

**RESTABELECIMENTO DA TOLERÂNCIA À
DESSECAÇÃO EM SEMENTES GERMINADAS
DE *Sesbania virgata* e *Cedrela fissilis***

TATHIANA ELISA MASETTO

2008

TATHIANA ELISA MASETTO

**RESTABELECIMENTO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM
SEMENTES GERMINADAS DE *Sesbania virgata* E *Cedrela fissilis***

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

Orientador

Prof. Dr. José Márcio Rocha Faria, PhD

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

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

Masetto, Tathiana Elisa.

Restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Sesbania virgata* e *Cedrela fissilis* / Tathiana Elisa Masetto. – Lavras : UFLA, 2008.

82 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: José Márcio Rocha Faria

Bibliografia.

1. Tolerância à dessecação. 2. *Sesbania virgata*. 3. *Cedrela fissilis*. 4. estresse osmótico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.54041042

TATHIANA ELISA MASETTO

RESTABELECIMENTO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM
SEMENTES GERMINADAS DE *Sesbania virgata* E *Cedrela fissilis*

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

APROVADA em 16 de outubro de 2008

Dr. Cláudio José Barbedo	IBt - SP
Profa. Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho	UFLA
Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães	UFLA
Dra. Roselaine Cristina Pereira	UFLA

Prof. Dr. José Márcio Rocha Faria PhD.
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciências Florestais.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pelo financiamento parcial do trabalho, por meio do Projeto N^o. 2005/04139-7.

Aos meus pais, Nelson e Jovina e a minha irmã, Patrícia, pelo amor e incentivo e por sempre transmitirem segurança e tranquilidade para que eu concluísse os meus objetivos.

Ao Rodrigo, pelo apoio e amor dedicado, interesses e planos em comuns, que sempre fortaleceram nossa relação e que foram essenciais para que eu enfrentasse com mais serenidade esse desafio.

Ao Zé Marcio, pelo constante estímulo no meu crescimento científico, confiança e entusiasmo com o meu trabalho e também pelas conversas engraçadas que sempre pautaram uma convivência harmoniosa.

Aos professores Renato Guimarães (DAG), Laene (DAG), Cláudio Barbedo (IBt-SP) e à Rose (DBI), pela amizade, participação na banca e contribuições com o trabalho.

À bióloga Ana Carla R. Fraiz, pela amizade, convivência especial e valiosa ajuda com os experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Sementes Florestais, nas pessoas de Olívia, Zé Pedro, Sue Ellen, Ana Júlia, Cinara, Giuliana, Cristiane, Julio, Dani, Simoni e Juliano, pelo companheirismo e infinitos momentos de descontração.

Às biólogas Patrícia Pierre (UFMG) e Larissa Fonseca (DBI), cujas discussões, argumentações e interesses estimularam as análises de citologia desenvolvidas neste trabalho. À Prof. Lizete Chamma Davide (DBI), por ceder parte do kit de morte celular, assim como o laboratório e as orientadas para a realização das análises.

Aos amigos do Laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas: Profa. Dulcinéia Carvalho, Fábio, Daniel, Murilo, Flávio, Alisson e Rogério, pela disposição e auxílio.

Ao Prof. Eduardo Alves (DFP) e à laboratorista Heloísa (LME), pelo auxílio com as análises de microscopia eletrônica de transmissão.

Aos amigos que passaram pela minha vida durante o curso, meus sinceros agradecimentos pela solidariedade e convivência harmoniosa ao longo desses anos.

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Introdução Geral	1
Referências Bibliográficas	5
Capítulo 1: Alterações citológicas durante a perda e o restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de <i>Sesbania virgata</i> (Cav.) (Pers.) (Fabaceae)	7
1 Resumo	8
2 Abstract	10
3 Introdução	12
4 Material e Métodos	15
5 Resultados e Discussão	21
6 Conclusões	39
7 Referências Bibliográficas	40
Capítulo 2: Alterações citológicas durante a perda e o restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de <i>Cedrela fissilis</i> Vell. (Meliaceae)	45
1 Resumo	46
2 Abstract	48
3 Introdução	49

4 Material e Métodos	52
5 Resultados e Discussão	58
6 Conclusões	75
7 Referências Bibliográficas	76

RESUMO

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

Este trabalho foi realizado com o objetivo de investigar as mudanças celulares que ocorrem durante a perda e o restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Sesbania virgata* e *Cedrela fissilis*. Para o restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *S. virgata* e *C. fissilis* com 1, 2, 3, 4 e 5 mm de comprimento de radícula, as sementes foram submetidas, por 72h, a tratamento osmótico com PEG (-2,04 Pa) e PEG (-2,04 MPa) + ABA (100 µM). Em seguida, as sementes foram desidratadas em sílica gel com redução do teor de água a cada dez pontos percentuais, pré-umidificadas (100% UR; 24h) e reidratadas (condições ideais de germinação). As avaliações citológicas (viabilidade celular, teste de TUNEL e microscopia eletrônica de transmissão) e da integridade do DNA foram feitas em radículas de *S. virgata* com 1, 3 e 5 mm e de *C. fissilis* com 1, 2 e 5 mm de comprimento. Sementes germinadas de *S. virgata*, com radículas de 1mm toleraram a dessecação até 10% de umidade (97% de sobrevivência), enquanto aquelas com radículas de 2 mm ou maiores, apresentaram mortalidade total. Os tratamentos com PEG e PEG+ABA foram eficientes no restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *S. virgata*, sendo que aquelas com radículas de 2, 3 e 4 mm tratadas com PEG apresentaram 50%, 47% e 14% de sobrevivência, e, quando tratadas com PEG+ABA, aquelas com 1, 2, 3, 4 e 5 mm apresentaram 100%, 61%, 61%, 63% e 64% de tolerância à dessecação, respectivamente. Sementes germinadas de *C. fissilis* não toleraram a dessecação até 10% de umidade, independente do comprimento da radícula. Entretanto, quando tratadas com PEG, aquelas com radículas de 1 e 2 mm de comprimento apresentaram 71% e 29% de sobrevivência, respectivamente, quando o teor de água foi reduzido a 10%. O tratamento com PEG+ABA foi eficiente para restabelecer a tolerância à dessecação nas sementes com radículas de 1 mm (100% de sobrevivência). A análise da integridade do DNA, avaliações citológicas e ultraestrutural e o teste de TUNEL detectaram a ocorrência de morte celular nas radículas de *S. virgata* e de *C. fissilis* que não sobreviveram à desidratação a 10%.

***Comitê Orientador:** José Márcio Rocha Faria, PhD - UFLA (Orientador), Antonio Claudio Davide, Dr. – UFLA (Co-orientador), Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, PhD – UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

Masetto, Tathiana Elisa. **Re-establishment of desiccation tolerance in germinated seeds of *Sesbania virgata* and *Cedrela fissilis***. 2008. 82p. (Thesis – Forest Engineering) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*.

The objective of this study was to investigate alterations in radicle cells during loss and re-establishment of desiccation tolerance (DT) in germinated seeds of *S. virgata* and *C. fissilis*. In order to re-establish DT, germinated seeds of *S. virgata* and *C. fissilis* with radicle length of 1, 2, 3, 4 and 5 mm were treated, for 72h, with PEG (-2.04 MPa) and PEG (-2.04 MPa) + ABA (100 μ M) before dehydration. Seeds were then dehydrated in silica gel to decreasing moisture contents and, at each 10 percent point intervals; samples were taken, pre-humidified (100% RH for 24h) and rehydrated (germination conditions). The cytological assays (cell viability, TUNEL test and electronic transmission microscopy) and DNA integrity were evaluated in *S. virgata* (radicles with 1, 3 and 5 mm length) and *C. fissilis* (1, 2 and 5 mm). Germinated seeds of *S. virgata*, with 1 mm radicle length tolerated the dehydration to 10% moisture content (MC), attained 97% survival upon rehydration, while those with radicle longer than 1mm did not survive. PEG treatment was capable to re-establish DT in *S. virgata* germinated seeds with radicle length of 2, 3 and 4 mm (50%, 47% and 14% survival, respectively). When treated with PEG+ABA, the survival rates in germinated seeds with 1, 2, 3, 4 and 5 mm radicle length were 100%, 61%, 61%, 63% and 64%, respectively. Germinated seeds of *C. fissilis* did not tolerate desiccation to 10% moisture content, irrespectively of the radicle length. However, when treated with PEG, those with radicle length of 1 and 2 mm attained 71% and 29% survival, respectively, when moisture content was reduced to 10%. The PEG+ABA treatment was efficient to re-establish DT in seeds with 1 mm long radicles (100% survival). The analysis of DNA integrity, cytological and ultrastructural evaluations and the TUNEL test detected cell death in radicles of *S. virgata* and *C. fissilis* that did not survive dehydration to 10%.

***Guidance Committee:** José Márcio Rocha Faria, PhD - UFLA (Adviser), Antonio Claudio Davide, Dr. – UFLA (Co-adviser), Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, PhD - UFLA (Co-adviser).

Introdução geral

A intervenção humana vem reduzindo drasticamente a área das florestas tropicais, as quais contribuem com a biodiversidade e a manutenção do equilíbrio climático global (Piva et al., 2007). A conservação *ex situ*, ou seja, fora da área de ocorrência das espécies, como em bancos de sementes, vem sendo empregada com sucesso para manutenção do germoplasma de espécies arbóreas tropicais e subtropicais, que vêm sendo ameaçadas de extinção, devido à expansão das fronteiras agrícolas e intensa exploração da madeira. Entretanto, a deficiência de conhecimento sobre as condições ideais de armazenamento de sementes de algumas espécies impede a manutenção da viabilidade do germoplasma de algumas espécies em bancos de sementes (Jetton et al., 2008).

A tolerância à dessecação, uma propriedade rara de vida dos organismos, é, notadamente, um mecanismo de sobrevivência que caracteriza os estágios do ciclo de vida. Entretanto, o fenômeno é reconhecido somente em espécies pertencentes a cinco filos entre os animais e como uma propriedade encontrada em bactérias, microalgas terrestres e líquens, sementes e plantas de ressurreição (Alpert, 2005). Há uma evidência emergente de que pode haver similaridades consideráveis entre os mecanismos que regem a tolerância à dessecação dentro de um espectro de organismos que exibem esta característica, independentemente de suas filogenias (Berjak, 2006).

A sensibilidade à dessecação limita a conservação *ex situ* de mais de 47% das espécies vegetais. Embora desejável, determinar empiricamente os níveis de tolerância à dessecação de todas as espécies é improvável (Daws et al., 2006). Entender os limites da tolerância à dessecação, provavelmente, ajudará a estender seus limites. Talvez a fronteira científica mais instigante do estudo da tolerância à dessecação seja como induzir ou produzir tal tolerância em sementes sensíveis (Crowe et al., 2005). Essa possibilidade vem sendo demonstrada, em

diversos trabalhos, por meio de aplicação de estresse osmótico em sementes ortodoxas germinadas (Bruggink & Toorn, 1995; Buitink et al., 2003; Leprince et al., 2000; Faria et al., 2005; Vieira, 2008).

O entendimento dos eventos celulares que ocorrem durante a perda e o restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas, técnicas largamente utilizadas em pesquisas com biologia celular, tais como, avaliações sobre a integridade do DNA, o aspecto dos núcleos, teste de TUNEL e microscopia eletrônica de transmissão, podem ampliar o conhecimento sobre o assunto.

Há, ainda, a necessidade de obter modelos fisiológicos que dissociem o fenômeno da aquisição de tolerância à dessecação de outros programas do desenvolvimento durante a maturação e a germinação e facilitar a interpretação dos sinais que direcionam a sobrevivência no estado desidratado (Buitink, et al., 2003).

No intuito de estabelecer sistemas modelos para avaliar as alterações das características intracelulares durante a perda e o restabelecimento da tolerância à dessecação, este trabalho foi desenvolvido utilizando-se sementes ortodoxas de *Cedrela fissilis* e *Sesbania virgata* após a germinação.

Cedrela fissilis (cedro, cedro-rosa e cedro-vermelho, entre outras sinónímias) pertence à família Meliaceae, ocorrendo desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais, principalmente nas florestas semidecídua e pluvial atlântica. Apresenta de 20 a 35 metros de altura e seu tronco varia de 60 a 90 centímetros de diâmetro. Sua madeira, considerada de boa qualidade, é largamente empregada no setor moveleiro, construção civil, naval e aeronáutica. A árvore de cedro também é recomendada para o paisagismo e a recomposição ambiental (Lorenzi, 1992). É uma espécie de grande valor econômico, em crescente risco de extinção, o que leva à necessidade de se estabelecerem plantios e explorações racionais (Barbedo et al., 1997).

Sesbania virgata é um arbusto pertencente à família Fabaceae, com até 6 m de altura, 25 cm de diâmetro do tronco à altura do peito e 5 m de diâmetro de copa (Araújo et al., 2003). É conhecida popularmente como sarazinho, mãe-josé e feijãozinho, distribuindo-se pelas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Apresenta floração mais intensa nos meses de janeiro, abril, setembro e outubro e frutificação nos meses de janeiro, outubro e novembro (Pott & Pott, 1994). Ocorre, principalmente, em matas de galerias de regiões tropicais e está associada com os estágios iniciais da sucessão ecológica (Potomati & Buckeridge, 2002).

Esta espécie mostra uma preferência por áreas alagáveis, ocorrendo às margens de rios, lagos e represas, solos arenosos e argilosos. Resiste à inundação na estação chuvosa quando a água pode alcançar até 2 m da superfície do solo e persistir por algumas semanas (Kolb et al., 2002). Apresenta grande potencial para revegetação de áreas degradadas sujeitas a inundações periódicas, devido à sua alta tolerância a condições de baixa oxigenação e deficiências minerais do solo, e sua propagação por sementes pode ser realizada com sucesso (Zayat, 1996). Sua capacidade de fixar N₂ permite seu crescimento rápido em solos deficientes, favorecendo sua utilização como adubo verde (Carvalho, 2002; Rodrigues et al., 2003).

Além disso, a grande quantidade produzida de sementes de *Sesbania virgata* e de *Cedrela fissilis* facilita o uso de tais espécies para investigar o fenômeno de tolerância/sensibilidade à dessecação, durante e após a germinação.

No intuito de contribuir para o conhecimento de aspectos determinantes da tolerância à dessecação, este trabalho foi realizado com os objetivos de definir as condições necessárias para o restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Cedrela fissilis* e *Sesbania virgata*, utilizando tratamento osmótico e ABA, e investigar, com técnicas aplicadas ao

estudo de biologia celular, as alterações que ocorrem nas células da radícula durante a perda e o restabelecimento da tolerância à dessecação.

Referências Bibliográficas

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

BARBEDO, C. J.; MARCOS FILHO, J.; NOVENBRE, A. D. L. C. Condicionamento osmótico e armazenamento de sementes de cedro-rosa (*Cedrela fissilis*). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 354-360, 1997.

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

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

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

CARVALHO, Y. **Caracterização fenotípica, genotípica e simbiótica de Azorhizobium sp de Sesbania virgata (Caz.) Pers.** 2002. 89 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; WOLKERS, W. F.; OLIVER, A. E.; MA, X.; AUH, J. H.; TANG, M.; ZHU, S.; NORRIS, J.; TABLIN, F. Stabilization of dry mammalian cells: lessons from nature. **Integrative and Comparative Biology**, v.45, Madison, v. 45, n. 5, p. 810-820, Nov. 2005.

DAWS, M. I.; GARWOOD, N. C.; PRITCHARD, H. D. Prediction of Desiccation Sensitivity in seeds of woody species: a probabilistic model based on two seed traits and 104 species. **Annals of Botany**, London, v. 97, n. 4, p. 667-674, Apr. 2006.

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

JETTON, R. M.; DVORAK, W. H.; WHITTIER, W. A. Ecological and genetic factors that define the natural distribution of Carolina hemlock in the southeastern United States and their role in ex situ conservation. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, n. 8-9, p. 3212–3221, May 2008.

KOLB, R. M.; RAWYLER, A.; BRAENDLE, R. Parameters affecting the early seedling development of four neotropical trees under oxygen deprivation stress. **Annals of Botany**, London, v. 81, n. 5, p. 551-558, 2002.

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

PIVA, L. H.; FURTADO, M.; BAITELO, R. L. Mudanças climáticas e medidas nacionais de mitigação. **Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente**, São Paulo, v. 2, n. 5, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.interfacehs.sp.senac.br>>.

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

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Corumbá: EMBRAPA/CPAP/SPI, 1994. 320 p.

RODRIGUES, L. A.; MARTINS, M. A., SALOMÃO, M. S. M. B. Usos de micorrizas e rizóbio em cultivo consorciado de eucalipto e sesbânia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 27, n. 4, p. 583-591, jul./ago. 2003

ZAYAT, A. G. **Termobiologia da germinação de sementes de *Sesbania virgata* (Fabaceae)**. 1968, 68 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

CAPÍTULO 1

ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS DURANTE A PERDA E O RESTABELECIMENTO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES GERMINADAS DE *Sesbania virgata* (Cav.) (Pers.) (FABACEAE)

1 RESUMO

MASETTO, Tathiana Elisa. Alterações citológicas durante a perda e o restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Sesbania virgata* (Cav.) (Pers.) (FABACEAE). In: _____. **Restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Sesbania virgata* e *Cedrela fissilis***. 2008. Cap. 2, p. 9-43. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Sementes ortodoxas germinadas podem ser utilizadas como sistemas modelo para o estudo da recalcitrância, devido à perda progressiva da tolerância à dessecação após o início da germinação, tornando-se comparáveis às sementes recalcitrantes, porém, com a vantagem de tornar possível o armazenamento. *Sesbania virgata*, um arbusto pertencente à família Fabaceae, produz sementes ortodoxas em grande quantidade e de fácil manipulação para pesquisa em fisiologia de sementes. O presente estudo foi realizado com o objetivo de estabelecer um protocolo de re-indução de tolerância à dessecação em sementes de *Sesbania virgata* após a germinação, utilizando polietileno glicol (PEG 8000) e investigar as mudanças que ocorrem, na célula, durante a perda e o restabelecimento da tolerância à dessecação. Para a caracterização da perda da tolerância à dessecação, sementes foram germinadas até atingirem diferentes comprimentos de radícula (1, 2, 3, 4 e 5 mm), sendo, em seguida, submetidas à secagem em sílica gel, reduzindo-se o teor de água a cada dez pontos percentuais. Para re-induzir a tolerância à dessecação, sementes germinadas foram tratadas com PEG (-2,04 MPa), por 72 horas e PEG (-2,04 MPa) + ABA (100 µM), por 72 horas, sendo, em seguida, desidratadas em sílica gel com redução do teor de água a cada dez pontos percentuais, pré-umidificadas (100% UR/24h) e reidratadas (condições ideais de germinação). As avaliações citológicas (viabilidade celular, teste de TUNEL e microscopia eletrônica de transmissão) e da integridade do DNA foram feitas em sementes germinadas com comprimento de radícula de 1, 3 e 5 mm, submetidas ao tratamento com PEG. Sem os tratamentos de re-indução, apenas as sementes com radículas de 1 mm de comprimento sobreviveram à desidratação a 10% de teor de água. O tratamento com PEG foi capaz de re-induzir a tolerância à dessecação, tendo as sementes com radículas de 2, 3 e 4 mm apresentado 50%, 47% e 14% de sobrevivência, respectivamente, quando o teor de água foi reduzido a 10%. Entretanto, não houve retomada do crescimento das radículas com 5 mm de comprimento. A aplicação de PEG+ABA foi eficiente para re-induzir a tolerância à dessecação nas radículas com todos os comprimentos estudados, tendo as radículas com 1, 2, 3, 4 e 5 mm submetidas a este tratamento e posteriormente desidratadas a 10% de teor de água, apresentado 100%, 61%, 61%, 63% e 64% de tolerância à dessecação, respectivamente. Pela análise de

integridade do DNA, somente o material genético das radículas com 1 mm manteve a integridade após a secagem a 10%. A análise citológica das radículas de *S. virgata* permitiu verificar a mortalidade em 26% e 67,5% das células com radículas de 3 e 5 mm de comprimento tratadas com PEG e secas posteriormente a 10% de teor de água. O TUNEL-positivo confirmou os resultados obtidos por meio da fluorescência verde dos núcleos das células das radículas com 3 e 5 mm, assim como a análise ultra-estrutural das células, que detectou a perda da integridade do conteúdo celular das radículas após a desidratação severa.

