

**GERMINAÇÃO E RE-INDUÇÃO DE
TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM
SEMENTES GERMINADAS DE *Tabebuia
impetiginosa* E *Alliaria petiolata***

CARLOS VINICIO VIEIRA

2008

CARLOS VINICIO VIEIRA

**GERMINAÇÃO E RE-INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO
EM SEMENTES GERMINADAS DE *Tabebuia impetiginosa* E *Alliaria
petiolata***

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

Orientador

Prof. Dr. Amauri Alves Alvarenga

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

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

Vieira, Carlos Vinício.

Germinação e re-indução de tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Tabebuia impetiginosa* e *Alliaria petiolata* / Carlos Vinício Vieira -- Lavras : UFLA, 2008.

98 p. : il.

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

Orientador: Amauri Alves de Alvarenga

Bibliografia.

1. Tolerância à dessecação. 2. Ipê roxo. 3. Expressão gênica. 4. Germinação. 5. Secagem lenta. 6. Fitohormônio. 7. *Tabebuia impetiginosa* I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.9562

CARLOS VINICIO VIEIRA

GERMINAÇÃO E RE-INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM
SEMENTES GERMINADAS DE *Tabebuia impetiginosa* E *Alliaria petiolata*

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

APROVADA em 19 de junho de 2008

Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva	UFLA
Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro	UFLA
Dr. Lisandro Tomas da Silva Bonome	UFLA
Dr. Marcelo Murad Magalhães	EPAMIG

Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

Dedico esta Tese aos meus pais, Baltazar Luiz Vieira e
Maria Aparecida Inácio Vieira, pelo jeito simples e humilde
de viver.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as coisas que têm acontecido na minha vida. Uma delas é a finalização do trabalho de tese. Temos nas mãos ferramentas e pessoas ao lado que nos colocam em locais inacreditáveis; basta sonhar, acreditar, se esforçar. Obrigado por fazer de um sonho a realidade.

Ao Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro, pela oportunidade de, um dia, entrar no seu laboratório e iniciar a carreira científica como bolsista atividade. Fica aqui meu grande agradecimento por essa etapa e também pela orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. Amauri Alves Alvarenga, por ter me recebido como orientado durante os anos de convivência na graduação, no mestrado e no doutorado e, principalmente, pela liberdade na escolha dos trabalhos científicos.

Ao Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, pelas orientações, sugestões, discussões e críticas aos trabalhos. Aqui fica meu grande agradecimento pela oportunidade de fazer o contato e de conhecer o Seed Conservation Department – Kew – (England), onde passei nove meses executando os trabalhos de tese e tive a oportunidade de conhecer profissionais muito dedicados em pesquisas com sementes.

Ao pesquisador Dr. Peter E. Toorop, pela sugestão desse projeto de tese, empenho na orientação e suporte no Seed Conservation Department.

À Universidade Federal de Lavras e ao Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do Mestrado e do Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal.

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

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iv

CAPÍTULO 1:

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 Sementes ortodoxas e recalcitrantes.....	1
1.2 Perda de tolerância à dessecação durante a germinação.....	1
1.3 Descrição das espécies <i>Tabebuia impetiginosa</i> e <i>Alliaria petiolata</i>	2

CAPÍTULO 2:

ESTUDO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Tabebuia impetiginosa</i> : TEMPERATURA ÓTIMA, LUZ, EFEITO DE INIBIDORES DE GIBERELINA (GA) E ÁCIDO ABCSÍSICO (ABA).....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
2.1 Coleta das sementes, localização e primeiros procedimentos.....	14
2.2 Experimentos de germinação.....	15
2.2.1 Temperatura e Luz.....	15
2.3 Inibidores da biossíntese de GA.....	15
2.4 Inibidores da biossíntese de ABA.....	16
3 RESULTADOS.....	17
3.1 Germinação: Temperatura e Luz.....	17
3.2 Inibidores da germinação.....	19
3.2.1 Efeito de paclobutrazol na germinação.....	19

3.2.2 Efeito de tetcyclacis na germinação.....	20
3.2.3 Efeito do fluridona na germinação.....	23
4 DISCUSSÃO.....	25
4.1 Germinação: Temperatura e Luz.....	25
4.2 Germinação: Efeitos dos inibidores da síntese de GA	26
4.3 Efeito do fluridona durante a germinação.....	29
5 CONCLUSÕES.....	31
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

CAPÍTULO 3:

