA using realtime reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, New York, v. 29, p. 23-39, 2002.

CARNEIRO, J. G. A.; AGUIAR, I. B. Armazenamento de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p. 333-350.

CARVALHO, M. L. M. et al. Morphophysiological development of *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. **Seeds Science Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 6, p. 643-651, Nov./Dec. 2008.

CHENNA, P. H. et al. Preparation and cytotoxicity toward cancer cells of mono (arylimino): derivatives of  $\alpha$ -Lapachone. **Journal Medical Chemistry**, Minneapolis, v. 44, p. 2486-2489, 2001.

CIONI, M.; PINZAUTI, G.; VANNI, P. Comparative biochemistry of the glyoxylate cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 70, n. 1, p. 1-26, 1981.

CLOSE, T. J. Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 97, p. 795-803, 1996.

DAT, J. F. et al. Parallel changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedling. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 116, p. 1351-1357, 1998.

DEGAN, P. et al. Influência de métodos de secagem na conservação de sementes de ipê branco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 5, n. 3, p. 492-496, 2001.

DEMIRKAYA, M.; DIETZ, K. J.; SIVRITEPE, H. O. Changes in antioxidant enzymes during aging of onion seeds. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, Cluj- Napoca, v. 38, n. 1, p. 49-52, 2010.

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

FAGAGNA, F. D. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. **Nature Reviews**, London, v. 8, n. 1, p. 512-522, July 2008.

FARIA, J. M. R. **Desiccation tolerance and sensitivity in *Medicago truncatula* and *Inga vera* seeds**. 2006. 145 p. Thesis (PhD) - Wageningen University, Wageningen, 2006.

FARRANT, J. M. Editorial: special issue GROW “plant desiccation stress”. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 62, p. 189–191, 2010.

FERREIRA, L.; CHALUB, D.; MUXFELDT, R. **Ipê-amarelo: tabebuia serratifolia (Vahl) Nichols**. Manaus: INPA, 2004. v. 5. (Informativo Técnico).

FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1984. 39 p. (Circular Técnica, 9).

FREEMAN, W. M.; WALKER, S. J.; VRANA, K. E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **Biotechniques**, Natick, v. 26, n. 1, p. 112-122, Jan. 1999.

FREITAS, S.C. et al. Determinação de equilíbrio higroscópico e viabilidade de sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nichols) armazenadas em diferentes umidades relativas. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 3, n. 2, p. 135-144, 1979.

GACHON, C.; SAINDRENAN, P. Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicola* and *Botrytis cinerea*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 5, p. 367-371, May 2004.

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

GENTIL, D. F. O. **Conservação de sementes de *Coffea arabica* L.:** interferências do grau de umidade e da temperatura. 1999. 41 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1999.

GEMAQUE, R. C. R. et al. Efeito das secagens lenta e rápida em sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.) **Cerne**, Lavras, v. 11, n. 4, p. 329-335, out./dez. 2005.

GEMAQUE, R. C. R. **Maturação, tolerância à dessecação e alterações na qualidade fisiológica em sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* Mart. Standl.) envelhecidas artificialmente.** 1999. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade federal de Lavras, Lavras, 1999.

GUIMARÃES, R. J. **Nutrição mineral de do cafeeiro.** Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 47 p.

GURLEY, W. B. HSPs: a Key component for the acquisition of thermotolerance in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 4, p. 457-460, Apr. 2000.

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

HARRINGTON, J. F. Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI, T. T. **Seed biology**. New York: Academic, 1972. v. 3, p. 145-245.

HELLMANN, M. E. **Tolerância ao congelamento e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil)**. 2006. 81 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo, 2006.

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

HUNDERTMARK, M.; HINCHA, D. K. L. (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Genomics**, London, v. 9, p. 118, 2008.

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**, New York, v. 345, p. 646-651, 2006.

JOSÉ, A. C. et al. Changes in gene expression during drying and imbibition of desiccation sensitive *Magnolia ovata* (A. St.-Hil.) Spreng. seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, p. 270-280, 2009.

JOSÉ, S. C. B. R. et al. Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 2, p. 115-121, fev. 2005.