Palavras chave: *Sesbania virgata*, tolerância à dessecação, estresse osmótico e ácido abscísico (ABA).

***Comitê Orientador:** José Márcio Rocha Faria, PhD - UFLA (Orientador), Antonio Claudio Davide, Dr. – UFLA (Co-orientador), Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, PhD – UFLA (Co-orientador).

2 ABSTRACT

MASETTO, Tathiana Elisa. Cytological alterations during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinated seeds of *Sesbania virgata*. In: _____. **Re-establishment of desiccation tolerance in germinated seeds of *Sesbania virgata* and *Cedrela fissilis***. 2008. Chapter 2, p. 9-43. Thesis – (Doctoral degree in Forest Engineering) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Germinated orthodox seeds can be used as a model system for research on recalcitrance, due to the progressive loss of desiccation tolerance after the early stages of germination, becoming comparable to the recalcitrant seeds, however, with the advantage of storage possibility. *Sesbania virgata*, a shrub belonging to Fabaceae, produces orthodox seeds in great amount and of easy manipulation for research in seeds physiology. This research aimed re-establishment of desiccation tolerance in germinated seeds, using polyethylene glycol (PEG 8000) and to investigate the changes at the cell level during the loss and the re-establishment of the desiccation tolerance. The loss of desiccation tolerance was characterized through germinated seeds with different radicle lengths (1, 2, 3, 4 and 5 mm), being soon after submitted to dehydration in silica gel to each ten percentile points water content. To re-establishment the desiccation tolerance, germinated seeds were treated with PEG (-2,04 MPa) for 72 hours and PEG (-2,04 MPa) + ABA (100 μ M) for 72 hours, and dehydrated in silica gel reducing the water content to each ten percentile points, pre-humidified (100% UR/24h) and rehydrated (germination conditions). The cytological assays (cell viability, TUNEL test and electronic transmission microscopy) and DNA integrity were evaluated in 1, 2 and 5 mm radicle lengths PEG-treated. Without the re-induction treatments, only 1mm radicle length dehydration at 10% of water content. The PEG treatment re-established the desiccation tolerance, and the 2, 3 and 4 mm PEG-treated radicles length presented 50%, 47% and 14% of survival, respectively, at 10% dehydration, however, there was not effect on 5 length mm radicle length. The PEG+ABA treatment was efficient to re-establish the desiccation tolerance in all radicle lengths studied, and the 1, 2, 3, 4 and 5 mm radicle lengths submitted to this treatment and dehydrated at 10% of WC presented 100%, 61%, 61%, 63% and 64% of desiccation tolerance, respectively. Through DNA integrity assay, only 1 mm radicle length maintained the DNA integrity at 10% dehydration. The cytological analysis of *S. virgata* radicles allowed to verify the mortality in 26% and 67,5% of the 3 and 5mm radicle length PEG-treated at 10% dehydration. The positive-Tunnel confirmed the obtained results, through the green fluorescence of the cell nuclei from 3 and

5 mm radicle length, as well as the ultrastructural analysis detected the loss of cellular content integrity after severe dehydration.

Key words: *Sesbania virgata*, desiccation tolerance, osmotic stress, and abscisic acid (ABA).

***Guidance Committee:** José Márcio Rocha Faria, PhD - UFLA (Adviser), Antonio Claudio Davide, Dr. – UFLA (Co-adviser), Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, PhD - UFLA (Co-adviser).

3 INTRODUÇÃO

A tolerância à dessecação corresponde à habilidade para sobreviver sob intensa desidratação protoplasmática. Este fenômeno é comum no reino vegetal, incluindo pteridófitas, líquens, polens e sementes de muitas angiospermas. Em sementes ortodoxas, a tolerância à dessecação é adquirida durante a metade da fase de maturação, aproximadamente. Após a embebição das sementes, a radícula emergida é a primeira a perder a habilidade de tolerar a secagem, seguida pelo hipocótilo e cotilédones. No estágio de plântula, os tecidos também não podem sofrer desidratação e assemelham-se às sementes recalcitrantes (Boudet et al., 2006).

Quando os embriões são hidratados e o processo germinativo inicia-se, as células reidratadas permanecem ilesas até o momento da secagem subsequente e continuam assim até que um estágio crítico da germinação é alcançado, após o qual a desidratação provoca a morte do embrião. Neste estágio, o embrião passa de tolerante para intolerante à dessecação. A estabilidade do DNA durante a desidratação e sua capacidade de reparo durante a reidratação são componentes essenciais de um mecanismo de tolerância completo (Boubriak et al., 1997).

Portanto, o início do processo germinativo em sementes ortodoxas torna-as semelhantes às sementes recalcitrantes. Considera-se a possibilidade de que uma desidratação moderada possa estimular o metabolismo, ou seja, um estresse moderado pode restabelecer a tolerância à dessecação em sementes ortodoxas germinadas sensíveis à dessecação (Buitink et al., 2003). Assim, o tratamento osmótico com polietileno glicol (PEG), um agente osmótico que não provoca a plasmólise, simula a mesma condição na radícula de sementes ortodoxas germinadas. A aplicação combinada de PEG e ABA tem se tornado uma rotina para estimular a maturação do embrião de algumas coníferas, sendo

possível simular o estresse hídrico natural que ocorre nas fases finais da maturação do embrião. Além disso, após a completa dessecação, uma grande porcentagem de embriões tratados com PEG é capaz de se converter em plântulas (Stasolla et al., 2003).

O fenômeno de tolerância à dessecação em qualquer sistema pode ser avaliado pela extensão de sobrevivência das células durante a reidratação. Quanto mais mecanismos de proteção dispostos para a célula durante o processo de desidratação, maior será a integridade da informação genética e menor será a demanda por transcritos de DNA para a síntese “de novo” de constituintes de membranas, organelas e citoesqueleto.

A dinâmica da perda da viabilidade no estado desidratado e as características biofísicas essenciais têm sido amplamente reportadas, tais como o enfraquecimento do estado vítreo do citoplasma, combinado com a hidrólise de açúcares e o desencadeamento de processos oxidativos (Pukacka & Ratajczak, 2005), resultando em danos aos lipídeos, proteínas e DNA (Apel & Hirt, 2004).

Vale ressaltar que direcionar as pesquisas para a investigação das características das células de sementes germinadas durante a desidratação e posterior reidratação, utilizando técnicas aplicadas à biologia celular, como o teste de TUNEL (*terminal deoxynucleotide transferase mediated-dUTP nick-end labeling*), que detecta extremidades de fragmentos de DNA pela incorporação de nucleotídeos modificados (dUTP) pela enzima transferase terminal de desoxinucleotídeos e microscopia eletrônica de transmissão, podem ser úteis ao entendimento dos mecanismos que regem a tolerância e a sensibilidade à dessecação em sementes ortodoxas e recalcitrantes, respectivamente.

Porém, a dificuldade de manuseio de sementes recalcitrantes, devido à rápida perda de viabilidade, também é um entrave nas pesquisas sobre a sensibilidade à dessecação. Assim, a manipulação de sementes ortodoxas durante a fase de germinação, ou seja, quando estas se assemelham às sementes

recalcitrantes, pode ser eficiente para investigar a natureza da tolerância à dessecação e as causas da sensibilidade em sementes recalcitrantes.

Diante do exposto, nesta pesquisa, a espécie contemplada para o estudo citológico do processo de re-indução de tolerância à dessecação foi a *Sesbania virgata*, pertencente à família Fabaceae. A espécie apresenta porte arbustivo com até 6 m de altura, 25 cm de diâmetro do tronco à altura do peito e 5 m de diâmetro de copa (Araújo et al., 2004). É conhecida popularmente como sarazinho, mãe-josé e feijãozinho, distribuindo-se pelas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Apresenta floração mais intensa nos meses de janeiro, abril, setembro e outubro e frutificação nos meses de janeiro, outubro e novembro (Pott & Pott, 1994).

Além disso, o estudo relacionado aos mecanismos de tolerância/sensibilidade à dessecação em sementes é importante para que, no futuro, sementes com comportamento recalcitrante possam também ser armazenadas *ex situ*, contribuindo para a conservação da diversidade vegetal.

Dessa forma, objetivou-se, com a realização deste trabalho, investigar as alterações citológicas durante a perda e o restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Sesbania virgata*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e beneficiamento de sementes: foram coletados, manualmente, frutos maduros de aproximadamente 40 matrizes, na região de Ijaci (21°10'S, 44°54'W), localizada ao sul de Minas Gerais, durante a primeira quinzena do mês de fevereiro. Após a coleta, os frutos foram levados ao Viveiro Florestal do Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. O beneficiamento consistiu na quebra dos frutos no interior de sacos de aniagem com martelo de borracha, de acordo com as recomendações de Davide et al. (1995).

Determinação do grau de umidade: o grau de umidade foi determinado pelo método da estufa, a $103\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 17 horas (Brasil, 1992), com quatro repetições de 2 g de sementes. Os resultados foram calculados com base no peso das sementes úmidas.

Teste de germinação: inicialmente, foi superada a dormência tegumentar que as sementes de *S. virgata* apresentam, por meio de escarificação química com ácido sulfúrico concentrado, densidade 1,84, durante 40 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas em água corrente, durante 10 minutos e desinfestadas com hipoclorito de sódio, a 2%, durante 2 minutos e, então, semeadas sobre papel de filtro umedecido no interior de caixas plásticas tipo gerbox. O experimento foi conduzido em BOD, sob temperatura de 25°C e luz branca constante, com base no proposto pelas Regras para Análise de Sementes para sementes de *S. exaltata* (Brasil, 1992).

Curva de embebição: foram utilizadas 5 repetições de 10 sementes, previamente escarificadas com ácido sulfúrico concentrado e mantidas nas mesmas condições de semeadura citadas anteriormente. As pesagens foram realizadas a cada 6 horas de embebição, até o final de 3 dias após a semeadura.

Avaliação da perda da tolerância à dessecação após a germinação: após a semeadura das sementes, como descrito anteriormente, e a germinação, aquelas que apresentavam 1, 2, 3, 4 e 5 mm de comprimento de radícula foram retiradas e submetidas à secagem. A desidratação ocorreu no interior de caixas plásticas tipo gerbox, vedadas com filme plástico, colocando-se as sementes sobre um telado, tendo uma camada de sílica gel ativada (8%) ao fundo. Durante a desidratação, foram realizadas pesagens sucessivas, até que o peso encontrado coincidissem com o peso desejado, correspondente ao grau de umidade desejado, por meio da expressão proposta por Cromarty et al. (1985). Após a desidratação, as sementes foram pré-umidificadas em câmara úmida (100% UR), durante 24 horas, a 25°C, e, então, reidratadas sobre papel umedecido, dentro de gerbox, a 25°C e luz branca constante. As sementes que retomaram seu desenvolvimento e originaram plântulas normais foram consideradas tolerantes à dessecação. O experimento foi conduzido com 4 repetições de 25 sementes para cada comprimento de radícula.

Restabelecimento da tolerância à dessecação com PEG: as sementes com 1, 2, 3, 4 e 5 mm de comprimento de radícula foram colocadas sobre uma folha de papel de germinação, em placas de Petri, às quais foram adicionados 20 mL de solução de PEG 8000 (380 gramas dissolvidos em 1 litro de água, segundo Michel & Kaufmann, 1973). As sementes permaneceram nesta condição durante 72 horas, a 5°C, tendo esta temperatura proporcionado um potencial osmótico de -2,04 MPa, o qual não permitiu o crescimento das radículas. Após esse período, as sementes foram retiradas, lavadas em água corrente para a remoção dos resíduos de solução e secas sobre papel toalha, durante 10 minutos até que o excesso de água fosse eliminado, em condições de temperatura e umidade relativa do ambiente. Paralelamente, foi determinado o teor de água das sementes. Posteriormente, as sementes foram submetidas à desidratação a cada dez pontos percentuais com sílica gel ativada (8%), em sala

climatizada (20°C/60%UR), até que fosse atingido o teor de água original das sementes e, em seguida, submetidas à pré-umidificação e à reidratação, da mesma forma citada anteriormente.

Restabelecimento da tolerância à dessecação com PEG + ABA: as sementes com 1, 2, 3, 4 e 5 mm de comprimento de radícula foram colocadas sobre uma folha de papel de germinação, em placas de Petri, às quais foram adicionados 20 ml de solução de PEG 8000 (380 gramas dissolvidos em 1 litro de água) e ABA (100µM). As sementes permaneceram nesta condição durante 72 horas, a 5°C, tendo esta temperatura proporcionado um potencial osmótico de -2,04 MPa, o qual não permitiu o crescimento das radículas. Após esse período, as sementes foram retiradas, lavadas em água corrente para a remoção dos resíduos de solução e secas sobre papel toalha, durante 10 minutos, até que o excesso de água fosse eliminado, em condições de temperatura e umidade relativa do ambiente. Paralelamente, foi determinado o teor de água das sementes. Posteriormente, as sementes foram submetidas à desidratação, a cada dez pontos percentuais, com sílica gel ativada no interior de sala climatizada (20°C/60%UR), até que fosse atingido o teor de água original das sementes e, em seguida, foram submetidas à pré-umidificação e à reidratação da mesma forma citada anteriormente.

Extração de DNA e eletroforese para avaliar a integridade do DNA: A microextração de DNA da ponta das radículas com 1, 3 e 5 mm de comprimento foi realizada de acordo com o protocolo com CTAB 2X modificado. Inicialmente, as amostras foram maceradas separadamente em nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó bem fino, que foi transferido para um microtubo de 2mL. Foram acrescentados 700µL de CTAB 2X (água pura; 1M TRIS-HCl pH 7,5; 5M NaCl; 0,5M EDTA pH 8,0; 2 g CTAB) pré-aquecido, a 65°C, mantendo-se esta temperatura por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e os

microtubos foram invertidos durante 5 minutos, quando, então, foram centrifugados a 12.000 rpm, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e acrescentaram-se 450 µL de isopropanol gelado, mantendo à temperatura de -20°C, durante 24 horas. Após a precipitação do DNA, os microtubos foram centrifugados, durante 10 minutos, a 12.000 rpm e 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, adicionaram-se 100 µL de etanol 70% e os tubos permaneceram em repouso por 10 minutos, quando foram novamente centrifugados, a 4000 rpm e 4°C, durante 10 minutos, com a finalidade de remover resíduos de CTAB. Os tubos foram então invertidos em um papel limpo para secar o pélete, que posteriormente foi dissolvido em 50 µL de TE pH 8,0 (10mM TRIS-HCl e 1mM EDTA).

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

Avaliação citológica das radículas após re-indução da tolerância à dessecação: de acordo com os resultados obtidos nos experimentos anteriores, as plântulas com comprimento de radícula de 1, 3 e 5 mm, frescas e submetidas à secagem em PEG 8000, sílica gel e reidratadas, foram escolhidas para a avaliação citológica. As pontas das radículas foram coletadas, fixadas em solução de Carnoy {metanol:ácido acético - (3:1)} e armazenadas a -20°C, até o momento da preparação das lâminas. Para o preparo das lâminas, inicialmente, as pontas das radículas foram retiradas da solução fixadora e submetidas a duas lavagens em água destilada (5 minutos cada). Subseqüentemente, as radículas foram secas em papel de filtro e maceradas em uma solução enzimática {2% celulase (Sigma): 20% pectinase (Sigma) diluída em tampão citrato-fosfato pH 4,8}, a 37°C, por 6 horas. Posteriormente, as lâminas foram preparadas pela técnica de dissociação celular, como descrito por Carvalho & Saraiva (1993) e

coradas com Giemsa 5%, durante 12 minutos. As lâminas foram avaliadas em microscópio de luz (Leica) e as imagens capturadas por meio de uma microcâmara digital Nikon acoplada ao microscópio e transferidas para um microcomputador. Nessas, lâminas foram comparadas à morfologia das células dos meristemas radiculares antes e após a secagem. Foram analisadas 5 lâminas para cada tratamento, sendo avaliadas 200 células por lâmina. Essas atividades foram realizadas no Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Lavras.

