



LORENA EGÍDIO DE CASTRO

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS, CELULARES E
MOLECULARES DA TOLERÂNCIA À
DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE
Anadenanthera colubrina DURANTE A
GERMINAÇÃO**

LAVRAS - MG

2013

LORENA EGÍDIO DE CASTRO

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS, CELULARES E MOLECULARES DA
TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE *Anadenanthera*
colubrina DURANTE A GERMINAÇÃO**

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

Orientador

Prof. Dr. José Marcio Rocha Faria

Coorientador

Prof. Dr. Anderson Cleiton José

LAVRAS - MG

2013

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

Castro, Lorena Egídio de.

Aspectos fisiológicos, celulares e moleculares da tolerância à
dessecação em sementes de *Anadenanthera colubrina* durante a
germinação / Lorena Egídio de Castro. – Lavras : UFLA, 2013.

64 p. : il.

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

Orientador: José Márcio Rocha Faria.

Bibliografia.

1. Sementes florestais. 2. Armazenamento. 3. Tolerância à
dessecação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.9562

LORENA EGÍDIO DE CASTRO

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS, CELULARES E MOLECULARES DA
TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE *Anadenanthera*
colubrina DURANTE A GERMINAÇÃO**

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

APROVADA em 28 de fevereiro de 2013.

Dr. Anderson Cleiton José - UFLA

Dr. Renato Mendes Guimarães - UFLA

Prof. Dr. José Marcio Rocha Faria
Orientador

Coorientador

Prof. Dr. Anderson Cleiton José

LAVRAS – MG

2013

*Aos meus pais; Conceição e Neivaldo e ao padrasto Olicio,
por todo amor e dedicação;
Aos meus avós e a tia Rosa, pelo carinho e cuidado;
A meu namorado, André, pelo apoio e companheirismo;*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus;

Agradeço aos meus pais, meu padrasto, avós e a tia Rosa, pelo apoio, carinho e incentivo;

Agradeço ao meu namorado, André, pelo carinho, companherismo, e por levar-me ao Laboratório sempre que precisei;

Agradeço à Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciências Florestais;

À CAPES, pela concessão da Bolsa;

Ao meu orientador, Dr. José Marcio Rocha Faria, por toda atenção e apoio, e pelas oportunidades dadas desde a graduação;

Ao professor Dr. Anderson Cleiton José, pelas sugestões e ensinamentos;

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade;

Aos colegas do Laboratório de Sementes Florestais, pela boa convivência;

À Tati, Olívia, Wilson e Janice, pelas ideias trocadas e pelo apoio desde que entrei no laboratório;

À minha amiga Cris, parceira de todas as horas, pelo companherismo e amizade;

À Leila, do Laboratório de Citogenética e à Heloisa do Laboratório de Análise de Sementes, pela ajuda indispensável.

À Claudia, do Laboratório de Microscopia Eletrônica, por sua grande ajuda, amizade e carinho;

Agradeços às amigas de república, pela amizade sincera;

Aos meus inesquecíveis amigos de graduação com quem iniciei esta jornada, em especial à Sarita, uma grande amiga;

A todos que contribuíram racionalmente e emocionalmente para a realização deste trabalho.

RESUMO

Durante a germinação, sementes ortodoxas tornam-se gradualmente intolerantes à dessecação, passando a se comportarem como sementes recalcitrantes. No presente trabalho, sementes de *Anadenanthera colubrina* em processo germinativo foram utilizadas para maior entendimento da sensibilidade à dessecação durante a germinação. Inicialmente, as sementes foram embebidas durante 0 (controle), 2,8,12 e aproximadamente 16 horas (sementes germinadas com 1 mm de radícula). Em seguida realizou-se secagem por 72 horas e até 70, 50 e 30% da umidade registrada em cada tempo da embebição. As sementes foram reidratadas e a sobrevivência avaliada. Ao longo da embebição foram realizadas análises citométricas, ultraestruturais, extração de proteínas resistentes ao calor e enzima peroxidase. Após embebição e secagem foram avaliadas a integridade do DNA e danos ultraestruturais. A tolerância à dessecação foi totalmente perdida após a protrusão radicular. Não houve perda da integridade e aumento do conteúdo de DNA 4C quando a tolerância à dessecação foi perdida. Características ultraestruturais de células de radículas de 1 mm assemelharam-se às encontradas em sementes recalcitrantes tanto no estado hidratado quanto desidratado. A perda da tolerância à dessecação coincidiu com a redução do conteúdo de proteínas resistentes ao calor e da enzima peroxidase.

Palavras-chave: Tolerância à dessecação. Sementes florestais. Secagem. Armazenamento.

ABSTRACT

During germination, orthodox seeds gradually become tolerant to desiccation, and start behaving as recalcitrant seeds. In this work, *Anadenanthera colubrina* seeds in germination process were used for the better understanding of the sensitivity to desiccation during germination. Initially, the seeds were soaked for 0 (control), 2, 8, 12 and approximately 16 hours (germinated seeds with 1 mm of radicle). Subsequently, we performed drying for 72 hours and up to 70, 50 and 30% of registered humidity in each soaking period of time. The seeds were rehydrated and the survival was evaluated. During the soaking we performed cytometric and ultra-structural, enzyme peroxidase analyses and extraction of proteins resistant to heat. After the soaking and drying we evaluated the DNA integrity and ultra-structural damages. The tolerance to desiccation was completely lost after radicular protrusion. There was no integrity loss and increase of 4C DNA content after the tolerance to desiccation was lost. Ultra-structural characteristics of 1 mm radicular cells were similar to those found in recalcitrant seeds in the hydrated state as well as in the dehydrated state. The loss of tolerance to desiccation was concluded with the reduction of the content of proteins resistant to heat and of the peroxidase enzyme.

Keywords: Tolerance to desiccation. Forest seeds. Drying. Storage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema da metodologia adotada no estudo da perda da tolerância à dessecação de sementes de <i>Anadenanthera colubrina</i>	24
Figura 2	Padrão de hidratação de sementes de <i>Anadenanthera colubrina</i>	32
Figura 3	Curvas de secagem de sementes de <i>Anadenanthera colubrina</i> em diferentes pontos da germinação	34
Figura 4	Perda da tolerância à dessecação em sementes de <i>Anadenanthera colubrina</i> expressas pelo percentual de formação de plântulas normais	35
Figura 5	Avaliação da sobrevivência de sementes de <i>A. colubrina</i> após a embebição em diferentes tempos seguida de diferentes intensidades de secagem.....	37
Figura 6	Histogramas de citometria de fluxo demonstrando o conteúdo de DNA nuclear em radículas de sementes de <i>Adenanthera colubrina</i> antes e após a germinação.....	39
Figura 7	Variação do conteúdo de DNA nuclear em radículas de eixos embrionários de <i>Adenanthera colubrina</i> em diferentes tempos da germinação.....	40
Figura 8	Gel de agarose 1% com DNA genômico extraído em diferentes pontos da germinação e após a desidratação. (1) Controle (sementes não embebidas); Sementes embebidas por (2) 2 horas e em seguida desidratadas (3) por 8 horas e em seguida desidratadas; (4) 12 horas e em seguida desidratadas; (5) sementes germinadas com 1 mm de comprimento radicular e desidratadas; (M) marcador molecular	43
Figura 9	Eletromicrografias de varredura de células radiculares de eixos embrionários de <i>Anadenanthera colubrina</i>	45

Figura 10 Eletromicrografias de transmissão de células radiculares de eixos embrionários de <i>Anadenanthera colubrina</i>	46
Figura 11 Padrão eletroforético das PRCs de radículas de sementes de <i>Anadenanthera colubrina</i> em diferentes tempos de embebição	49
Figura 12 Padrão eletroforético da enzima peroxidase de radículas de sementes de <i>Anadenanthera colubrina</i> . em diferentes tempos de embebição: (0 h) Sementes secas.(2-12 h) Sementes embebidas por 2, 8 e 12 horas; (1 mm) Sementes germinadas com radículas de 1 mm	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Tolerância à dessecação e classificação fisiológica das sementes quanto à secagem e ao armazenamento	14
2.2	Mecanismos que conferem a tolerância à dessecação em sementes	15
2.2.1	Proteínas resistentes ao calor	16
2.2.2	Sistemas antioxidantes	17
2.2.3	Modificações ultraestruturais	18
2.2.4	Conteúdo e integridade do DNA	19
2.2.5	Uso de sementes ortodoxas germinadas como modelo para entender a sensibilidade à dessecação	20
2.3	<i>Anadenanthera colubrina</i>	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Material vegetal	22
3.2	Caracterização do lote	22
3.3	Curva de embebição	22
3.4	Curvas de secagem	23
3.5	Caracterização da perda da tolerância à dessecação	23
3.6	Avaliação ultraestrutural	25
3.6.1	Microscopia eletrônica de transmissão	26
3.6.2	Microscopia eletrônica de varredura	26
3.7	Quantificação do DNA nuclear	27
3.8	Avaliação da integridade do DNA	27
3.9	Análise dos padrões eletroforéticos de proteínas resistentes ao calor	28
3.10	Extração enzimática (peroxidase)	29
3.11	Análise dos dados	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	Caracterização do lote e curva de embebição	31
4.2	Curvas de secagem e perda da tolerância à dessecação	33
4.3	Avaliação do conteúdo de DNA	38
4.4	Manutenção da integridade do DNA	42
4.5	Análise ultraestrutural	43
4.6	Proteínas resistentes ao calor	48
4.7	Peroxidase	50
5	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de conservação das florestas tropicais e o fortalecimento da política ambiental promoveram um aumento na demanda de sementes de espécies nativas, que constituem insumo básico nos programas de recuperação e conservação de ecossistemas (CARVALHO et al., 2006). Uma das formas de conservação de espécies vegetais é por meio do armazenamento das sementes em bancos de germoplasma, que inclui etapas como a secagem e manutenção em temperatura e umidade reduzidas. Todavia, sementes de diferentes espécies podem apresentar variações nos níveis de tolerância à secagem e diferentes comportamentos durante o armazenamento.

A classificação em relação à tolerância à dessecação e ao armazenamento leva em consideração três categorias de sementes denominadas ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias. As sementes ortodoxas seriam aquelas que toleram secagem até grau de umidade próximo de 5% e podem ser armazenadas em temperaturas negativas por longos períodos, com reduzida perda de viabilidade. Sementes recalcitrantes são dispersas com teor de água elevado, perdem a viabilidade quando secas abaixo de 20-30% de umidade e não toleram temperaturas negativas, inviabilizando o armazenamento a longo prazo (ROBERTS, 1973). De acordo com Ellis, Hong e Roberts (1990) as sementes classificadas como intermediária seriam aquelas que toleram a secagem mas não resistem às baixas temperaturas durante período de tempo prolongado. Atualmente acredita-se que as sementes não se limitam a categorias distintas, mas sim que estejam inseridas em um continuum com diferentes níveis de tolerância à dessecação e ao armazenamento.

A sensibilidade à dessecação constitui um obstáculo para conservação da biodiversidade e execução de pesquisas à longo prazo. Diante disso a utilização de modelos para estudo da recalcitrância torna-se extremamente

necessária. Sementes ortodoxas germinadas ou em processo germinativo constituem uma importante ferramenta no estudo da sensibilidade à dessecação, pois com o decorrer da germinação, essas sementes perdem progressivamente a tolerância à dessecação, passando a se comportar como as recalcitrantes (SUN, 1999).

A gradual perda da tolerância à dessecação durante a germinação está relacionada à redução ou ineficiência nos mecanismos de proteção e reparo. A incapacidade de resistir à desidratação durante o processo germinativo tem sido associada com a perda da integridade do DNA e das estruturas celulares, aumento do conteúdo de DNA 4C, e redução do conteúdo de moléculas protetoras como proteínas resistentes ao calor e enzimas antioxidantes (PAMMENTER; BERJAK, 1997).

