



ANDREZA DA SILVA MARTINS

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES
DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM
SEMENTES DE *Anadenanthera colubrina* (VELL.)
BRENAN**

LAVRAS – MG

2015

ANDREZA DA SILVA MARTINS

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DA TOLERÂNCIA À
DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE *Anadenanthera colubrina* (VELL.)
BRENAN**

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

Orientador

Dr. José Márcio Rocha Faria

Coorientadores

Dr. Anderson Cleiton José

Dra. Olívia Alvina Oliveira Tonetti

LAVRAS – MG

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Martins, Andreza da Silva.

Aspectos fisiológicos e moleculares da tolerância à
dessecação em sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.)
Brenan / Andreza da Silva Martins. – Lavras : UFLA, 2015.
80 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal
de Lavras, 2015.

Orientador(a): José Marcio Rocha Faria.

Bibliografia.

1. Sementes florestais. 2. Restabelecimento da Tolerância à
dessecação. 3. Atividade enzimática. 4. Perfil proteico. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

ANDREZA DA SILVA MARTINS

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DA TOLERÂNCIA À
DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE *Anadenanthera colubrina* (VELL.)
BRENAN**

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

APROVADA em 25 de fevereiro de 2015.

Dr. Anderson Cleiton José	UFLA
Dr. Renato Mendes Guimarães	UFLA
Dra. Leticia Renata de Carvalho	UFMG

Dr. José Márcio Rocha Faria
Orientador

LAVRAS – MG

2015

Ao meu pai, *José Arnaldo Martins*, que mesmo não estando mais entre nós,
continua sempre presente em nossos corações...

DEDICO

À minha querida mãe *Maria*, o meu porto seguro e melhor amiga...

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar até aqui, sempre com suas bênçãos.

A minha mãe Maria, pois sem sua dedicação eu não teria ido tão longe.

Ao meu irmão, Marcus Vinícius, pelo apoio.

Aos meus avós e a toda a família, pelo carinho.

Ao Gabriel, pela compreensão nos dias difíceis e companheirismo durante toda esta caminhada.

Ao professor Dr. José Márcio Rocha Faria, pela orientação e conhecimento, pela paciência e mostrando sempre que um líder pode ser um amigo.

Ao professor Dr. Anderson Cleiton José e a técnica Dra. Olivia Alvina Tonetti, pelos ensinamentos e sugestões.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal.

À CAPES que apoiou, financeiramente, a minha formação acadêmica.

A todos os colegas do Laboratório de Sementes Florestais, pela amizade formada, boa convivência, conselhos e ideias trocadas.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade.

Ao amigo e quase coorientador Wilson Vicente, pelos conhecimentos, ajuda e sugestões.

A Elizabeth Marques, pela importante ajuda em partes do meu trabalho.

A Elenir e ao Antônio, do Laboratório de Análise de Sementes, pela ajuda indispensável.

À amiga de república, Carol, pela amizade.

A todos os que contribuíram, de alguma forma, com a realização e conclusão deste trabalho.

RESUMO GERAL

A tolerância à dessecação é a habilidade de um organismo de sobreviver à remoção severa de água, atingindo graus de umidade reduzidos, e retomando o metabolismo normal com a reidratação. A aquisição e a manutenção da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas estão associadas a uma série de processos celulares. Neste trabalho, objetivou-se estudar aspectos fisiológicos e moleculares da tolerância e restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes de *Anadenanthera colubrina* em processo germinativo. Inicialmente, as sementes foram embebidas durante 0 (controle), 8, 16, 24 horas e até o final da germinação (radícula protruída com 1mm de comprimento). Após a embebição/germinação, as sementes foram desidratadas e, posteriormente, reidratadas. Aquelas que retomaram o processo germinativo e formaram plântulas normais foram consideradas tolerantes à dessecação. Com isso, foi caracterizado o padrão da perda da tolerância à dessecação para as sementes dessa espécie, durante a embebição e após a germinação. Também foram realizados tratamentos de restabelecimento da tolerância à dessecação, por meio da incubação das sementes em soluções de diferentes potenciais osmóticos e concentrações de ABA. Por fim, foram realizadas análises eletroforéticas de proteínas totais e resistentes ao calor e a quantificação da atividade enzimática da catalase, superóxido dismutase e peroxidase. Foi possível concluir que as sementes perdem a tolerância ao longo do processo germinativo, sendo total a perda após a protrusão radicular. Além disso, as proteínas resistentes ao calor e as enzimas CAT e SOD estão diretamente envolvidas com perda da tolerância à dessecação ao longo da embebição.

Palavras-chave: Sementes florestais. Atividade enzimática. Perfil proteico.

GENERAL ABSTRACT

The desiccation tolerance is the ability of an organism to survive the severe water removal, reaching low levels of humidity, and resuming normal metabolism after rehydration. The acquisition and maintenance of desiccation tolerance in orthodox seeds are associated to many cellular processes. This work aimed to evaluate physiological and molecular aspects of desiccation tolerance in germinating seeds of *Anadenantheracolumbrina*. Initially, the seeds were put to imbibe for 0 (control), 8, 16, 24 hours and after germination (1mm radicle protrusion). After imbibition/germination, seeds were dried on drying boxes with silica gel until reach the initial water content (before imbibition) and rehydrated. Those that developed into normal seedlings were considered desiccation tolerant. Besides characterizing the pattern of loss of desiccation tolerance, treatments for its reestablishment were also carried out through incubation of the seeds in solutions with different osmotic potential and ABA concentrations. Total and heat resistant proteins were also analyzed as well as the enzymatic activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POX). It was concluded that the seeds lose tolerance throughout the germination process, with the total loss at root protrusion. Moreover, the heat resistant proteins and enzymes SOD and CAT are directly involved with the loss of desiccation tolerance during the germination.

Keywords: Forest Seeds. Enzymatic activity. Protein profile.

LISTA DE FIGURAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

- Figura 1 – Esquema da metodologia adotada para realização da curva de embebição em sementes de *Anadenanthera colubrina*.....32
- Figura 2 - Padrão de hidratação de sementes de *Anadenanthera colubrina* expressos em percentual de ganho de massa em relação ao peso inicial (tempo 0).....38
- Figura 3 - Curvas de secagem de sementes de *Anadenanthera colubrina* em diferentes pontos da embebição e germinação40
- Figura 4 - Perda da tolerância à dessecação em sementes de *Anadenanthera colubrina* expressas pelo percentual de formação de plântulas normais, após embebição e germinação (protrusão da radícula com comprimento de 1mm).....41

ARTIGO 2

- Figura 1 - Esquema da metodologia adotada para realização da curva de embebição em sementes de *Anadenanthera colubrina*.....58
- Figura 2 - Padrão eletroforético das proteínas totais e resistentes ao calor de radículas de sementes de *Anadenanthera colubrina* em diferentes tempos de embebição64
- Figura 3 - Variações na abundância de proteínas resistentes ao calor em eixos embrionários de *Anadenanthera colubrina* ao longo da embebição e após a protrusão radicular67
- Figura 4 - Variações na abundância de proteínas resistentes ao calor em eixos embrionários de *Anadenanthera colubrina* ao longo da embebição e após a protrusão radicular68

- Figura 5 - Atividade enzimática da catalase em sementes de *Anadenanthera colubrina* em diferentes tempos de embebição: (SS) Sementes secas. (8 – 24) Sementes embebidas por 8, 16 e 24 horas. (1mm) Sementes germinadas com radículas de 1 mm ...70
- Figura 6 - Atividade enzimática da superóxido dismutase em sementes de *Anadenanthera colubrina* em diferentes tempos de embebição: (SS) Sementes secas. (8 – 24) Sementes embebidas por 8, 16 e 24 horas. (1mm) Sementes germinadas com radículas de 1 mm71
- Figura 7 – Atividade enzimática da peroxidase em sementes de *Anadenanthera colubrina* em diferentes tempos de embebição: (SS) Sementes secas. (8 – 24) Sementes embebidas por 8, 16 e 24 horas. (1mm) Sementes germinadas com radículas de 1 mm ...72

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Valores de umidade em sementes germinadas de <i>Anadenanthera colubrina</i> antes e após os tratamentos de reindução da tolerância à dessecação	44
--	----

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 13
	REFERÊNCIAS 22
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS 26	
ARTIGO 1 Caracterização fisiológica da perda da tolerância à dessecação em sementes de <i>Anadenanthera colubrina</i> 26	
1	INTRODUÇÃO 28
2	MATERIAL E MÉTODOS 30
2.1	Material vegetal 30
2.2	Determinação do grau de umidade 30
2.3	Determinação do peso de mil sementes 30
2.4	Germinação 30
2.5	Curva de embebição 31
2.6	Caracterização da perda da tolerância à dessecação durante a germinação 32
2.7	Restabelecimento da tolerância à dessecação 34
2.8	Análise de dados 35
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO 37
3.1	Caracterização do lote e curva de embebição 37
3.2	Curvas de secagem, perda da tolerância à dessecação e restabelecimento da tolerância à dessecação 39
4	CONCLUSÕES 46
	REFERÊNCIAS 48
ARTIGO 2 Proteínas totais, proteínas resistentes ao calor e atividade enzimática em sementes de <i>Anadenanthera colubrina</i> em processo germinativo 51	
1	INTRODUÇÃO 53
2	MATERIAL E MÉTODOS 56
2.1	Material vegetal 56
2.2	Determinação do grau de umidade 56
2.3	Determinação do peso de mil sementes 56
2.4	Germinação 57
2.5	Curva de embebição 57
2.6	Caracterização da perda da tolerância à dessecação durante a germinação 59
2.7	Padrões eletroforéticos de proteínas totais e resistentes ao calor ao longo da germinação 60
2.8	Ensaio enzimáticos 61
2.9	Análise dos dados 62

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.1	Proteínas totais e resistentes ao calor	64
3.2	Atividade enzimática	69
4	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS	78

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade vem sendo perdida gradualmente, principalmente, por causa da exploração descontrolada dos recursos naturais, o que vem incentivando a busca por medidas compensadoras para sua recuperação e manutenção. A conservação de espécies vegetais pode ser feita por meio do armazenamento de sementes em bancos de germoplasma, sendo que esse processo inclui etapas de secagem e armazenamento em temperatura e umidade baixas. Entretanto, diferentes categorias de sementes apresentam variações quanto à tolerância à secagem e ao armazenamento.

A tolerância à dessecação é a habilidade de um organismo sobreviver a níveis críticos de remoção da água celular, sem que ocorra perda significativa de suas funções e sem causar danos irreversíveis às células (BUITINK; LEPRINCE, 2008). Dessa forma, é a habilidade das células em perder água até atingirem o equilíbrio com o ar moderadamente a extremamente seco e, então, retomarem suas funções normais após a reidratação (ALPERT, 2005).

Para entender a tolerância à dessecação em sementes e os principais processos envolvendo sua perda, é importante entender a diferença entre duas categorias de sementes. Roberts (1973) classificou as sementes em recalcitrantes ou ortodoxas. As recalcitrantes são aquelas liberadas da planta mãe com alto conteúdo de água e metabolismo ativo. Se armazenadas, sofrem deterioração causada por danos estruturais passíveis para redução da capacidade germinativa e consequente aumento na mortalidade das sementes. Em contraste, as sementes ortodoxas toleram a dessecação e podem ser secas a níveis de umidade abaixo de 10%, podendo ser armazenadas no estado seco por um longo período de tempo, a baixas temperaturas e umidade relativa do ar.

Ellis, Hong e Roberts (1990) propuseram outra categoria e a denominaram de sementes intermediárias, as quais toleram a desidratação até 10 a 12% de umidade, porém não podem ser armazenadas em baixas temperaturas por período prolongado, podendo manter sua viabilidade por até alguns anos.

O período de formação e maturação das sementes está intimamente relacionado com a presença de água, sendo que sementes de diferentes espécies podem, no final da maturação, apresentar dois tipos de comportamentos: nas sementes ortodoxas, haverá redução considerável do teor de água, e nas recalcitrantes, as sementes serão liberadas da planta mãe com elevado teor de água (BARBEDO; MARCOS-FILHO, 1998).

As sementes ortodoxas adquirem tolerância à dessecação durante seu desenvolvimento, o que viabiliza a secagem de maturação (semente ainda ligada à planta mãe), quando a semente chega a perder até 90% do seu conteúdo de água (ADAMS; RINNE, 1980). Após se liberar da planta mãe, a tolerância à dessecação é mantida, com as sementes permanecendo com teores de água muito baixos, possibilitando, ainda, mais perda de água. Ao entrar em contato com a água e a semente seca iniciar o processo de embebição, a tolerância à dessecação permanece inalterada por um tempo, permitindo que elas sejam secas novamente e possam voltar ao seu estágio original, sem danos irreversíveis. No entanto, se as sementes continuam a embeber, a tolerância à dessecação é, gradualmente, perdida, em um ritmo que varia entre as espécies, tempo de embebição e entre as diferentes partes da semente (FARIA et al., 2005).