Teste de TUNEL nas radículas após re-indução da tolerância à dessecação: a reação do *terminal deoxynucleotide transferase mediated-dUTP nick-end labeling*, ou TUNEL, é utilizada para avaliar a fragmentação do DNA pela detecção das extremidades 3'-OH da fita do DNA, pela ação da enzima terminal transferase de desoxinucleotídeo, por meio de fluorescência verde. Foi utilizado o protocolo de acordo com as instruções do fabricante do “Kit APO-BrdUTM TUNEL Assay” (Invitrogen - Molecular Probes) com Alexa fluor. Foram utilizadas três radículas com comprimentos de 1, 3 e 5 mm frescas e submetidas ao tratamento com PEG e secagem na sílica a 10% de grau de umidade fixadas em paraformaldeído a 1%, durante 12 horas. Após esse período, as radículas foram desidratadas em gradiente alcoólico durante 1 hora cada (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), fixadas em cera Steedman a 37%, utilizando uma série de cera:etanol (v:v) (50:50%, 70:30%, 90:10%) e 100% de cera, a cada 1 hora. As radículas foram seccionadas longitudinalmente com espessura de 10µm com micrótomo e as reações foram preparadas de acordo com o fabricante. As imagens foram observadas com microscópio epifluorescente utilizando comprimento de onda de 500nm (Olympus BX60).

Análise da morfologia celular por meio de microscopia eletrônica de transmissão: as plântulas com comprimento de radícula de 1, 3 e 5 mm frescas e submetidas à secagem em PEG 8000, sílica gel e reidratadas foram analisadas

tomando-se 5 radículas por tratamento, sendo fixadas na solução Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5%; formaldeído 2% em um tampão sódio cacodilato 0,05M; CaCl₂ 0,001M, pH 7,2). As amostras foram lavadas três vezes (10 minutos cada) com o tampão cacodilato 0,05M e, depois, foram fixadas em uma solução aquosa de tetróxido de ósmio 1%, durante 2 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas em água MiliQ, durante 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram contrastadas em acetato de uranila (0,5%), durante 12 horas, a 4°C e desidratadas em uma gradativa de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%, três vezes). Em seguida, realizou-se a infiltração em resina, sendo o material incluído em gradiente crescente de Spurr/acetona 30%/8h; 70%/12h e 100% duas vezes, por 24 horas cada, tendo as amostras sido transferidas para moldes de silicone e polimerizadas em estufa a 70°C, por 48 horas. Os cortes foram realizados com o ultramicrotomo Reichart-Jung, cuja lâmina de diamante permitiu seccionar os tecidos com espessura inferior a 100nm e contrastados com acetato de uranila, seguido por citrato de chumbo (3 minutos). As amostras foram avaliadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109, Carl Zeiss, Jena, Alemanha), a 80 kV, utilizando células do meristema radicular. As atividades citadas nesse item foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva de embebição de sementes de *Sesbania virgata* consta na Figura 1. Após 48 horas de embebição, 98% das sementes apresentaram protrusão de radícula. Os resultados referentes à porcentagem de sobrevivência das sementes com diferentes comprimentos de radícula, que foram diretamente submetidas à desidratação com sílica gel em função de diferentes níveis de hidratação, estão dispostos na Figura 2. Pelos resultados observados, é possível inferir que apenas as sementes com 1 mm de comprimento de radícula mantiveram a alta porcentagem de sobrevivência quando desidratadas ao teor de água original (próximo de 10%). A partir do comprimento de radícula de 2 mm, houve praticamente a nulidade da sobrevivência das radículas, quando desidratadas abaixo de 30% de grau de umidade. Os resultados obtidos com a técnica de restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Sesbania virgata* estão apresentados nas Figuras 3 e 4.

Black & Pritchard (2002) sugerem que a dessecação é prejudicial por vários motivos, entre eles os danos que incidem no citoesqueleto como resultado das mudanças que ocorrem no volume celular. Além disso, a remoção da água pode ocasionar danos às membranas, mudança de pH, cristalização de solutos e desnaturação de proteínas. Aparentemente, a tolerância à dessecação não é alcançada por somente uma simples característica adaptativa, mas por uma interação complexa de muitos mecanismos.

Quando plântulas são colocadas em condições apropriadas de secagem, com controle de temperatura e de umidade relativa do ambiente adequadas a uma desidratação segura e homogênea, algumas espécies têm demonstrado ser dotadas de mecanismos capazes de resgatar a capacidade de tolerância à dessecação e permanecerem com o meristema radicular vivo. Isso foi observado em plântulas de *Medicago truncatula* cv. Paraggio, nas quais a perda da

tolerância à dessecação ocorreu com 2,7 mm de comprimento de radícula (Buitink et al., 2003).

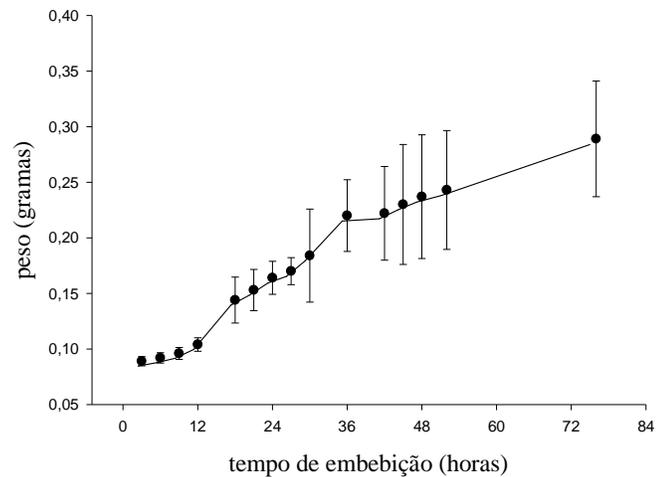


FIGURA 1: Curva de embebição de sementes de *Sesbania virgata*.

Durante a coleta dos dados, foi observado que, conforme a reidratação das sementes com 1 mm de comprimento de radícula que haviam sido submetidas à secagem até 10% de umidade, inicialmente, a raiz primária apresentou aspecto de necrose, caracterizado pelo escurecimento dos tecidos. Consequentemente, primórdios de raízes adventícias projetavam-se ao redor da porção final do hipocótilo, acompanhando o desenvolvimento das plântulas de *S. virgata*. Após a retomada do crescimento, as plântulas com parte aérea e sistema radicular desenvolvidos foram classificadas como tolerantes à dessecação. Posteriormente, tais sintomas de aparecimento de raízes adventícias também foram visualizados nas sementes com os demais comprimentos de radícula. A emissão de raízes adventícias em sementes submetidas ao estresse hídrico também foi observada por Vieira (2008) ao re-induzir a tolerância à dessecação

em sementes germinadas de *Tabebuia impetiginosa* (ipê-roxo), uma espécie nativa do Brasil.

Gutterman & Gozlan (1998) relataram que plântulas de *Hordeum spontaneum* com raiz primária de 40-50 mm de comprimento sobreviveram sob completa desidratação, durante 3 semanas, tendo seu cariopse retornado ao peso seco original e também ocorrido a emissão de raízes adventícias.

A habilidade para desenvolver raízes varia largamente entre as espécies e pode estar relacionada à hipótese de adaptação, devido ao fato de a proliferação de raízes aumentar a absorção de nutrientes numa situação de competição, à hipótese de ocupação (a proliferação de raízes permite o estabelecimento de espécies sub-dominantes) ou pode ser consequência de outras características diferentes, tais como a taxa de crescimento de uma determinada planta (Kembel et al., 2008). No caso de *S. virgata*, há relatos, na literatura, de que é uma planta adaptada a condições inóspitas (Kolb et al., 2002; Carvalho, 2002; Rodrigues et al., 2003) e tal rusticidade pode favorecer a perpetuação da espécie em locais com diferentes condições.

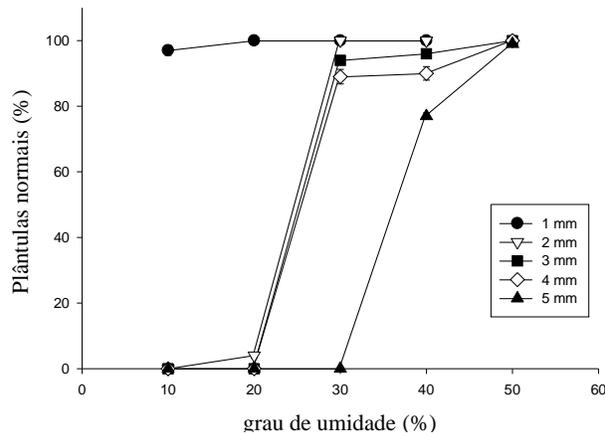


FIGURA 2: Tolerância à dessecação de sementes germinadas com diferentes comprimentos de radícula submetidas diretamente à secagem com sílica gel a diferentes graus de umidade.

As radículas com comprimento de 1 mm mantiveram a alta taxa de sobrevivência (97%), assim como o tratamento com PEG re-induziu substancialmente a tolerância à dessecação em sementes com radícula acima de 2 mm e teores de água até 20%, exceto o comprimento de 5 mm, que perdeu completamente a viabilidade quando o teor de água foi reduzido para 30% (Figura 3). A morte das radículas foi observada pelo amolecimento e flacidez dos tecidos da porção final da raiz primária. Vieira (2008) também obteve resultados positivos com a aplicação do PEG para re-induzir a tolerância à dessecação em radículas de *Alliaria petiolata* com 2,5 mm de comprimento submetidas à secagem com sílica gel.

A condição de secagem rápida (a sílica gel proporciona umidade relativa próxima de 8%) foi eficiente para avaliar a porcentagem final de sobrevivência das radículas. Geralmente, em sementes recalcitrantes, quanto mais rápida a secagem mais baixo é o conteúdo de água que a semente pode tolerar, pelo fato

de não haver tempo suficiente para o progresso de reações de efeito deletério que causariam a perda da viabilidade em materiais sensíveis à dessecação (Pammenter et al., 1998).

Células de embriões que estão na fase tolerante à dessecação (primeiras horas de embebição) permanecem tolerantes à dessecação quando submetidas à secagem e germinam quando reidratadas. As evidências sugerem que a competência para executar o reparo efetivo do DNA durante a reidratação determina a tolerância para a desidratação dos tecidos (Boubriak et al., 1997). Durante o tratamento osmótico com PEG ocorre um estímulo que é necessário para induzir a tolerância à dessecação em sementes após a germinação (Buitink et al., 2003).

As taxas de sobrevivência das radículas com diferentes comprimentos, submetidas ao tratamento com PEG+ABA antes da secagem, estão apresentadas na Figura 4. Pelos dados obtidos, é possível observar que esse tratamento

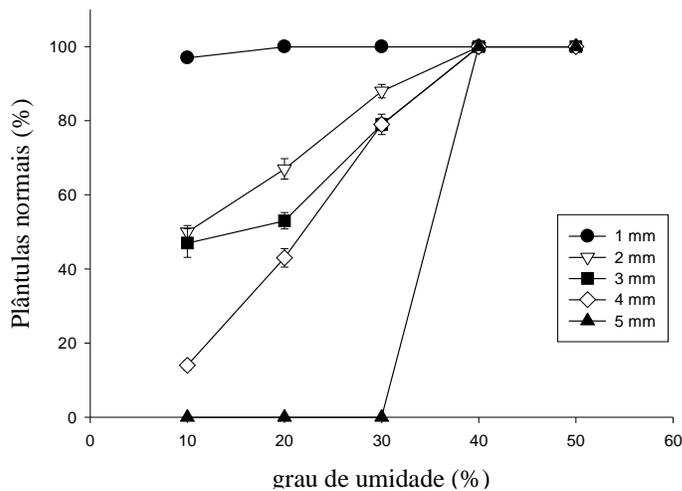


FIGURA 3: Tolerância à dessecação de sementes germinadas com diferentes comprimentos de radícula submetidas ao tratamento com PEG e à secagem com sílica gel a diferentes graus de umidade.

permitiu resultados positivos na re-indução da tolerância à dessecação em sementes de *S. virgata*. Com exceção das sementes com radículas com comprimento de 1 mm que sobreviveram à secagem, as sementes com os demais comprimentos de radícula apresentaram redução na formação de plântulas em decorrência da desidratação gradativa. Entretanto, as radículas com comprimento de 2 a 5 mm, que anteriormente não sobreviveram à secagem rápida, quando tratadas com a solução de PEG, apresentaram índices satisfatórios de tolerância à dessecação (próximos de 60%), mesmo com a redução do grau de umidade para próximo do original (10%). O tratamento com PEG associado ao ácido abscísico também propiciou a tolerância à dessecação em radículas de *Tabebuia impetiginosa* com 3 mm de comprimento (Vieira, 2008).

A presença de ABA em endospermas isolados de *S. virgata* sugere que este hormônio está fortemente envolvido com o controle da mobilização de reservas e indiretamente no crescimento da plântula. Sob condições naturais, a concentração de ABA diminui com a germinação, igualmente pelo desenvolvimento dos cotilédones, por permitir a mobilização de galactomananas e, conseqüentemente, ocorre a entrada de água que ficou retida durante a embebição para o crescimento do embrião (Potomati & Buckeridge, 2002).

Provavelmente, a incubação na solução de PEG com alta concentração de ABA tem estreita correlação com mecanismos de proteção que permitiram a sobrevivência das células das radículas após extrema desidratação. A aplicação de ABA exógeno está relacionada ao acúmulo de transcritos de proteínas de reserva em sementes que germinam precocemente (Ren & Bewley, 1999), rotas de tradução que aumentam a tolerância à dessecação (Beckett et al., 2005) e tolerância à dessecação associada ao aumento de açúcares solúveis. O aumento de solutos poderia estimular a tolerância à dessecação severa, possivelmente por

estabilizar estruturas celulares e proteger as funções metabólicas contra o estresse hídrico (Wang et al., 2002).

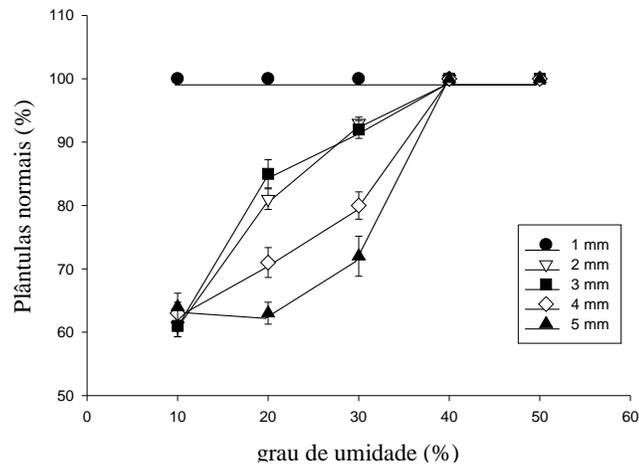


FIGURA 4: Tolerância à dessecação de sementes germinadas com diferentes comprimentos de radícula submetidas aos tratamentos com PEG+ABA e à secagem com sílica gel, em função de diferentes níveis de hidratação.

Alternativamente, o tratamento osmótico pode inibir o crescimento radicular até o ABA ser acumulado e manifestar suas funções, como sugerem Buitink et al. (2003). Isso se deve ao fato de o ABA sozinho não ter sido efetivo na inibição do crescimento radicular de *Medicago truncatula*.

A aplicação de ABA exógeno pode inibir a mobilização de reservas durante a germinação de sementes que, presumivelmente, deve-se a fatores induzidos por ABA que impedem a transcrição e ou a tradução de hidrolases (Lin et al., 1998). Outro efeito importante do ABA, além da aquisição de tolerância à dessecação, é a redução de danos celulares, devido à proteção da atividade metabólica, como foi demonstrado em embriões somáticos de alfafa (Sreedhar et al., 2002).

Vale ressaltar que, no presente estudo, a raiz primária mostrou-se mais sensível à dessecação que o hipocótilo. Após a secagem e reidratação das radículas, muitas vezes detectou-se o desenvolvimento normal do hipocótilo, seguido pelo primeiro par de folhas cotiledonares, sendo que a raiz primária já encontrava-se morta. A mesma observação foi relatada em diversas espécies, como pepino e tomate (Lin et al., 1998) e *Medicago truncatula* (Buitink et al., 2003).

Diante dos resultados obtidos com o estabelecimento do protocolo de re- indução de tolerância à dessecação em sementes germinadas de *S. virgata*, foram selecionadas radículas com 1, 3 e 5 mm de comprimento, e submetidas ao tratamento com PEG e secagem com sílica gel para as avaliações citológicas. Estes comprimentos de radícula foram escolhidos por permitirem a nítida visualização dos efeitos do PEG, sendo que, com radículas de 1 mm de comprimento, houve a total sobrevivência; com 3 mm, 47% das radículas sobreviveram à secagem e, com 5 mm de comprimento, as radículas perderam completamente a tolerância à dessecação. A partir da seleção desses comprimentos de radícula foi possível obter um sistema com contrastes para investigar, com técnicas aplicadas à biologia celular, as mudanças que ocorrem durante a desidratação das radículas de *S. virgata*.

As mudanças que ocorrem com o grau de umidade das radículas com 1, 3 e 5 mm de comprimento, durante o tratamento com PEG, durante a secagem com sílica e durante a pré-umidificação e reidratação estão representadas nas Figuras 5, 6 e 7, respectivamente. O grau de umidade das radículas com 1, 3 e 5 mm de comprimento diminuiu acentuadamente durante as primeiras 6 horas de incubação no PEG, tendo o grau de umidade das sementes com radícula de 1 mm reduzido dez pontos percentuais e as sementes com 3 e 5 mm de radícula, igualmente, apresentaram redução de 8 pontos percentuais no grau de umidade. Após as primeiras horas de incubação no PEG, houve uma redução sutil do grau

de umidade e, até as 72 horas finais, as radículas com 1, 3 e 5 mm apresentaram 39%, 45% e 50% de grau de umidade, respectivamente (Figura 5).

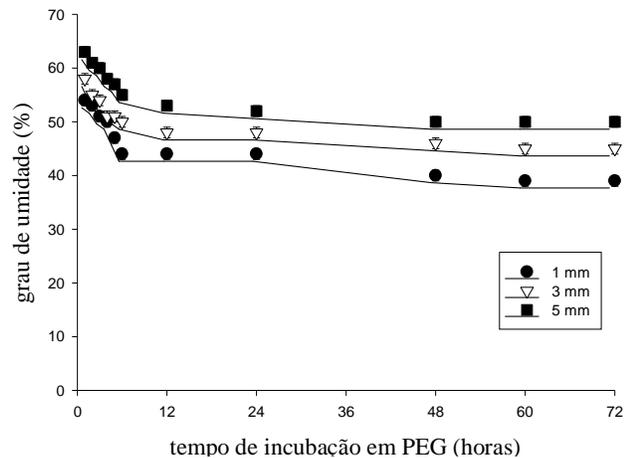


FIGURA 5: Mudanças no grau de umidade (%) das sementes com diferentes comprimentos de radícula durante incubação em PEG.