KASUGA, M. et al. A combination of the Arabidopsis DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 45, n. 3, p. 346-350, 2004.

KOHAMA, S. et al. Secagem de sementes de grumixama (*Eugenia brasiliensis*). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 28, n. 1, 2006.

KUHN, H. et al. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. **The Plant Journal**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 503-528, 2001.

LAN, L. et al. Microarray analysis reveals similarities and variations in genetic programs controlling pollination/fertilization and stress responses in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 59, p. 151-164, 2005.

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

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

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

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat shock proteins. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 22, p. 631-677, 1988.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Plantarum, 1992. 367 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. v. 1.

MACHEREL, D. et al. Function and stress tolerance of seed mitochondria. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 129, p. 233-241, 2007.

MANFRE, A. J. et al. Seed dehydration and the establishment of desiccation tolerance during seed maturation is altered in the arabidopsis thaliana mutant atem6-1. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 50, n. 2, p. 243-253, Feb. 2009.

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

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Brasília: Abrates, 2005b. p. 1-24.

MARTINS, C. A. O. et al. Atividade da isocitrato liase durante a germinação de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 42-46, jan./jun. 2000.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MIYASAKI, J. M.; CÂNDIDO, J. F. Secagem de sementes de ipê amarelo (*Tabebuia serratifolia* Vall/Don). **Seiva**, viçosa, MG, v. 38, n. 85, p. 12-17, 1978.

NEPOMUCENO, A. L. et al. Tolerância à seca em plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 23, p.12-18, 2001.

NERY, M. C. **Aspectos morfofisiológicos do desenvolvimento de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich.** 2005. 95 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

NEVES, E. et al. Secagem de sementes de milho em espiga, em função da altura da camada e fluxo de ar. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 27, n. 2, p.117-124, 2005.

NTULI, T. M. et al. Increased drying rate lowers the critical water content for survival in embryonic axes of English Oak (*Quercus robur* L.) seeds. **Journal of Integrative Plant Biology**, Pequim, v. 53, p. 270-280, 2011.

NÚÑEZ, V. et al. Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. **Brazilian Journal Medical Biology Research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 7, p. 969-977, July 2004.

NUSSBAUMER, C. et al. Comprehensive analysis of Arabidopsis expression level polymorphisms with simple inheritance. **Molecular and System Biology**, Dordrecht, v. 5, n. 242, p. 1-10, 2009.

OLIVEIRA, L. M. et al. Avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e *T. impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley - (Bignoniaceae) pelo teste de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 138-143, dez. 2004.

OLIVEIRA, L. M. et al. Temperatura e regime de luz na germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley e *T. serratifolia* Vahl Nich. – Bignoniaceae. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 642-648, maio/jun. 2005.

OLMSTEAD, R.G.; GROSE, S. O. Taxonomic revisions in the polyphyletic genus *Tabebuia* s. 1. (Bignoniaceae). **Systematic Botany**, Kent, v. 32, p. 660-670, 2007.

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

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

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

PARK, B. S. et al. Selective growth-inhibiting effects of compounds identified in *Tabebuia impetiginosa* inner bark on human intestinal bacteria. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 1152-1157, 2005.

PINTO, M. M.; SADER, R.; BARBOSA, J. M. Influência do tempo de secagem e do armazenamento sobre a viabilidade das sementes de ipê-rosa. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 8, n. 1, p. 37-47, 1986.

PORCEL, R. et al. Impairment of NtAQPI gene expression in tobacco plants does not affect root colonization pattern by arbuscular mycorrhizal fungi but decrease their symbiotic efficiency under drought. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 15, p. 417-423, 2005.

PORTILLO, A. et al. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 76, p. 93-98, 2001.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 3, p. 499-514, 1973.

ROSA, S. D. V. F. **Indução de tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho por meio de pré-condicionamento a baixa temperatura**. 2000. 121 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

SANTOS, G. C. **Expressão de genes relacionados ao processo oxidativo durante a secagem de sementes de café**. 2010. 89 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 221–227, 2007.

SCHWEMBER, A.; BRADFORD, K. J. Quantitative trait loci associated with longevity of lettuce seeds under conventional and controlled deterioration storage conditions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 15, p. 4423-4436, 2010.