No presente estudo foram utilizadas sementes de *Anadenanthera colubrina* durante o processo germinativo para maior entendimento da sensibilidade à dessecação. Esta espécie foi escolhida porque segundo Nery (2008), apresenta sementes isentas de dormência, e com altas percentagens de germinação, características desejáveis para este tipo de trabalho.

Portanto, o objetivo geral desta pesquisa foi estudar a perda da tolerância à dessecação de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan durante a germinação. Os objetivos específicos foram: Caracterizar fisiologicamente a perda da tolerância à dessecação durante a germinação;

Correlacionar a perda da tolerância à dessecação com o conteúdo de DNA, de proteínas resistentes ao calor e enzima peroxidase;

Avaliar os efeitos da dessecação de sementes em processo germinativo, em relação à integridade do DNA e a danos celulares.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Tolerância à dessecação e classificação fisiológica das sementes quanto à secagem e ao armazenamento

A tolerância à dessecação é a habilidade das células de um organismo de perderem água até atingirem o equilíbrio higroscópico com o ar moderadamente a extremamente seco (50% de umidade relativa e 20 °C) e, então, retomarem suas funções normais após a reidratação (BLACK; PRITCHARD, 2002).

Segundo Alpert (2006), a tolerância à dessecação é um caráter primitivo, sendo encontrada em clados inferiores como em fungos, bactérias, nematóides, rotíferos e tardígrados. No reino vegetal esta característica é verificada principalmente em algas, briófitas, e estruturas reprodutivas das plantas superiores como pólen, esporos e sementes (OLIVER; TUBA; MISHLER, 2000).

A tolerância à dessecação em sementes é uma característica desejável para conservação *ex situ* das espécies vegetais, uma vez que para a realização do armazenamento de sementes é necessário que estas sejam desidratadas (JOSÉ; SILVA; DAVIDE, 2007). Além da redução do teor de água, a manutenção da qualidade fisiológica das sementes armazenadas depende também temperatura e umidade do ambiente de armazenamento Harrington (1972).

Conforme mencionado, segundo seu comportamento quanto ao armazenamento e sensibilidade à dessecação, as sementes foram categorizadas em ortodoxas, recalcitrantes (ROBERTS, 1973) e intermediárias (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990).

Em sementes ortodoxas, a aquisição da tolerância à dessecação é um evento programado da fase final do desenvolvimento. Após o acúmulo de reservas as sementes passam por um período de secagem, com redução considerável do teor de água (entre 90 a 95%) e do metabolismo, passando a um

estado quiescente (BLACK; PRITCHARD, 2002). Isto permite que estas sementes possam ser armazenadas por longos períodos sob condições convencionais, ou seja, no estado seco e em baixas temperaturas (ROBERTS, 1973).

Sementes recalcitrantes não apresentam ao final do desenvolvimento, a etapa de secagem e aquisição da tolerância à dessecação. Portanto, estas sementes são dispersas com alto teor de água e metabolicamente ativas (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998; PAMMENTER; BERJAK, 2000). Além disso, muitas espécies, particularmente as de origem tropical, são também sensíveis à refrigeração não podendo ser armazenadas em baixas temperaturas.

Variações nas respostas das sementes levaram à observação de um terceiro grupo, formado por sementes dispersas úmidas, mas que suportam secagem até 12% de umidade e toleram armazenamento em temperaturas baixas, porém, não negativas, sendo denominadas sementes intermediárias (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990).

Nos últimos anos vem sendo aceita a ideia de que o comportamento das sementes em relação à tolerância à dessecação e ao armazenamento não deve ser limitado às categorias distintas, mas sim considerado um continuum formado pelo máximo de ortodoxia em um extremo e o máximo de recalcitrância no outro, com gradações sutis de não ortodoxia entre os dois extremos (BERJAK; PAMMENTER, 1997).

2.2 Mecanismos que conferem a tolerância à dessecação em sementes

Atualmente acredita-se que um conjunto de mecanismos ou processos esteja associado à tolerância à dessecação, e ajudam a garantir a sobrevivência das sementes ortodoxas no estado desidratado, e durante a reidratação (VICRÉ; FARRANT; DRIOUICH, 2004). Tais mecanismos incluem características físicas

celulares e intracelulares, acúmulo de sistemas antioxidantes eficientes, de moléculas protetoras, tais como proteínas LEA, proteínas resistentes ao calor, e açúcares redutores (KERMODE; FINCH-SAVAGE, 2002). A seguir, serão detalhados alguns destes mecanismos.

2.2.1 Proteínas resistentes ao calor

Um dos mecanismos mais estudados na adaptação dos organismos à condição de estresse consiste na indução da expressão de proteínas resistentes ao calor (*Heat Stable Proteins*) as quais têm sido relatadas desde bactérias até tecidos vegetativos de plantas tolerantes à dessecação (WATERS; LEE; VIERLING, 1996; SHIH; HOEKSTRA; HSING, 2008).

Nos vegetais seis classes de proteínas resistentes ao calor (PRCs) têm sido relacionadas à proteção contra danos causados por estresse, e em sementes estas proteínas têm sido associadas com a aquisição da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas (VIERLING, 1991; FARRANT; MOORE, 2011). Dentre as classes de PRCs expressas em sementes destacam-se as proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) que como o próprio nome diz são expressas nas etapas finais do desenvolvimento (ILLING et al., 2005).

Acredita-se que a importância das PRCs na tolerância à dessecação de sementes se deve ao fato dessas proteínas atuarem como chaperonas, impedindo a desestruturação proteica (FEDER; HOFMANN, 1999). O termo chaperona é utilizado para designar moléculas que ajudam na montagem ou manutenção de estruturas moleculares, impedindo que haja interações errôneas (HAND et al., 2011).

Em estudos com *Medicago truncatula* Larre et al. (2006) verificaram que a perda da tolerância à dessecação durante a germinação foi acompanhada da redução do conteúdo de proteínas resistentes ao calor, e conseguiram

identificar alguns grupos dessas proteínas. Em embriões de *Arabidopsis thaliana*, também foi observado que as PRCs começam a acumular-se no meio da maturação e são abundantes após aquisição da tolerância à dessecação (WEHMEYER; VIERLING, 2000).

2.2.2 Sistemas antioxidantes

Durante a dessecação das sementes, observa-se um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres nas células (LEPRINCE et al., 1994; NTULI et al., 2011). Estas moléculas são prejudiciais à integridade celular, sendo capazes de induzir a oxidação e despolimerização de ácidos nucleicos, a desnaturação de proteínas e a peroxidação dos lipídios da membrana plasmática (KRANNER; BIRTIC, 2005; KRANNER et al., 2010).

Segundo Marcos Filho (2005) um dos fatores que levam algumas sementes a não tolerarem a dessecação seria a ausência ou ineficiência de mecanismos eficientes no combate à EROs. Vários danos causados por radicais livres durante a dessecação de sementes podem ser minimizados pela presença de mecanismos protetores, como a ação das enzimas glutathione redutase, superóxido dismutase, catalase e peroxidase especializadas em remover espécies reativas de oxigênio (PUKACKA; RATAJCZAK, 2006).

Segundo Asada(1992), o grupo enzimático das peroxidases compreende uma grande família de proteínas responsáveis pela remoção do peróxido de hidrogênio. O autor também afirma que o peróxido de hidrogênio pode ser extremamente nocivo às células, pois dá origem ao radical hidroxila (HO^\cdot) o qual causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares.

Alguns estudos tem verificado relação entre o conteúdo de enzima peroxidase e a tolerância à dessecação. Em estudo com embriões de milho, Leprince, Bronchart e Deltour (1990) observaram uma diminuição na atividade

das enzimas superóxido dismutase e peroxidase, durante o processo de embebição, em estágios de intolerância à dessecação. Observações semelhantes foram feitas por Tang (2000) com sementes de *Pinus taeda*, as quais apresentaram maior conteúdo de peroxidase no estado tolerante quando comparado com o estado intolerante à secagem. Estes resultados remetem à importância dessa enzima como mecanismo de proteção.

2.2.3 Modificações ultraestruturais

A tolerância à dessecação também está associada à capacidade de manutenção da integridade das estruturas celulares, e alguns marcadores ultraestruturais têm sido relacionados com a sensibilidade e tolerância à dessecação (BERJAK; PAMMENTER, 2000).

Sementes recalcitrantes são caracterizadas por serem metabolicamente ativas e ultraestruturalmente pelo grande número de polissomos, retículos endoplasmáticos, complexos de golgi e inúmeros vacúolos (CACCERE et al., 2013; WEN, 2011).

Os principais efeitos da dessecação nas estruturas celulares são injúrias às membranas e descolamento destas da parede celular, dobramento da parede, condensação da cromatina, e justaposição das mitocôndrias e cloroplastos, degradação de organelas devido à ineficiência de sistemas antioxidantes (WESLEY-SMITH, 2001; KIOKO; BERJAK; PAMMENTER, 2006). As mitocôndrias são um dos principais alvos de danos relativos à dessecação, provavelmente devido à presença de espécies reativas de oxigênio (WANG et al., 2012).

Como resposta à desidratação as células aumentam a vacuolização, ocorre a desdiferenciação de organelas, alterações no citoesqueleto e na

conformação de moléculas como o DNA, além da redução do metabolismo (BERJAK; PAMMENTER, 2000).

2.2.4 Conteúdo e integridade do DNA

Durante o início da embriogênese de sementes ortodoxas ocorre uma alta atividade do ciclo celular, a qual é gradualmente reduzida até ser suspensa ao final da maturação, e então estas sementes são dispersas com o ciclo celular mantido na fase G1 (conteúdo de DNA 2C). A retomada da atividade mitótica se dá durante o processo germinativo, o qual é finalizado com a divisão celular (SLIWINSKA, 2009; VÁZQUEZ- RAMOS; SÁNCHEZ, 2003).

Tem sido demonstrado que as células na fase G2 do ciclo celular, são mais sensíveis ao estresse do que as células que ainda se encontram na fase G1, pré-síntese (DELTOUR; DE BARSY, 1985). Portanto, células com DNA duplicado possuem menor tolerância à dessecação do que células com conteúdo de DNA 2C, e isto tem sido demonstrado em diversos trabalhos na literatura (DEWITTE; MURRAY, 2003; SILVA et al., 2008; FARIA et al., 2005). Segundo Portis et al. (1999) a aquisição da tolerância à dessecação durante o desenvolvimento de sementes de pimenta coincide com a redução da síntese de DNA e manutenção do conteúdo de DNA 2C. Também foi verificado por Sen e Osborne (1974) que em sementes de centeio (*Secale cereale*) a perda da tolerância à dessecação coincidiu com a entrada das células na fase G2 do ciclo celular ao final do processo germinativo.

Além do ciclo celular, outro fator determinante para a tolerância à dessecação é a manutenção da integridade do DNA (BOUBRIAK; KARGIOLAKI; LYNE, 1997). O estresse gerado pela restrição hídrica pode levar à degradação do material genético e indução da morte celular programada.

A morte celular programada (MCP) corresponde à um processo de regulação da auto destruição celular, caracterizada pela sequência de ativação de enzimas destinadas à destruir macromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (FUKUDA, 2000). Uma rota comum da morte celular é a que leva à ativação de DNases, enzimas que clivam o DNA genômico entre nucleossomos gerando fragmentos de DNA com comprimentos correspondentes a múltiplos de aproximadamente 180 pb (KRANNER et al., 2010).