As mudanças no grau de umidade das radículas submetidas ou não ao tratamento com PEG durante a secagem em sílica gel são mostradas na Figura 6. Aparentemente, as radículas que não foram tratadas com PEG, assim como aquelas que foram submetidas ao tratamento com PEG, apresentaram semelhanças em relação à redução do grau de umidade, durante as primeiras 6 horas de secagem em sílica gel. Entretanto, a determinação do grau de umidade das radículas a cada 6 horas seguintes de desidratação permitiu detectar que aquelas que foram submetidas ao tratamento com PEG apresentaram constante redução do grau de umidade até o final das 24 horas de secagem. Já as radículas que não foram tratadas com PEG permaneceram com uma diminuição acentuada do grau de umidade durante todo o período de secagem em sílica gel, embora

aquelas com 1, 3 e 5 mm de comprimento, que foram submetidas ou não ao tratamento com PEG, tenham apresentado, ao final das 24 horas de secagem, aproximadamente 10% de grau de umidade.

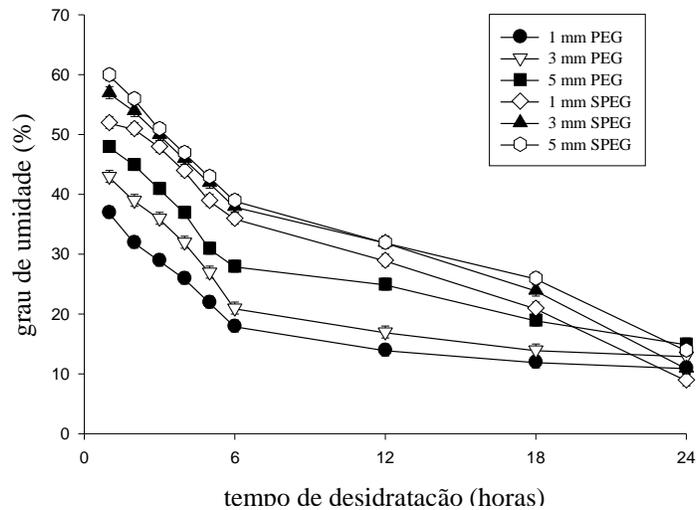


FIGURA 6: Mudanças no grau de umidade (%) das sementes com diferentes comprimentos de radícula, submetidas ou não ao tratamento com PEG, durante secagem com sílica gel.

Durante a pré-umidificação (24 horas) e as primeiras 24 horas de reidratação (Figura 7), as mudanças no grau de umidade das radículas submetidas ou não ao tratamento com PEG foram semelhantes. Conforme as primeiras 12 horas de pré-umidificação, o grau de umidade das radículas aumentou rapidamente, o que observado pelo acréscimo de, aproximadamente, 5 pontos percentuais no grau de umidade, assim como durante as primeiras 24 horas de reidratação, quando as radículas já apresentavam, em média, 40% de grau de umidade.

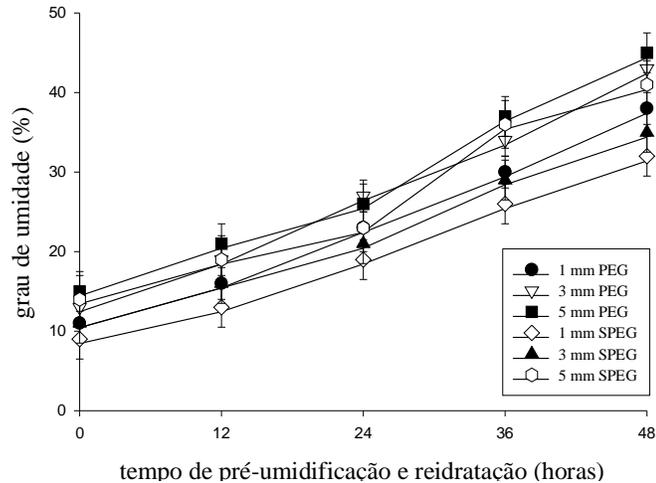


FIGURA 7: Mudanças no grau de umidade (%) das sementes com diferentes comprimentos de radícula, submetidas ou não ao tratamento com PEG, durante a pré-umidificação (24h) seguida pela reidratação.

Pela análise da integridade do DNA das radículas submetidas ao tratamento com PEG, secagem em sílica gel e reidratação, é possível observar que o DNA das radículas com 1 mm de comprimento permaneceu intacto, enquanto o material genético das radículas com 3 e 5 mm de comprimento sofreu degradação (Figura 8). Estes resultados coincidem com os dados apresentados na Figura 3, segundo os quais a sobrevivência das plântulas com 1 mm de comprimento de radícula permaneceu próxima de 100%, mesmo com a redução drástica do teor de água a 10%.

Faria et al. (2005) sugerem que a incubação no PEG pode induzir a síntese de proteínas nucleares que desempenham um papel protetor do DNA. Entretanto, em radículas com comprimento acima de 3 mm, houve redução na porcentagem de tolerância à dessecação, acentuando-se nas radículas com 5 mm de comprimento, que não sobreviveram ao estresse hídrico. Provavelmente, a

degradação do DNA observada no gel é proveniente de 53% de radículas com 3 mm que não sobreviveram à secagem.

Possivelmente, as células das radículas com comprimentos de 3 e 5 mm, quando submetidas ao drástico estresse hídrico, sofreram danos irreparáveis que as tornaram incapazes de exercer suas funções vitais.

O padrão de degradação total do DNA (Figura 8) indica morte passiva das células das radículas de *S. virgata*. Masetto et al. (2008) também observaram o padrão correspondente em sementes de *Eugenia pleurantha* quando submetidas a nível drástico de desidratação (7%). Nas radículas de *Medicago truncatula* com 2 mm de comprimento submetidas à secagem, a fragmentação do DNA foi mais acentuada quando comparadas com as radículas tratadas com PEG e secas posteriormente; o padrão de morte programada de células também coincidiu com a perda da viabilidade das radículas desta espécie (Faria et al., 2005). A manutenção da informação genética é fundamental para a tolerância à dessecação e a sobrevivência da célula após a desidratação e a reidratação (Osborne et al., 2002).

Necrose é diferente de morte programada de células. Enquanto a morte programada de células é um processo fisiológico dependente de energia, programado geneticamente, que envolve genes reguladores, rotas de sinalização e distintas características expressas morfológicamente, a necrose é um processo não fisiológico, dissociado dos eventos morfogenéticos e relacionados ao desenvolvimento e que está diretamente envolvido com a turgescência da célula, lise e lixiviação do conteúdo celular, sem mudanças óbvias do DNA (por exemplo, sem condensação da cromatina e fragmentação do DNA) (Krishnamurthy et al., 2000; Xu et al., 2004).

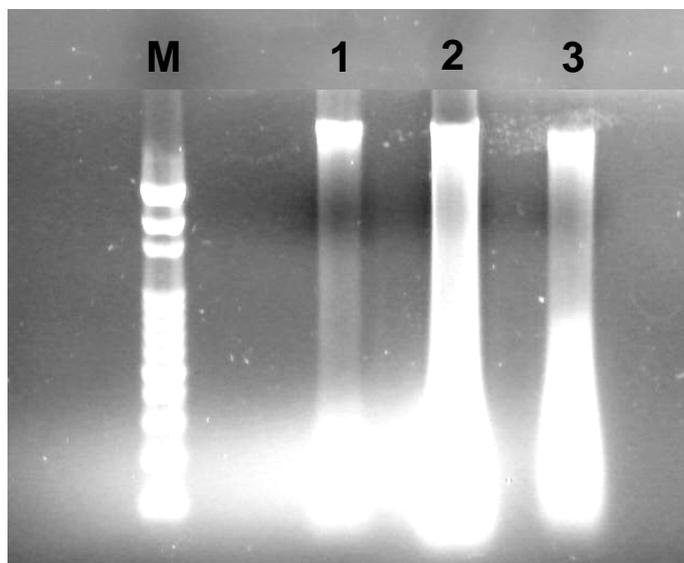


FIGURA 8: Gel de agarose 1% com DNA extraído de radículas de *Sesbania virgata* após tratamento com PEG e secagem. **M:** Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder, **1:** radícula com 1 mm de comprimento, **2:** radícula com 3 mm de comprimento e **3:** radícula com 5 mm de comprimento.

Células sujeitas a determinadas injúrias, tais como patógenos e outros estresses ambientais e abióticos (osmótico, salino, térmico, hídrico, metais pesados, toxinas, UV, deficiência nutricional, entre outros), frequentemente sofrem morte programada de células (Pennell & Lamb, 1997; Fusconi et al., 2006). Em muitos casos, doses letais de determinado estresse ativam os mecanismos de morte programada da célula (Vaux & Korsmeyer, 1999). Mas, uma análise crítica da literatura avaliada também indicou que, especialmente quando a dose do estresse está acima de um nível particular, há a ocorrência de necrose nas células.

Os resultados referentes à integridade do DNA estão de acordo com os dados obtidos a partir da avaliação citológica das radículas de *S. virgata* com 1, 3 e 5 mm de comprimento (Figura 9). Núcleos do meristema radicular

mostraram tamanho reduzido e coloração bastante escura, evidenciando a ocorrência de morte celular em radículas com 3 mm (26% das células) e 5 mm de comprimento (67% das células). A integridade das estruturas celulares durante uma desidratação severa é ainda um fenômeno sem esclarecimento em muitos sistemas biológicos (Röhrig et al., 2006).

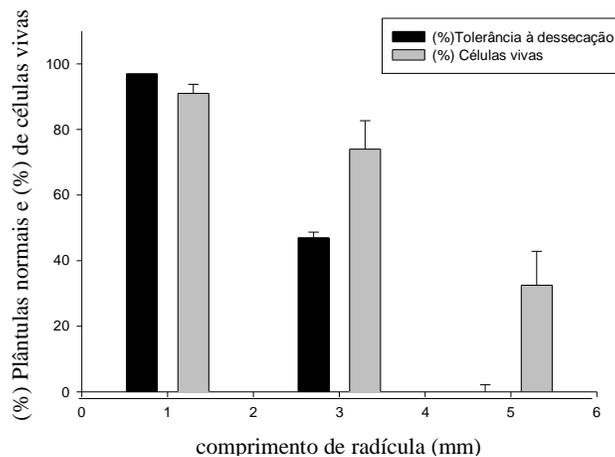


FIGURA 9: Tolerância à dessecação e células vivas em radículas de *Sesbania virgata* com 1, 3 e 5 mm de comprimento, após tratamento com PEG, secagem com sílica gel e pré-umidificação.

As imagens obtidas com a técnica do TUNEL estão apresentadas na Figura 10. A análise do TUNEL foi aplicada para detectar um possível colapso no DNA e, assim como demonstrado pelas imagens da Figura 10, os núcleos coloridos com verde fluorescente indicam TUNEL-positivo das células. A perda da integridade do material genético em radículas com 5 mm de comprimento que foram submetidas ao tratamento com PEG, mas que não sobreviveram a secagem (Figura 8), foi confirmada pelas imagens da Figura 10C, obtidas com a técnica do TUNEL. A morte celular na raiz primária em *Stenocereus gummosus* e *Pachycereus pringlei* (Cactaceae) também foi detectada com a técnica do

TUNEL associada à coloração verde fluorescente dos núcleos (Shishkova & Dubrovsky, 2005).

A morte programada de células é conhecida por ser um processo rápido, que ocorre dentro de algumas horas e que envolve um pequeno número de células, enquanto a necrose, condicionada por um determinado estresse abiótico, ocorre mais lenta e gradativamente alguns dias após o estresse. A típica morte programada de células está sempre associada com os “ladders” do DNA no teste de TUNEL, os quais não foram observados durante o processo de morte celular das radículas de *S. virgata* submetidas ao estresse hídrico, como também não foi observado em plântulas de arroz submetidas ao estresse osmótico e salino (Liu et al., 2007).

A transição de radículas frescas para desidratadas e reidratadas pôde ser acompanhada por mudanças estruturais nas células do meristema radicular (Figura 11). Nas radículas frescas com 1, 3 e 5 mm de comprimento há a delimitação perfeita da parede celular ao redor da célula, pequeno vacúolo e presença de corpos lipídicos e amido no conteúdo celular.

Nas imagens referentes as radículas com 3 e 5 mm de comprimento após a desidratação, há a perda da integridade da parede e do conteúdo celular, caracterizado pelo aumento do tamanho do vacúolo e o desaparecimento dos grânulos de amido, correspondente ao excessivo consumo de energia. O aumento dos vacúolos é considerado uma característica da sensibilidade à dessecação (Pammenter & Berjak, 1999); conseqüentemente, os danos

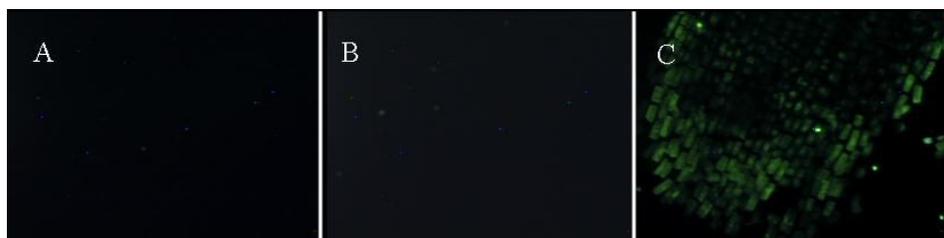


FIGURA 10: Teste de TUNEL nas células das radículas com 1 (A), 3 (B) e 5 (C) mm de comprimento, que foram submetidas ao estresse osmótico com PEG (-2,04 MPa), desidratação com sílica gel (10% de grau de umidade) e reidratação. As figuras B e C correspondem ao TUNEL-positivo das células das radículas com 3 e 5 mm.

associados às mudanças drásticas no volume celular não puderam ser evitados (Golovina et al., 2001; Verslues et al., 2006).

Muitas similaridades morfológicas e bioquímicas vêm sendo encontradas entre células animais e vegetais que estão sofrendo apoptose, dentre elas, condensação e encolhimento do citoplasma e do núcleo, formação de corpos contendo DNA (apoptóticos) e degradação do DNA genômico (Xu & Hanson, 2000). O citoplasma, a membrana plasmática e as organelas apresentam aberrações morfológicas. O citoplasma se torna altamente vesiculado e vacuolizado, com aparência flocosa, mitocôndrias e plastídeos deformados e translúcidos (Gunawardena et al., 2001; Errakhi et al., 2008).

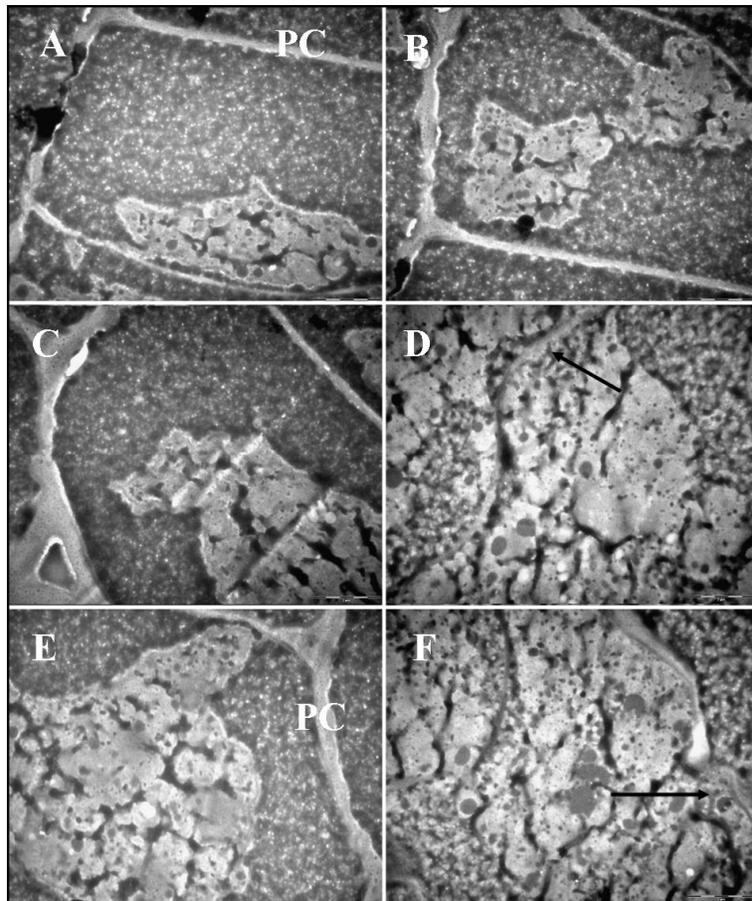


FIGURA 11: Microscopia eletrônica de transmissão de células da radícula de *S. virgata* com 1(A), 3 (C) e 5 (E) mm de comprimento. B, D e F correspondem às células das radículas com 1, 3 e 5 mm de comprimento, respectivamente, após secagem em sílica gel e reidratação. Destaque para a parede celular (PC) com aspecto normal antes da secagem (A, E). As setas indicam a perda da integridade do citoplasma após a secagem e reidratação (D, F).

No presente estudo, os dados obtidos com o TUNEL foram amplamente correlacionados com o resultado do padrão do DNA de radículas de *S. virgata* e com as imagens obtidas por meio de microscopia eletrônica de transmissão

(Figura 11). Embora o TUNEL-positivo dos núcleos possa ser considerado um indicador de morte celular, outros fatores citológicos podem ser avaliados, como a caracterização ultra-estrutural da morte celular em plantas, que indica uma perda progressiva da compartimentalização e organização celular (DeBono e Greenwood, 2006).

A sensibilidade à dessecação das radículas com 3 e 5 mm tratadas com PEG claramente induziu a morte celular e indica que este pode ser um mecanismo importante de intolerância ao estresse abiótico em sementes germinadas de *S. virgata*.

6 CONCLUSÕES

O tratamento com PEG e PEG+ABA permitiu resultados positivos na re-indução da tolerância à dessecação das radículas de *S. virgata*.

Houve uma relação entre a perda da integridade do DNA e a perda da tolerância à dessecação em radículas com 3 e 5 mm de comprimento, quando desidratadas a 10% de umidade. Nestas radículas foi observado o padrão de morte passiva das células.

A avaliação citológica do meristema radicular de *S. virgata*, por meio de análise da viabilidade celular, teste de TUNEL e microscopia eletrônica de transmissão, proporcionou evidências sobre a ocorrência de morte celular em radículas com 3 e 5 mm que não sobreviveram à desidratação.

Radículas de *S. virgata* germinadas constituíram um sistema interessante para o estudo da tolerância à dessecação em sementes germinadas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.