Portanto, a tolerância à dessecação em sementes pode ser entendida como a capacidade de sobrevivência e manutenção da viabilidade depois de quase completa remoção de água. Para isso, é necessário que as sementes possuam habilidade de manter a integridade estrutural da membrana celular e das organelas para reparar danos quando a água estiver novamente disponível (VERTUCCI; FARRANT, 1995).

A aquisição e a manutenção da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas estão associadas a uma série de processos celulares, distribuídos em: características físicas da célula e componentes intracelulares; acumulação de reservas insolúveis; desdiferenciação intracelular; mudanças na estrutura física das células e um aumento constante e gradual na viscosidade do citoplasma das células; desligamento (*switching off*) metabólico; presença e operação de um sistema de reparo, durante a reidratação; acúmulo de substâncias protetoras, incluindo proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), HSPs (Heat-Shock Proteins) e de maturação estáveis no calor (Heat Stable Maturation Proteins), sacarose e certos oligossacarídeos (como moléculas anfipáticas); e expressão de genes reguladores da dessecação e ou ABA (ácido abscísico) (ANGELOVICI et al., 2010; LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993). A tolerância/sensibilidade à dessecação está fortemente relacionada a essas interações, sendo que sementes tolerantes à dessecação desenvolveram uma série de mecanismos capazes de proteger as células contra as consequências da perda de água a diferentes níveis de hidratação (PAMMENTER; BERJAK, 1999).

Em resumo, os principais processos associados com a tolerância à dessecação de sementes incluem o acúmulo de açúcares solúveis, a síntese de proteínas LEA e a eficiência do processamento de radicais livres (NTULI et al., 2011).

Durante a secagem, açúcares não redutores, em especial a sacarose e alguns oligossacarídeos (rafinose, estaquiase e trealose), podem atuar nas células, de forma a proteger suas estruturas contra danos estruturais. Vários autores têm associado a esses açúcares à tolerância à dessecação. Na desidratação, os açúcares não redutores formam ligações de hidrogênio com as cabeças fosfolipídicas da membrana, havendo, assim, a substituição da água associada com as superfícies das membranas. Assim, o espaçamento dos grupos lipídicos é mantido, evitando a transição da fase líquida cristalina para a fase gel

(KOSTER; LEOPOLD, 1988; PAMMENTER; BERJAK, 1999). A sacarose ajuda a manter a conformação original das membranas, evitando que suas estruturas se desorganizem e ocorra a lixiviação de exsudatos, acelerando o processo de deterioração das sementes.

Um segundo mecanismo em que os açúcares estão envolvidos é a formação de vidro intracelular em sementes durante a desidratação (BURKE, 1986). O vidro é um líquido extremamente viscoso capaz de parar reações químicas que requisitam a difusão molecular, agindo, assim, na conservação de estruturas celulares, durante a desidratação, impedindo processos de degradação, preenchendo espaços e evitando o colapso celular após a dessecação (BURKE, 1986; OOMS et al., 1993). Em face à perda de água, a sacarose e outros oligossacarídeos formam soluções saturadas de alta viscosidade, produzindo um efeito estabilizador sobre as atividades intracelulares, protegendo macromoléculas contra a desnaturação e, conseqüentemente, reduzindo o efeito deletério do metabolismo perturbado, além de impossibilitar a formação de cristais de gelo, que podem romper os tecidos, mesmo em temperaturas muito baixas (KOSTER, 1991; PAMMENTER; BERJAK, 1999).

A produção de um conjunto de proteínas capazes de responder ao choque térmico e tolerar às altas temperaturas, também é uma adaptação do organismo para resistir a condições de estresse possíveis no ambiente. Essas proteínas denominadas de proteínas de choque térmico (HSPs) são sintetizadas pelos eucariotos, incluindo as plantas (WANG et al., 2004; WATERS; LEE; VIERLING, 1996).

Existem seis classes de proteínas resistentes ao calor ou HSPs conhecidas em bactérias, leveduras, mamíferos e nos vegetais, designadas pelos pesos moleculares aproximados em Kilodalton (KDa). Em sementes ortodoxas, essas proteínas têm sido associadas com a tolerância à dessecação (FEDER; HOFMANN, 1999; VIERLING, 1991).

A acumulação das HSPs protege as células dos efeitos prejudiciais das altas temperaturas e conduz a um aumento da tolerância térmica, o que levou vários autores a associar a presença das HSPs à tolerância à dessecação. Acredita-se que essas proteínas atuam como chaperonas, cuja função é impedir a desnaturação proteica (WATERS; LEE; VIERLING, 1996).

As chaperonas são moléculas que atuam na montagem ou manutenção de estruturas moleculares, evitando a agregação irreversível ou interações erradas, facilitando a reativação da proteína após o estresse. Além disso, as moléculas de chaperona são componentes responsáveis pelo dobramento da proteína, montagem, translocação e degradação em vários processos celulares normais, funcionando, também, na estabilização de proteínas e das membranas em condições de estresse (VIERLING, 1991; WANG et al., 2004; WATERS; LEE; VIERLING, 1996).

Dentre as classes das proteínas resistentes ao calor, envolvidas na tolerância à dessecação de sementes, destacam-se as proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) e as deidrinas. A abundância das proteínas LEA está associada com a tolerância à dessecação, e como o próprio nome diz, elas são originadas nos estágios tardios do desenvolvimento do embrião (HAND et al., 2011).

Proteínas LEA estão localizadas no citoplasma e no núcleo das células. Suas principais funções estão distribuídas em substituir a água nas ligações de hidrogênio, revestindo macromoléculas intracelulares, e no sequestro de íons. Durante a desidratação, as proteínas LEA proporcionam uma camada de seus resíduos hidroxilados, possibilitando uma interação com grupos de superfícies de outras proteínas, proporcionando proteção e evitando a desnaturação dessas proteínas em condições de estresse (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001).

Outro mecanismo de proteção das sementes contra a perda de água é a possível interação dos açúcares com as proteínas, que impede a mudança de sua conformação e, conseqüentemente, de sua função (LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993). Essas proteínas estão associadas a diversas macromoléculas, e caracteriza-se, principalmente, pelas proteínas LEA, altamente hidrofílicas e solúveis em altas temperaturas. Estudos mostram a interação de açúcares com proteínas LEA na formação de um estado vítreo, conferindo grande vantagem às sementes na desidratação, já que ambas as moléculas exibem muitas e distintas funções importantes para a preservação e funcionalidade estrutural das células e organelas (BUITINK; LEPRINCE, 2008).

Ao longo da desidratação das sementes, observa-se um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres nas células (LEPRINCE et al., 1994). Cadeias de transferência ou transporte de elétrons no oxigênio podem gerar uma atividade ou resposta ao oxigênio. Com exceção da fase inicial de desenvolvimento, sementes ortodoxas são desprovidas de uma fonte importante de resposta ao oxigênio, o que leva à produção de superóxido. A redução do oxigênio conduz à formação do radical superóxido, que é uma molécula com um elétron desacoplado, podendo reagir com outras moléculas para estabilizar sua energia. O superóxido é altamente reativo e pode permanecer na forma de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou como radical hidroxila (OH) (BAILLY, 2007).

Segundo Bailly (2007), a produção de radicais livres pelas sementes pode variar muito, desde o desenvolvimento embrionário até o momento da germinação, já que o grau de umidade e a atividade metabólica variam drasticamente nos diferentes estágios, sendo a cadeia respiratória a mais envolvida nas reações ao oxigênio. Dessa forma, a quantidade de H_2O_2 produzida é diretamente proporcional à atividade respiratória. É provável que as mitocôndrias e os peroxissomos sejam as principais fontes de ação ao oxigênio

em sementes ortodoxas, sendo que é nos peroxissomos que se localiza a enzima catalase, que elimina o H_2O_2 . O acúmulo de radicais livres de oxigênio é altamente tóxico às células, podendo reagir com a maioria das biomoléculas, resultando em estresse oxidativo. Essa reação pode se tornar irreversível e causar danos graves às células, danificando o transporte de proteínas, os receptores e canais iônicos, levando a uma disfunção celular (BAILLY, 2007).

Alguns efeitos prejudiciais da dessecação estão associados à produção de espécies reativas, como resultado do metabolismo desbalanceado e diminuição do transporte de elétrons. O aumento das EROs conduzirá a processos deterioradores como peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao DNA, contribuindo para o envelhecimento e, conseqüentemente, à morte celular. É mais provável que no estado seco ocorra a produção de radicais livres, através de reações não enzimáticas e processos oxidativos. Dessa forma, essas moléculas altamente reativas são a fonte mais provável dos danos que ocorrem nos ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e membranas (KRANNER; BIRTIC, 2005; POTTS, 2001), sendo que o dano oxidativo pode ser tanto uma causa ou uma consequência da deterioração tecidual e/ou da morte (NTULI et al., 2011).

A presença de mecanismos eficientes no combate às espécies reativas de oxigênio (EROs) é indispensável para que sementes ainda sejam tolerantes à dessecação quando expostas à desidratação (MARCOS FILHO, 2005). Durante a dessecação de sementes, alguns danos gerados por radicais livres podem ser reduzidos pela existência de mecanismos protetores responsáveis em remover as EROs, tais como as enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), peroxidase (POX), glutathione redutase e a catalase (KRANNER; BIRTIC, 2005).

Algumas células toleram a dessecação, podendo, assim, proteger componentes vitais de sua maquinaria celular de danos e, conseqüentemente,

sendo possível repará-los rapidamente após a reidratação (POTTS, 2001). Sendo assim, a tolerância à dessecação de sementes é um processo complexo que envolve uma maquinaria celular intrincada, responsável em tornar possível a sobrevivência de sementes ortodoxas expostas a condições ambientais adversas, permitindo que paralisem seu metabolismo, diminuam a taxa respiratória e permanecem em estado quiescente, sem danos permanentes em sua estrutura e funcionalidade celular.

A espécie arbórea *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, utilizada no presente estudo, pertence à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae, e é conhecida, popularmente, por angico, angico-vermelho, angico-branco, angico-liso, angico cambuí, angico-escuro, angico-liso, entre outros (LORENZI, 2000).

Essa espécie pode atingir de 10 a 20 metros de altura, sendo uma árvore decídua, heliófita, pioneira, com ocorrência principalmente acima de 400 metros de altitude, nas Florestas Estacionais Semidecíduais, ocorrendo, naturalmente, desde o nordeste brasileiro ao sul do Brasil (CARVALHO, 2003). A árvore apresenta tronco mais ou menos tortuoso, as folhas são compostas e bipinadas, as flores são alvas, dispostas em capítulos e o fruto é um legume seco e deiscente, que se abre por meio de uma única fenda, liberando sementes brilhantes, achatadas e de coloração marrom (LORENZI, 2000). As sementes são ortodoxas e, segundo Nery (2008), isentas de dormência e com percentual germinativo elevado e rápido, o que as tornam apropriadas para o estudo da tolerância à dessecação.

O angico apresenta grande importância ecológica, uma vez que é dotado de rápido crescimento e tolerância a solos arenosos e rasos, o que tem permitido sua utilização no reflorestamento em áreas degradadas e recomposição de matas ciliares (CARVALHO, 1994).

Conduziu-se, este trabalho, com o objetivo de caracterizar a perda da tolerância à dessecação em diferentes pontos ao longo da germinação, bem como

conhecer alguns dos processos celulares envolvidos na manutenção e na perda dessa tolerância, tais como proteínas totais e proteínas resistentes ao calor, e a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e peroxidase em sementes de *Anadenanthera colubrina*.

Como resultado, foi estabelecido o padrão da perda da tolerância à dessecação, por uma curva, que mostrou a perda ao longo da embebição, sendo essa total com a protrusão radicular. Também foram realizados testes de restabelecimento da tolerância à dessecação, pela incubação das sementes em diferentes potenciais osmóticos, porém não foram obtidos resultados positivos. Posteriormente a esses testes, realizaram-se estudos referentes ao padrão eletroforético de proteínas totais e resistentes ao calor e a quantificação da atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e peroxidase ao longo da embebição.

Com esses estudos, foi possível concluir que as sementes de *Anadenanthera colubrina* perdem a tolerância à dessecação com o decorrer do processo germinativo, sendo total com a protrusão radicular. A manutenção e a perda da tolerância à dessecação ao longo da embebição podem estar relacionadas com as proteínas resistentes ao calor, as quais, com o avanço da embebição, apresentam menor abundância, e com as enzimas catalase, que diminuem sua atividade gradativamente, e superóxido dismutase, que apresenta comportamento similar ao da catalase, mas com a redução da atividade menos intensa.