A morte celular programada pode ser observada pela técnica de eletroforese, onde ocorre a formação de uma escada de DNA ('DNA ladder') quando visualizado no gel de agarose. Desse modo, a presença de escada de DNA tem sido extensivamente usada como um marcador da morte celular programada (EL-MAAROUF-BOUTEAU et al., 2011)

2.2.5 Uso de sementes ortodoxas germinadas como modelo para entender a sensibilidade à dessecação

Após a dispersão, as sementes recalcitrantes permanecem viáveis por períodos relativamente curtos, dificultando o trabalho com esse tipo de semente (PAMMENTER et al., 2008). Ao contrário, sementes ortodoxas adquirem tolerância à dessecação ao final do desenvolvimento, sendo dispersas com baixos teores de água, e em estado quiescente (FRANCHI et al., 2011).

Conforme já foi dito durante o processo germinativo, sementes ortodoxas passam a se comportarem como sementes recalcitrantes, e por isso podem ser utilizadas para estudo da recalcitrância (CACCERE et al., 2013). Segundo Sun (1999), os mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares que ocorrem durante a perda de tolerância à dessecação em sementes ortodoxas germinadas, poderiam ser similares aqueles responsáveis pela sensibilidade à dessecação em sementes recalcitrantes.

A utilização de sementes ortodoxas como modelo pode facilitar a realização de estudos comparativos e conferir maior flexibilidade na concepção de experimentos que visam o entendimento da sensibilidade à dessecação.

2.3 *Anadenanthera colubrina*

A espécie *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, pertence à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae, sendo conhecida popularmente por angico, angico-branco, angico-liso, angico cambuí, angico-escuro, angico-liso, angico-vermelho, entre outros (LORENZI, 2000).

O angico é uma árvore decídua, heliófita, pioneira, característica da mata secundária de regiões acima de 400 metros de altitude e ocorre naturalmente desde os estados do nordeste brasileiro até o sul do Brasil (CARVALHO, 1994). A árvore possui caule 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 escuras, brilhantes, achatadas e de coloração marrom, altamente polida (LORENZI, 2002).

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

A espécie *Anedanthera colubrina* foi escolhida dentre outros motivos devido à facilidade de coleta e à grande produção anual de sementes viáveis, ausentes de dormência e com alto percentual de germinação. Além disso, na literatura consta grande quantidade de informações disponíveis sobre a espécie tais como as fornecidas pelos estudos de (MARQUES, 2007; NERY, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Frutos de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan foram coletados no campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), durante o período de dispersão, nos meses de agosto e setembro. Foram coletados frutos fechados, de coloração amarronzada, os quais foram levados para o Viveiro Florestal da UFLA. No Viveiro, os frutos foram mantidos sobre bandejas com fundo telado até que secagem e deiscência natural.

3.2 Caracterização do lote

Foi determinado o grau de umidade de sementes recém coletadas, e após secagem prévia ao armazenamento em sala climatizada (20 °C e U.R. 60 %). O grau de umidade das mesmas foi determinado pelo método de estufa a 103 °C por 17 horas (BRASIL, 2009), com 4 repetições de 10 sementes cada. O cálculo foi feito na base úmida.

Até o momento dos experimentos as sementes foram armazenadas em saco de plástico, em câmara fria (5 °C e 40% UR).

O peso de 1000 sementes recém dispersas foi obtido pela pesagem de oito amostras de 100 sementes, segundo as determinações das RAS (BRASIL, 2009).

3.3 Curva de embebição

A caracterização do padrão de hidratação das sementes foi realizada em rolo de papel, sob luz e temperatura constante de 30 °C, de acordo com Nery

(2008). Foram pesadas 40 repetições de 1 semente, as quais foram pesadas de hora em hora durante as primeiras 5 horas, a cada 2 horas, até 12 horas de embebição, e em intervalos regulares até caracterização da fase III do processo germinativo. Foi anotado o momento da protrusão radicular, e para representação gráfica da curva, foram selecionadas apenas as sementes germinadas no intervalo de 14 a 19 horas, as quais totalizaram 23 sementes.

3.4 Curvas de secagem

As curvas de secagem foram realizadas em pontos de interesse definidos a partir da curva de embebição (0,2, 8 e 12 horas de embebição e 1mm de comprimento de radícula). Para cada ponto escolhido foi realizado o teste de umidade a fim de determinar o teor de água em cada ponto. Em seguida 4 repetições de 25 sementes foram colocadas sobre tela de alumínio de recipientes contendo sílica gel no fundo (U.R. 20%), mantidos a 20 °C. A perda de água foi acompanhada por meio de pesagens sucessivas e as sementes foram mantidas em ambiente de secagem por 72 horas.

3.5 Caracterização da perda da tolerância à dessecação

Para caracterização da perda da tolerância à dessecação durante a germinação foram amostradas 4 repetições de 25 sementes, avaliadas em 4 diferentes pontos ao longo do processo germinativo: com 2, 8 e 12 horas de embebição e com 1 mm de comprimento radicular. Após a embebição em cada ponto, as sementes foram desidratadas, pré-umidificadas, e reidratadas nas condições de germinação. A sobrevivência foi avaliada pelo percentual de formação de plântulas normais.

Com a finalidade de verificar a existência de pontos críticos da perda da tolerância à dessecação, as sementes foram desidratadas até 70%, 50% e 30% do grau de umidade da semente em cada ponto. Além disso, também foi realizada secagem por 72 horas a fim de se atingir o grau de umidade das condições de armazenamento (Figura 1).

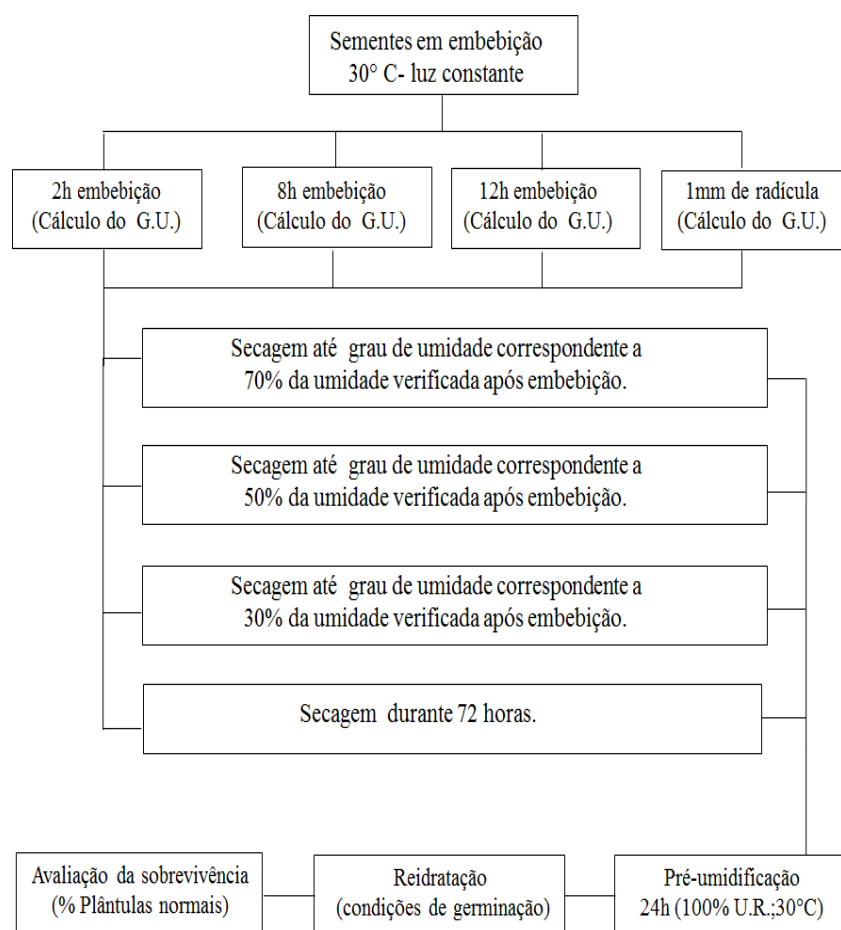


Figura 1 Esquema da metodologia adotada no estudo da perda da tolerância à dessecação de sementes de *Anadenanthera colubrina*

Nota: (G.U.) grau de umidade; (U.R.) Umidade relativa

O processo de secagem foi monitorado por meio de pesagens sucessivas. Para cada grau de umidade desejado havia um peso correspondente, calculado por meio da expressão proposta por Cromarty, Ellis e Roberts (1985):

$$Pf = Pi (100 - Ui) \times (100 - Uf)^{-1}$$

Onde:

Pf = peso final da amostra (g) (após a secagem);

Pi = peso inicial da amostra (g) (antes da secagem);

Ui = grau de umidade inicial (%) (antes da secagem);

Uf = grau de umidade final (%) (após a secagem).

A pré-umidificação foi realizada para evitar danos pela rápida entrada de água, decorrente da diferença entre potenciais hídricos. Durante esta etapa, as sementes foram mantidas em ambiente úmido durante 24 horas (100% UR, 30 °C).

3.6 Avaliação ultraestrutural

A fim de avaliar as mudanças ultraestruturais após a dessecação, foram utilizadas técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura de acordo com a metodologia proposta por Alves (2004), as quais foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

Para cada tratamento foram utilizados 5 eixos embrionários, os quais foram extraídos de sementes embebidas por 2 horas, sementes desidratadas após 2 horas de embebição, sementes germinadas com 1 mm de radícula, e sementes

germinadas (com 1 mm de radícula) e desidratadas. Também foram avaliados eixos embrionários de sementes na condição de armazenamento.

3.6.1 Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras foram fixadas por 24 horas no fixador Karnovsky (glutaraldeído 2,5%; formaldeído 2% em tampão sódio cacodilato 0,05 M; CaCl₂ 0,001 M, pH 7,2) , lavadas (a cada dez minutos por três vezes) em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,2, e em seguida colocadas em solução de tetróxido de ósmio a 1% por uma hora. Posteriormente o material foi lavado em água destilada (duas lavagens de 15 minutos), imerso em acetato de uranila por 12 horas e desidratado em gradiente de concentração crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100 % por três vezes).

Realizou-se a inclusão em spurrr/acetona 30 % (8 h), 70 % (12 h) e 100% duas vezes por 24 h cada, sendo os espécimes montados em moldes e colocados para polimerizar em estufa a 70 °C por 48 h. Os blocos foram cortados em ultramicrótomo (Reichert-jung ultracut), utilizando-se lâmina de diamante. Os cortes foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. As seções foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) Zeiss Mod. EM-109 a 80kV.

3.6.2 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras foram fixadas em solução Karnovisky modificado (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0%, tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,2) durante no mínimo 24 horas. Em seguida o material foi transferido para uma solução de tetróxido de ósmio 1% por uma hora, lavado três vezes em água destilada, desidratado em série de acetona (25, 50, 75, 90 e 100%) e levado para

o aparelho de ponto crítico (Bal-Tec). O material foi montado em suportes de alumínio stubs, coberto com ouro e observado em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 XVP.

3.7 Quantificação do DNA nuclear

A quantificação do conteúdo de DNA 2C e 4C foi feita em 4 repetições de 10 radículas de eixos embrionários embebidos por 2, 8, 12, e até que fosse atingido 1mm de comprimento radicular nas sementes germinadas. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras.

As amostras foram trituradas em placa de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado para a liberação dos núcleos. A suspensão de núcleos foi aspirada com pipeta plástica e em seguida filtrada. Os núcleos foram corados pela adição de 25 µL de solução de 1 mg/ mL de iodeto de propídeo. O material foi analisado imediatamente após o preparo. Para cada amostra, 10 mil núcleos foram avaliados utilizando-se escala logarítmica.

A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), os histogramas foram obtidos com o software Cell Quest e analisados estatisticamente no software WinMDI ® 2.8.