ARAÚJO, E. C.; MENDONÇA, A. V.; BARROSO, D. G.; LAMÔNICA, K. R.; SILVA, R. da. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Sesbania virgata* (CAV.) PERS. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, n.1, p.105-110, 2004

BECKETT, R. P.; MAYABA, N.; MINIBAYEVA, F. V.; ALYABYEVA, A. J. Hardening by Partial Dehydration and ABA Increase Desiccation Tolerance in the Cyanobacterial Lichen *Peltigera polydactylon*. **Annals of Botany**, London, v. 96, n. 1, p. 109–115, July 2005

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

BOUBRIAK, I.; KARGIOLAK, H.; LYNE, L.; OSBORNE, D. J. The requirement for DNA repair in desiccation tolerance of germinating embryos. **Seed Science Research**, Wallington, v.7, n. 1, p. 97-105, Mar. 1997.

BOUDET, J.; BUITINK, J.; HOEKSTRA, F. A.; ROGNIAUX, H.; LARRÉ, C.; SATOUR, P.; LEPRINCE, O. Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with dessication tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v.140, n. 4, p. 1418-1436, Apr. 2006.

BRASIL. Ministério da agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365 p.

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

CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. **Biothecnic & Histochemistry**, Baltimore, v. 68, n. 3, p. 142-145, May 1993.

CARVALHO, Y. Caracterização fenotípica, genotípica e simbiótica de *Azorhizobium sp* de *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. Lavras: UFLA. 89 p., 2002 (Tese de doutorado em Agronomia).

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

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

ERRAKHI, R.; MEIMOUN, P.; LEHNER, A.; VIDAL, G.; BRIAND, G.; CORBINEAU, F.; RONA, J.P.; BOUTEAU, F. Anion channel activity is necessary to induce ethylene synthesis and programmed cell death in response to oxalic acid. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 11, p. 3121–3129, Aug. 2008.

FARIA, J. M. R.; BUITINK, J.; LAMMEREN, A. A. M.; HILHORST, H. W. M. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 418, p. 2119–2130, Aug. 2005

FUSCONI, A.; REPETTO, O.; BONA, E.; MASSA, E.; GALLO, C.; GAUDOT, E. D.; BERTA, G. Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 1-3, p. 1-8, Dec. 2006.

GOLOVINA, E. A.; HOEKSTRA, F. A.; VAN AELST, A. C. The competence to acquire desiccation tolerance is independent of seed morphological development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 358, p. 1015-1027, May 2001.

GUNAWARDENA, A. H. A. L. N.; PEARCE, D. M.; JACKSON, M. B.; HAWES, C. R.; EVANS, D. E. Characterization of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). **Planta**, New York, v. 212, n. 2, p. 205-214, Jan. 2001.

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

KEMBEL, S. W.; KROON, H.; CAHILL JUNIOR., J. F.; MOMMER, L.
Improving the scale and precision of hypotheses to explain root foraging ability.
Annals of Botany, London, v. 101, n. 9, p.1295–1301, June 2008.

KOLB, R. M.; RAWYLER, A.; BRAENDLE, R. Parameters affecting the early seedling development of four neotropical trees under oxygen deprivation stress.
Annals of Botany, London, v. 81; n. 5, p. 551-558, May 2002

KRISHNAMURTHY, K. V.; KRISHNARAJ, R.; CHOZHAVENDAN, R.; CHRISTOPHER, F. S. The programme of cell death in plants and animals – A comparison. **Current Science**, Bangalore, v. 79, n. 9, p. 1169-1181, Nov. 2000.

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

LIU, S. H.; FU, B. Y.; XU, H. X.; ZHU, L. H.; ZHAI, H. Q.; LI, Z. K. Cell death in response to osmotic and salt stresses in two rice (*Oryza sativa* L.) ecotypes. **Plant Science**, Clare, v. 172, n. 5, p. 897–902, May 2007.

MASETTO, T. E.; FARIA, J. M. R.; DAVIDE, A. C.; DA SILVA, E. A. A. Desiccation tolerance and DNA integrity in *Eugenia pleurantha* O. Berg. (MYRTACEAE) seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 30, n. 1, p. 175-180, 2008.

Michel; Kaufmann, 1973. In: Black, M.; PRITCHARD, H.W. eds. **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford, Oxon, UK: CABI Publishing, 2002. p.343-364.

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

PAMMENTER, N. W.; GREGGAINS, V.; KIOKO, J. I.; WESLEY-SMITH, J.; BERJAK, P.; FINCH-SAVAGE, W. E. Effects of differential drying rates on viability of recalcitrant seeds of *Ekebergia capensis*. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, n. 4 p. 463-471, Dec. 1998.

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

PENNELL, R. I.; LAMB, C. Programmed cell death in plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 7, p. 1157–1168, July 1997.

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

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Corumbá: EMBRAPA/CPAP/SPI, 1994. 320 p.

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

REN, C. W.; BEWLEY, J. D. Developmental and germinative events can occur concurrently in precociously germinating Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *Pekinensis*) seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 341, p. 1751-1761, Dec. 1999.

RODRIGUES, L. A.; MARTINS, M. A., SALOMÃO, M. S. M. B. Usos de micorrizas e rizóbio em cultivo consorciado de eucalipto e sesbânia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 27, n. 4, p. 583-591, jul./ago. 2003.

RÖHRIG, H.; SCHMIDT, J.; COLBY, T.; BRÄUTIGAM, A.; HUFNAGEL, P.; BARTELS, D. Desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* induces dynamic changes in protein phosphorylation. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 29, n. 8, p. 1606–1617, Aug. 2006.

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

SHISHKOVA, S.; DUBROVSKY, J. G. Developmental programmed cell death in primary roots of Sonoran Desert Cactaceae. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 92, n. 9, p. 1590-1594, Sept. 2005.

STASOLLA, C.; ZYL, L.; EGERTSDOTTER, U.; CRAIG, D.; LIU, W.; SEDEROFF, R. The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, n. 1, p. 49-60, Jan. 2003.

VAUX, D. L.; KORSMEYER, S. J. Cell Death in Development. **Cell**, Cambridge, v. 96, n. 2, p. 245–254, Jan. 1999.

VERSLUES, P. E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J. K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, Oxford, v. 45, n. 4, p. 523–539, Feb. 2006.

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

WANG, X. J.; LOH, C. S.; YEOH, W. S. Drying rate and dehydrin synthesis associated with abscisic-acid induced dehydration tolerance in *Spathoglottis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 368, p. 551-558, Mar. 2002.

XU, Y.; Hanson, M. R. Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in petunia, **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 4, p. 1323–1333, Apr. 2000

XU, C.; CHEN, K.; FERGUSON, I. B. Programmed cell death features in apple suspension cells under low oxygen culture. **Journal of Zhejiang University science**, Zhejiang, v. 5, n. 2, p. 137-1432, 2004.

CAPÍTULO 2

ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS DURANTE A PERDA E O REESTABELECIMENTO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES GERMINADAS DE *Cedrela fissilis* Vell. (MELIACEAE)

1 RESUMO

MASETTO, Tathiana Elisa. Alterações citológicas durante a perda e o restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Cedrela fissilis* Vell. (MELIACEAE). In: _____. **Restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Sesbania virgata* e *Cedrela fissilis***. 2008. Cap. 3, p. 45-76. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

A dificuldade de armazenamento de sementes não ortodoxas, especialmente as recalcitrantes, é um entrave aos programas de conservação *ex situ*. A literatura relata que sementes ortodoxas germinadas podem ser utilizadas nos estudos da tolerância/sensibilidade à dessecação por comportarem-se às sementes recalcitrantes. Baseado em tal pensamento, sementes de *Cedrela fissilis*, uma árvore nativa da Mata Atlântica, foram testadas quanto à re-indução de tolerância à dessecação nas sementes após a germinação, utilizando polietileno glicol (PEG 8000). As mudanças que ocorrem na célula durante a perda e o restabelecimento da tolerância à dessecação foram investigadas. Para a caracterização da perda da tolerância à dessecação, as sementes foram germinadas até atingirem diferentes comprimentos de radícula (1, 2, 3, 4 e 5 mm), sendo, em seguida, submetidas à secagem em sílica gel, reduzindo-se o teor de água a cada dez pontos percentuais. Para re-induzir a tolerância à dessecação, sementes germinadas foram tratadas com PEG (-2,04 MPa), por 72 horas e PEG (-2,04 MPa) + ABA (100 µM), por 72 horas, sendo em seguida desidratadas em sílica gel com redução do teor de água a cada dez pontos percentuais, pré-umidificadas e reidratadas. As avaliações citológicas (viabilidade celular, teste de TUNEL e microscopia eletrônica de transmissão) e da integridade do DNA foram feitas em sementes germinadas com comprimento de radícula de 1, 2 e 5 mm, submetidas ao tratamento com PEG. O tratamento com PEG foi capaz de re-induzir a tolerância à dessecação em radículas com 1 e 2 mm de comprimento, que apresentaram 71% e 29% de sobrevivência, respectivamente, quando o teor de água foi reduzido a 10%. Entretanto, não houve retomada do crescimento das radículas com os demais comprimentos. A aplicação de PEG+ABA foi eficiente para re-induzir a tolerância à dessecação nas radículas com todos os comprimentos estudados e desidratadas a 20% de umidade. Apenas as radículas com 1 mm de comprimento mantiveram a tolerância à dessecação (100%) quando atingiram 10% de umidade. Pela análise de integridade do DNA, somente radículas com 1 mm mantiveram a integridade do material genético após a secagem a 10%. A análise citológica das radículas permitiu verificar a mortalidade em 60% e 73,5% das células com radículas de 2 e 5 mm de comprimento tratadas com PEG e secas, posteriormente, a 10% de teor de água. O TUNEL-positivo e a análise ultra-estrutural das células das

radículas com 2 e 5 mm confirmaram os resultados obtidos, contribuindo para a identificação de marcadores diagnósticos de morte celular.

Palavras chave: *Cedrela fissilis*, tolerância à dessecação, estresse osmótico e sementes germinadas.

***Comitê Orientador:** José Márcio Rocha Faria, PhD - UFLA (Orientador), Antonio Claudio Davide, Dr. – UFLA (Co-orientador), Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, PhD – UFLA (Co-orientador).

2 ABSTRACT

MASETTO, Tathiana Elisa. **Cytological alterations during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinated seeds of *Cedrela fissilis***. In: _____. Re-establishment of desiccation tolerance in germinated seeds of *Sesbania virgata* and *Cedrela fissilis*. 2008. Chapter. 3, p. 45-76. Thesis (Doctoral degree in Forest Engineering) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

The difficulty in storing non orthodox seeds, especially the recalcitrant ones, is an obstacle for the *ex situ* conservation. The use of germinated orthodox seeds as a model system for studies on desiccation tolerance/sensitivity has been suggested. Based on such thought, seeds of *Cedrela fissilis*, a native tree species from the Brazilian Atlantic Forest were used in the present study, whose objectives were to characterize the re-establishment of desiccation tolerance (DT) in germinated seeds, using polyethylene glycol (PEG 8000) and to investigate the cell changes during loss and re-establishment of DT. The loss of DT was characterized by drying germinated seeds with different radicle lengths (1, 2, 3, 4 and 5 mm) in silica gel to decreasing moisture contents (each ten percent points interval), followed by pre-humidification (100% RH/24h) and rehydration (germination conditions).. To re-establish DT, germinated seeds were treated for 72h with PEG (-2.04 MPa) and PEG (-2.04 MPa) + ABA (100 µM) before dehydration. The cytological assays (cell viability, TUNEL test and electronic transmission microscopy) and DNA integrity were evaluated in 1, 2 and 5 mm radicle lengths. Germinated seeds did not tolerate desiccation to 10% moisture content, irrespectively of the radicle length. However, when treated with PEG, those with radicle length of 1 and 2 mm attained 71% and 29% survival, respectively, when moisture content was reduced to 10%. . The PEG+ABA treatment was efficient to re-establish DT in seeds with 1 mm long radicles (100% survival). . The positive-TUNEL and the ultrastructural assays of the cells from 2 and 5 mm radicle lengths confirmed the obtained results.

Key words: *Cedrela fissilis*, desiccation tolerance, osmotic stress and germinated seeds.

***Guidance Committee:** José Márcio Rocha Faria, PhD - UFLA (Adviser), Antonio Claudio Davide, Dr. – UFLA (Co-adviser), Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, PhD - UFLA (Co-adviser).

3 INTRODUÇÃO

Há uma crescente preocupação mundial sobre a exploração descontrolada e depreciação dos recursos naturais, especialmente sobre a diversidade vegetal das florestas tropicais. A extinção potencial dessas espécies está relacionada ao grau de vulnerabilidade biológica e à ameaça dos fatores abióticos (Phartyal et al., 2002). Além disso, pouco se conhece sobre as espécies ocorrentes, a estrutura e o funcionamento desses ambientes florestais. Dessa forma, há a necessidade de estudos intensivos, a fim de escolher corretamente as estratégias de manejo e conservação a serem implantadas (Kawaguici & Kageyama, 2001).

A conservação dos recursos florestais inclui a conservação *in situ*, em que as espécies são conservadas no seu ambiente e a conservação *ex situ*, realizada fora da área de ocorrência da espécie, principalmente em jardins botânicos e bancos de sementes. A conservação *ex situ* complementa a *in situ*, no entanto, pode ser a única alternativa viável para conservação dos recursos genéticos de determinadas espécies (Young et al., 2000). A conservação *ex situ* corresponde, principalmente, ao armazenamento de sementes e outros propágulos em bancos de germoplasma. Porém, a falta de habilidade para sobreviver após a desidratação, por parte das sementes de algumas espécies, é um entrave aos programas de conservação.

Durante o desenvolvimento da semente, a aquisição de tolerância à dessecação faz parte do processo de maturação, o qual ocorre antes da secagem da maturação. O conteúdo de água diminui gradativamente durante o progresso da maturação da semente, mas o potencial hídrico celular permanece acima ao da secagem da maturação. Este decréscimo no conteúdo de água se deve ao acúmulo gradual de reservas armazenadas. O ácido abscísico (ABA) previne a

ocorrência da germinação e desempenha um papel importante nos eventos que determinam a tolerância à dessecação (Hoekstra et al., 2001).

Assim, nem todas as espécies respondem ao ambiente durante o armazenamento do mesmo modo. Baseado na resposta sob dessecação e baixas temperaturas, Roberts (1973) classificou as sementes em ortodoxas e recalcitrantes. Mais tarde, uma terceira categoria intermediária entre as ortodoxas e as recalcitrantes foi identificada por Ellis et al. (1990). Sementes de espécies com comportamento ortodoxo podem ser mantidas satisfatoriamente de modo *ex situ* por longos períodos em ambiente frio e seco. Contudo, a conservação da viabilidade de sementes com comportamento intermediário ou recalcitrante é problemática. Conseqüentemente, tais sementes não podem ser armazenadas sob as condições satisfatórias para sementes ortodoxas (Hong & Ellis, 1996).

Assim, a dificuldade de manipulação das sementes sensíveis à dessecação durante a experimentação sugere que sementes ortodoxas germinadas podem ser utilizadas como modelos para o estudo da recalcitrância, baseados no fato de que, após a germinação, as sementes ortodoxas perdem a tolerância à dessecação gradativamente, comparadas às sementes recalcitrantes. Existem vários trabalhos que relatam as perspectivas de utilizar sementes ortodoxas germinadas para investigar os fenômenos relacionados à recalcitrância (Bruggink e van der Toorn, 1995; Leprince et al., 2000; Buitink, et al., 2003; Faria et al., 2005; Vieira, 2008). Outra vantagem de empregar sementes ortodoxas germinadas é a possibilidade de utilizar técnicas simples, como aplicação de estresse osmótico, utilizando-se o polietileno glicol (PEG) e ABA exógeno para re-induzir a tolerância à dessecação.

Entre as técnicas para detectar as mudanças que ocorrem nas células após um determinado estresse está a eletroforese de DNA (Faria, 2005). A clivagem do DNA em fragmentos internucleossomais (Palavan-Unsal et al.,

2005) e a degradação do DNA no gel são aceitos como marcadores para a morte celular programada e passiva, respectivamente, em células animais e vegetais (McCabe & Leaver, 2000).

O *terminal desoxynucleotide transferase mediated d-UTP nick-end labeling*, ou TUNEL, é um método largamente utilizado e sensível para avaliar a deformação nuclear durante a apoptose, na qual ocorre a degradação do DNA, comum em tecidos que sofrem morte celular (Liu et al., 2007). Outra técnica importante para avaliar as alterações que ocorrem nas células é a microscopia eletrônica de transmissão, cuja análise permite visualizar as mudanças que ocorrem com as estruturas celulares sujeitas ao estresse hídrico.

Na tentativa de propor um sistema para o estudo dos mecanismos relacionados à tolerância/sensibilidade em sementes ortodoxas após a germinação, com ferramentas aplicadas às pesquisas com biologia celular, foram utilizadas sementes de *Cedrela fissilis*, uma árvore nativa da Mata Atlântica.

O cedro (*Cedrela fissilis* Vell.), da família Meliaceae, ocorre desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais, principalmente nas florestas semidecídua e pluvial atlântica. Sua madeira é largamente empregada no setor moveleiro, construção civil, naval e aeronáutica. A árvore de *Cedrela fissilis* também é recomendada para o paisagismo (Lorenzi, 1992).

Assim, objetivou-se, com a realização deste trabalho, avaliar as mudanças nos aspectos celulares durante a perda e o restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Cedrela fissilis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e beneficiamento de sementes: foram coletados frutos maduros em início de deiscência com auxílio de podão e lona plástica de, aproximadamente, 20 matrizes na região de Lavras, sul de Minas Gerais (21°14'S, 45°00'W), no mês de julho de 2006. Após a coleta, os frutos foram levados ao galpão do Laboratório de Sementes Florestais do Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. O beneficiamento consistiu de abertura dos frutos maduros e a remoção do prolongamento alado das sementes, de acordo com as recomendações de Davide et al. (1995).

Determinação do grau de umidade: o grau de umidade foi determinado pelo método da estufa, a $103\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 17 horas (Brasil, 1992), com quatro repetições de 2 g de sementes. Os resultados foram calculados com base no peso das sementes úmidas.

Teste de germinação: inicialmente, as sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio, a 2%, durante 2 minutos e, então, semeadas sobre papel de filtro umedecido no interior de caixas plásticas tipo gerbox. O experimento foi conduzido em BOD, sob temperatura de 25°C e luz branca constante, proposto pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

Curva de embebição: foram realizadas pesagens diárias de sementes de cedro semeadas da mesma forma citada anteriormente, durante sete dias. Foram utilizadas dez repetições com dez sementes cada.