SILVA, D. G. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante o armazenamento de sementes de *Tabebuia serratifolia*. **Cerne**, Lavras, v. 17, p. 1-7, 2011.

SILVA, E. A. A. et al. Alterações de isoenzimas em sementes de milho infectadas por fungos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 1725-1732, 2000.

SILVA, S. R. et al. Estudo comparativo da extração e caracterização do perfil em CLAE do alcalóide de espécies do gênero *Uncaria* sp. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 25., 2002, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas: SBQ, 2002. 1 CD ROM.

SOUZA, V. C. et al. Produção de mudas de ipê-amarelo (*tabebuia serratifolia* (vahl.) nich.) em diferentes substratos e tamanhos de recipientes. **Agropecuária Técnica**, Areia, v. 26, n. 2, p. 98–108, 2005.

STEINER, F.; PINTO JÚNIOR, A.S.; ZOZ, T.; GUIMARÃES, V. F.; DRANSKI, J.A.L.; RHEINHEIMER, A.R. Germinação de sementes de rabanete sob temperaturas adversas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.4, p.430-434, 2009.

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.

TOLEDO, F. F.; MARCOS FILHO, J. **Manual de sementes: tecnologia da produção**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1977. 224 p.

TUNES, L. M. et al. Perfil enzimático em sementes de cevada em resposta a diferentes concentrações salinas. **Interciência**, Catanduva, v. 35, n. 5, maio 2010.

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

ULLMANN, R. et al. Qualidade das sementes de pinhão manso submetidas à secagem artificial. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 41, n. 3, p. 442-447, 2010.

VEIGA, P. O. A. **Qualidade de mudas e aspectos fisiológicos, bioquímicos e biofísicos de sementes de café armazenadas**. 2010. 112 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

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

VILLELA, F. A.; PESKE, S. T. Secagem de sementes. In: PESKE, S.; ROSENTHAL, M.; ROTA, G. (Ed.). **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. Pelotas: UFPel, 2003. p. 283-321.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic response. **Trends Plant Science**, Oxford, v. 9, p. 244-252, 2004.

WETZEL, M. M. V.; SILVA, D. B.; GONÇALVES, L. P. **Conservação de germoplasma semente de cebola (*Allium cepa* L.) a longo prazo no Brasil**. Brasília: Embrapa, 2005. 5 p. (Circular Técnica, 38).

XIONG, L.; SCHUMAKER, K. S.; ZHU, J. K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 165-183, 2002.

ZONTA, J. B. Secagem, beneficiamento e armazenamento de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). 2011. 91 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

## ANEXOS

Tabela 1A Resumo da análise de variância de sementes de ipê-amarelo submetidas à secagem lenta, rápida e tratamento controle

FV		Grau de liberdade	Emergência em bandeja	Estande inicial bandeja	IVE bandeja
Secagem		1	0,500 <sup>NS</sup>	338,000*	1,125*
Umidade		3	8,833 <sup>NS</sup>	129,000 <sup>NS</sup>	0,458*
Secagem x umidade	x	3	26,833*	135,000 <sup>NS</sup>	0,458*
(Secagem x Umidade)	x	1	9,388 <sup>NS</sup>	4.672.222*	1,125*
Temperatura					
Erro		27	6,222	647,000	0,138
CV		-	2,56	12,04	5,52

Tabela 2A Resumo da análise de variância de sementes de ipê-amarelo submetidas à secagem lenta, rápida e tratamento controle

FV		Emergência em campo	Germinação rolo	1ª contagem de germinação
Secagem		50,000 <sup>NS</sup>	392,000*	861,125*
Umidade		128,333 <sup>NS</sup>	37,833 <sup>NS</sup>	220,791*
Secagem x umidade		20,333 <sup>NS</sup>	14,000 <sup>NS</sup>	98,791 <sup>NS</sup>
(Secagem x Umidade)		555,555*	40,500 <sup>NS</sup>	136,125 <sup>NS</sup>
x Temperatura				
Erro		63,814	23,666	60,296
CV		9,02	5,38	10,22