3.8 Avaliação da integridade do DNA

Para avaliação da manutenção da integridade durante a desidratação, as sementes foram embebidas até os pontos de interesse (2, 8 e 12 horas de embebição e até que fosse atingido 1mm de comprimento radicular nas sementes germinadas), e em seguida foram desidratadas e realizada a extração de DNA. Também foi extraído DNA de sementes não embebidas (controle).

Para extração do DNA foram utilizadas 4 repetições de 25 pontas de radículas, maceradas com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bem fino. O material foi colocado em microtubos contendo 600 µL de tampão de extração (0,6 M NaCl; 0,1 M Tris HCl; 0,04 M EDTA; 2% Sarcosyl; 0,5% SDS; 40% Ureia 12 M; 5% fenol equilibrado) e em seguida agitados em vórtex. Em cada microtubo foi acrescentado 600 µL de fenol-clorofórmio (1:1 v/v), e centrifugou-se por 20 min a 4.000 rpm à 20 °C. O sobrenadante foi coletado, determinado o seu volume, e foi adicionado 80% do volume de isopropanol. O material foi misturado gentilmente por inversão do tubo e deixado em temperatura ambiente por 10 min. Após esta etapa, realizou-se centrifugação por 10 min a 35.000 rpm a 20 °C. A fase aquosa foi descartada, o pélete lavado com etanol 80%, e dissolvido em TE pH 8,0 (10 mM TRIS-HCl e 1 mM EDTA) contendo 10 µg de enzima RNase.

Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop ®). A quantificação permitiu realizar cálculos para equalizar o volume de DNA a ser aplicado no gel de eletroforese. Foi aplicado no gel 15 µL de solução por tratamento.

A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose, corado com brometo de etídio, após 40 minutos de corrida eletroforética a 100W. Utilizou-se o marcador 1Kb PlusDNA Ladder (1 µg/µL). O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento EDAS 290 (Kodak®).

3.9 Análise dos padrões eletroforéticos de proteínas resistentes ao calor

As análises foram realizadas no Laboratório de Análise e de Técnicas Moleculares do Setor de Sementes da UFLA. Para extração foram adotados procedimentos indicados por Blackman et al. (1991). Em cada ponto de interesse foram utilizadas 4 repetições de 25 eixos embrionários de *Anadenanthera*

colubrina (aproximadamente 100 mg). Os eixos foram macerados em cadinho com nitrogênio líquido e antioxidante PVP. Em seguida adicionou-se tampão de extração descrito por Alfenas (1998), na proporção de 10 partes de tampão para 1 de amostra. As amostras foram centrifugadas a 16000x g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante separado e incubado em banho-maria a 85 °C por 10 minutos. Em seguida a centrifugação foi repetida e o sobrenadante recolhido. Aplicou-se o extrato de proteínas resistentes ao calor e o tampão da amostra na canaleta, em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). Em seguida realizou-se a corrida eletroforética, e coloração dos géis utilizando-se solução de Coomassie Blue 0,05% por 12 horas e solução de ácido cítrico para descoloração.

O gel foi colocado sobre transluminador para avaliação das intensidades das bandas e registro fotográfico.

3.10 Extração enzimática (peroxidase)

As análises foram realizadas no Laboratório de Análise e de Técnicas Moleculares do Setor de Sementes da UFLA. Para a extração da enzima peroxidase, foram utilizados 100 mg de radículas por tratamento, as quais foram maceradas em cadinhos contendo nitrogênio líquido e antioxidante PVP. Em seguida foram acrescidos às amostras 300 µL de tampão de extração (Tris-HCl 0,2 M + 0,001% de β-mercaptoetanol pH 8) e tampão fosfato. As amostras foram mantidas em temperatura de 4 °C durante 12 horas e depois centrifugadas a 14.000 rpm. durante 30 minutos a 4 °C.

Após a extração foi realizada a corrida eletroforética, em sistema descontínuo (7,5% gel de separação e 4,5% gel de concentração) a 4 °C e 120 V, por 6 horas. O tampão gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8.9.

O gel foi revelado seguindo as prescrições de Tanksley e Orton (1983), e a avaliação realizada sobre transluminador, sendo observada a presença e intensidade das bandas.

3.11 Análise dos dados

Em todos os experimentos utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado.

Os dados coletados tiveram a normalidade testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Dados qualitativos tiveram as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade e aos dados quantitativos foi aplicada análise de regressão ou correlação.

O teste de média foi realizado no programa Sisvar 5.3; as demais análises foram realizadas com o auxílio do programa Sigma Plot versão 12.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do lote e curva de embebição

As sementes recém coletadas apresentaram teor de água de 10%. A secagem prévia ao armazenamento reduziu o grau de umidade para aproximadamente 8%. Estes valores estão de acordo com os esperados para espécies classificadas como ortodoxas, visto que segundo Carvalho et al. (2006) sementes de angico são classificadas como tal. De acordo com Roberts (1973) sementes ortodoxas são dispersas com teores de água entre 10 e 12 %.

O peso de mil sementes de *Anadenanthera colubrina* foi de 121 gramas, o que equivale à 8250 sementes por quilograma. Em estudos com a mesma espécie, Nery (2008), relatou o peso de mil sementes próximo a 120 gramas, o

que corresponderia a $\cong 8333$ sementes por quilograma. O peso das sementes pode

variar de acordo com o grau de umidade, com as características genéticas das plantas matrizes, com as condições ambientais predominantes durante a formação e o estágio de maturação das sementes (GENTIL; FERREIRA, 2002).

O padrão de hidratação de sementes de *Anadenanthera colubrina* é apresentado na Figura 2. A curva de embebição de sementes de *Anadenanthera colubrina* não apresentou Fase II bem definida. O processo germinativo foi caracterizado por rápida absorção de água e protrusão radicular, uma vez que a fase III do processo germinativo é atingida em menos de 24 horas. A rápida absorção de água pode ser um indicativo de ausência de dormência para essa espécie.

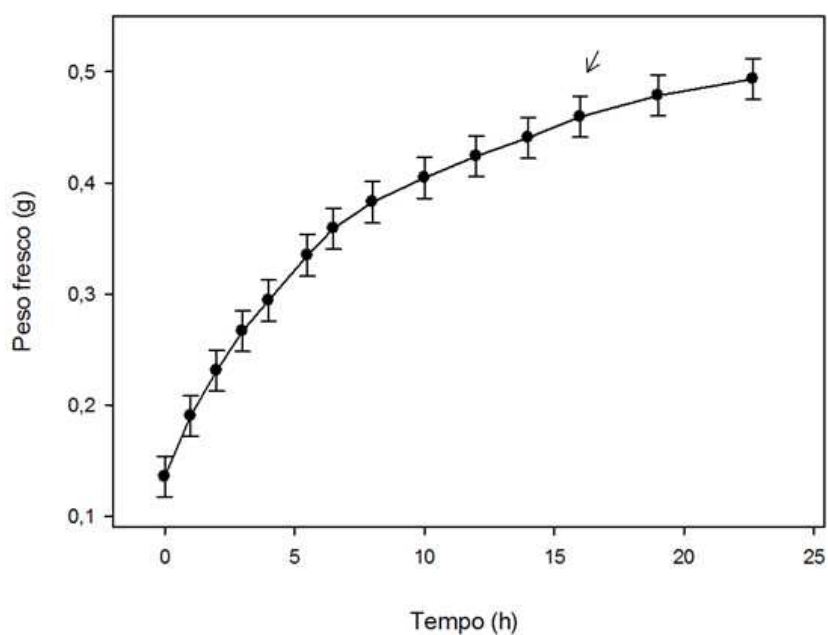


Figura 2 Padrão de hidratação de sementes de *Anadenanthera colubrina*

Nota: Seta indica momento em que mais de 50% das sementes apresentam protrusão radicular. Cada ponto no gráfico representa a média de 23 sementes.

Semelhante padrão de hidratação foi encontrado por Nery (2008) em estudos com 2 diferentes lotes de angico. Neste trabalho 50% das sementes apresentavam protrusão radicular de ± 2 mm, no intervalo de 18 a 20 horas. Além disso, não foi relatada estabilização do peso fresco durante a fase II.

Segundo Parsons (2012) espécies que apresentam rápida germinação (até 24 horas) normalmente apresentam o tegumento fino e permeável, os quais embebem água prontamente. O autor também afirma que a rápida germinação

pode ser um tipo de estratégia para melhor aproveitamento de condições favoráveis temporárias. Portanto, esta característica pode significar uma vantagem adaptativa da espécie *Anadenanthera colubrina* na colonização de ambientes.

Após caracterização da curva de embebição, os pontos de interesse escolhidos para avaliação da perda da tolerância à dessecação foram: 0, 2, 8, 12 e sementes germinadas com raiz primária de 1 mm (aproximadamente 18 horas de embebição).

4.2 Curvas de secagem e perda da tolerância à dessecação

Após diferentes períodos de hidratação, as sementes foram mantidas em ambiente de secagem por 72 horas, onde a maioria atingiu grau de umidade próximo ao inicial (8%). Ao contrário do que era de se esperar, sementes germinadas com 1 mm de comprimento radicular apresentaram perda de água menos acentuada, e atingiram grau de umidade próximo a 20%. A curva de secagem das sementes germinadas (com 1 mm de radícula) foi realizada 3 vezes e o mesmo padrão foi observado (Figura 3). Este comportamento pode ser indicativo de alguma estratégia fisiológica das plântulas (e não mais das sementes) para evitar a perda de água.

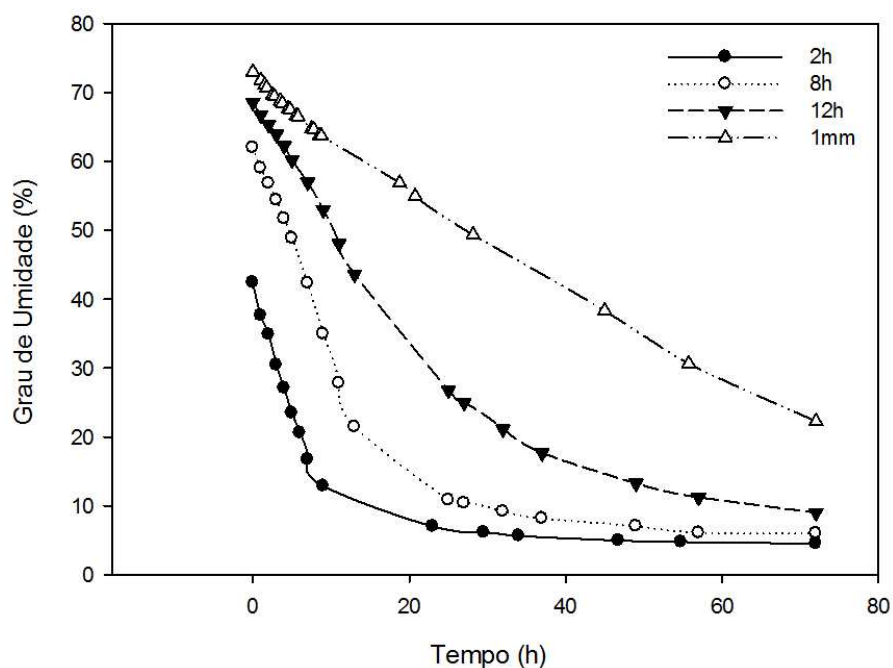
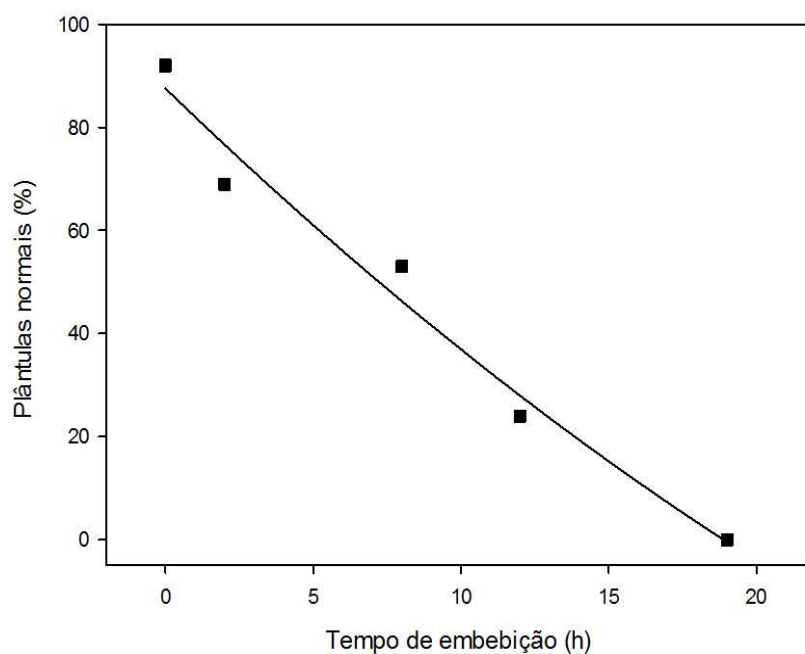


Figura 3 Curvas de secagem de sementes de *Anadenanthera colubrina* em diferentes pontos da germinação

Testes preliminares permitiram observar que teores de água $\leq 20\%$ foram letais para sementes germinadas com radículas de 1mm, por isso as curvas de secagem e testes de tolerância á dessecação foram realizados apenas até este ponto.