Avaliação da perda da tolerância à dessecação após a germinação: após a semeadura das sementes, como descrito anteriormente, as sementes que apresentavam 1, 2, 3, 4 e 5 mm de comprimento de radícula foram submetidas à secagem. A desidratação ocorreu no interior de caixas plásticas tipo gerbox, vedadas com filme plástico, colocando-se as sementes sobre um telado, tendo

uma camada de sílica gel ativada (8%) ao fundo. Durante a desidratação, foram realizadas pesagens sucessivas, até que o peso encontrado coincidissem com o grau de umidade desejado, por meio da expressão proposta por Cromarty et al. (1985). Após a desidratação, as sementes foram pré-umidificadas em câmara úmida (100%UR), durante 24 horas, a 25°C e, então, reidratadas (sobre papel umedecido, dentro de gerbox a 25°C e luz branca constante). As sementes que retomaram o crescimento da radícula e originaram plântulas normais foram consideradas tolerantes à dessecação. O experimento foi conduzido com 4 repetições de 25 sementes para cada comprimento de radícula.

Restabelecimento da tolerância à dessecação com PEG: as sementes com 1, 2, 3, 4 e 5 mm de comprimento de radícula foram colocadas sobre uma folha de papel de germinação, em placas de Petri onde foram adicionados 20 mL de solução de PEG 8000 (380 gramas dissolvidos em 1 litro de água, segundo Michel & Kaufmann, 1973). As sementes permaneceram imersas nesta solução durante 72 horas, a 5°C e esta temperatura proporcionou um potencial osmótico de -2,04 MPa, o qual não permitiu o crescimento das radículas. Após esse período, as sementes foram retiradas, lavadas em água corrente para a remoção dos resíduos de PEG e secas sobre papel toalha, até que o excesso de água fosse eliminado, em condições de temperatura e umidade relativa do ambiente. Paralelamente, foi determinado o teor de água das sementes. Posteriormente, as sementes foram submetidas à desidratação a cada dez pontos percentuais, com sílica gel ativada (8%) a 20°C, até que fosse atingido o teor de água original das sementes e, em seguida, foram submetidas à pré-umidificação e à reidratação da mesma forma citada anteriormente.

Restabelecimento da tolerância à dessecação com PEG + ABA: as sementes com 1, 2, 3, 4 e 5 mm de comprimento de radícula foram colocadas sobre uma folha de papel de germinação, em placas de Petri onde foram adicionados 20 mL de solução de PEG 8000 (380 gramas dissolvidos em 1 litro

de água) e ABA (100 μ M). As sementes permaneceram imersas nesta solução durante 72 horas, a 5°C e esta temperatura proporcionou um potencial osmótico de -2,04 MPa, o qual não permitiu o crescimento das radículas. Após esse período, as sementes foram retiradas, lavadas em água corrente para a remoção dos resíduos de PEG e secas sobre papel toalha até que o excesso de água fosse eliminado, em condições de temperatura e umidade relativa do ambiente. Paralelamente, foi determinado o teor de água das sementes. Posteriormente, as sementes foram submetidas à desidratação a cada dez pontos percentuais com sílica gel ativada a 20C, até que fosse atingido o teor de água original das sementes e, em seguida, foram submetidas à pré-umidificação e à reidratação da mesma forma citada anteriormente.

Extração de DNA e eletroforese para avaliar a integridade do DNA:

a microextração de DNA da ponta das radículas foi realizada de acordo com o protocolo com CTAB 2X modificado. Inicialmente, as amostras foram maceradas separadamente em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bem fino que foi transferido para um microtubo de 2mL. Foram acrescentados 700 μ L de CTAB 2X (água pura; 1M TRIS-HCl pH 7,5; 5M NaCl; 0,5M EDTA pH 8,0; 2 gramas de CTAB) pré-aquecido a 65°C, mantendo-se esta temperatura por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 600 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e os microtubos foram invertidos durante 5 minutos, quando, então, foram centrifugados a 12.000 rpm, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e acrescentaram-se 450 μ L de isopropanol gelado, mantendo-se à temperatura de -20°C, durante 24 horas. Após a precipitação do DNA, os microtubos foram centrifugados durante 10 minutos, a 12.000 rpm e 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, adicionaram-se 100 μ L de etanol 70% e os tubos permaneceram em repouso por 10 minutos, quando foram novamente centrifugados a 4.000 rpm e a 4°C, durante 10 minutos, com a finalidade de

remover resíduos de CTAB. Os tubos foram, então, invertidos em um papel limpo para secar o pélete que, posteriormente, foi dissolvido em 50 µL de TE pH 8,0 (10mM TRIS-HCl e 1mM EDTA).

Para a avaliação por eletroforese, foi utilizado o marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (1µg/µL) e 5 µL de DNA de cada amostra em um gel de agarose 1% com coloração de brometo de etídio, sendo visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em equipamento EDAS 290 (Kodak®).

Avaliação citológica das radículas após re-indução da tolerância à dessecação: de acordo com os resultados obtidos nos experimentos anteriores, as plântulas com comprimento de radícula de 1, 2 e 5 mm frescas e submetidas à secagem em PEG 8000, sílica gel e reidratadas foram escolhidas para a avaliação citológica. As pontas das radículas foram coletadas, fixadas em solução de Carnoy {metanol:ácido acético - (3:1)} e armazenadas, a -20°C, até o momento da preparação das lâminas. Para o preparo das lâminas, inicialmente, as pontas das radículas foram retiradas da solução fixadora e submetidas a duas lavagens em água destilada (5 minutos cada). Subsequentemente, as radículas foram secas em papel de filtro e maceradas em uma solução enzimática {2% celulase (Sigma): 20% pectinase (Sigma) diluída em tampão citrato-fosfato pH 4,8}, a 37°C, por 6 horas. Posteriormente, as lâminas foram preparadas pela técnica de dissociação celular, como descrito por Carvalho & Saraiva (1993) e coradas com Giemsa 5%, durante 12 minutos. As lâminas foram avaliadas em microscópio de luz (Leica) e as imagens capturadas por meio de uma microcâmera digital Nikon acoplada ao microscópio e transferidas para um microcomputador. Nessas, lâminas foram comparadas à morfologia das células dos meristemas radiculares antes e após a secagem. Foram analisadas 5 lâminas para cada tratamento, sendo avaliadas 200 células por lâmina. Essas atividades foram realizadas no Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Lavras.

Teste de TUNEL nas radículas após re-indução da tolerância à dessecação: a reação do *terminal deoxynucleotide transferase mediated-dUTP nick-end labeling* ou TUNEL é utilizada para avaliar a fragmentação do DNA pela detecção das extremidades 3'-OH da fita do DNA, pela ação da enzima terminal transferase de desoxinucleotídeo, por meio de fluorescência verde. Foi utilizado o protocolo de acordo com as instruções do fabricante do “Kit APO-BrdUTM TUNEL Assay” (Invitrogen - Molecular Probes) com Alexa fluor. As radículas com comprimentos de 1, 2 e 5 mm frescas e submetidas ao tratamento com PEG e secagem na sílica a 10% de grau de umidade (3 repetições cada) foram fixadas em paraformaldeído a 1%, durante 12 horas. Após esse período, as radículas foram desidratadas em gradiente alcoólico durante 1 hora cada (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), fixadas em cera Steedman a 37%, utilizando uma série de cera:etanol (v:v) (50:50%, 70:30%, 90:10%) e 100% de cera, a cada 1 hora. As radículas foram seccionadas longitudinalmente com espessura de 10µm com micrótomo e as reações foram preparadas de acordo com o fabricante. As imagens foram observadas com microscópio epifluorescente, utilizando comprimento de onda de 500nm (Olympus BX60).

Análise da morfologia celular por meio de microscopia eletrônica de transmissão: as plântulas com comprimento de radícula de 1, 2 e 5 mm, frescas e submetidas à secagem em PEG 8000, sílica gel e reidratadas, foram analisadas tomando-se 5 radículas por tratamento, sendo fixadas na solução Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5%; formaldeído 2% em um tampão sódio cacodilato 0,05M; CaCl₂ 0,001M, pH 7,2). As amostras foram lavadas três vezes (10 minutos cada) com o tampão cacodilato 0,05M e, após serem fixadas em uma solução aquosa de tetróxido de ósmio 1% durante 2 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas em água MiliQ, durante 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram contrastadas em acetato de uranila (0,5%), durante 12 horas, a 4°C e desidratadas em uma gradativa de acetona (25%, 50%,

75%, 90% e 100% três vezes). Em seguida, realizou-se a infiltração em resina, sendo o material incluído em gradiente crescente de Spurr/acetona 30%/8h; 70%/12h e 100% duas vezes, por 24 horas cada, tendo as amostras sido transferidas para moldes de silicone e polimerizadas em estufa, a 70°C, por 48 horas. Os cortes foram realizados com o ultramicrótomo Reichart-Jung, cuja lâmina de diamante permitiu seccionar os tecidos com espessura inferior a 100nm e contratados com acetato de uranila seguido por citrato de chumbo (3 minutos). As amostras foram avaliadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109, Carl Zeiss, Jena, Alemanha), a 80 kV, utilizando células do meristema radicular. As atividades citadas nesse item foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1, observa-se a curva de embebição de sementes de *Cedrela fissilis*, tendo, aos 6 dias após a semeadura, o lote utilizado apresentado 81% de germinação. A perda da tolerância à dessecação conforme a germinação está caracterizada na Figura 2. A secagem em sílica gel entre 60% e 50% de grau de umidade não reduziu a viabilidade das sementes de *Cedrela fissilis* com 4 e 5 mm de comprimento de radícula. Entretanto, ao reduzir o grau de umidade para níveis inferiores a 40%, houve uma redução acentuada na tolerância à dessecação nas sementes com todos os comprimentos de radícula estudados, que culminou com a total perda da viabilidade quando foi atingido o grau de umidade original das sementes de *Cedrela fissilis* recém-beneficiadas.

As sementes de *Cedrela fissilis* apresentaram melhor desempenho quando armazenadas com baixo teor de água (7,5%) em ambiente frio e seco (Figliolia et al., 1988). Corvello et al. (1999) concluíram que as sementes de *Cedrela fissilis* com 10% de grau de umidade, armazenadas em embalagem hermeticamente fechada em câmara fria, apresentaram o melhor desempenho durante o armazenamento, caracterizando seu comportamento tipicamente ortodoxo.

No presente trabalho, ao iniciar o processo germinativo, as sementes de *Cedrela fissilis* perderam completamente a capacidade de tolerar a desidratação, assemelhando-se às sementes recalcitrantes. Após a germinação, a falta de habilidade para re-induzir a proteção após a secagem a 20% resultou na totalidade de radículas mortas com todos os comprimentos observados. A hidratação das membranas é necessária para iniciar os eventos metabólicos e a hidratação de amidos e proteínas armazenados é necessária para ativar o metabolismo, produzindo energia e substratos indispensáveis ao crescimento da plântula (Kikuchi et al., 2006). As plântulas de algumas espécies têm a

capacidade de tolerar a dessecação como estratégia para resistir aos problemas de escassez e imprevisibilidade de precipitação em regiões áridas (Zhang et al., 2005).

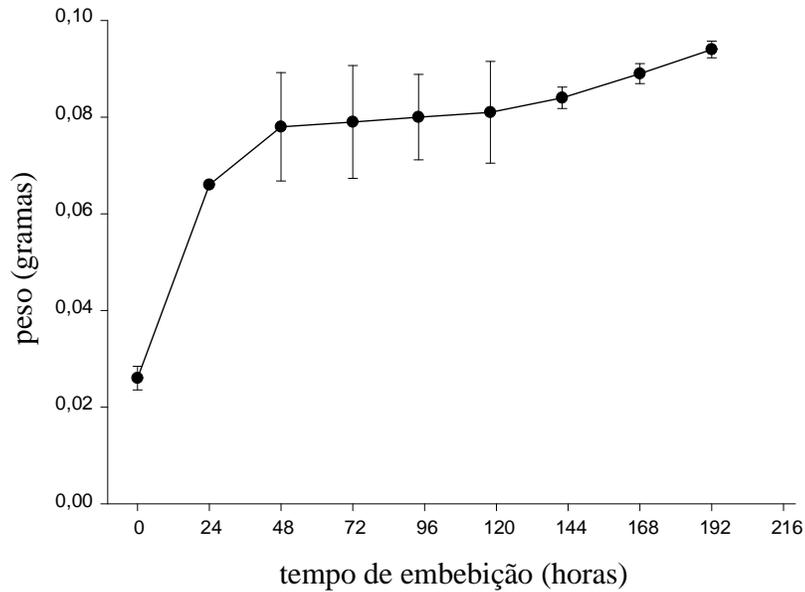


FIGURA 1: Curva de embebição de sementes de *Cedrela fissilis*.

Para as radículas de *Cedrela fissilis*, a redução do grau de umidade gradativamente, a cada dez pontos percentuais, permitiu algumas inferências sobre o comportamento durante a secagem rápida. As chances de restabelecimento após a secagem e, conseqüentemente, a retomada do desenvolvimento normal da plântula dependeram do comprimento de radícula observado e do grau de umidade atingido, cujos níveis reduzidos (abaixo de 20%) ocasionaram a mortalidade das radículas emergidas com 3, 4 e 5 mm de comprimento. A condição de secagem rápida utilizada com a sílica gel para avaliar a tolerância à dessecação pode ter impedido a ativação de alguns agentes protetores que permitiriam às radículas de *Cedrela fissilis* suportarem a

desidratação severa. A tolerância à dessecação pode ser induzida experimentalmente em embriões por meio de secagem lenta, pela qual as mudanças celulares que conferem resistência à secagem se iniciam com a perda de água e são consolidadas, desde que a remoção de água não seja tão rápida (Black et al., 1999).

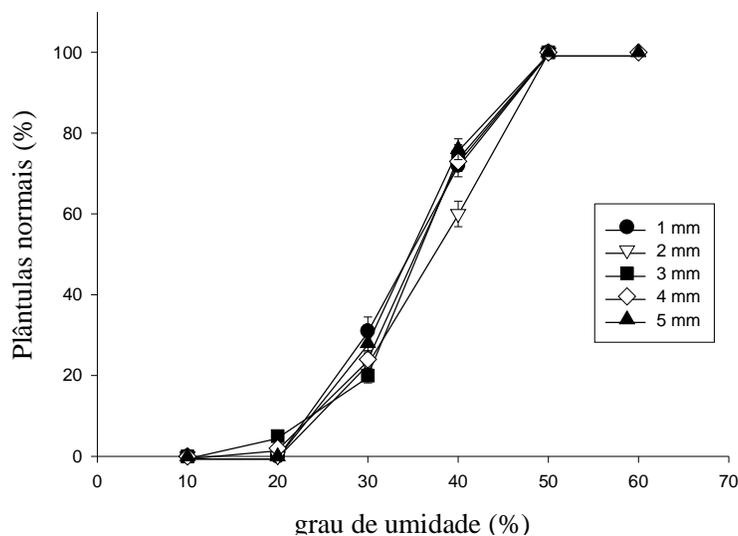


FIGURA 2: Tolerância à dessecação de sementes de *Cedrela fissilis* germinadas com diferentes comprimentos de radícula submetidas diretamente à secagem com sílica gel a diferentes graus de umidade.

O tratamento com PEG (-2,04 MPa) foi eficiente para re-induzir a tolerância à dessecação nas sementes com 1 mm de comprimento de radícula, que apresentaram 73% de sobrevivência quando o grau de umidade foi reduzido a 20%, mantendo-se a alta taxa de tolerância à dessecação (71%), quando o grau de umidade foi reduzido a 10%. As sementes com 2 mm de comprimento de radícula submetidas ao tratamento com PEG apresentaram um pequeno aumento na sobrevivência (29%) com a redução do grau de umidade a 10%. Por outro

lado, não foram observadas variações consideráveis quanto aos demais comprimentos de radícula avaliados, que apresentaram diminuição acentuada da tolerância à dessecação, conforme a redução do teor de água.

Leprince et al. (2000) relataram que sementes germinadas de pepino e ervilha podem restabelecer a tolerância à dessecação por meio de aplicação de estresse osmótico com PEG em suas radículas. Considerando-se que a re-indução de tolerância à dessecação é alcançada pela exposição das radículas ao baixo potencial hídrico, mudanças na expressão gênica podem ser relacionadas à indução de tolerância à dessecação e à condição do estresse osmótico. Buitink et al. (2004) relataram que o nível de transcritos que controlam enzimas em resposta ao estresse não aumentou durante a incubação em PEG (-1,7MPa) nas radículas de *Medicago truncatula* com 5 mm de comprimento, que permaneceram sensíveis à dessecação. Entretanto, as radículas com 3 mm de comprimento, incubadas em PEG durante 24 horas, apresentaram um aumento dos níveis de transcritos, concomitantemente com a re-indução da tolerância à dessecação.

As radículas de *M. truncatula* com 2,7 mm de comprimento inicialmente submetidas ao tratamento com PEG combinado com baixa temperatura restabeleceram a tolerância à dessecação. Após a germinação, o fato de as radículas sensíveis à dessecação adquirirem tolerância à secagem indicou que há uma lacuna (entre radículas com 1 e 3 mm de comprimento) entre o desenvolvimento e o estabelecimento da plântula (Buitink et al., 2003). Para os autores, o tratamento osmótico é capaz de induzir mudanças por meio de diferentes rotas metabólicas, juntamente com a paralisação do crescimento radicular. As fontes de carbono endógenas que são normalmente designadas para a divisão e a expansão celular são desviadas da síntese da parede celular para constituírem oligossacarídeos que, provavelmente, serão acumulados durante o restabelecimento da tolerância à dessecação.

Além disso, durante a incubação no PEG, houve uma redução sensível no grau de umidade das radículas de *Cedrela fissilis* (Figura 5). A secagem lenta é relatada por diversos autores por induzir a tolerância à dessecação em embriões em desenvolvimento. Uma pequena redução no grau de umidade dos embriões de trigo (*Triticum aestivum* L.) induziu a tolerância à dessecação, pelo acúmulo de alguns protetores, entre eles, as deidrininas (Black et al., 1999).

Possivelmente, as mudanças que ocorreram com o desenvolvimento das radículas de *Cedrela fissilis* acima de 2 mm de comprimento não permitiram a re-indução da tolerância à dessecação e tais radículas permaneceram sensíveis à desidratação, mesmo após o tratamento osmótico. Igualmente, o tempo e a temperatura de incubação no PEG e o potencial hídrico utilizado podem não terem sido eficazes para re-induzir a tolerância à dessecação nas radículas com 3, 4 e 5 mm de comprimento submetidas a 10% de grau de umidade.