REFERÊNCIAS

ADAMS, C. A.; RINNE, R. W. Moisture content as a controlling factor in seed development and germination. **International Review of Cytology**, New York, v. 68, p. 1-8, 1980.

ALPERT, P. No the limits and frontiers of desiccation-tolerant life. **Integrative and Comparative Biology**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 685-695, Nov. 2005.

ANGELOVICI, R. et al. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 211-218, 2010.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, n. 1, p. 93-107, 2007.

BARBEDO, C. J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 12, n. 2, p. 145-164, 1998.

BUITINK, J.; LEPRINCE, O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 331, n. 10, p. 788-795, 2008.

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

CARVALHO, P. E. R. **Angico-branco: *Anadenanthera colubrina* var. colubrina: espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2003. 97 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA Produção de Informação, 1994. 640 p.

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

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

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 61, p. 243-82, Mar. 1999.

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

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

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

KOSTER, K.L.; LEOPOLD, A.C. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 88, p. 828-832, 1988.

KRANNER, I.; BIRTIC, S.A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. **Integrative and Comparative Biology**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 734-40, 2005.

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

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. v. 1, 194 p.

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

NERY, F. C. **Germinação, cultivo in vitro e tolerância ao congelamento de sementes de angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina*)**. 2008. 217 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

NTULI, T. M. et al. Increased drying rate lowers the critical water content for survival in embryonic axes of English Oak (*Quercus robur* L.) seeds. **Journal of Integrative Plant Biology**, Pequim, v. 53, n. 4, p. 270-280, Apr. 2011.

OOMS, J.J.J. et al. Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 102, n. 4, p. 1185-1191, Aug. 1993.

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

POTTS, M. Desiccation tolerance: a simple process? **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.9, n.11, p. 553-559, 2001.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science & Technology**, Bassersdorf, v.1, n. 4, p. 499-514, 1973.

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

VIERLING, E. The roles of heat shock proteins in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 579-620, 1991.

WANG, W. et al. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.9, n.5, p. 244-252, 2004.

WATERS, E. R.; LEE, G. J.; VIERLING, E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 325-338, 1996.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

**ARTIGO 1 Caracterização fisiológica da perda da tolerância à dessecação
em sementes de *Anadenanthera colubrina***

ANDREZA DA SILVA MARTINS¹

**Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003), conforme
exige o Manual de Normalização da UFLA.**

¹ Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas. Email de contato:
andrezadsmartins@gmail.com

RESUMO

No estudo de sementes, a sensibilidade à dessecação sempre foi um obstáculo para a sua conservação e armazenamento, visto que diversas espécies vegetais produzem sementes com essa característica. Por isso, uma das alternativas para entender os processos envolvidos nessa abordagem é o uso de sementes ortodoxas em processo germinativo, já que, ao passarem por processos de reativação metabólica germinativa, as sementes passam de uma condição tolerante para sensível à dessecação. A espécie arbórea *Anadenanthera colubrina* foi escolhida para este trabalho, em função de sua produção anual abundante de sementes, cuja germinação apresenta taxa e velocidade altas, tornando-a interessante em estudos que visam à caracterização da perda da tolerância à dessecação ao longo da germinação e o restabelecimento da tolerância à dessecação após a germinação, com a protrusão da radícula. As sementes perderam gradativamente a tolerância à dessecação, ao longo da embebição, sendo essa perda total após a protrusão radicular. Tratamentos de restabelecimento da tolerância à dessecação foram testados, no entanto, sem sucesso. Foi possível concluir que as sementes de *Anadenanthera colubrina* não seguem o padrão trifásico da curva de embebição estabelecido para a maioria das sementes ortodoxas, ocorrendo a perda da tolerância à dessecação ao longo da embebição, a qual é totalmente perdida após a protrusão radicular.

Palavras-chave: Sensibilidade à dessecação. Curva de embebição. Restabelecimento da tolerância à dessecação. Sementes florestais.

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que a tolerância à dessecação é um fenômeno de manutenção da vida, mesmo em condições mínimas de água, e quando há a reidratação, as células reassumem seu metabolismo normal. Isso é possível, graças a mecanismos de proteção, de reparo que atuam nas células, durante a desidratação e reidratação.

Segundo Faria et al. (2005), estudos relacionados à tolerância/sensibilidade à dessecação têm utilizado sementes ortodoxas germinadas para tentar superar a dificuldade em manipular e, conseqüentemente, armazenar sementes recalcitrantes. Esses estudos envolvem o chamado restabelecimento da tolerância à dessecação. As sementes ortodoxas, quando em processo de germinação, perdem a tolerância à dessecação, passando a se comportar como as recalcitrantes (BUITINK et al., 2003, 2006; FARIA et al., 2005). O uso desse sistema baseia-se na pressuposição de que grande parte dos eventos metabólicos e moleculares envolvidos com a perda da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas em processo de germinação, assemelha-se àqueles que ocorrem em sementes recalcitrantes recém-colhidas (SUN, 1999).

O restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas germinadas pode ser conseguido a partir da aplicação de um estresse osmótico (FARIA et al., 2005). O potencial hídrico, o tempo e a temperatura de incubação para o restabelecimento da tolerância à dessecação variam de acordo com a espécie. Portanto, se ocorrer a retomada do crescimento normal das raízes primárias das sementes

germinadas submetidas ao tratamento, e houver a formação de plântulas normais, pode-se considerar a eficiência do tratamento de reindução.

Nos tratamentos de reindução da tolerância à dessecação, é possível que a redução do potencial hídrico atue diretamente nas membranas, que induzem uma cascata de sinalização no metabolismo das células. Sabe-se que as altas atividades metabólicas estão intimamente ligadas à sensibilidade à dessecação, e, por isso, a interrupção do crescimento radicular pode contribuir para diminuir a demanda por energia. Paralelamente à redução do metabolismo, açúcares não redutores, como a sacarose, e as deidrinas (que fazem parte de um grande grupo de proteínas hidrofílicas conhecidas como LEA - Late Embryogenesis Abundant), acumuladas durante a maturação, atuam durante a secagem, interagindo com membranas e outras macromoléculas, formando um estado vítreo estabilizador altamente viscoso (BUITINK et al., 2003).

Dessa forma, durante o restabelecimento da tolerância à dessecação, tratamentos com restrição hídrica são capazes de induzir mudanças nos fluxos, através de diferentes vias metabólicas, culminando na parada do crescimento radicular (BUITINK et al., 2003).

Por isso, objetivou-se, com esse trabalho, descrever o comportamento de sementes de *Anadenanthera colubrina* quanto à perda e restabelecimento da tolerância à dessecação durante o processo germinativo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Frutos maduros foram coletados em árvores no *Campus* da Universidade Federal de Lavras e colocados sobre uma lona para secagem e abertura natural. As sementes foram selecionadas e beneficiadas manualmente, retirando as mal formadas, atacadas por insetos e chochas. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Sementes Florestais, no Departamento de Ciências Florestais, na UFLA.

2.2 Determinação do grau de umidade

O grau de umidade das sementes foi determinado pelo método de estufa a 105°C, por 24 horas (BRASIL, 2009), com 4 repetições de 10 sementes cada. O cálculo foi feito na base úmida e o grau de umidade expresso em porcentagem.

2.3 Determinação do peso de mil sementes

O peso de mil sementes foi determinado, utilizando-se 8 repetições de 100 sementes, pesadas em balança com precisão de 0,001 g, de acordo com Brasil (2009) e a média dos dados expressa em gramas (g).

2.4 Germinação

O teste de germinação foi conduzido em rolo de papel, umedecido com água no volume de 2,5 vezes o peso do papel. Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes. Em seguida, os rolos foram mantidos em germinadores tipo BOD a 25 °C, com luz constante.

O critério de avaliação foi a formação de plântulas normais (sistema radicular desenvolvido e primeiro par de folhas visível, com, aproximadamente, oito dias). Adicionalmente, foram contadas as sementes que formaram plântulas anormais; as sementes que não germinaram e permaneceram firmes e as sementes mortas (amolecidas e/ou atacadas por microorganismos).

2.5 Curva de embebição

Para determinar o padrão de embebição de água pelas sementes, foram pesadas duas amostras com 40 repetições de uma semente cada, colocadas para embeber em rolos de papel acondicionados em germinadores a 25 °C sob luz constante.

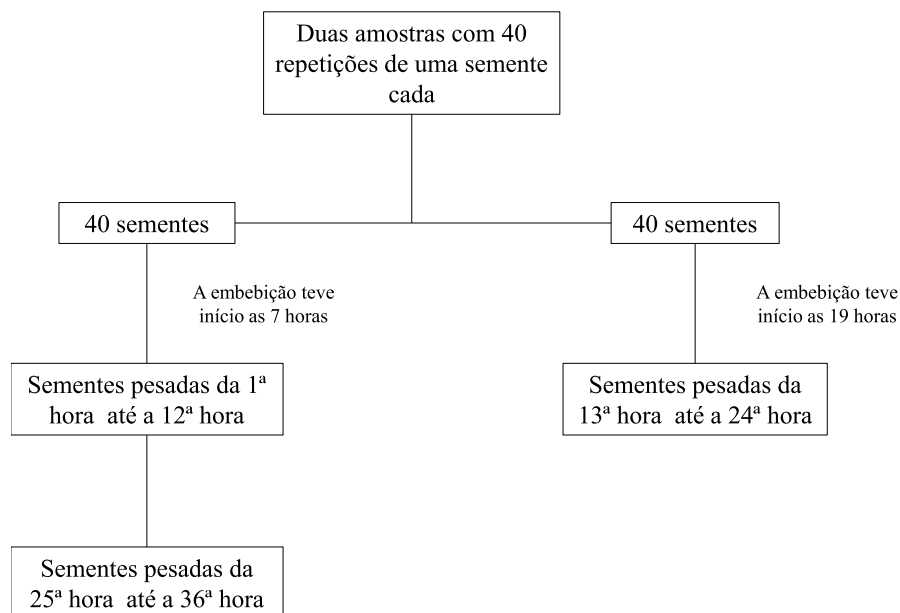


Figura 1 - Esquema da metodologia adotada para realização da curva de embebição em sementes de *Anadenanthera colubrina*

As sementes foram pesadas em balança com precisão de 0,001g, durante 36 horas, período este em que verifica-se a protrusão radicular para 50% das sementes em estudo. Para o estabelecimento da curva de embebição, foram utilizadas a média dos valores de ganho de massa fresca em relação ao tempo zero de embebição.

2.6 Caracterização da perda da tolerância à dessecação durante a germinação

Para a caracterização da perda da tolerância à dessecação durante a embebição e germinação, foram constituídas amostras de 20 sementes

para cada um dos seguintes tratamentos, definidos em função do padrão de absorção de água: 8h, 16h, 24h de embebição e sementes já germinadas, com raiz primária de 1mm de comprimento. A embebição das sementes foi conduzida nas mesmas condições dos testes de germinação.

Após cada tratamento, as amostras foram desidratadas em caixas de secagem, colocando-se as sementes de cada tratamento no interior de envelopes de papel germitest sobre um telado, tendo uma camada de sílica gel ao fundo (16% de umidade relativa do ar), à temperatura aproximada de 20°C até que as sementes atingiram o grau de umidade inicial. Durante a desidratação foram realizadas pesagens sucessivas até que o peso alvo fosse alcançado, correspondente ao grau de umidade alvo. Esse valor de umidade foi obtido pela Fórmula 1 (HONG; ELLIS, 1996).

$$\text{Peso alvo} = \frac{(100 - \text{Umidade inicial})}{(100 - \text{Umidade alvo})} \times \text{Peso inicial}$$

Fórmula 1: Equação utilizada para cálculo do peso alvo a ser atingido pelas sementes.

Após a desidratação, as sementes foram mantidas no estado seco por 72 horas e, então, pré-umedecidas em ar úmido (100 % UR) por 6 horas a 25 °C. Em seguida, as sementes foram colocadas de volta nas condições de germinação e aquelas que continuaram sua germinação e formaram plântulas normais foram consideradas tolerantes à dessecação

(TD), sendo esses dados plotados em um gráfico gerando uma curva de perda da tolerância à dessecação.

2.7 Restabelecimento da tolerância à dessecação

Tratamentos visando ao restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes de *Anadenanthera colubrina* foram aplicados em sementes com germinação visível, ou seja, radículas com aproximadamente 1mm de comprimento.

Foram utilizados diferentes tratamentos compostos pela incubação de sementes germinadas, ou seja, com raízes primárias de comprimento igual a 1 mm, em soluções de polietilenoglicol (PEG) em dois potenciais osmóticos, sem ou com ácido abscísico (ABA) em diferentes concentrações. A escolha desse ponto de 1 mm foi decorrente dos resultados obtidos na perda da tolerância à dessecação, que nesse caso, foi total.