Na figura 4 são apresentados os dados de sobrevivência (formação de plântulas normais) de sementes de *A. colubrina* após embebição por 2, 8, 12 e aproximadamente 18 horas, seguida de desidratação por 72 horas.



$$Y_{\text{dessecação}} = 87,5752 - 5,5465x + 0,0480 x^2$$

$$R^2 = 0,9867$$

Figura 4 Perda da tolerância à dessecação em sementes de *Anadenanthera colubrina* expressas pelo percentual de formação de plântulas normais

Nota: As sementes foram embebidas por 2, 8, 12 e aproximadamente 18 horas, desidratadas durante 72 horas e reidratadas.

Os valores de porcentagem de formação de plântulas apresentaram correlação negativa com os tempos de embebição ($r = -0,985$). O avanço no tempo de embebição foi acompanhado por uma redução na porcentagem de formação de plântulas normais após desidratação e reidratação.

O resultado encontrado está de acordo com a proposição de Bewley e Black (1994), de que a tolerância à dessecação é perdida gradualmente durante o

processo germinativo, chegando a ser nula na fase III. Embora alguns trabalhos confirmem esta proposição, sabe-se que há variações em relação ao momento no qual esta é perdida. Em estudos da perda da tolerância à dessecação com diversas espécies agrícolas Lin, Yen e Chien (1998), observaram que sementes germinadas de tomate, quiabo ervilha tornaram-se sensíveis à secagem quando foram atingidos comprimentos radiculares de 2, 1 e 0,5 mm respectivamente.

Em estudos com 2 espécies florestais, Masetto (2008) observou que *Sesbania virgata* não tolera a desidratação quando atinge 2 mm de comprimento radicular. Por outro lado *Cedrela fissilis* mostrou-se mais sensível à dessecação, visto que não tolerou a secagem em nenhum comprimento radicular testado.

Diferentes intensidades de secagem (70,50 e 30% da umidade inicial) realizadas em cada ponto de interesse permitiram observar alguns aspectos críticos da tolerância à dessecação. Em sementes com 1mm de radícula, mesmo com desidratação até 70% do grau de umidade inicial (G.U.= 45%), o percentual de formação de plântulas normais caiu pela metade. Sementes com 12 horas de embebição mantiveram alta percentagem de sobrevivência (84%) até grau de umidade de 35% e a partir desse ponto houve grande queda na formação de plântulas normais (Figura 5).

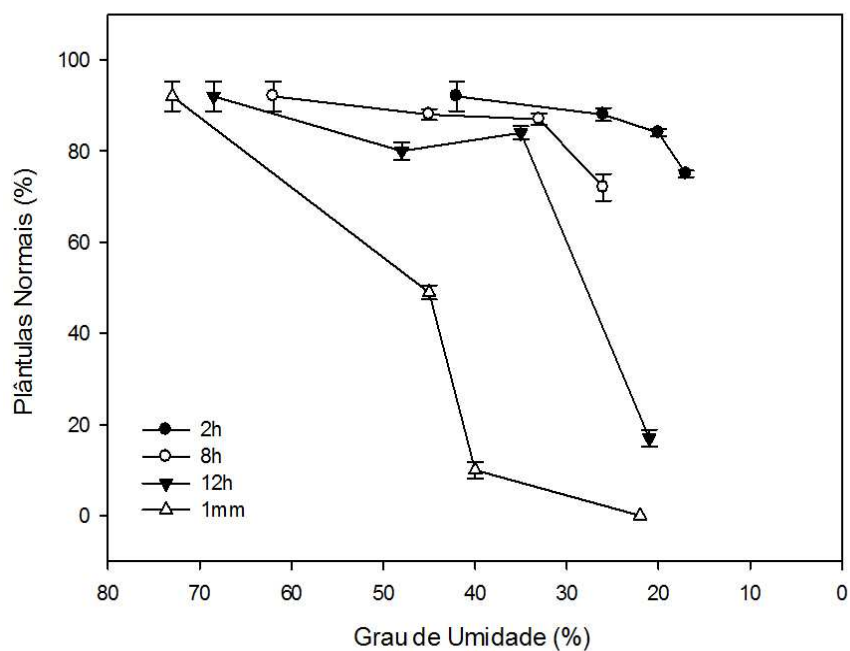


Figura 5 Avaliação da sobrevivência de sementes de *A. colubrina* após a embebição em diferentes tempos seguida de diferentes intensidades de secagem

Nota: O primeiro ponto de cada curva representa a porcentagem de formação de plântulas normais quando não há desidratação. O segundo ponto representa a sobrevivência após desidratação até 70% do grau de umidade do primeiro ponto. O terceiro ponto corresponde à sobrevivência após desidratação até 50% do grau de umidade do primeiro ponto, e o último ponto de cada curva representa a sobrevivência após redução para 30% do grau de umidade do primeiro ponto.

Quedas na sobrevivência para teores de água maiores que 20% assemelham-se ao comportamento observado em estudos com a tolerância à dessecação de sementes recalcitrantes. Ao trabalhar com *Eugenia stipitata*, espécie sensível à dessecação, Gentil e Ferreira (1999) observaram que a viabilidade foi afetada pela redução do teor de água entre 58,8% e 47,1%, e

houve perda total do lote com níveis iguais ou inferiores a 25,8% de água. Em estudos com *Eugenia uniflora* e *Eugenia pyriforme*, Delgado (2006) também observou perda da viabilidade para valores de grau de umidade menores ou iguais a 32,5% e 39,8%, respectivamente.

Conforme mencionado anteriormente, durante o processo germinativo os mecanismos que conferem tolerância à dessecação vão sendo gradativamente desativados, de modo que a protrusão radicular, marca em geral a perda da tolerância a dessecação para grande parte das espécies estudadas. Entretanto, em algumas espécies a perda da tolerância à dessecação pode ser anterior a protrusão radicular, como é o caso da espécie estudada.

4.3 Avaliação do conteúdo de DNA

Células da ponta da radícula de embriões de *A. colubrina* em diferentes pontos da germinação e em sementes não embebidas (controle) apresentaram núcleos com conteúdo de DNA 2C, 4C, 8C e 16C (Figura 6). A presença de células somáticas com ploidias diferentes no mesmo órgão, a polissomatia, é consequência do processo de endoreduplicação, ou seja, da passagem dos núcleos por ciclos repetidos de replicação do DNA sem que ocorra a divisão celular (NAGL, 1976).

O ciclo celular é dividido nas fases G1, S, G2 e M. A fase G1 apresenta conteúdo de DNA nuclear 2C, a fase S constitui a fase de replicação do DNA e a fase G2 apresenta conteúdo de DNA 4C. A constante C denota o conteúdo de DNA para a condição haploide. Células que apresentam endoreduplicação replicam o DNA sem que haja divisão celular. Ao invés da mitose convencional, estas células apresentam endociclos, os quais possuem as fases S, G1 e G2, mas não apresentam mitose (EDGAR;ORR-WEAVER, 2001).

Foi observada maior porcentagem de núcleos 2C ao longo da embebição, seguidos de 4C, 8C e 16C (Figura 7). Com exceção da porcentagem de núcleos 16C, a qual se manteve constante, as demais porcentagens foram reduzidas durante a germinação. Foi verificado um número muito grande de núcleos na fase S, chegando a quase 50% em pontas de radículas secas.

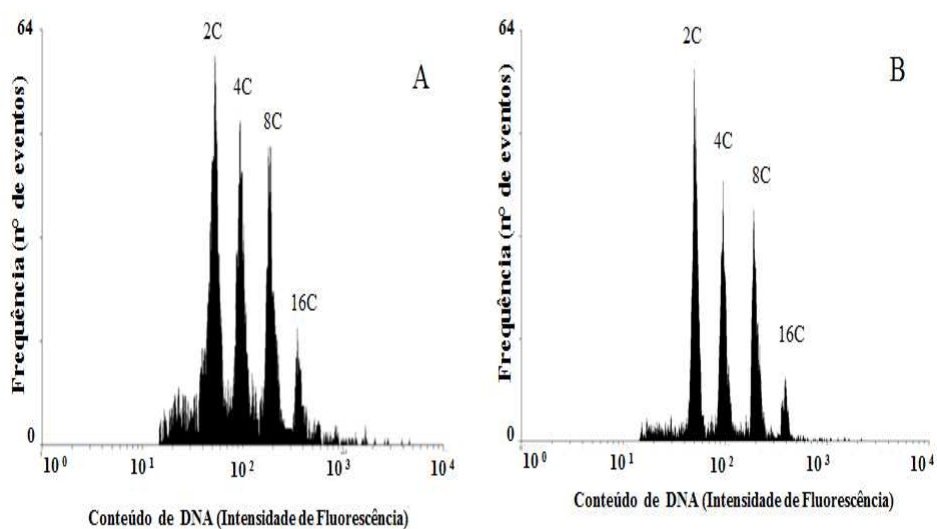
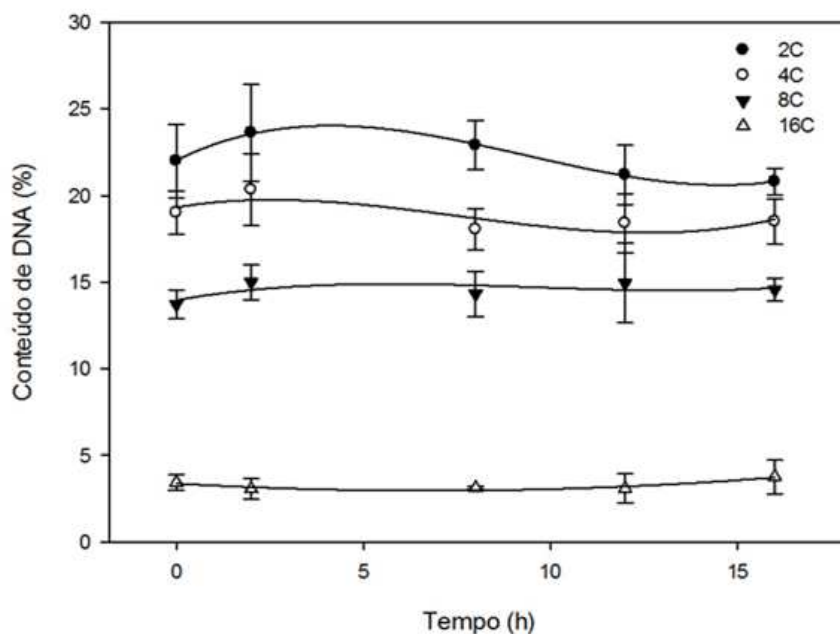