Os dados obtidos com a utilização do tratamento com PEG combinado com o ABA, na tentativa de re-induzir a tolerância à dessecação nas radículas de *Cedrela fissilis* constam da Figura 4. Pela observação dos dados, destacam-se as sementes com 1 mm de comprimento de radícula, que mantiveram a alta taxa de sobrevivência (100%), mesmo quando o teor de água foi reduzido gradualmente a cada dez pontos percentuais (50% a 10%).

As sementes com 2 mm de comprimento de radícula também toleraram a desidratação até 20% de grau de umidade; no entanto, com a redução do grau de umidade para 10% houve a nulidade da tolerância à dessecação. A combinação do tratamento osmótico com o ABA também propiciou um aumento na taxa de sobrevivência das radículas com 3, 4 e 5 mm de comprimento, que apresentaram comportamentos semelhantes, alcançando porcentagem de sobrevivência de 83%, 76% e 64%, com 20% de umidade; porém, com a redução do grau de umidade para 10%, as radículas perderam completamente a tolerância à dessecação.

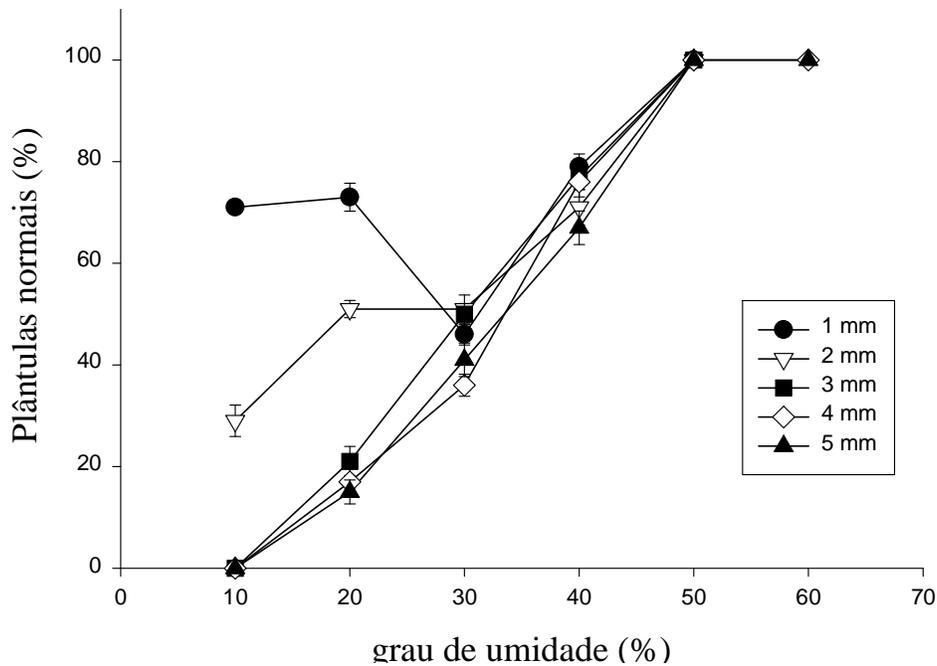


FIGURA 3: Tolerância à dessecação de sementes germinadas com diferentes comprimentos de radícula submetidas ao tratamento com PEG e à secagem com sílica gel, em função de diferentes níveis de hidratação

A ação do ABA pode também induzir a tolerância à dessecação, como demonstrado primeiramente por Bartels et al. (1988). Buitink et al. (2003) sugerem que o ABA e o estresse osmótico agem como dois estímulos independentes, necessários para re-induzir a tolerância à dessecação. Alternativamente, o tratamento osmótico poderia inibir o crescimento radicular até que o ABA fosse acumulado e desempenhasse suas funções.

Com a adição de ABA ao meio de cultura de embriões somáticos, houve uma diminuição do metabolismo que, conseqüentemente, aumentou o índice de tolerância à dessecação dos embriões de *M. truncatula*. A secagem lenta sem tratamento com ABA ocasionou a mortalidade dos embriões (Sreedhar et al., 2002). No presente trabalho, o tratamento osmótico, isoladamente, também não aumentou consideravelmente a porcentagem de tolerância à dessecação, quando comparado com a adição de ABA à solução de PEG. Embora somente as radículas com 1 mm de comprimento mantivessem a alta sobrevivência durante todos os níveis de secagem, as radículas de *Cedrela fissilis* com 2, 3, 4 e 5 mm de comprimento também apresentaram um incremento na formação de plântulas normais após o tratamento com ABA e subsequente redução do grau de umidade.

Possivelmente, o ABA desempenhou um papel de adaptação ao estresse. O acúmulo de ABA nos tecidos vegetais corresponde a mudanças metabólicas e fisiológicas que ocorrem durante o estresse hídrico em plântulas. A aplicação de ABA exógeno melhorou a adaptação das plântulas após o estresse hídrico (Boominathan et al., 2004). O ABA também tem um papel reconhecido na manutenção da dormência de sementes (Gualano et al., 2007) e, quando aplicado exogenamente, levam à expressão de genes que respondem à desidratação (Seki et al., 2002, Wang et al., 2002, Narusaka et al., 2004).

Diante dos resultados obtidos com a re-indução de tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Cedrela fissilis*, foram selecionadas as radículas com 1, 2 e 5 mm de comprimento, que foram submetidas ao tratamento com PEG e secagem com sílica gel para as avaliações citológicas. Estes comprimentos de radícula foram escolhidos por permitirem a nítida visualização das diferenças entre os sistemas obtidos com o tratamento com PEG. Com radículas de 1 mm de comprimento, houve 71% de sobrevivência; com 2 mm,

29% das radículas sobreviveram à secagem e, com 5 mm de comprimento, as radículas perderam completamente a tolerância à dessecação.

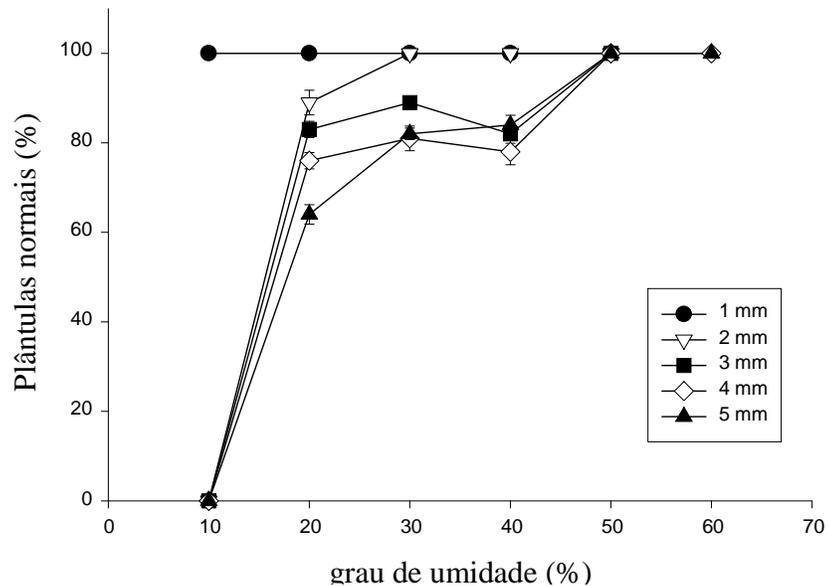


FIGURA 4: Tolerância à dessecação de sementes de *Cedrela fissilis* germinadas com diferentes comprimentos de radícula submetidas aos tratamentos com PEG+ABA e à secagem com sílica gel, em função de diferentes níveis de hidratação.

A partir da seleção desses modelos foi possível obter um sistema com contrastes para investigar, com técnicas aplicadas à biologia celular, as mudanças que ocorrem durante a perda e o restabelecimento da tolerância à dessecação das radículas de *Cedrela fissilis*.

As alterações no grau de umidade das radículas durante a incubação no PEG são apresentadas na Figura 5. Houve redução acentuada do grau de umidade das radículas com 1, 2 e 5 mm de comprimento, durante as primeiras 6 horas de incubação no PEG, tendo o grau de umidade das sementes com radícula

de 1 mm reduzido oito pontos percentuais; as radículas com 2 mm apresentaram redução de nove pontos percentuais e as sementes com 5 mm de radícula apresentaram diminuição de 12 pontos percentuais no grau de umidade. Após as primeiras horas de incubação no PEG, houve uma redução sutil do grau de umidade. Até as 72 horas finais, as radículas com 1 e 2 mm apresentaram, igualmente, 42% de umidade, enquanto as radículas com 5 mm apresentaram 52% de grau de umidade (Figura 5).

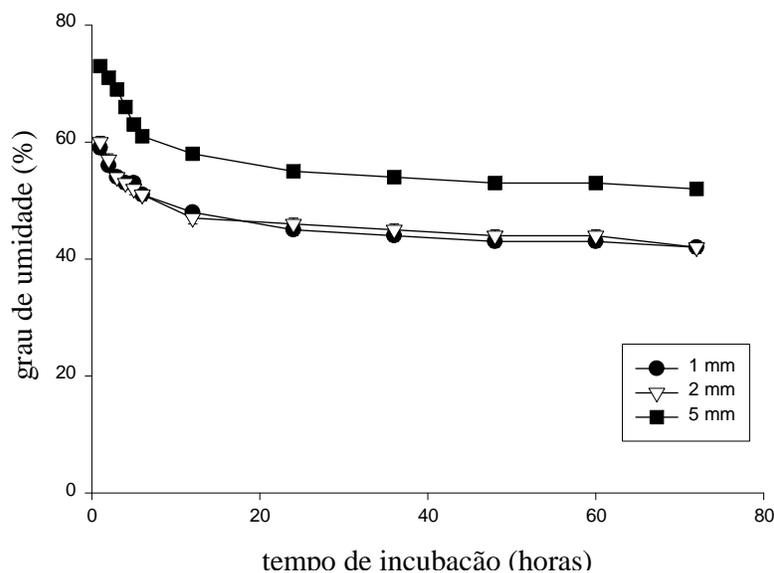


FIGURA 5: Mudanças no grau de umidade (%) das sementes com diferentes comprimentos de radícula, durante incubação em PEG.

As mudanças no grau de umidade das radículas submetidas ou não ao tratamento com PEG durante a secagem em sílica gel constam da Figura 6. As radículas que não foram submetidas ao tratamento com PEG, assim como aquelas que foram tratadas com PEG, foram semelhantes em relação à redução do grau de umidade, durante as primeiras 6 horas de secagem em sílica gel.

Entretanto, a observação do grau de umidade das radículas, nas 6 horas seguintes de desidratação, permitiu detectar que aquelas tratadas com PEG apresentaram um decréscimo constante do grau de umidade, até o final das 24 horas de secagem. Já as radículas que não foram tratadas com PEG apresentaram uma diminuição um pouco mais acentuada do grau de umidade durante todo o período de secagem em sílica gel. Contudo, as radículas com 1, 2 e 5 mm de comprimento, que foram submetidas ou não ao tratamento com PEG, apresentaram, ao final das 24 horas de secagem, aproximadamente 10% de grau de umidade.

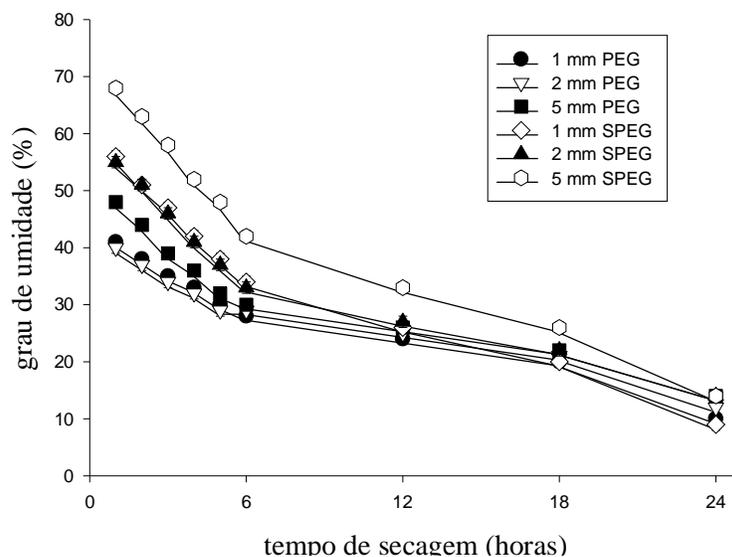


FIGURA 6: Mudanças no grau de umidade (%) das sementes com diferentes comprimentos de radícula, submetidas ou não ao tratamento com PEG, durante secagem com sílica gel.

As mudanças no grau de umidade das radículas de *Cedrela fissilis*, submetidas ou não ao tratamento com PEG durante a pré-umidificação (24 horas) e as primeiras 24 horas de reidratação (Figura 7), foram semelhantes. Ao

longo das primeiras 12 horas de pré-umidificação, o grau de umidade das radículas aumentou rapidamente, observado pelo aumento de aproximadamente 4 pontos percentuais no grau de umidade das radículas. Nota-se que, durante as primeiras 24 horas de reidratação, as radículas com 1 mm de comprimento, sem tratamento com PEG, apresentaram um aumento acentuado na absorção de água, quando comparadas com as radículas de mesmo tamanho tratadas com PEG. As radículas com os demais comprimentos apresentaram comportamento semelhantes durante o período de pré-umidificação e reidratação, tendo, ao final de 48 horas, apresentado, em média, 35% de grau de umidade.

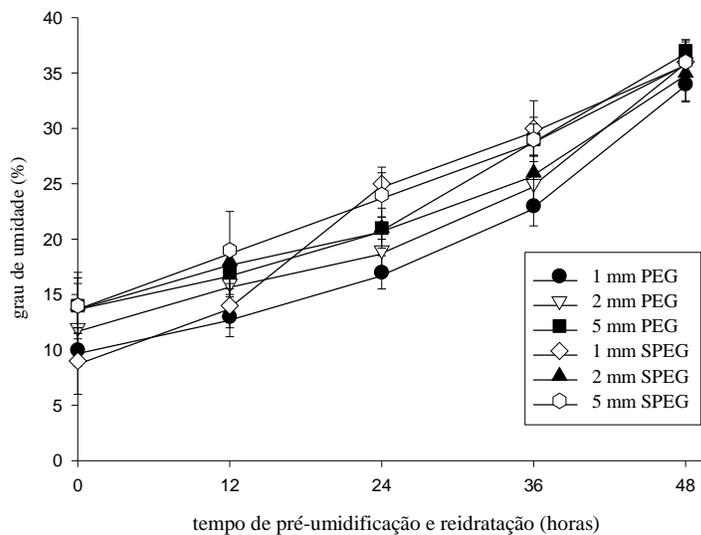


FIGURA 7: Mudanças no grau de umidade (%) das sementes com diferentes comprimentos de radícula, submetidas ou não ao tratamento com PEG, durante a pré-umidificação (24h) seguida pela reidratação.

O perfil eletroforético do DNA genômico extraído das radículas de *Cedrela fissilis* pode ser observado na Figura 8. A imagem indicada pelo número 1 refere-se ao DNA das radículas com 1 mm de comprimento, cujo padrão apresenta-se intenso, porém, com uma mancha ao longo do perfil.

Provavelmente, tal observação deve-se ao fato de que parte das radículas (29%) não restabeleceu a tolerância à dessecação após a secagem em sílica gel. A banda referente ao DNA extraído a partir das radículas com 2 mm de comprimento encontra-se parcialmente degradada, caracterizada pela mancha no gel de agarose, assim como o DNA das radículas com 5 mm de comprimento, cuja banda enfraquecida também apresenta sinais de degradação de DNA.

A ocorrência de tal aspecto do DNA é relatada na literatura como morte passiva das células. Esse fenômeno é um evento não controlado, resultante após uma injúria irreversível das células da membrana. Quando as células são mortas devido a um tratamento abiótico, o DNA não é clivado e não se desloca durante a eletroforese ou, alternativamente, sob determinado estresse, é danificado mais propriamente pelo fator do que pelas endonucleases e é visualizado como uma mancha no gel (McCabe & Leaver, 2000).

A morte passiva das células é diferente de morte programada de células, um processo de morte celular altamente controlado ao nível genômico, resultante de uma série de mudanças nas características morfológicas e da degradação do DNA pelas endonucleases. A morte passiva das células é causada por uma injúria severa no tecido que, em animais, resulta no desenvolvimento de sintomas inflamatórios (Eckardt, 2006) e em plantas, especialmente sementes, ocasiona a perda da viabilidade (Kranter et al., 2006).

A incubação no PEG pode induzir a síntese de proteínas que desempenham uma função protetora do DNA (Faria et al., 2005). No entanto, de acordo com os dados apresentados, provavelmente, o DNA não efetuou o reparo necessário para manter a integridade genética após a secagem e a reidratação. Osborne & Boubriak (1997) enfatizaram a importância do reparo do DNA na determinação do genoma da planta, considerando que a habilidade para retomar a síntese de proteínas, lipídeos e de RNA só é efetuada se a integridade da informação genética também for conservada. A incubação no PEG pode induzir

a síntese de proteínas que desempenham uma função protetora do DNA (Faria et al., 2005). No entanto, de acordo com os dados apresentados, provavelmente, o DNA não efetuou o reparo necessário para manter a integridade genética após a secagem e reidratação.

Osborne & Boubriak (1997) enfatizaram a importância do reparo do DNA na determinação do genoma da planta, considerando que a habilidade para retomar a síntese de proteínas, lipídeos e de RNA só é efetuada se a integridade da informação genética também for conservada.

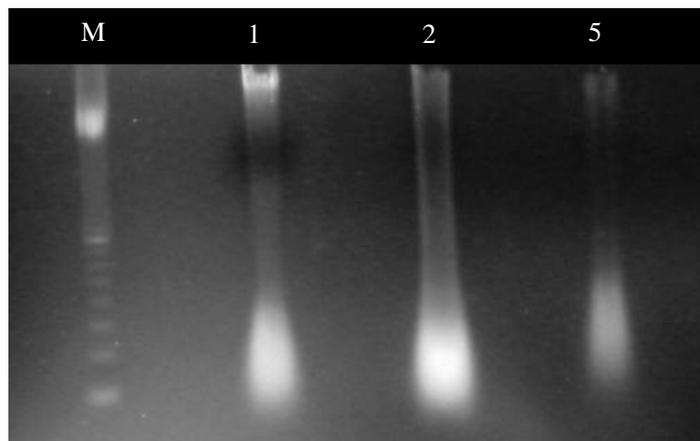


FIGURA 8: Gel de agarose 1% com DNA extraído de radículas de *Cedrela fissilis* após tratamento com PEG e secagem. **M:** Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder, **1:** radícula com 1 mm de comprimento, **2:** radícula com 2 mm de comprimento e **3:** radícula com 5 mm de comprimento.