As sementes embebidas foram colocadas em caixas tipo gerbox, contendo uma folha de papel de germinação umedecida com 35 mL de solução PEG 6000, por 72 horas, a 5^oC. Foram utilizados os potenciais osmóticos de -1,8 MPa e -2,24 MPa. Os tratamentos realizados foram:

PEG 0 (MPa) / ABA 0 (μ Mol); PEG 0 (MPa) / ABA 25 (μ Mol);
PEG -1,8 (MPa) / ABA 0 (μ Mol); PEG -1,8 (MPa)/ ABA 25 (μ Mol);
PEG -1,8 (MPa)/ ABA 50 (μ Mol); PEG -1,8 (MPa)/ ABA 100 (μ Mol);
PEG -2,24 (MPa)/ ABA 0 (μ Mol); PEG -2,24 (MPa)/ ABA 25 (μ Mol);
PEG -2,24 (MPa) / ABA 50 (μ Mol).

Após a incubação, as sementes foram lavadas em água corrente para a remoção dos resíduos de solução e secas, superficialmente, sobre papel toalha para eliminar o excesso de água. Parte das sementes foram utilizadas na determinação do teor de água e, o restante foi submetido à desidratação em sílica gel ativada (8% de umidade), em caixa de secagem do tipo “higrostat”, até que o teor de água original fosse alcançado. Durante a desidratação, foram realizadas pesagens sucessivas até que o peso da amostra coincidissem com o peso desejado, correspondente ao grau de umidade esperado, equivalente ao valor de 6,3% de umidade, e calculado por meio da expressão proposta por Hong e Ellis (1996).

Com o objetivo de verificar a sobrevivência das sementes logo após a desidratação, as amostras foram retiradas, pré-umidificadas em câmara úmida (100%UR), durante seis horas, a 25^oC, e reidratadas em rolos de papel a 25 °C sob luz branca constante. As sementes que retomaram o crescimento da radícula e originaram plântulas normais, com sistema radicular desenvolvido e primeiro par de folhas visível, indicaram a eficiência do tratamento de reindução. O experimento foi conduzido com quatro repetições de 20 sementes por tratamento.

2.8 Análise de dados

Os experimentos foram estabelecidos em delineamento inteiramente casualizado. Utilizando-se a média de massa fresca das sementes em cada ponto avaliado foi calculado o percentual médio de ganho de massa para cada ponto mensurado, sendo esses dados utilizados para o estabelecimento da curva de embebição. Ao longo da secagem, o

peso das sementes em cada um dos pontos mensurados foi utilizado para cálculo do percentual de umidade das sementes com base na Formula 1, o qual foi utilizado para o estabelecimento das curvas de secagem. Para a caracterização da tolerância à dessecação os dados percentuais foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização do lote e curva de embebição

Após a abertura natural dos frutos, as sementes de *Anadenanthera colubrina* apresentavam, em média, teor de água de 6,3%. As sementes foram beneficiadas e armazenadas em recipientes herméticos, em uma câmara fria, sendo desnecessária a secagem para o armazenamento, já que a umidade das sementes já estava adequada. De acordo com Roberts (1973), sementes do grupo das ortodoxas podem alcançar teor de umidade entre 5% e 10%. Dessa forma, a classificação do angico vermelho como ortodoxa está de acordo com Carvalho et al. (2006). O peso de mil sementes de *Anadenanthera colubrina* foi de 154 gramas, o que corresponde a 6000 sementes por quilograma. O padrão de hidratação do angico corresponde com o estabelecido por Bewley e Black (1994) para a maioria das sementes, apresentando, porém, a fase III pouco definida. Isso pode estar associado com o fato das sementes amostradas para realização da curva de embebição não terem sido pesadas até a completa germinação, ou seja, 100% do lote amostrado, exibindo germinação visível. Observou-se a rápida absorção de água e protrusão radicular, sendo o início da fase III atingida por volta das 25 horas de embebição (Figura 2), quando as primeiras sementes concluíram o processo germinativo. Essa rápida absorção de água pelas sementes indica a ausência de dormência física.

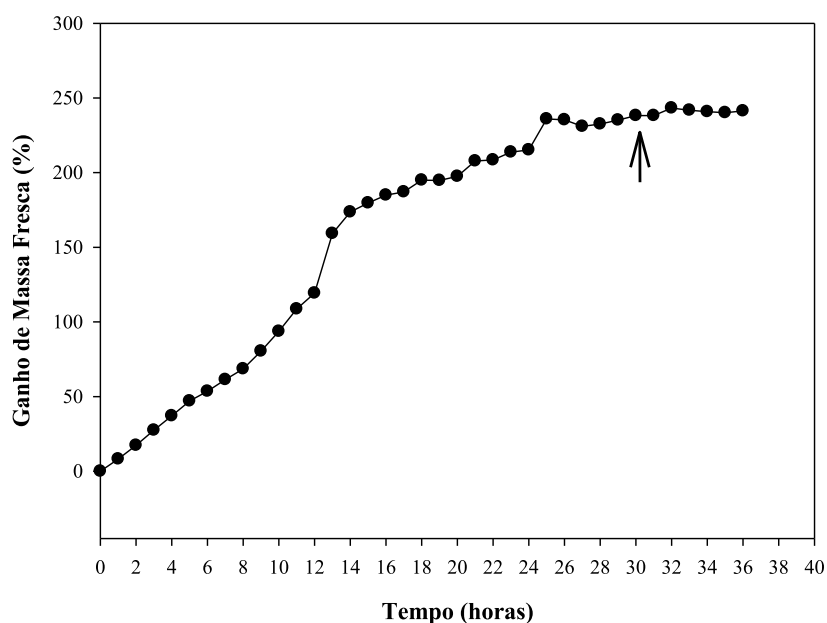


Figura 2 - Padrão de hidratação de sementes de *Anadenanthera colubrina* expressos em percentual de ganho de massa em relação ao peso inicial (tempo 0)

Nota: Seta indica momento em que 50% das sementes apresentaram protrusão radicular.

Segundo Marcos Filho (2005), na Fase I, as sementes absorvem água do substrato rapidamente, já que há uma diferença acentuada dos potenciais hídricos entre eles. Em sementes de *Anadenanthera colubrina*, essa fase de rápida embebição pode ser observada até aproximadamente 15 horas de embebição.

Ainda, segundo Marcos Filho (2005), algumas espécies podem ou não exibir a Fase II, em que há uma redução drástica da velocidade de hidratação. Para a espécie em estudo, essa fase é exposta na curva de embebição entre 15 e 24 horas, aproximadamente. A fase III ,

provavelmente, inicia por volta de 24 horas de embebição, já que se pode observar que algumas sementes já concluem o processo germinativo, marcando a transição da Fase II para a Fase III, em que há a retomada do crescimento do embrião e, portanto, a protrusão radicular.

As sementes de *Anadenanthera colubrina* apresentam rápida germinação, com a protrusão radicular, ocorrendo por volta das 25 horas após o início da embebição e as plântulas normais se formando em torno de 8 dias, o que, segundo Parsons (2012), normalmente é decorrente do tegumento fino e permeável, que possibilita a entrada de água nas células. Essa rápida embebição pode também ser um tipo de estratégia adaptativa desenvolvida pelas sementes para aproveitar as condições climáticas favoráveis à germinação.

Após a caracterização da curva de embebição, os pontos de interesse escolhidos para avaliação da perda da tolerância à dessecação foram: 8, 16, 24 horas de embebição e sementes germinadas com raiz primária de 1 mm, próximo de 30 horas.

3.2 Curvas de secagem, perda da tolerância à dessecação e restabelecimento da tolerância à dessecação

As sementes de angico vermelho foram hidratadas por diferentes tempos e submetidas à secagem em sílica gel até retornarem ao grau de umidade próximo do inicial (6,3%).

Sementes com raiz primária de 1 mm se comportaram diferente dos demais tempos de embebição, apresentando uma secagem mais lenta, que foi equivalente a 70 horas (Figura 3). Essa perda de água menos

acentuada por sementes germinadas pode ser um indicativo de estratégias fisiológicas da plântula, para dificultar a dessecação e minimizar os danos que essa pode causar.

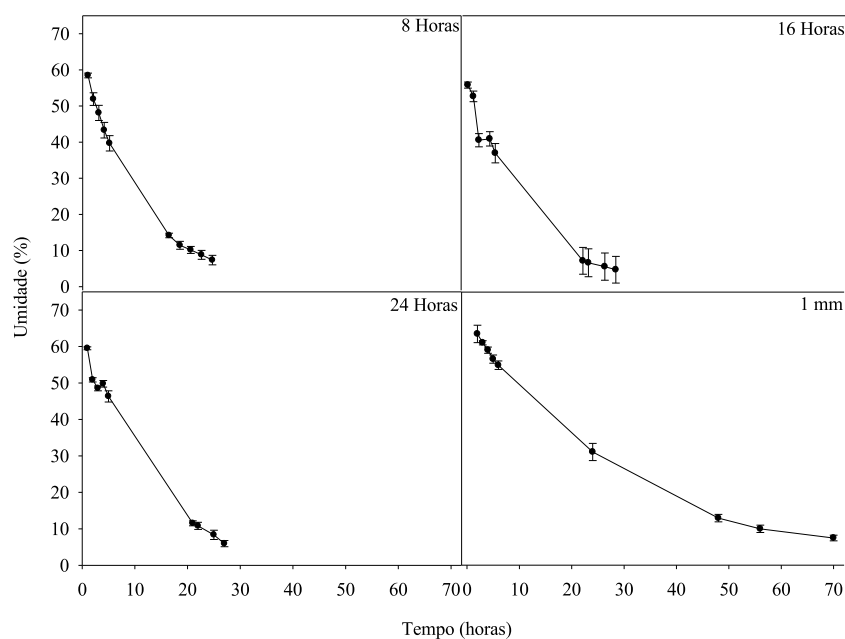


Figura 3 - Curvas de secagem de sementes de *Anadenanthera colubrina* em diferentes pontos da embebição e germinação

Após a secagem, as sementes foram mantidas por 72 horas, no mesmo ambiente, com sílica gel ativada. Esse período de três dias foi estabelecido porque para uma semente ser considerada tolerante à dessecação, além de tolerar a secagem, ela também deve tolerar a permanência no estado seco por algum tempo.

Na figura 4, são apresentados os dados de sobrevivência de sementes de *Anadenanthera colubrina* embebidas por 8, 16, 24 horas e aquelas já germinadas, com raiz primária de 1mm de comprimento,

seguida pela desidratação até próximo ao grau de umidade inicial, pré-umidificação por seis horas e reidratação. À medida que a semente embebe, a tolerância à dessecação é gradualmente perdida, levando a um decréscimo na porcentagem de plântulas normais havendo, portanto, uma correlação negativa com os tempos de embebição ($p < 0,0001$; CV = 10,19).

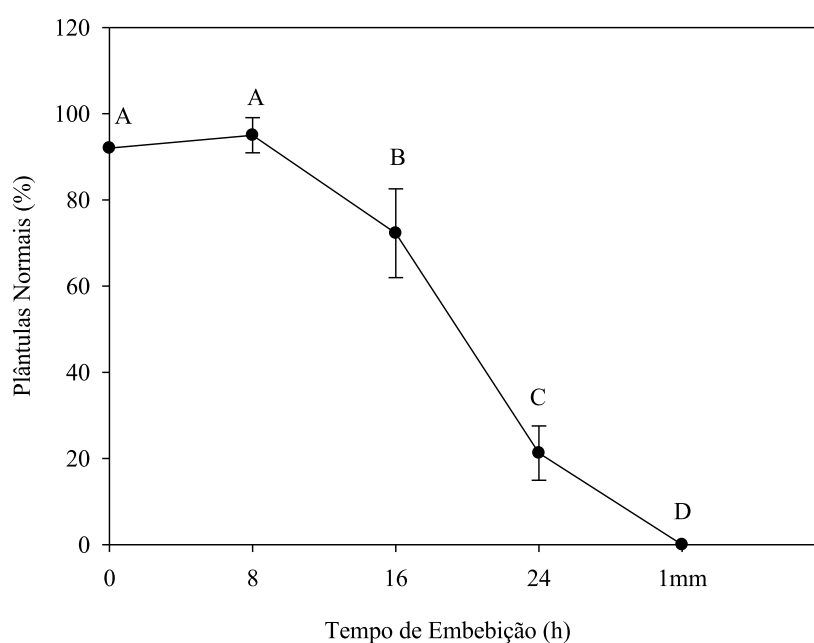


Figura 4 - Perda da tolerância à dessecação em sementes de *Anadenanthera colubrina* expressas pelo percentual de formação de plântulas normais, após embebição e germinação (protrusão da radícula com comprimento de 1mm)

Nota: Letras iguais indicam ausência de diferença entre os pontos de amostragem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras indicam o desvio padrão.