EFEITO DA SECAGEM CONTROLADA NA SOBREVIVÊNCIA DE PLÂNTULAS DE <i>Tabebuia impetiginosa</i> E <i>Alliaria petiolata</i>	36
RESUMO.....	37
ABSTRACT.....	39
1 INTRODUÇÃO.....	41
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1 Local de coleta e beneficiamento das sementes de <i>T. impetiginosa</i> e <i>Alliaria petiolata</i>	43
2.2 Germinação de sementes de <i>T. impetiginosa</i>	43
2.3 Germinação de sementes de <i>Alliaria petiolata</i>	44
2.4 Método de secagem.....	44
2.5 Rehidratação das plântulas após a secagem.....	45
2.6 Secagem das diferentes partes das plântulas (raiz primária, hipocótilo e cotilédones).....	45
3 RESULTADOS.....	46
4 DISCUSSÃO.....	53
5 CONCLUSÕES.....	58
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

CAPÍTULO 4:

THE RE-INDUCTION OF DESICCATION TOLERANCE IN GERMINATED SEEDS OF <i>Tabebuia impetiginosa</i> Mart.....	62
ABSTRACT.....	63
1 INTRODUCTION.....	65
2 MATERIAL AND METHODS.....	67
2.1 Plant material.....	67
2.2 Germination experiments.....	67
2.3 Desiccation methods.....	68
2.3.1 PEG treatment.....	68
2.3.2 ABA treatment.....	69
2.3.3 Cold and heat shock effect.....	70
2.4 Growth and development of seedlings.....	70
2.5 RNA extraction.....	71
2.6 cDNA synthesis.....	72
2.7 PCR reaction.....	72
2.8 Gene expression studies through quantitative real-time PCR reactions.....	73
2.9 Statistical analysis.....	73
3 RESULTS.....	74
3.1 Germination.....	74
3.2 Re-establishment of desiccation tolerance.....	76
3.2.1 Desiccation methods.....	76
3.2.2 Polyethylene glycol treatment.....	77
3.2.3 ABA in combination with polyethylene glycol.....	80
3.2.4 Cold shock and heat shock.....	83
3.3 Growth and development of the seedlings.....	84

3.4 Application of protocol on re-establishment of desiccation tolerance in seedlings of <i>Alliaria petiolata</i> (<i>Brassicaceae</i>).....	86
3.5 Gene expression studies in <i>Tabebuia impetiginosa</i> seedlings.....	86
4 DISCUSSION.....	88
5 CONCLUSIONS.....	93
6 ACKNOWLEDGEMENTS.....	93
7 REFERENCES.....	94
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98

RESUMO

Vieira, Carlos Vinicio. **Germinação e re-indução de tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Tabebuia impetiginosa* e *Alliaria petiolata***. 2008. 98p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a fisiologia da germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa*, capacidade de tolerância à dessecação em plântulas e sua re-indução de tolerância à dessecação quando submetidos a condições de estresse via polietileno glicol (PEG-8000), altas e baixas temperaturas, seguida de secagem controlada. Plântulas de *Alliaria petiolata* também foram utilizadas para testar o protocolo de re-indução de tolerância à dessecação. A primeira etapa do trabalho foi dedicada ao estudo da germinação, em que a melhor temperatura de germinação para *T. impetiginosa* foi encontrada a 30°C, na presença de luz (8/16 horas), iniciando com 24 horas de embebição e chegando a 100% de protrusão em 49 horas. Na condição de escuro a 30°C, o início da germinação foi observado com 38 horas de embebição, atingindo 100% com 67 horas. Na identificação dos fatores determinantes para a germinação, mesmo usando elevadas concentrações de inibidores da síntese de giberelinas, paclobutrazol e tetcyclacis (100µM), a germinação não foi completamente inibida, chegando a 32% de protrusão radicular na presença de paclobutrazol e a 48% quando foi usado tetcyclacis. A presença dos inibidores causou atraso no tempo para iniciar a germinação. Quando adicionado o inibidor de acúmulo de ABA fluridone à embebição na presença de luz (8/16 horas), a germinação iniciou-se com 22 horas de embebição, superando os demais tempos. A segunda etapa do estudo foi direcionada para a tolerância à dessecação. Inicialmente, sementes germinadas (plântulas) foram selecionadas quanto ao comprimento da radícula, submetidas à secagem controlada e também separadas nas suas partes (radícula, hipocótilo e cotilédones) para subsequente desidratação. Para isso,