Figura 6 Histogramas de citometria de fluxo demonstrando o conteúdo de DNA nuclear em radículas de sementes de *Adenantha colubrina* antes e após a germinação

Nota: A. Sementes frescas. B. Raízes com 1 mm de comprimento.



$$Y_{2C} = 22,0365 + 1,0729 x - 0,1671 x^2 + 0,0060 x^3 \quad R^2 = 0,9987$$

$$Y_{4C} = 19,3248 + 0,3605 x - 0,0847 x^2 + 0,0037 x^3 \quad R^2 = 0,7959$$

$$Y_{8C} = 13,9677 + 0,3797 x - 0,0473 x^2 + 0,0016 x^3 \quad R^2 = 0,7589$$

$$Y_{16C} = 3,3732 - 0,1223 x + 0,0090 x^2 \quad R^2 = 0,9307$$

Figura 7 Variação do conteúdo de DNA nuclear em radículas de eixos embrionários de *Adenanthera colubrina* em diferentes tempos da germinação

Em sementes, a endorreducação é um evento comum durante o desenvolvimento, presente em células do embrião e do endosperma. Existem várias hipóteses a respeito da finalidade da endorreducação, uma delas seria que o aumento do conteúdo de DNA seja útil para suprir a grande demanda de proteínas durante a embriogênese (LEE; DAVIDSON; DURONIO, 2009). O

aumento no número de fitas moldes permitiria que atividades de transcrição e tradução aumentassem proporcionalmente a cada duplicação do genoma. Outra hipótese seria que devido à endorreduplicação ser mais frequente em tecidos de armazenamento das sementes, ela possa ser um mecanismo de armazenamento de nucleotídeos ou de nitrogênio no embrião. Apesar das hipóteses, ainda se sabe pouco a respeito desse mecanismo (LARKINS et al., 2001).

Alguns trabalhos têm relatado a ocorrência de endorreduplicação também durante o processo germinativo. Em sementes de *Beta vulgaris* L. e *Brassica oleracea* verificou-se que antes da ocorrência da divisão celular, as células passaram por ciclos de endorreduplicação, de modo que ocorreu um aumento no conteúdo de núcleos 8C e 16C (SLIWINSKA, 2009).

Em células que não apresentam endorreduplicação, a proporção de núcleos 4C/2C no embrião tem sido utilizada como um marcador de vigor, na maturação e na germinação das sementes (SLIWINSKA, 2009). Tal proporção diminui durante a maturação e aumenta no final da segunda fase de germinação. Isto só é possível porque células 2C (fase G1) são mais resistentes a estresses e possuem maior longevidade, quando comparadas a células 4C (fase G2) (SARACCO et al., 1995). Além disso, a passagem de um estado tolerante para um estado sensível à dessecação em sementes ortodoxas coincide com a entrada das células na fase G2, podendo ser uma das causas da sensibilidade à dessecação (BOUBRIAK et al., 2000).

Em espécies polissomáticas a replicação do DNA mostra um perfil diferente, portanto a presença de células embrionárias com conteúdos de DNA 8C e 16C torna necessário utilizar outro marcador para estabelecer o estado fisiológico de uma semente polissomática em relação à tolerância à dessecação.

4.4 Manutenção da integridade do DNA

A manutenção da integridade genética do ácido desoxirribonucleico (DNA) é considerada um requisito fundamental para tolerância à dessecação (OSBORNE; BOUBRIAK, 1994). A desidratação induz a formação de radicais livres, os quais podem atuar como sinalizadores no processo de morte celular programada, ou causar danos celulares e ao material genético na morte passiva (KRANNER et al., 2010).

A morte celular programada (MCP) constitui uma cascata de eventos que culmina na clivagem do DNA por endonucleases em sítios internucleossômicos. Este padrão de degradação pode ser identificado em gel de agarose, pela formação de escada ou “laddering” de DNA (STEIN; HANSEN, 1999).

No presente estudo, sementes de *Anadenanthera colubrina* perderam totalmente a tolerância à dessecação após a protrusão radicular, quando a radícula atingiu 1 mm de comprimento. Entretanto, apesar da perda de viabilidade, a integridade do DNA foi mantida (Figura 8). Este resultado pode ser devido à ocorrência de morte passiva ou necrose. A necrose geralmente ocorre em resposta à injúria severa às células e é caracterizada pela perda de integridade da membrana plasmática, floculação da cromatina, inchaço seguido de lise celular com extravasamento do conteúdo intracelular e desintegração de organelas (CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002). Na morte passiva a degradação do DNA nem sempre ocorre. Além disso, alguns autores como Walters et al. (2007) tem demonstrado ser possível a extração de DNA íntegro de sementes não viáveis ou envelhecidas.

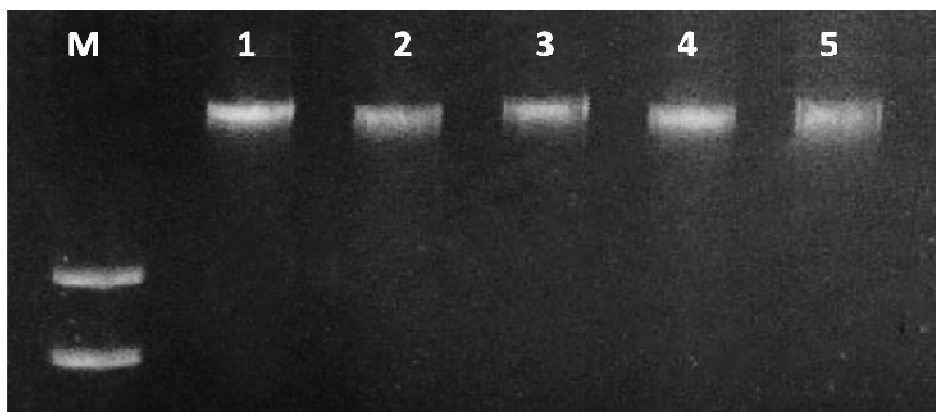


Figura 8 Gel de agarose 1% com DNA genômico extraído em diferentes pontos da germinação e após a desidratação. (1) Controle (sementes não embebidas); Sementes embebidas por (2) 2 horas e em seguida desidratadas (3) por 8 horas e em seguida desidratadas; (4) 12 horas e em seguida desidratadas; (5) sementes germinadas com 1 mm de comprimento radicular e desidratadas; (M) marcador molecular

A manutenção da integridade do DNA durante a perda da tolerância à dessecação também tem sido relatada por outros autores. Em estudos com *Leucaena leucocephala* e *Sesbania virgata*, foi verificado que a perda da tolerância à dessecação de sementes germinadas não foi acompanhada da perda da integridade do DNA (COSTA, 2011; OLIVEIRA, 2009).

4.5 Análise ultraestrutural

Nas Figuras 9 e 10, são apresentadas eletromicrografias de varredura e transmissão de pontas de radículas de sementes de *Anadenanthera colubrina* na condição de armazenamento, embebidas, e embebidas e desidratadas por 27 horas. No início do processo germinativo (embebição por 2 horas) as células do meristema radicular apresentavam-se uniformes (Figura 9 a), a plasmalema

estava íntegra e bem aderida à parede celular. Foram observadas numerosas e pequenas vesículas (Figura 10a), denominadas pré-vacúolos por Sargent, Mandi e Osborne (1981).

A embebição por 2 horas, seguida de desidratação, induziu a vacuolização. Acredita-se que tenha ocorrido a fusão das vesículas (pré-vacúolos) presentes antes da desidratação, dando origem aos vacúolos, formados após a secagem. Além disso, a desidratação após 2 horas de embebição resultou em aspecto irregular das paredes celulares, padrão também observado em células de sementes após a dispersão (Figura 9 e), indicando que tal conformação possa ser apenas um efeito físico da desidratação.

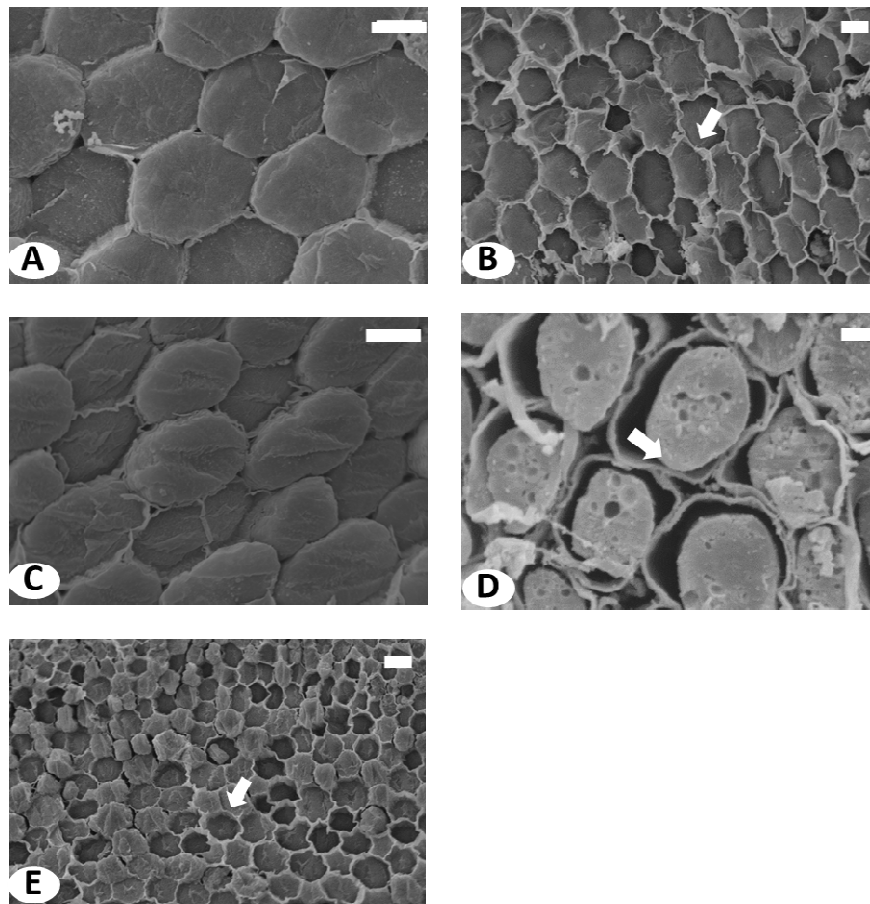


Figura 9 Eletromicrografias de varredura de células radiculares de eixos embrionários de *Anadenanthera colubrina*

Nota: (A) Após 2 horas de embebição; (B) Após 2 horas de embebição e posterior desidratação; (C) Sementes germinadas (radículas com 1 mm de comprimento) (D) Sementes germinadas (radículas com 1 mm de comprimento) e desidratadas (E). Barras: A, B, C, E = 10 μm ; D = 2 μm . Setas indicam irregularidades da parede celular (B, E) e descolamento do conteúdo celular da parede.