Considerando-se a curva de embebição clássica para sementes ortodoxas (BEWLEY et al., 2013), tem-se estabelecido como regra para essas sementes que a perda total da tolerância à dessecação ocorre na transição da fase II para a fase III, ou seja, um pouco antes da protrusão radicular, sendo que, em geral, a perda total ocorre após esse evento, ou seja, na fase III da curva (FARIA et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2011; LIN; YEN; CHIEN, 1998; MASETTO et al., 2008). Para *Anadenanthera colubrina*, foi observado padrão similar, visto que a redução mais expressiva na tolerância à dessecação foi observada com 24 horas de embebição, período esse que é próximo à protrusão radicular.

Nos estágios iniciais da germinação, em que as sementes foram embebidas por oito horas, a secagem aos níveis iniciais de umidade (aproximadamente 6%) não provocou danos às sementes, com índices de formação de plântulas normais iguais a 95%. O aumento significativo da mortalidade das sementes ocorreu quando essas foram embebidas por 16 e 24 horas, quando a formação de plântulas normais foram equivalentes a 71% e 21%, respectivamente. Já, em sementes com raízes primárias de 1mm de comprimento, observou-se a completa perda da tolerância à dessecação. Dessa forma, considerando o metabolismo germinativo, subentende-se que o grau da tolerância à dessecação de sementes de angico vermelho diminuiu com o decorrer da embebição.

Vários autores apresentaram resultados semelhantes referentes ao aumento da sensibilidade à dessecação durante a hidratação de sementes ortodoxas. Em estudo realizado com *Peltophorum dubium*, Guimarães et al. (2011) observaram o mesmo padrão de perda da tolerância à dessecação em função da hidratação. Os pontos de embebição estudados

foram 12, 24, 48, 72 horas e raízes primárias com 1mm, 3mm e 5mm, nas quais a sensibilidade a secagem aumentou à medida que as sementes foram embebidas, com a total perda da tolerância acontecendo com a protrusão radicular. Já Masetto (2008), trabalhando com *Sesbania virgata*, observou que suas plântulas ainda são tolerantes à dessecação em comprimentos radiculares iguais a 1 mm, enquanto que a partir de 2 mm as sementes não toleram mais a secagem.

Ainda há muito que se estudar para esclarecer as razões da conversão de uma semente antes tolerante à dessecação para uma condição de sensível à dessecação. No entanto, sabe-se que essa perda da tolerância à dessecação coincide com o nível de atividade celular embrionária, principalmente as da extremidade radicular (BUIKINK et al., 2003). Ao estudarem o decréscimo da tolerância à dessecação e a eventual perda da mesma em sementes germinadas de *Pisum sativum*, Reisdorph e Koster (1999) observaram maior sensibilidade na região da raiz primária, mostrando ser esta a primeira região da semente a sofrer danos pela secagem.

A partir dos dados obtidos com a perda da tolerância à dessecação das sementes de *Anadenanthera colubrina*, tentou-se restabelecer a tolerância à desidratação perdida em função da germinação. Na Tabela 1, indicam-se os valores percentuais de umidade das sementes, após o tratamento de restabelecimento da tolerância à dessecação.

Tabela 1- Valores de umidade em sementes germinadas de *Anadenanthera colubrina* antes e após os tratamentos de reindução da tolerância à dessecação

Tratamento	Umidade (%)
Inicial*	67,3
PEG 0 (MPa) / ABA 0 (μ Mol)	77,2
PEG 0 (MPa) / ABA 25 (μ Mol)	76,6
PEG -1,8 (MPa) / ABA 0 (μ Mol)	69,7
PEG -1,8 (MPa) / ABA 25 (μ Mol)	69,8
PEG -1,8 (MPa) / ABA 50 (μ Mol)	77,0
PEG -1,8 (MPa) / ABA 100 (μ Mol)	77,2
PEG -2,24 (MPa) / ABA 0 (μ Mol)	73,0
PEG -2,24 (MPa) / ABA 25 (μ Mol)	70,7
PEG -2,24 (MPa) / ABA 50 (μ Mol)	68,0

*Valor de umidade das sementes antes de serem submetidas ao tratamento de reindução da tolerância à dessecação

Os tratamentos aplicados não foram eficazes em restabelecer a tolerância à dessecação nas sementes germinadas, já que em todos os procedimentos a sobrevivência foi nula. Pode-se observar, através dos dados de umidade (Tabela 1), que em todos os tratamentos houve um aumento da umidade, o que explica a ineficiência desses tratamentos no restabelecimento da tolerância à dessecação, mostrando que as condições escolhidas não foram suficientes para impor às sementes uma secagem moderada, que poderia levar à expressão de genes de tolerância à dessecação, desativados durante a embebição.

Esse resultado não implica em que a tolerância à dessecação não possa ser restabelecida nas sementes da espécie em estudo. Como os tratamentos visando à reindução envolvem vários fatores (tempo de

incubação, potencial hídrico da solução, concentração de ABA e temperatura de incubação), ao combinar diferentes níveis desses fatores, uma condição pode ser adequada para se obter sucesso na reindução e as sementes retornarem seu desenvolvimento e formarem plântulas normais.

Vários autores obtiveram sucesso no restabelecimento da tolerância à dessecação em diferentes espécies (BUITINK et al., 2003; FARIA et al., 2005; MASETTO, 2008), o que mostra a necessidade da realização de mais pesquisas sobre o tema. Bruggink e Toorn (1995) foram os primeiros a demonstrar a subsequente sobrevivência da ponta da radícula ou hipocótilo quando as sementes germinadas de *Cucumis sativus* e *Impatiens walleriana* foram secas depois de incubação em solução de polietilenoglicol (PEG).

Segundo Buitink et al. (2003), as combinações de temperaturas mais baixas e potenciais hídricos menores levam a uma maior porcentagem de sobrevivência radicular após a dessecação. Nesse mesmo estudo, Buitink et al. (2003) tentaram entender a relação do ABA com o restabelecimento da tolerância à dessecação. Segundo os autores, o ABA é sintetizado em decorrência de um estresse osmótico em tecidos vegetativos, o que pode gerar um paralelo entre o ABA e as vias de sinalização que são induzidas pelo choque osmótico, usado no restabelecimento. Dessa forma, a sugestão é que os dois atuam como estímulos independentes necessários para induzir a tolerância à dessecação.

4 CONCLUSÕES

Em sementes de *Anadenanthera colubrina* a perda da tolerância à dessecação é gradativa, ao longo da germinação, sendo que, com a protrusão radicular essa perda é total.

Os tratamentos usados nas sementes germinadas com 1 mm de raiz primária não foram eficientes para restabelecer a tolerância à dessecação em sementes de angico vermelho.

ABSTRACT

In the study on seeds, sensitivity to desiccation has always been an obstacle to its conservation and storage as various plant species produce seeds with this trait. Therefore, an alternative to understand the processes involved in this approach is the use of germinating orthodox seeds as they lose desiccation tolerance with the activation of the germination metabolic processes. The tree species *Anadenanthera colubrina* produces high amount of seeds annually, which presents high rate and speed of germination, making it interesting in studies aimed at characterizing the loss of desiccation tolerance during germination and the reestablishment of desiccation tolerance. The seeds did not show the standard triphasic imbibition curve established for most orthodox seeds and seeds gradually lost desiccation tolerance during imbibition. At radicle protrusion, desiccation tolerance was totally lost. Treatments aiming the reestablishment of desiccation tolerance were tested, but without success

Keywords: Desiccation sensitivity. Imbibition curve. Reestablishment of desiccation tolerance. Forest seeds.

REFERÊNCIAS

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1994. 392 p.

BEWLEY, J. D. et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. New York: Springer, 2013. 392 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009.365 p.

BRUGGINK, T.; TOORN, P. van der. Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 5, n. 1, p. 1-4, 1995.

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

BUITINK, J. et al. Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. **Plant Journal**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 735-750, Sept. 2006.

CARVALHO, L. R. et al. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 15-25, 2006.

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

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

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 62 p. (IPGRI Technical Bulletin, 1).

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, 1998.

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

MASETTO, T. E. **Restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Sesbania virgata* e *Cedrela fissilis***. 2008. 92 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

MASETTO, T. E. et al. Desiccation tolerance and DNA integrity in *Eugenia pleurantha* O. Berg. (Myrtaceae) seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 51-56, 2008.

PARSONS, R. F. Incidence and ecology of very fast germination. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 22, n. 3, p. 161-167, 2012.

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

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science & Technology**, Bassersdorf, v.1, n. 4, p. 499-514, 1973.

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

ARTIGO 2 Proteínas totais, proteínas resistentes ao calor e atividade enzimática em sementes de *Anadenanthera colubrina* em processo germinativo

ANDREZA DA SILVA MARTINS²

Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003), conforme exige o Manual de Normalização da UFLA.

² Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas. Email de contato: andrezadsmartins@gmail.com

RESUMO

Sementes ortodoxas e recalcitrantes se diferenciam no que se refere à tolerância à dessecação. A dificuldade em se trabalhar com sementes recalcitrantes tem refletido em poucos estudos com essa categoria de sementes. Dessa forma, o estudo com espécies ortodoxas em processo germinativo tem permitido avanços na compreensão de processos presentes ou ausentes em sementes recalcitrantes, ligados à tolerância à dessecação. Neste trabalho, objetivou-se analisar proteínas e enzimas dos sistemas antioxidantes, durante o processo germinativo de sementes de *Anadenanthera colubrina*. Proteínas totais e resistentes ao calor foram avaliadas quanto à abundância por eletroforese em gel de acrilamida em eixos embrionários submetidos a diferentes períodos de embebição, ou seja, 0 (controle), 8, 16, 24 horas de embebição e em sementes com germinação visível (1mm). Esses mesmos pontos de embebição foram usados para a quantificação da atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e peroxidase. Houve correlação de algumas proteínas resistentes ao calor com a manutenção e perda da tolerância à dessecação ao longo do processo germinativo. Além disso, o padrão decrescente encontrado na atividade enzimática da catalase e superóxido dismutase, ao longo da embebição, sugere que essas enzimas estejam relacionadas com a perda da tolerância à dessecação observada ao longo da germinação de sementes de *Anadenanthera colubrina*.

Palavras-chave: Tolerância à dessecação. Perfil proteico. Sistema antioxidante. Sementes florestais.

1 INTRODUÇÃO

Durante o período de formação e maturação de sementes, a água assume papel crucial e seu teor permanece elevado em sementes recalcitrantes ou diminui, consideravelmente, durante o desenvolvimento em sementes ortodoxas, o que corresponde à fase de dessecação das sementes ainda ligadas à planta mãe. Independente da quantidade em que se encontra, a água é importante nos organismos tanto como solvente para reações bioquímicas como um estabilizador de estruturas. As interações hidrofílicas e hidrofóbicas conferem a estrutura de macromoléculas e organelas celulares (KOSTER; LEOPOLD, 1988).

A tolerância à dessecação está fortemente relacionada a essas interações, sendo que sementes tolerantes à dessecação desenvolveram uma série de mecanismos capazes de proteger as células contra as consequências da perda de água a diferentes níveis de hidratação (PAMMENTER; BERJAK, 1999). As membranas celulares são consideradas como locais primários de danos de dessecação, dependendo de inúmeros processos e interações para manter sua conformação.

Em síntese, os mecanismos envolvidos na tolerância a dessecação podem ser divididos em três grupos: 1) mecanismos de sinalização e regulação gênica 2) de ajuste metabólico e sistemas antioxidantes e 3) macromoleculares e estabilidade mecânica (MUNDREE; FARRANT, 2000).

Durante o processo de desidratação, mecanismos que ocorrem naturalmente em níveis de hidratação, principalmente aqueles de proteção oferecidos pela água, não são mais possíveis, ficando a semente exposta a

efeitos prejudiciais à sua estrutura. À medida que mais água é eliminada das células, mais mecanismos protetores desaparecem e mais danos ocorrem. Mecanismos de tolerância à dessecação contribuem nos processos de proteção e reparo durante a desidratação e reidratação, reduzindo os danos (PAMMENTER; BERJACK, 1999).

Em defesa contra esses danos, as sementes desenvolveram alternativas capazes de proteger estruturas essenciais da desidratação e dos efeitos deletérios ao seu metabolismo. Proteínas resistentes ao calor ou HSPs (*Heat Shock Proteins* – Proteínas de Choque Térmico) respondem às altas temperaturas, sendo essa uma adaptação dos organismos para resistir a um possível estresse ambiental (WANG et al., 2004). Um grupo de proteínas resistentes ao calor importante é o das LEAs (*Late Embryogenesis Abundant*), que agem na substituição da água quando esta é perdida ao longo da desidratação, realizando as ligações de hidrogênio com outras macromoléculas celulares (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001).