A morte celular observada nas radículas de *Cedrela fissilis* também foi caracterizada pela avaliação citológica (Figura 9). A observação do aspecto dos núcleos foi realizada por meio de microscopia de luz, cuja

coloração intensa e tamanho reduzido comprovaram a incidência de mortalidade. Radículas com 1, 2 e 5 mm de comprimento apresentaram 41%, 60% e 74% de células mortas, respectivamente, pela análise microscópica. O conteúdo hídrico da célula pode determinar a manutenção da integridade de proteínas, ativação de endonucleases e conformação do DNA (Osborne, 2000).

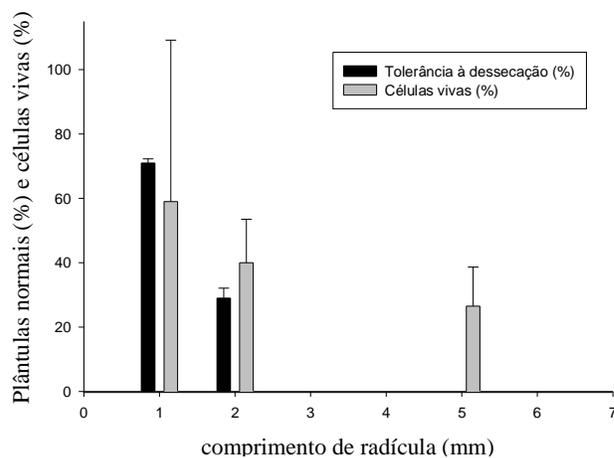


FIGURA 9: Tolerância à dessecação e células vivas em radículas de *Cedrela fissilis* com 1, 2 e 5 mm de comprimento após tratamento com PEG, secagem com sílica gel e pré-umidificação.

As imagens obtidas com o teste de TUNEL encontram-se na Figura 10. O teste de TUNEL é largamente aplicado para a detecção de degradação do DNA *in situ* e ocorrência de morte celular, seja resultante de morte passiva ou programada de células. Adicionalmente aos resultados obtidos com a eletroforese do DNA e com a avaliação da viabilidade celular, a técnica do TUNEL evidenciou a ocorrência de morte celular nas radículas com 1, 2 e 5 mm de comprimento submetidas ao estresse hídrico, caracterizado pela fluorescência verde dos núcleos ou TUNEL-positivo (Figuras 10A, 10B E 10C). As Figuras 10B e 10C correspondem aos núcleos do meristema de radículas com 2 e 5 mm,

respectivamente e destacam-se pela intensidade da coloração verde, relacionada à perda da viabilidade após a secagem dessas radículas.

Os núcleos do meristema de radículas com 1 mm, embora apresentassem um restabelecimento parcial da tolerância à dessecação, também apresentaram perda da viabilidade celular após a secagem a 10%, caracterizada pelo TUNEL-positivo em menor intensidade (Figura 10A).

Resumidamente, a técnica do TUNEL baseia-se na detecção de fragmentos de DNA pela incorporação de nucleotídeos modificados (dUTP) pela enzima denominada Transferase terminal de desoxinucleotídeos, cujos nucleotídeos são marcados com o corante fluorescente (Huang et al., 2005).

A literatura relata a utilização da técnica do TUNEL com sucesso como marcador de morte celular em raízes submetidas ao estresse abiótico em diversas espécies, tais como cevada (Katsuhara, 1997), milho (Xiong et al., 2006) e arroz (Liu et al., 2007).

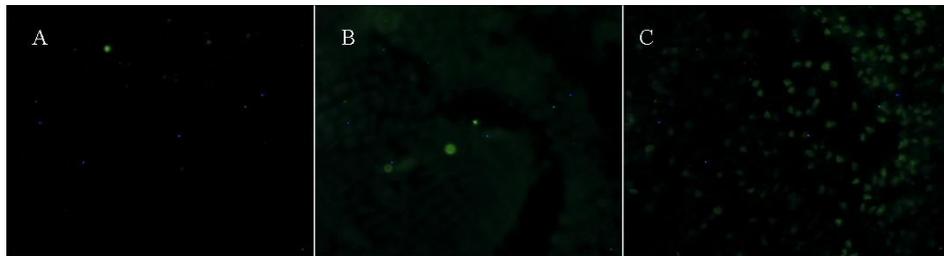


FIGURA 10: Teste de TUNEL nas células das radículas de *Cedrela fissilis* com 1 (A), 2 (B) e 5 (C) mm de comprimento, que foram submetidas ao estresse osmótico com PEG (-2,04 MPa), desidratação com sílica gel (10% de grau de umidade) e reidratação. A, B e C correspondem ao TUNEL-positivo das células das radículas com 1, 2 e 5 mm, respectivamente.

As mudanças ultra-estruturais que ocorreram nas células das radículas de *Cedrela fissilis* após a secagem, seguida de reidratação, podem ser visualizadas na Figura 11. As Figuras 11A, 11C e 11E referem-se às imagens das células das radículas com 1, 2 e 5 mm de comprimento, respectivamente,

que não foram submetidas ao estresse hídrico. Notam-se a densidade citoplasmática e a conformação da parede celular normais e a organização do conteúdo celular. Após a secagem e a reidratação das radículas com 1 mm de comprimento (Figura 11B), a imagem correspondente às células ilustra a manutenção da integridade da parede celular, porém, com princípios de alterações no conteúdo celular. Além disso, é importante avaliar quantas células são danificadas para que a viabilidade seja afetada. Uma pequena mudança na permeabilidade da membrana não necessariamente resulta na perda da viabilidade. A morte do tecido resulta quando uma porção crítica de células perdeu a integridade da membrana (Ingram & Bartels, 1996; Leprince et al., 1999).

A análise ultra-estrutural das células das radículas com 2 e 5 mm de comprimento, Figuras 11D e 11F, respectivamente, detectou alterações relacionadas à morte celular, como a perda da compartimentalização dos componentes celulares e fragmentação da parede celular e citoplasma. Essas observações estão de acordo com dados encontrados na literatura (Filonova et al., 2000). Embora 29% das radículas com 2 mm de comprimento retomassem o crescimento, as alterações verificadas impediram o total restabelecimento da tolerância à dessecação e contribuíram para a totalidade da mortalidade das radículas com 5 mm de comprimento após o estresse hídrico.

Para tolerar a dessecação, as células precisam ser protegidas contra as mudanças potencialmente letais que podem ocorrer após a desidratação. Dentre os mecanismos que podem prevenir tais danos estão a participação de certos carboidratos solúveis (rafinose e estaquiase), que são envolvidos na formação do estado vítreo da membrana e ou interação protetora com os fosfolipídeos da membrana e ou LEA proteínas (late embryogenesis abundant). LeA proteínas são envolvidas na estabilização de estruturas macromoleculares no estado

desidratado, portanto, permitem a integridade funcional das membranas após a desidratação e reidratação (Buitink et al., 2002).

Além disso, a estabilização de membranas no estado desidratado é de suma importância para a tolerância à dessecação. Os açúcares desempenham um papel crucial, interagindo com a fase hidrofílica dos fosfolípidos e substituindo (no mínimo uma porção bastante significativa) a água normalmente ocupada nesta posição (Berjak et al., 1990; Hoekstra et al., 2005).

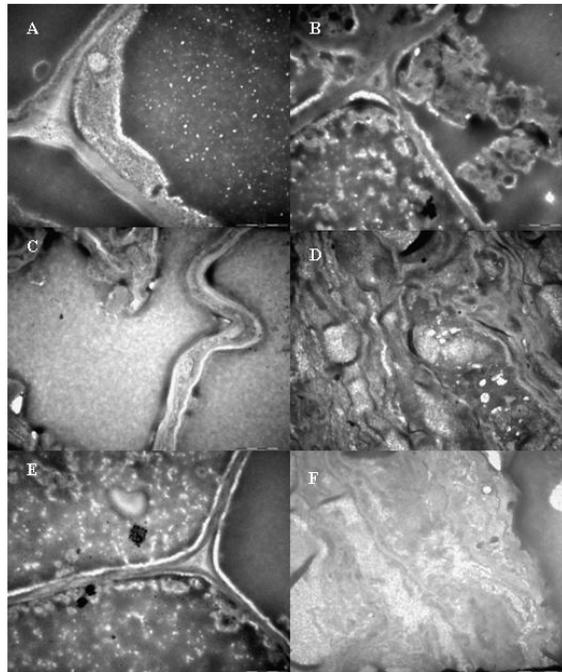


FIGURA 11: Microscopia eletrônica de transmissão de células da radícula de *Cedrela fissilis* com 1(A), 2 (C) e 5 (E) mm de comprimento. B, D e F correspondem às células das radículas com 1, 2 e 5 mm de comprimento, respectivamente, após secagem em sílica gel e reidratação. As barras indicam 2 μm .

6 CONCLUSÕES

O tratamento com PEG foi eficiente na re-indução da tolerância à dessecação em radículas de *Cedrela fissilis*.

As radículas com 1 mm de comprimento restabeleceram completamente a tolerância à dessecação, quando previamente tratadas com PEG+ABA.

A perda da tolerância à dessecação nas radículas coincidiu com a degradação do DNA. A ocorrência de morte celular também foi verificada nas radículas de *Cedrela fissilis* intolerantes à dessecação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTELS, D.; SINGH, M.; SALAMINI, F. Onset of desiccation tolerance during development of the barley embryo. **Planta**, Berlin, v. 175, n. 4, p. 485–492, Oct. 1988.

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

BOOMINATHAN, P.; SHUKLA, R.; KUMAR, A.; MANNA, D.; NEGI, D.; VERMA, P. K.; CHATTOPADHYAY, D. Long Term Transcript Accumulation during the Development of Dehydration Adaptation in *Cicer arietinum*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, n. 3, p. 1608–1620, July 2004.

BUITINK, J.; HOEKSTRA, F. A.; LEPRINCE O. Biochemistry and Biophysics of desiccation tolerance systems. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Ed.). **Desiccation and Survival in Plants**. Wallingford: CABI, 2002. p. 293–318.

BUITINK, J.; THOMAS, M.; GISSOT, L.; LEPRINCE, O. Starvation, osmotic stress and desiccation tolerance lead to expression of different genes of the regulatory b and g subunits of the SnRK1 complex in germinating seeds of *Medicago truncatula*. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 55–67, Jan. 2004.

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

CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. **Biothetic & Histochemistry**, Baltimore, v. 68, n. 3, p. 142-145, May 1993.

CORVELLO, W. B. V.; VILLELA, F. A.; NEDEL, J. L.; PESKE, S. T. Época de colheita e armazenamento de sementes de *Cedrela fissilis* (*Cedrela fissilis* Vell.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 28-34, 1999.

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

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

ECKARDT, N. A. Programmed cell death in plants: A role for mitochondrial-associated hexokinases. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 9, p. 2097–2099, Sept. 2006.

FARIA, J. M. R.; BUITINK, J.; LAMMEREN, A. A. M.; HILHORST, H. W. M. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 418, p. 2119–2130, Aug. 2005.

FIGLIOLIA, M. B. Conservação de sementes de essências florestais. **Boletim Técnico do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 43, p. 1-18, 1988.

FILONOVA, L. H.; BOZHKOVA, P. V.; BRUKHIN, V. B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; ARNOLD, S. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 113, n. 24, p. 4399-4411, Dec. 2000.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; TETTEROO, F. A.; WOLKERS, W. F. Induction of desiccation tolerance in plant somatic embryos: how exclusive is the protective role of sugars? **Cryobiology**, San Diego, v. 43, n. 2, p. 140-150, Sept. 2001.

HOEKSTRA, F. A. Differential congeivities in desiccated anhydrobiotic plant systems. **Integrative and Comparative Biology**, Madison, v. 45, n. 5, p. 725-733, 2005.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. A protocol to determine seed storage behaviour. **Technical Bulletin International Plant Genetic Research Institute**, Rome, n. 1, p. 55, 1996

HUANG, X.; HALICKA, H. D.; TRAGANOS, F. Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. **Cell Proliferation**, Oxford, v. 38, n. 4, p. 223–243, Aug. 2005.

KATSUHARA, M. Apoptosis-like cell death in barley roots under salt stress. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 38, n. 9, p. 1091-1093, Sept. 1997.

- KAWAGUICI, C. B.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade genética de três indivíduos (adultos, jovens e plântulas) de *Calophyllum brasiliense* em uma população de mata de galeria. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, n. 59, p. 131-143, jun. 2001.
- KIKUCHI, K.; KOIZUMI, M.; ISHIDA, N.; KANO, H. Water uptake by dry beans observed by micro-magnetic resonance imaging. **Annals of Botany**, London, n. 3, p.545-553, Sept. 2006.
- KRANNER, B. S.; ANDERSON, K. M.; PRITCHARD, H. W. Glutathione half-cell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death? **Free Radical Biology & Medicine**, p.1-11, 2006.
- LEPRINCE, O.; BUITINK, J.; HOEKSTRA, F. A. Axes and cotyledons of recalcitrant seeds of *Castanea sativa* Mill. exhibit contrasting responses of respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n.338, p.1515-1524, Sept. 1999.
- LEPRINCE, O.; HARREN F. J. M.; BUITINK, J.; ALBERDA, M.; HOEKSTRA F. A. Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 2, p. 597–608, Feb. 2000.
- LIU, S. H.; FU, B. Y.; XU, H. X.; ZHU, L. H.; ZHAI, H. Q.; LI, Z. K. Cell death in response to osmotic and salt stresses in two rice (*Oryza sativa* L.) ecotypes. **Plant Science**, Clare, v. 172, n. 5, p. 897–902, May 2007.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 368 p.
- MCCABE, P. F.; LEAVER, C. J. Programmed cell death in cell cultures. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 44, n. 3, p. 359–368, Oct. 2000.
- MICHEL; KAUFMANN, 1973. In: Black, M.; PRITCHARD, H.W. eds. **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford, Oxon, UK: CABI Publishing, 2002. p.343-364.
- NARUSAKA, Y.; NARUSAKA, M.; SEKI, M.; UMEZAWA, T.; ISHIDA, J.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; SHINOZAKI, K. Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis*: Analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 55, n. 3, p. 327–342, May 2004.

OLIVER, M. J.; WOOD, A. J.; O'MAHONY, P. 'To dryness and beyond': preparation for the dried state and rehydration in vegetative desiccation tolerant plants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 24, n. 3, p.193–201, Mar. 1998.

OSBORNE, D. J.; BOUBRIAK, I. I. DNA status, replication and repair in desiccation tolerance and germination. **Basic and applied aspects of seed biology**. Kluwer Academic, 1997. p. 23-32, 1997.

PHARTYAL, S. S.; THAPLIYAL, R. C.; KOEDAM, N.; GODEFROID, S. *Ex situ* conservation of rare and valuable forest tree species through seed-gene banks. **Current Science**, Bangalore, v. 83, n. 11, p. 1351-1357, dez. 2002.

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

SEKI, M.; ISHIDA, J., NARUSAKA, M.; FUJITA, M.; NANJO, T.; UMEZAWA, T.; SHINOZAKI, K. Monitoring expression pattern of about 7000 Arabidopsis genes under ABA treatment using full length cDNA microarray. **Plant Journal**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 279–292, Aug. 2002.

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

XIONG, H. Y.; LI, Y. S.; LI, L. J. A unique form of cell death occurring in meristematic root tips of completely submerged maize seedlings. **Plant Science**, Clare, v. 171, n. 5, p. 624–631, Nov. 2006.

YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. **Forest conservation genetics: principles and practice**. Australia: CSIRO, 2000. 352 p.

WANG, X. J.; LOH, C. S.; YEOH, W. S. Drying rate and dehydrin synthesis associated with abscisic-acid induced dehydration tolerance in *Spathoglottis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n.368, p. 551-558, Mar. 2002.

ZHANG, F.; CHEN, F. G.; HUANG, E. Q.; ORION, E. O.; KRUGMAN, E. T.; FAHIMA, T.; KOROL, A. B.; NEVO, E.; GUTTERMAN, Y. Genetic basis of barley caryopsis dormancy and seedling desiccation tolerance at the germination tage. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 110, n. 3, p. 445–453, Feb. 2005.

Considerações finais

O presente trabalho permitiu inferências sobre a técnica de restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Sesbania virgata* e *Cedrela fissilis*. Em sementes germinadas de *S. virgata* e de *C. fissilis*, o tratamento com PEG e PEG+ABA permitiu resultados positivos no restabelecimento da tolerância à dessecação, verificado pela sobrevivência (formação de plântulas normais) após a secagem na sílica e reidratação. As chances de restabelecimento após a secagem e conseqüentemente a retomada do desenvolvimento normal das plântulas dependeram do comprimento de radícula das espécies utilizadas e do grau de umidade atingido.

Para *S. virgata*, houve uma relação entre a perda da integridade do DNA e a perda da tolerância à dessecação em radículas com 3 e 5 mm de comprimento, quando desidratadas a 10% de umidade. Nas radículas de *C. fissilis* com 2 e 5 mm de comprimento desidratadas a 10% também foi observada a perda da integridade do DNA. Nas radículas de ambas espécies foi observado o padrão de morte passiva das células no perfil eletroforético do DNA.

A avaliação citológica do meristema radicular de *S. virgata* por meio de análise da viabilidade celular, teste de TUNEL e microscopia eletrônica de transmissão proporcionou evidências sobre a ocorrência de morte celular em radículas de *S. virgata* com 3 e 5 mm e em radículas de *C. fissilis* com 2 e 5 mm de comprimento que não sobreviveram à desidratação.

De acordo com os resultados obtidos, as radículas de *S. virgata* e de *C. fissilis* germinadas constituíram sistemas interessantes para os avanços nas pesquisas sobre as causas da perda e do restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas após a germinação. Estudos mais aprofundados sobre açúcares, proteínas e expressão gênica durante a germinação e o tratamento osmótico com ou sem ABA, juntamente com os resultados a

respeito das alterações celulares investigadas no presente trabalho, constituirão ferramentas para ampliar o conhecimento sobre as causas da tolerância/sensibilidade à dessecação em sementes.