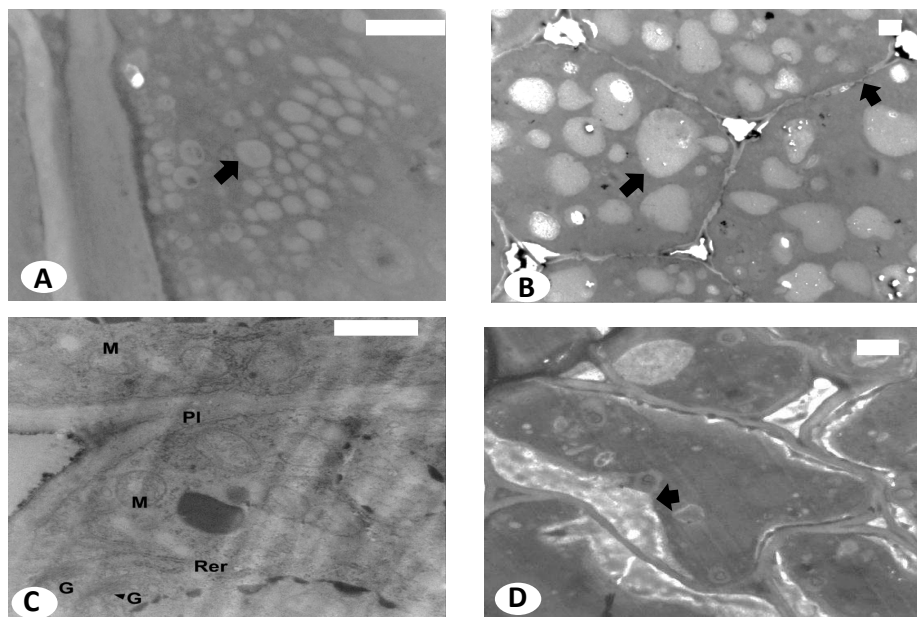


Figura 10 Eletromicrografias de transmissão de células radiculares de eixos embrionários de *Anadenanthera colubrina*

Nota: (A) Após 2 horas de embebição; (B) Após 2 horas de embebição e posterior desidratação; (C) Após germinação (radículas com 1mm de comprimento) (D) Sementes germinadas (com 1mm de comprimento radicular) e desidratadas. Seta indica pré- vacúolos (A), vacúolos (B) e o descolamento da membrana plasmática (D) Barras = 1 μ m.

Os vacúolos são compartimentos exclusivos de células vegetais, e podem ser classificados como vacúolos de armazenamento ou vacúolos líticos. Em sementes, os primeiros acumulam proteínas utilizadas na germinação e crescimento inicial de plântulas. Já os vacúolos líticos possuem enzimas hidrolíticas que degradam materiais celulares desnecessários. Situações de estresse podem induzir a formação ou o aumento da atividade de vacúolos líticos

a fim de remover organelas danificadas ou redundantes e outros materiais da matriz celular (HARA-NISHIMURA; HATSUGAI, 2011).

A vacuolização durante a secagem tem sido constatada por diversos autores. Em estudos com *Avicennia marina*, Berjak, Dini e Pammenter (1984) verificaram que uma leve desidratação inicial estimulou o aumento do número de vacúolos.

Células de sementes com radículas de 1mm, apresentaram-se túrgidas, uniformes (Figura 9 C) e com intensa atividade metabólica (Figura 10 C). Foram visualizado retículos endoplasmáticos rugosos, mitocôndrias e complexos de Golgi. Estes últimos são marcadores ultraestruturais de intensa atividade intracelular. Estas organelas são responsáveis pelo metabolismo de carboidratos, processamento de glicoproteínas e elaboração de moléculas da parede celular, como pectina, e precursores da celulose e lignina (BERJAK; PAMMENTER, 2000).

A desidratação de sementes germinadas resultou em grande desestruturação culminando em colapso celular. Devido à intensa perda de água, houve o desprendimento do plasmalema da parede celular e não foi possível a identificação das organelas (Figuras 9 D e 10 D).

As características ultraestruturais observadas em radículas de 1mm de *A. colubrina* embebidas e dessecadas assemelharam-se às observadas em sementes recalcitrantes antes e depois da dessecação (BERJAK; PAMMENTER, 2000). Em estudos com a espécie recalcitrante *Trichilia emetica*, Kioko; Berjak e Pammenter (2006) encontraram em sementes recém dispersas células com grandes vacúolos, várias organelas bem desenvolvidas distribuídas pelo citoplasma e polissomos. Após a secagem mais severa, as células tiveram a ultraestrutura completamente perturbada, não sendo possível a identificação de organelas.

4.6 Proteínas resistentes ao calor

O padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor ao longo da germinação de sementes de *A. colubrina* é apresentado na Figura 11.

É possível observar a presença de PRCs durante todo o processo germinativo. Sementes germinadas (1mm de radícula) apresentaram bandas pouco intensas para todos os grupos de proteínas resistentes ao calor.

Cinco frações de diferentes pesos moleculares se destacam no gel, as quais consistem de aproximadamente 100, entre 70 e 80, 60, 50 e 45 kDa. As PRCs podem ser classificadas em seis classes distintas, de acordo com os pesos moleculares, a saber: PRC100, PRC90, PRC70, PRC60, proteínas de baixo peso molecular (17-30 kDa) e ubiquitinas (8,5kDa) (VIERLING, 1991; WATERS; LEE; VIERLING, 1996). Proteínas de alto peso molecular apresentam grande similaridade em suas sequências, no entanto, exibem grandes diferenças funcionais e de localização celular (VIERLING, 1991).

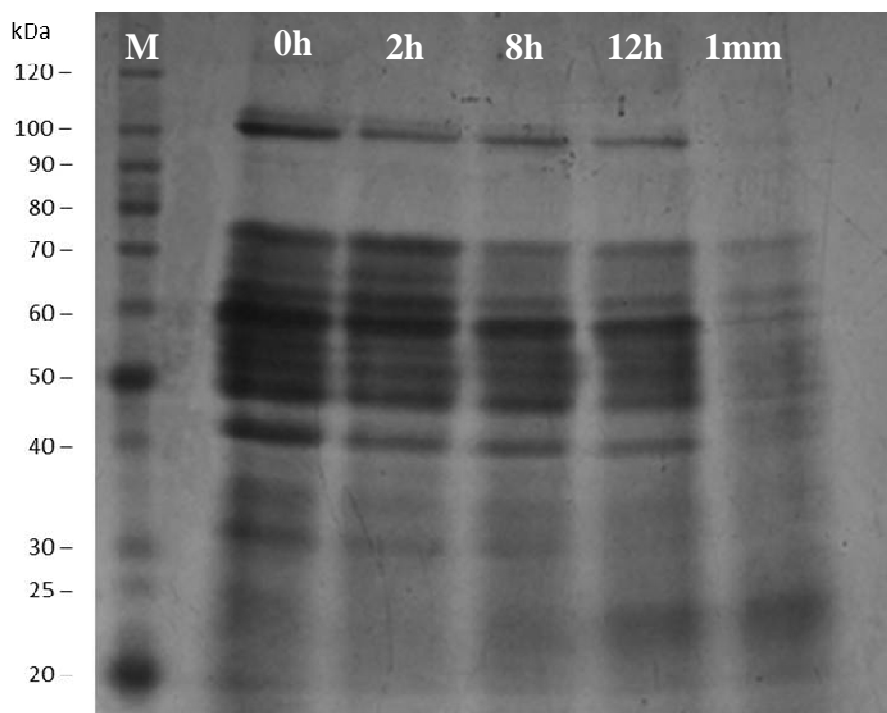


Figura 11 Padrão eletroforético das PRCs de radículas de sementes de *Anadenanthera colubrina* em diferentes tempos de embebição

Nota: (M) Marcador; (0 h) Sementes secas. (2-12 h) Sementes embebidas por 2, 8 e 12 horas; (1 mm) Sementes germinadas com radículas de 1 mm.

Proteínas da família PRC100 atuam na proteção à desnaturação e agregação de proteínas (WANG et al., 2004). O papel principal das PRC70 está relacionado à condições de estresse, sendo encontradas dentro do citoplasma, mitocôndrias, núcleos, retículo endoplasmático e cloroplastos. (HENDRICK; HARTL, 1993). A super expressão deste grupo proteico induz tolerância à estresses ambientais (WANG et al., 2004). A classe das PRC60 ajuda no dobramento de proteínas e montagem de subunidades.

Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Soares (2012), em estudos da tolerância à dessecação durante a germinação de sementes de *Anadenanthera pavonina*. A autora observou a presença de PRCs90, PRCs60 e pPRCs. Além disso, a redução gradual de PRCs,coincidiu com o aumento da sensibilidade à dessecação. Em estudos com *Sesbania virgata*, Costa, (2011) também relatou maior conteúdo de proteínas resistentes ao calor em fases tolerantes à dessecação de plântulas.

Este resultado dá créditos a hipótese de que mecanismos de proteção durante a dessecação, tais como a presença de proteínas resistentes ao calor são de grande importância para a manutenção da tolerância à dessecação. As PRCS atuam como chaperonas, portanto, auxiliam na manutenção da integridade das estruturas celulares.

4.7 Peroxidase

O perfil eletroforético da enzima peroxidase ao longo da germinação, é apresentado na Figura 12.

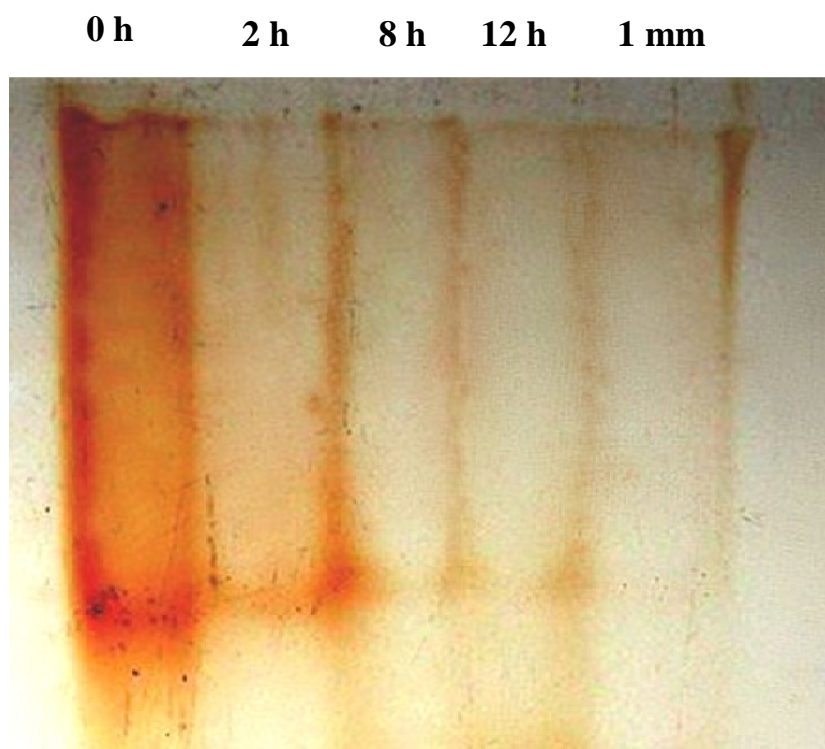


Figura 12 Padrão eletroforético da enzima peroxidase de radículas de sementes de *Anadenanthera colubrina*. em diferentes tempos de embebição: (0 h) Sementes secas. (2-12 h) Sementes embebidas por 2, 8 e 12 horas; (1 mm) Sementes germinadas com radículas de 1 mm

Houve uma acentuada redução no conteúdo de peroxidase logo nas 2 primeiras horas de embebição, e observa-se tendência uma redução mais discreta a partir daí.

A enzima peroxidase desempenha um papel crítico no metabolismo das sementes, e de acordo com Bewley e Black (1994), a redução da atividade dessa enzima proporciona maior exposição dos sistemas de membranas à ação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Portanto, a queda observada no conteúdo

dessa enzima remete à uma redução do sistema de proteção, e maior sensibilidade à estresses, tal como a dessecação.