Outro mecanismo de adaptação das células das sementes à desidratação é a redução de danos originados por radicais livres, pela remoção de espécies reativas ao oxigênio (EROs), que podem ser combatidos por enzimas, tais como: a superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, peroxidase, glutathione redutase e a catalase (KRANNER; BIRTIC, 2005).

Estudos a respeito da tolerância à dessecação em sementes sugerem a prevenção de consequências fisiológicas, bioquímicas e anatômicas esperadas em tecidos vivos quando submetidas a algum estresse. Essa prevenção permite que a tolerância à dessecação seja

certificada, prevenindo estresse mecânico associado à redução do volume celular, estresse oxidativo provocado pela produção de radicais livres oriundos de um metabolismo desregulado e da ruptura de membranas, além da integridade macromolecular, resultado da perda de água associada às estruturas celulares (MUNDREE; FARRANT, 2000).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de analisar possíveis relações entre alguns mecanismos envolvidos na tolerância à dessecação e o processo germinativo de sementes de *Anadenanthera colubrina*, bem como a abundância de proteínas totais e resistentes ao calor e a atividade enzimática da catalase, superóxido dismutase e peroxidase.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Frutos maduros foram coletados em árvores no *Campus* da Universidade Federal de Lavras e colocados sobre uma lona para secagem e abertura natural. As sementes foram selecionadas e beneficiadas, manualmente, retirando as mal formadas, atacadas por insetos e chochas. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Sementes Florestais, no Departamento de Ciências Florestais, na UFLA.

2.2 Determinação do grau de umidade

O grau de umidade das sementes foi determinado pelo método de estufa a 105°C, por 24 horas (BRASIL, 2009), com 4 repetições de 10 sementes cada. O cálculo foi feito na base úmida e o grau de umidade expresso em porcentagem.

2.3 Determinação do peso de mil sementes

O peso de mil sementes foi determinado, utilizando-se 8 repetições de 100 sementes, pesadas em balança analítica com precisão de 0,001 g, de acordo com Brasil (2009) e a média dos dados expressa em gramas (g).

2.4 Germinação

O teste de germinação foi conduzido em rolo de papel, umedecido com água no volume de 2,5 vezes o peso do papel. Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes. Em seguida, os rolos foram mantidos em germinadores tipo BOD a 25 °C, com luz constante.

O critério de avaliação foi a formação de plântulas normais (sistema radicular desenvolvido e primeiro par de folhas visível, com, aproximadamente, oito dias). Adicionalmente, foram contadas as sementes que formaram plântulas anormais; as sementes que não germinaram e permaneceram firmes e as sementes mortas (amolecidas e/ou atacadas por microrganismos).

2.5 Curva de embebição

Para determinar o padrão de embebição de água pelas sementes, foram pesadas duas amostras com 40 repetições de uma semente cada, colocadas para embeber em rolos de papel que foram acondicionados em germinadores a 25 °C sob luz constante.

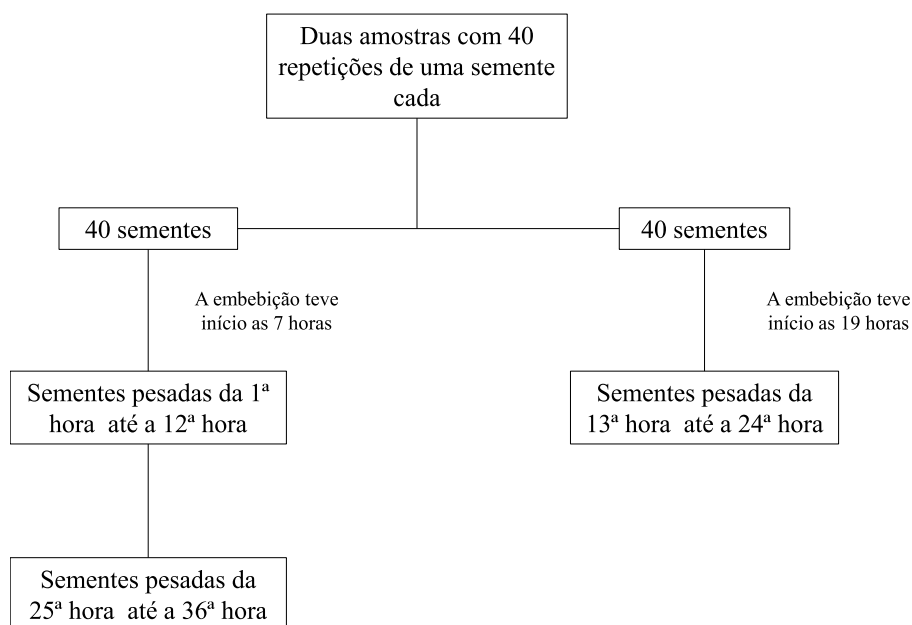


Figura 1 - Esquema da metodologia adotada para realização da curva de embebição em sementes de *Anadenanthera colubrina*

As sementes foram pesadas em balança com precisão de 0,001g, durante 36 horas, período este em que verifica-se a protrusão radicular para 50% das sementes em estudo. Para o estabelecimento da curva de embebição, foi utilizada a média dos valores de ganho de massa fresca em relação ao tempo zero de embebição.

2.6 Caracterização da perda da tolerância à dessecação durante a germinação

Para a caracterização da perda da tolerância à dessecação durante a embebição e germinação, foram constituídas amostras de 20 sementes para cada um dos seguintes tratamentos, definidos em função do padrão de absorção de água: 8h, 16h, 24h de embebição e sementes já germinadas, com raiz primária de 1mm de comprimento. A embebição das sementes foi conduzida nas mesmas condições dos testes de germinação.

Após cada tratamento, as amostras foram desidratadas em caixas de secagem, colocando-se as sementes de cada tratamento no interior de envelopes de papel germitest sobre um telado, tendo uma camada de sílica gel ao fundo (16% de umidade relativa do ar), à temperatura aproximada de 20°C até que as sementes atingiram o grau de umidade inicial. Durante a desidratação, foram realizadas pesagens sucessivas até que o peso alvo fosse alcançado, correspondente ao grau de umidade alvo. Esse valor de umidade foi obtido pela Fórmula 1 (HONG; ELLIS, 1996).

$$Peso\ alvo = \frac{(100 - Umidade\ inicial)}{(100 - Umidade\ alvo)} \times Peso\ inicial$$

Fórmula 1: Equação utilizada para cálculo do peso alvo a ser atingido pelas sementes.

Após a desidratação, as sementes foram mantidas no estado seco por 72 horas e, então, pré-umedecidas em ar úmido (100 % UR) por 6 horas a 25 °C. Em seguida, as sementes foram colocadas de volta nas condições de germinação e aquelas que continuaram sua germinação e formaram plântulas normais foram consideradas tolerantes à dessecação (TD), sendo esses dados plotados em um gráfico, gerando uma curva de perda da tolerância à dessecação.

2.7 Padrões eletroforéticos de proteínas totais e resistentes ao calor ao longo da germinação

Para a determinação do padrão eletroforético de proteínas totais e resistentes ao calor, foram amostrados os seguintes pontos: eixos embrionários de semente seca (0 hora de embebição), 8, 16, 24 horas de embebição e raiz primária com 1mm de comprimento. Esses pontos foram escolhidos com base nos pontos estabelecidos na perda da tolerância à dessecação. As extrações foram realizadas em duas repetições de 25 eixos embrionários por tratamento.

Para avaliar as concentrações de proteínas totais e resistentes ao calor, foram usados 100mg de material pulverizado ao qual foi adicionado 1 mL do tampão de extração (500mM de Tris HCl pH 7,5, 5mM de NaCl, 5mM de MgCl₂ 0,001M de inibidor de protease e 1μL de β-mercaptoetanol). As amostras foram misturadas em vórtex e centrifugadas a 13200 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado em duas alíquotas, uma para análise de proteínas totais e uma para análise de proteínas resistentes ao calor, sendo esta aquecida a 85°C por 15 minutos.

Após isso, as duas alíquotas (total e resistente ao calor) foram centrifugadas a 13200 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e quantificado de acordo com o método de Bradford (1976).

As amostras foram aplicadas em gel descontínuo de acrilamida [gel concentrador (acrilamida a 6%) e separador (acrilamida 12%)], aplicando em uma das canaletas 10 µL de padrão de proteína, e corrido em cuba vertical, contendo tampão SDS, regulada a 160 V por ,aproximadamente, 6 horas. Após a corrida, o gel foi transferido para um recipiente, contendo solução de fixação (40% metanol, 7% ácido acético) por 30 minutos. Depois desse período, o gel foi colocado em solução de coloração [0,08% (p/v) de Comassie Blue G-250, 1,6% (v/v) de ácido ortofosfórico e 12% (p/v) de sulfato de amônio] e mantido em agitador por até 48 horas. Posteriormente, o gel foi lavado em solução de descoloração [0,26% (p/v) de trizma base com pH ajustado a 6,5 e 40 % (v/v) de solução de metanol] e imerso em água por 24 horas.

2.8 Ensaio enzimáticos

Para a extração da catalase, superóxido dismutase e peroxidase foram utilizados 1,0 mL do tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, 15µL de EDTA 100mM, 15µL de ácido ascórbico 100mM, 6µL de DTT 500 mM e 12 µL PMSF 100 mM que foram adicionados a 0,05 g de sementes trituradas em moinho. Em seguida, os extratos foram centrifugados a 14.000 rpm, durante 30 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados para determinação das atividades enzimáticas e

quantificação das proteínas. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em placas de ELISA e os dados de determinação das atividades enzimáticas apresentados foram valores médios de ensaios em triplicata.

Atividade da catalase: a atividade da enzima foi determinada pelo ensaio contendo 10 μL do extrato enzimático bruto e 190 μL de um meio de reação constituído de: 100 μL de tampão fosfato 200 mM pH 7,0; 80 μL de água e 10 μL de H_2O_2 250 mM.

Atividade da superóxido dismutase: a atividade da enzima foi determinada pelo ensaio contendo 20 μL do extrato enzimático bruto e 180 μL de um meio de reação constituído de: 100 μL de tampão de fosfato 100 mM, pH 7,8, 40 μL de metionina 70 mM, 2 μL EDTA 10 μM , 31 μL de água, 15 μL de azul de p-nitro tetrazólio NBT 1 mM, 2 μL riboflavina 0,2 mM. A reação foi conduzida a 20°C em câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. Após sete minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi medida a 560 nm (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977).

Atividade da peroxidase: a atividade da enzima foi determinada pelo ensaio contendo 10 μL do extrato enzimático bruto e 190 μL de um meio de reação constituído de: 120 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, 40 μL do guaiacol 50 mM e 40 μL do H_2O_2 125 mM.

2.9 Análise dos dados

Os dados da atividade enzimática foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro Wilk. Uma vez que constatada a normalidade, os

dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando constatada diferença entre os tratamentos (ou pontos amostrais) pelo teste F, foi realizado teste de Tukey à 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Proteínas totais e resistentes ao calor

O perfil eletroforético das proteínas totais e resistentes ao calor de eixos embrionários de sementes de *Anadenanthera colubrina* ao longo da germinação está apresentado na Figura 2.

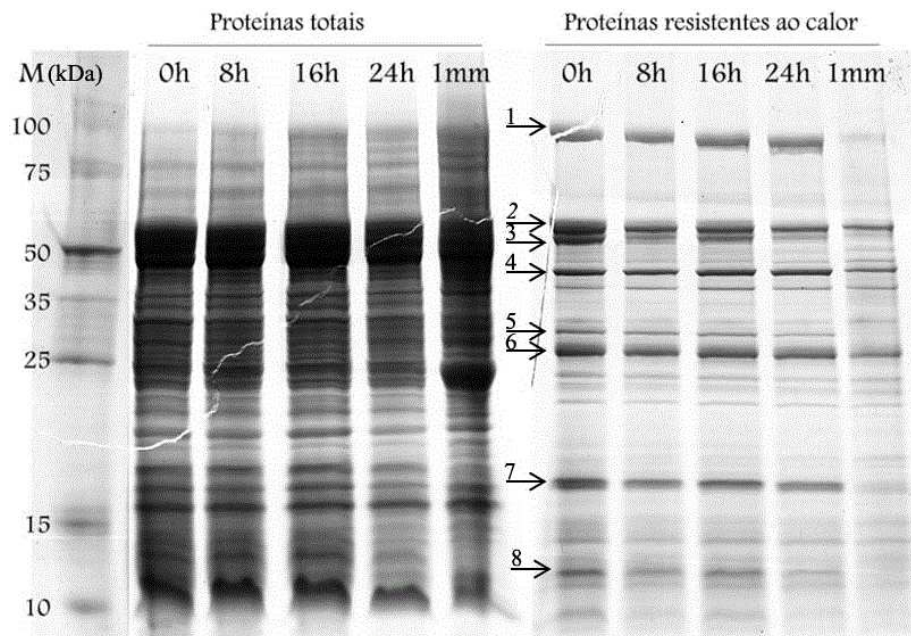


Figura 2 - Padrão eletroforético das proteínas totais e resistentes ao calor de radículas de sementes de *Anadenanthera colubrina* em diferentes tempos de embebição

Nota: (M) Marcador; (0 h) Sementes secas. (8-24 h) Sementes embebidas por 8, 16 e 24 horas; (1 mm) Sementes germinadas com radículas de 1 mm. Setas indicam proteínas que diminuíram sua abundância ao longo da germinação.

Em relação às proteínas totais, foi possível observar a abundância de muitas proteínas, as quais não variaram significativamente no decorrer do processo germinativo, exceto após a protrusão radicular, onde houve aumento de proteínas. Pode-se observar que a abundância de proteínas resistentes ao calor é menor quando comparada com as proteínas totais. Já, outras proteínas resistentes ao calor, diminuem sua abundância com o decorrer da embebição, estando presentes ao longo da germinação, com a redução da intensidade ou desaparecimento de algumas das bandas, sendo mais evidente em sementes germinadas (1 mm de radícula).

No gel de proteínas resistentes ao calor, eixos embrionários de sementes secas, que não iniciaram o processo germinativo, apresentaram bandas mais intensas, mostrando ser, como esperado, as mais tolerantes à secagem. Com o decorrer da embebição, algumas proteínas diminuem a abundância ao longo de cada tratamento, culminando com o desaparecimento ou abundância muito baixa em sementes germinadas. Acredita-se, então, que há relação dessas bandas com características de tolerância à dessecação.

Observando o gel de proteínas resistentes ao calor, oito frações de diferentes pesos moleculares se destacam, aproximadamente em 100, 50, 35, 25, 15 e entre 15 e 10 kDa.

Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Albuquerque et al. (2009) em estudos fisiológicos e bioquímicos, ao longo da embebição de sementes de *Bowdichia virgilioides* (sucupira preta). Os autores observaram a presença de proteínas resistentes ao calor, durante todo o processo germinativo, com redução na expressão, à medida que se aproximava a protrusão radicular.

Em estudo de tolerância à dessecação, durante o processo germinativo de sementes de *Anadenanthera colubrina*, Castro (2013) encontrou o mesmo padrão de proteínas resistentes ao calor ao observado no presente estudo, relatando uma maior expressão daquelas proteínas de peso molecular entre 100 kDa e 30 kDa, corroborando o presente estudo.

O perfil eletroforético de proteínas resistentes ao calor ao longo da embebição e após a protrusão radicular (1mm) foram analisadas no software GelAnalyzer, sendo possível observar que houve um decréscimo na abundância dessas proteínas ao longo do processo germinativo (Figuras 3 e 4).

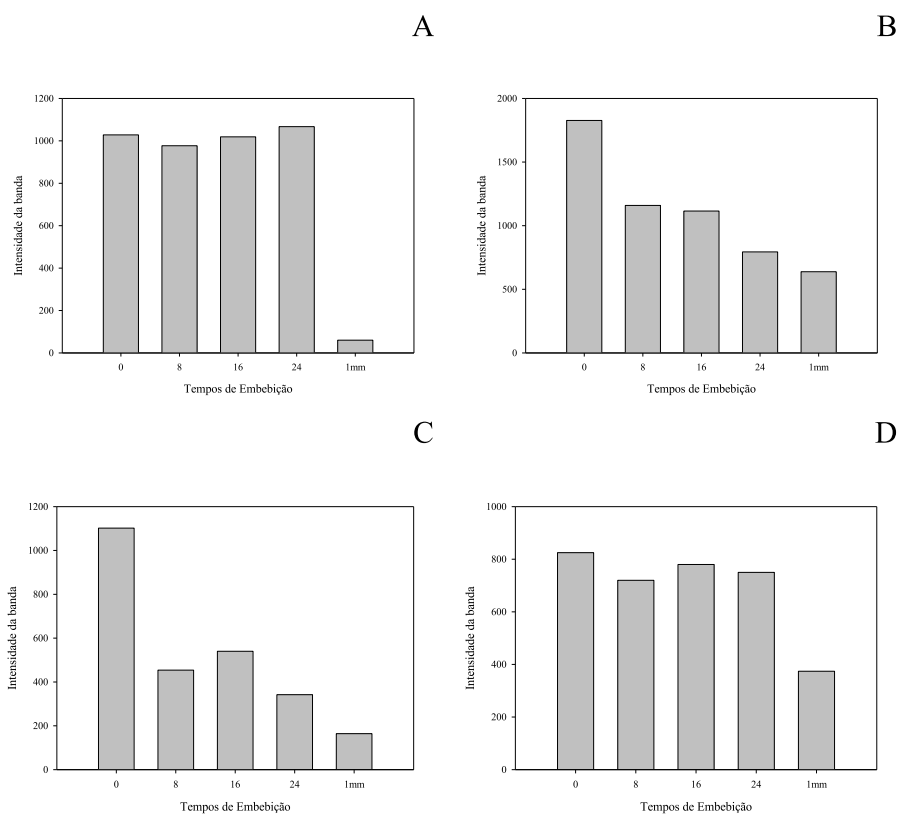


Figura 3 - Variações na abundância de proteínas resistentes ao calor em eixos embrionários de *Anadenanthera colubrina* ao longo da embebição e após a protrusão radicular

Nota: A- Proteína 1; B- Proteína 2; C- Proteína 3; D- Proteína 4.

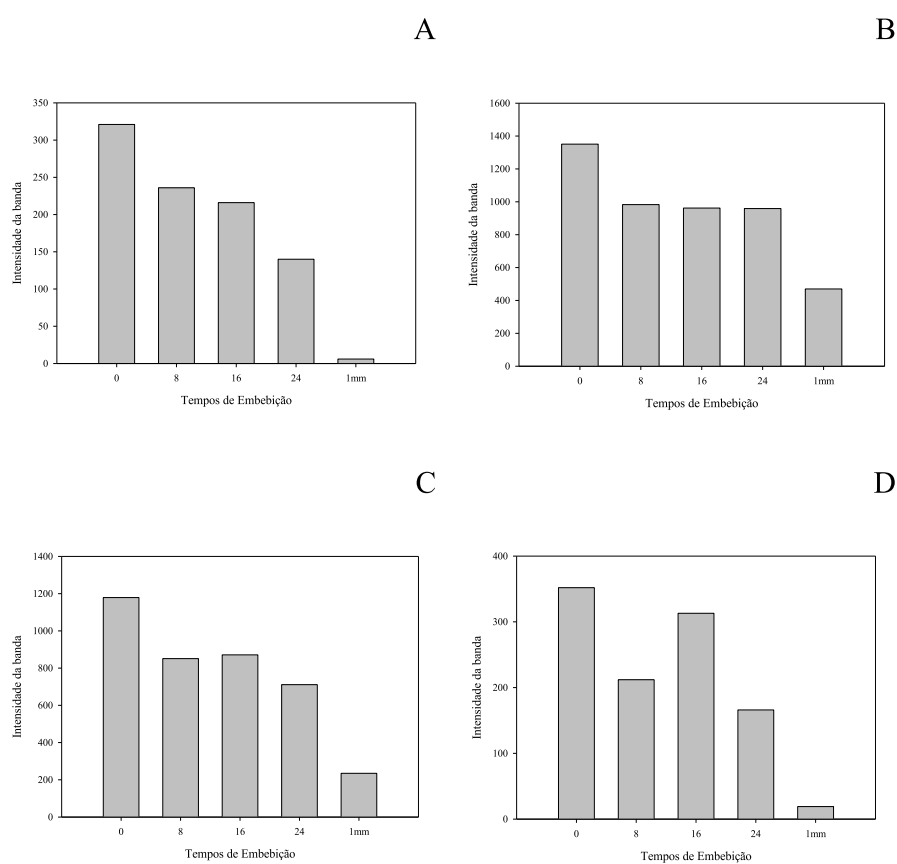


Figura 4 - Variações na abundância de proteínas resistentes ao calor em eixos embrionários de *Anadenanthera colubrina* ao longo da embebição e após a protrusão radicular

Nota: A- Proteína 5; B- Proteína 6; C- Proteína 7; D- Proteína 8.

As proteínas resistentes ao calor atuam como agentes protetores de membranas, contribuindo para a manutenção da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas. Por isso, sua importância no metabolismo celular das sementes que passam por um processo de desidratação, seja ele natural, quando as sementes se desligam da planta mãe, ou artificial, em

condições de estudos em laboratório, possibilitando a manutenção da viabilidade dessas sementes. Portanto, a redução das proteínas resistentes ao calor durante a embebição coincide com o aumento da sensibilidade à dessecação, podendo ser uma das causas da perda da tolerância à dessecação em sementes.

3.2 Atividade enzimática

A atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e peroxidase foi analisada em cada um dos tempos de embebição, mostrando a diferença da atividade enzimática nas sementes secas, que não iniciaram o processo germinativo e, portanto, não ativaram seu metabolismo, até sementes que já concluíram o processo germinativo e passaram por intensa atividade metabólica, sugerindo que as enzimas estão envolvidas no processo germinativo e, conseqüentemente, na perda da tolerância à dessecação.

Na figura 5, pode-se ver um perfil decrescente da atividade da enzima catalase com o decorrer do processo germinativo, mostrando que sementes que não iniciaram a embebição (0 horas de embebição) apresentam maior atividade que sementes germinadas com radículas de 1 mm de comprimento. Esse decréscimo do padrão de expressão da enzima CAT coincide com a queda observada na tolerância à dessecação, mostrando que a catalase pode estar envolvida nos mecanismos de tolerância à dessecação. Já os demais tratamentos (8, 16 e 24 horas de embebição) não diferem estatisticamente entre si e não variam nem em

relação às sementes secas nem em relação às germinadas ($p=0,024$ e $CV=29,98$).

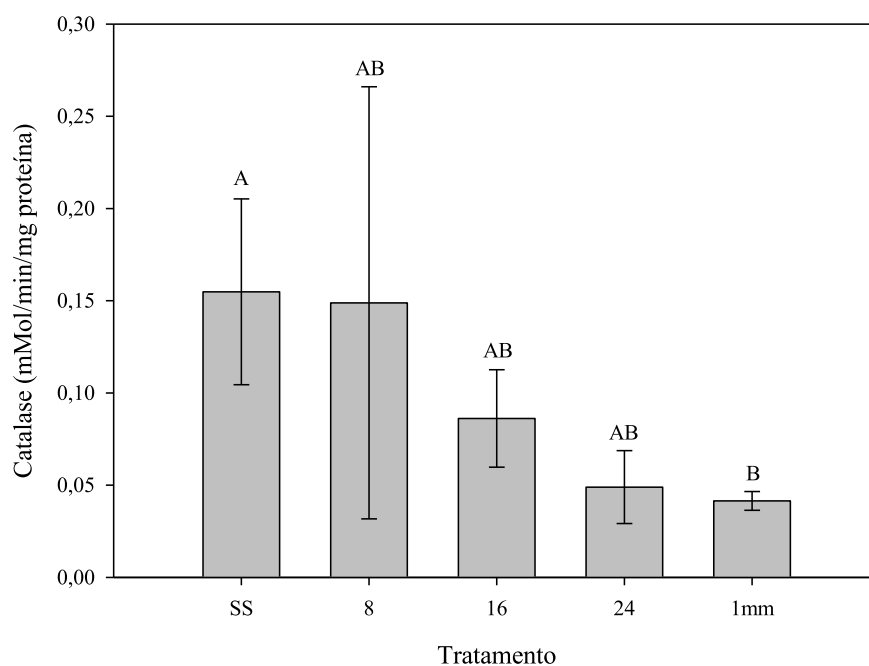


Figura 5 - Atividade enzimática da catalase em sementes de *Anadenanthera colubrina* em diferentes tempos de embebição: (SS) Sementes secas. (8 – 24) Sementes embebidas por 8, 16 e 24 horas. (1mm) Sementes germinadas com radículas de 1 mm

Nota: Letras iguais indicam ausência de diferença entre os pontos de embebição pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A atividade enzimática da superóxido dismutase, ao longo da germinação, apresentou um comportamento similar ao observado para a enzima catalase, mostrando um perfil decrescente da atividade dessa

enzima, ao longo da embebição. Contudo, essa redução é menor do que a observada para a catalase (Figura 6) ($p < 0,0001$ e $CV = 9,33$).