Em estudos com sementes de soja, Senaratna, McKersie e Stinson, (1985), observaram que sementes embebidas por 6 horas, e ainda tolerantes à dessecação, apresentavam maior conteúdo de antioxidantes do que aquelas embebidas durante 36 horas e já sensíveis à dessecação.

Em sementes de *Phaseolous vulgaris* processo de aquisição da tolerância à dessecação coincidiu com o aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase e ascorbato peroxidase e, ao final do processo, houve aumento da atividade da catalase (BAILLY et al., 2001). Em sementes de milho, a perda da tolerância à dessecação ao longo da germinação foi relacionada com o aumento de espécies reativas de oxigênio, sugerindo a perda da eficiência de sistemas protetores na remoção de radicais livres (LEPRINCE; BRONCHART; DELTOUR, 1990).

Em estudos com a espécie recalcitrante *Quercus robur*, Hendry et al. (1992) também verificaram que a perda da viabilidade das sementes durante a secagem estava relacionado com a redução de moléculas protetoras tais como superóxido dismutase, glutathione redutase e ascorbato peroxidase e o aumento da concentração de radicais livres.

5 CONCLUSÕES

Em sementes de *Anadenanthera colubrina* a perda da tolerância à dessecação inicia-se nas primeiras horas de embebição, culminando na perda total após a protrusão radicular e a intensidade da desidratação em cada ponto da embebição influencia a sobrevivência das sementes.

Não foi observada perda da integridade do DNA nem aumento do conteúdo de DNA 4C quando a tolerância à dessecação foi perdida.

A perda da tolerância à dessecação foi acompanhada por completa desorganização ultraestrutural.

A perda da tolerância à dessecação coincidiu com a redução de mecanismos de proteção como proteínas resistentes ao calor e enzima peroxidase.

REFERÊNCIAS

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

ALPERT, P. Constraints of tolerance: why are desiccation tolerant organisms so small or rare? **The Journal of Experimental Biology**, Massachusetts, v. 209, n. 9, p. 1575-84, 2006.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, n. 2, p. 235–241, 1992.

ALVES, E. **Microscopia eletrônica de varredura**. 1. ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2004. 43 p. (Apostila do Curso Introdutório)

BAILLY, C. et al. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 357, p. 701-708, 2001.

BARBEDO, C. J.; MARCOS FILHO, J. Dessecação em sementes. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 145-164, 1998.

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

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

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Progress in the understanding and manipulation of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds. In: ELLIS, R. H. et al. (Ed.). **Basic and applied aspects of seed biology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1997. p. 689–703.

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

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

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

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

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

BOUBRIAK et al., Desiccation and survival in the recalcitrant seeds of *Avicennia marina*: DNA replication, DNA repair and protein synthesis. **Seed Science Research**, Wallington, v. 10, n. 3, p. 307-315, Sept. 2000.

BOUBRIAK, I.; KARGIOLAKI, H.; LYNE, L. O. D. The requirement for DNA repair in desiccation tolerance of germinating embryos. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 7, p. 97-105, 1997.

CACCERE, R. et al. R. Metabolic and structural changes during early maturation of *Inga vera* seeds are consistent with the lack of a desiccation phase. **Journal of Plant Physiology**, Jena, p. 1-10, 2013.

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.

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

COSTA, M. C. D. **Armazenamento de plântulas de *Sesbania virgata***. 2011. 79 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

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

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 265, n. 1, p. 49-72, 2002.

DELGADO, L. F. **Tolerância à dessecação em sementes de espécies brasileiras de *Eugenia***. 2006. 106 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente)-Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, 2006.

DELTOUR, R.; DE BARSY, T. Nucleolar activation and vacuolation in embryo radicle cells during early germination. **Journal of Cell Science**, Londres, v. 76, p. 67-83, June 1985.

DEWITTE, W.; MURRAY, J. A. H. The plant cell cycle. **Annual Review of Plant Biology**, London, v. 54, p. 235-264, 2003.

EDGAR, B. A.; ORR-WEAVER, T. L. Endoreplication cell cycles: More for less. *Cell*, Cambridge, v. 105, p. 297-306, 2001.

EL-MAAROUF-BOUTEAU, H. et al. DNA alteration and programmed cell death during ageing of sunflower seed. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 14, p. 5003-11, 2011.

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

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

FRANCHI, G. G. et al. Pollen and seed desiccation tolerance in relation to degree of developmental arrest, dispersal, and survival. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 15, p. 5267-81, 2011.

FUKUDA, H. Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 44, n. 3, p. 245-253, 2000.

GENTIL, D. F. D. O.; FERREIRA, S. A. D. N. Preparação das subamostras, temperatura e período de secagem na determinação do grau de umidade de sementes de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 62-69, 2002.

GENTIL, D. F. O.; FERREIRA, S. A. N. Viabilidade e superação da dormência em sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 29, n.1, p. 21-31, 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.

HARA-NISHIMURA, I.; HATSUGAI, N. The role of vacuole in plant cell death. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 18, n. 8, p. 1298-304, 2011.

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

HENDRY et al. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New Phytology**, London, v. 122, p. 273-279, 1992.

HENDRICK, J. P.; HARTL, F-U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. **Annual Review of Biochemistry**, London, v. 62, p. 349-84, 1993.

ILLIN, G. et al. The signature of seeds in resurrection plants: a molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. **Integrative and Comparative Biology**, Oxford, v. 45, p. 771–787, 2005.

JOSÉ, A. C.; SILVA, E. A. D.; DAVIDE, A. C. Classificação fisiológica de sementes de cinco espécies arbóreas de mata ciliar quanto a tolerância à dessecação e ao armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 171-178, 2007.

KERMODE, A. R.; FINCH-SAVAGE, B. E. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development In: BLACK, M. PRITCHARD, H.M. (Ed.). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford: CABI, 2002. p. 149-184

KIOKO, J. I.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Viability and ultrastructural responses of seeds and embryonic axes of *Trichilia emetica* to different dehydration and storage conditions. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 72, n. 1, p. 167-176, 2006.

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.

KRANNER, I. et al. Inter-nucleosomal DNA fragmentation and loss of RNA integrity during seed ageing. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 63, n. 1, p. 63-72, 2010.

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **The New Phytologist**, Cambridge, v. 188, n. 3, p. 655-73, 2010.

LARKINS, B. A et al. Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 355, p. 183-92, Feb. 2001.

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

LEE, H. O.; DAVIDSON, J. M.; DURONIO, R. J. Endoreplication□: polyploidy with purpose. **Genes & Development**, London, v. 23, p. 2461-2477, 2009.

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

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

LIN, T.; YEN, W.; CHIEN, C. 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.

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

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

MARQUES, M. A. **Secagem e armazenamento de sementes de *Anadenanthera peregrina* e *Anadenanthera colubrina***. 2007. 139 p. Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

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.

NAGL, W. DNA Endoreduplication and polyteny understood as evolutionary strategies. **Nature**, v. 261, p. 614–615, 1976.

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, p. 270-80, 2011.

OLIVEIRA, J. M. **Tolerância à dessecação em sementes de *Leucaena leucocephala* durante a germinação**. 2009. 80 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

OLIVER, M. J.; TUBA, Z.; MISHLER, B. D. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. **Plant Ecology, Dordrecht**, v. 151, n. 1, p. 85-100, 2000.

OSBORNE, D. J.; BOUBRIAK, I. I. DNA and desiccation tolerance. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 2, p. 175-185, June 1994.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Aspects of recalcitrant seed physiology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12, n. p. 56-69, 2000. Edição Especial.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. INVITED REVIEW A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Wallingford, v.9, n.01, p13- 37. 1999.

PAMMENTER, N. W. et al. Why do stored hydrated recalcitrant seeds die? **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 2, p. 187-191, 2008.

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

PORTIS, E. et al. Molecular and physiological markers during seed development of peppers (*Capsicum annuum* L.): DNA replication and β tubulin synthesis. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, p.85-90, 1999.

PUKACKA, S.; RATAJCZAK, E. Antioxidative response of ascorbate-glutathione pathway enzymes and metabolites to desiccation of recalcitrant *Acer saccharinum* seeds. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 163, n. 12, p. 1259-1266, 2006.

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

VÁZQUEZ-RAMOS, J. M.; SÁNCHEZ, M. D. L. P. The cell cycle and seed germination. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 13, n. 2, p. 113-130, 2003.

SARACCO, F. et al. Influence of priming-induced nuclear replication activity on storability of pepper (*Capsicum annuum* L.) seed. **Seed Science Research**, Wallington, v. 5, n. 1, p. 25-29, Mar. 1995.

SARGENT, J. A.; MANDI, S. S.; OSBORNE, D. J. The loss of desiccation tolerance during germination: an ultrastructure and Biochemical approach. **Protoplasma**, New York, v. 105, p. 225-239, 1981.

SEN, S.; OSBORNE, D. J. Germination of rye embryos following hydration-dehydration treatments: enhancement of protein and RNA synthesis and earlier induction of DNA replication. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 25, p. 1010-1019, 1974.

SENARATNA, T.; MCKERSIE, B. D.; STINSON, R. H. Antioxidant Levels in Germinating Soybean Seed Axes in relation to Free Radical and Dehydration Tolerance. **Plant Physiology**, v. 78, p. 168-171, 1985.

SHIH, M. D. E. R.; HOEKSTRA, F. A.; HSING, Y. U. E. I. E. C. Late embryogenesis abundant proteins. *Advances in Botanical Research*, London, v. 48, n. 8, p. 2296, 2008.

SILVA, E. A. A et al. ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. **Annals of Botany**, London, v. 102, n. 3, p. 425-433, 2008.

SLIWINSKA, E. Nuclear DNA replication and seed quality. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 19, n. 1, p. 15, 2009.

SOARES, G. C. M. **Perda da tolerância à dessecação em sementes de tentacarina (*Adenantha pavonina* L.) durante a germinação.** 2012. 55 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

STEIN, J. C.; HANSEN, G. Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells. **Plant Physiology**, London, v. 121, p. 71-79, 1999.

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.

TANG, W. Peroxidase activity of desiccation-tolerant loblolly pine somatic embryos. **In Vitro Cellular e Developmental Biology Plant**, Columbia, v. 36, n. 6, p. 488-491, 2000.

TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. **Isozymes: developments in plant genetic and breeding.** New York: Elsevier, 1983. 516 p.

VICRÉ, M.; FARRANT, J. M.; DRIOUICH, A. Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species. **Plant, Cell and Environment**, Dordrecht, v. 27, p. 1329-1340, 2004.

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.

WALTERS, C. et al. The utility of aged seeds in DNA banks. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 16, n. 3, p. 169-178, Feb. 2007.

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. 296, p. 325-338, 1996.

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

WANG, W. et al. Role of plant heat shock proteins and molecular chaperons in the abiotic stress response. **Trends Plant Science**, London, v. 9, p. 1360-1385, 2004.

WANG, W.-Q. et al. The role of recovery of mitochondrial structure and function in desiccation tolerance of pea seeds. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 144, n. 1, p. 20-34, 2012.

WEHMEYER, N.; VIERLING, E. The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 4, p. 1099-108, 2000.

WEN, B. Cytological and physiological changes related to cryotolerance in recalcitrant *Livistona chinensis* embryos during seed development. **Protoplasma**, New York, v. 248, n. 3, p. 483-91, July 2011.

WESLEY-SMITH, J. The Effects of two drying rates on the desiccation tolerance of embryonic axes of recalcitrant jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) seeds. **Annals of Botany**, Londres, v. 88, n. 4, p. 653-664, Oct. 2001.