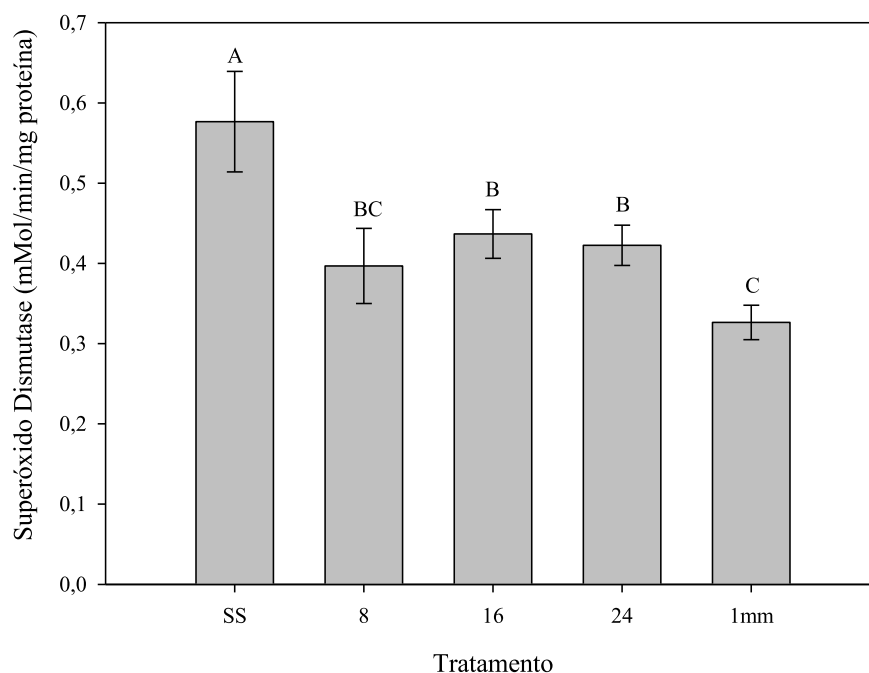


Figura 6 - Atividade enzimática da superóxido dismutase em sementes de *Anadenanthera colubrina* em diferentes tempos de embebição: (SS) Sementes secas. (8 – 24) Sementes embebidas por 8, 16 e 24 horas. (1mm) Sementes germinadas com radículas de 1 mm

Nota: Letras iguais indicam ausência de diferença entre os pontos de embebição pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A atividade enzimática da peroxidase se manteve uniforme, ao longo do processo germinativo com um acentuado aumento após a protrusão radicular (Figura 7). Esse resultado sugere a ligação da atividade dessa enzima com o final do processo germinativo, sugerindo

maior importância dessa enzima no desenvolvimento da plântula ($p < 0,0001$ e $CV = 46,01$).

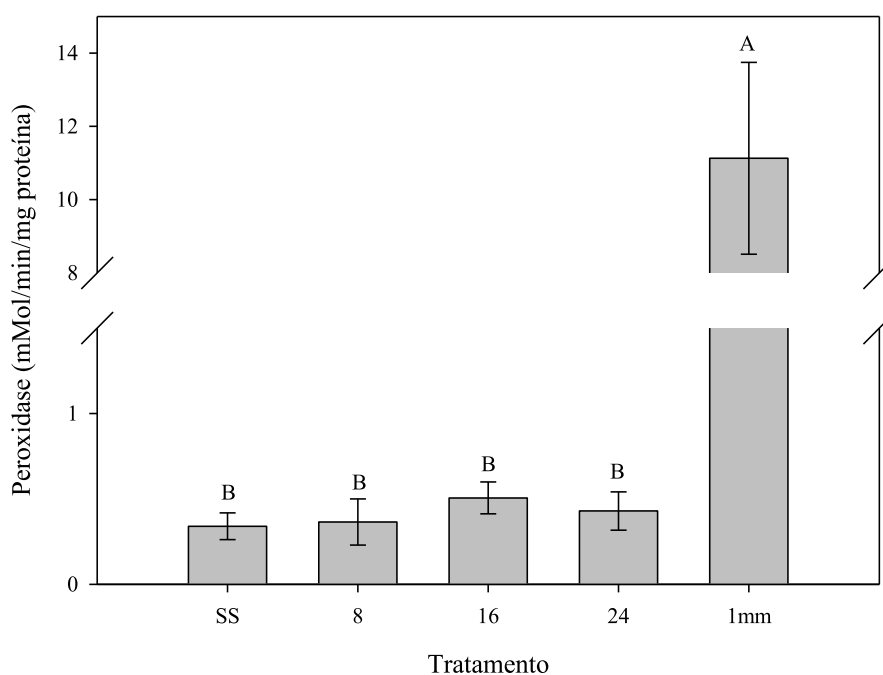


Figura 7 – Atividade enzimática da peroxidase em sementes de *Anadenanthera colubrina* em diferentes tempos de embebição: (SS) Sementes secas. (8 – 24) Sementes embebidas por 8, 16 e 24 horas. (1mm) Sementes germinadas com radículas de 1 mm

Nota: Letras iguais indicam ausência de diferença entre os pontos de embebição pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No presente estudo, as enzimas CAT e SOD apresentaram alterações durante a embebição. Em estudos com semente de sucupira preta (*Bowdichia virgilioides*), Albuquerque et al. (2009) observaram que

em um dos lotes estudados, a atividade da catalase foi maior nas primeiras horas de embebição, reduzindo sua expressão à medida que o processo germinativo avançou. Esse evento também foi observado por Resende (2006) em estudos durante a germinação de sementes de café (*Coffea arabica*), mostrando que a atividade da enzima CAT é maior nas sementes secas, diminuindo com o decorrer da embebição.

Em estudo da atividade enzimática ao longo da germinação de sementes de *Melanoxylon brauna*, Flores et al. (2014) observaram que a atividade da enzima superóxido dismutase em sementes submetidas a germinação à temperatura de 25°C diminuiu nas primeiras horas de embebição e à medida que as sementes absorviam água, apresentaram atividade praticamente uniforme ao longo do processo germinativo. No presente estudo, o padrão de expressão da SOD foi semelhante ao observado por esses autores, os quais sugeriram que a presença dessa enzima nas sementes ao longo da embebição indica que ela está envolvida na proteção celular contra os radicais superóxidos.

Com o decorrer da embebição, na medida em que os reparos celulares avançam, principalmente nas membranas, a produção de superóxido vai sendo reduzida, e, conseqüentemente, a redução da atividade da enzima SOD, já que a resposta antioxidativa capaz de neutralizar o oxigênio tóxico formado durante os processos de estresse, o qual não é mais tão intenso quanto no início da embebição (RESENDE, 2006).

No entanto, no trabalho com sementes de *Erythrina falcata*, Artur (2014) observou o contrário. A enzima SOD não apresentou diferença na sua atividade nas 12 primeiras horas de embebição, aumentando a partir

das 18 horas de embebição, mantendo-se elevada até que a raiz primária atingisse 3 mm de comprimento. Nesse mesmo trabalho, a autora observou o mesmo padrão da SOD para a enzima CAT, que apresentou uma atividade crescente, ao longo da embebição até raízes primárias com 3 mm de comprimento. Ambas as enzimas apresentaram diferença no padrão da atividade, ao longo do processo germinativo, em sementes de *Anadenanthera colubrina*.

Já, em relação à atividade enzimática da peroxidase (POX), Matos (2013), em estudo com sementes de *Dalbergia nigra*, encontrou nas sementes colocadas em condição de germinação, um aumento da atividade da enzima POX com o decorrer da embebição. No entanto, no presente trabalho, esse aumento ocorreu apenas em sementes que apresentavam raízes primárias com 1mm de comprimento.

Em estudo realizado com sementes de café, Rezende (2006) não observou atividade da enzima peroxidase nas sementes embebidas em água. No entanto, a embebição dessas sementes em solução de giberelina, levou a um aumento na atividade da enzima POX aos 10, 12 e 14 dias de embebição, com maior atividade aos 14 dias, ou seja, no final do processo germinativo. Uma das prováveis explicações, pela autora, para esse aumento da atividade enzimática da peroxidase foi que a giberelina, hormônio envolvido com o desenvolvimento das plântulas, aumenta a liberação da peroxidase, o que, normalmente, ocorre no final do processo germinativo.

Dessa forma, a atividade enzimática da peroxidase, que aumenta abruptamente em sementes germinadas com radícula de 1mm de comprimento, pode estar associada não com o processo germinativo, mas

com o desenvolvimento de plântulas. Uma possível explicação para o aumento da atividade da enzima POX após a germinação, é que a CAT e a SOD podem ter sido degradadas ao longo da embebição, inviabilizando sua ação contra os radicais livres, e, possivelmente, acumulando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas células.

A atividade das enzimas CAT e SOD diminuiu progressivamente, o que pode estar relacionado, segundo Garnczarska, Bednarski e Jancelewicz (2009), ao declínio nos níveis de ROS, decorrentes da eliminação, por meio da ação dessas enzimas. Portanto, a atividade de enzimas em sementes em processo germinativo é um mecanismo protetor contra a ação de radicais livres e pode estar associado à manutenção até certo ponto da tolerância à dessecação.

4 CONCLUSÕES

Proteínas resistentes ao calor apresentam redução durante o processo germinativo das sementes de *Anadenanthera colubrina*.

A atividade enzimática da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) apresentou um padrão decrescente ao longo da embebição.

Proteínas resistentes ao calor, bem como as enzimas catalase e superóxido dismutase podem estar relacionadas com a tolerância à dessecação.

O aumento da atividade da peroxidase (POX) em sementes germinadas pode estar associado ao processo de desenvolvimento das plântulas, bem como à degradação das enzimas CAT e SOD, ao longo da embebição.

ABSTRACT

Orthodox seeds and recalcitrant seeds differ with regard to desiccation tolerance. The difficulty in working with recalcitrant seeds has reflected in a few studies with this category of seed. Thus, the study of germinating orthodox seeds has allowed advances in the understanding of processes related to desiccation sensitivity in recalcitrant seeds. This study aimed to analyze proteins and enzymes of antioxidant systems during the germination process of *Anadenanthera colubrina* seeds. The abundance of total proteins and heat resistant proteins were evaluated by electrophoresis in acrylamide gel. Proteins were extracted from embryonic axes under different soaking periods: 0 (control), 8, 16, 24 hours of imbibition and seeds with visible germination (1mm protruded radicle). Activity of catalase, superoxide dismutase and peroxidase were assessed for the same imbibition times. There was a correlation of some heat resistant proteins with maintenance and loss of desiccation tolerance during the germination process. Besides, the decreasing pattern found on the enzymatic activity of catalase and superoxide dismutase along the imbibition suggests that these enzymes are related to the loss of desiccation tolerance occurred during the germination of seeds *Anadenanthera colubrina*.

Keywords: Desiccation tolerance. Protein profile. Antioxidant system. Forest seeds.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, K. S. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a embebição de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 1, p.12-19, 2009.

ARTUR, M. A. S. **Processos fisiológicos e anatômicos associados à embebição e perda da tolerância à dessecação em sementes de *Erythrina falcata* Benth.** 2014. 76 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes.** Brasília, 2009. 365 p.

CASTRO, L. E. **Aspectos fisiológicos, celulares e moleculares da tolerância à dessecação em sementes de *Anadenanthera colubrina* durante a germinação.** 2013. 63 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

FLORES, A. V. et al. Atividade enzimática durante a germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott sob diferentes temperaturas. **Cerne**, Lavras, v. 20, n. 3, p. 401-408, 2014.

GARNCZARSKA, M.; BEDNARSKI, W.; JANCELEWICZ, M. Ability of lupine seeds to germinate and to tolerate desiccation as related to changes in free radical level and antioxidants in freshly harvested seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 47, n. 1, p. 56-62, Jan. 2009.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 59, p. 309-314, 1977.

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

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 62 p. (IPGRI Technical Bulletin, 1).

KOSTER, K. L.; LEOPOLD, A. C. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 88, p. 828-832, 1988.

KRANNER, I.; BIRTIC, S. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. **Integrative and Comparative Biology**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 734-40, 2005.

MATOS, A. C. B. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra*) ((Vell.) fr. all. ex Benth) sob estresse térmico**. 2013. 45 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.

MUNDREE, S. G.; FARRANTE, J. M. Some physiological and molecular insights into the mechanisms of desiccation tolerance in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker. In: CHERRY, J. H.; LOCY, R. D.; RICHTER, A. (Ed.). **Plant tolerance to abiotic stress in agriculture: role of genetic engineering**. Wageningen: Klumer Academic, 2000. p. 2001-222.

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

RESENDE, M. L. **Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a germinação de sementes de café (*coffea arabica*) cv. Rubi**. 2006. 119 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

WANG, W. et al. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 244-252, 2004.