plântulas e partes dissecadas (radícula, hipocótilo e cotilédones) de *Tabebuia impetiginosa* e *Alliaria petiolata* com diferentes comprimentos de radícula sofreram desidratação em ambiente controlado com sílica gel a 20%UR e temperatura regulada em 20°C. Em seguida, foram transferidos para condições ideais de germinação para se observar o restabelecimento do crescimento da radícula (taxa de sobrevivência). Plântulas de *T. impetiginosa*, nos comprimentos de radícula de 1,0 e 2,0mm, apresentaram restabelecimento da tolerância à dessecação com taxas de sobrevivência de 80% e 50%, respectivamente. Para as plântulas de *Alliaria petiolata*, os comprimentos de radícula de 0,5; 1,0 e 1,5mm tiveram taxa de sobrevivência de 57,6%, 43% e 14,8%, respectivamente. A desidratação nas diferentes partes das plântulas revelou que a radícula sofre remoção da água em um tempo mais curto, quando comparada com regiões de hipocótilo e cotilédones. A terceira etapa foi direcionada em função da presença de sensibilidade à dessecação, ou seja, a não capacidade de as sementes sobreviverem à dessecação, o que apresenta grave problema para o armazenamento a longo prazo, desde que o armazenamento sob condições úmidas é considerado impossível. Para isso, foram usadas plântulas de *Tabebuia impetiginosa* Mart (Bignoniaceae). Na secagem, foram utilizadas duas taxas, secagem lenta e secagem rápida. Para efeito de reindução de tolerância à dessecação em radículas, foi utilizado polietileno glicol (PEG-8000), na concentração de -1,7MPa. Em paralelo, foi estudada a manipulação do potencial de água por meio de diferentes concentrações de polietileno glicol (-1,4; -1,7 e -2,0MPa). Além desses, também foi estudado o efeito de ABA, de baixas temperaturas e de altas temperaturas após a protrusão da radícula na re-indução de tolerância à dessecação. Os diferentes protocolos utilizados foram benéficos para aumentar a reindução de tolerância à dessecação em plântulas de *T. impetiginosa*. A secagem lenta ocorreu em 30 horas e permitiu subsequente crescimento da radícula; já a secagem rápida ocorreu em 14 horas, porém, nessa

situação, as radículas morreram. Plântulas tratadas com solução de PEG – 1,7MPa apresentaram sobrevivência de radículas de 92%, 74% e 54%, para os comprimentos de radícula de 1,0; 2,0 e 2,5mm, respectivamente. Para o controle, foi encontrada sobrevivência das plântulas em 80% e 54%, nos comprimentos de radícula de 1,0 e 2,0mm, respectivamente. A manipulação do potencial de água a -1,7MPa permitiu a sobrevivência de plântulas com 2,5mm de comprimento. Quando foi adicionado ABA à solução de PEG – 1,7MPa, ocorreu sobrevivência da radícula com 3,0mm de comprimento. O tratamento das plântulas com uma hora de baixas e altas temperaturas, seguido de PEG, permitiu a sobrevivência de radículas com 3,0mm de comprimento. O mesmo protocolo usado para plântulas de *T. impetiginosa* foi aplicado em plântulas de *Alliaria petiolata*, mostrando que, para essa situação, quando usado apenas PEG, foi observada sobrevivência em plântulas com 2,5mm de comprimento. Finalizando, foi feito o estudo da expressão de gene expansina (*TiExp1*) em hipocótilos e radículas de plântulas de *T. impetiginosa*, no qual foi possível observar aumento de expressão no hipocótilo e radícula durante a embebição (antes da protrusão da radícula) e reidratação (pré-umidificação depois da secagem lenta).

***Comitê Orientador:** Dr. Amauri Alves Alvarenga - UFLA (Orientador), Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva – UFLA.

ABSTRACT

Vieira, Carlos Vinicio. **Germination and re-induction of desiccation tolerance in germinated seeds of *Tabebuia impetiginosa* and *Alliaria petiolata***. 2008. 98p. Thesis (Doctor in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*.

The objective of this study was to investigate the physiology of the germination of *Tabebuia impetiginosa* seeds, the seedling's desiccation tolerance and their re-induction to desiccation tolerance after submitted to polyethylene glycol stress (PEG-8000) and high and low temperatures followed by controlled drying. *Alliaria petiolata* seedlings were used as protocol test for drying tolerance.

The first stage of the studies was to investigate the germination in the best temperature conditions for *T. impetiginosa*, which was placed at 30 °C in light presence (8/16), starting after 24 hours of imbibition, reaching 100% of protrusion in 49 hours. Under dark conditions at 30°C, the germination started after 38 hours of imbibition, reaching 100% in 67 hours. Identifying the germination factors, even using elevated concentration of gibberellins inhibitors, paclobutrazol and tetcyclasis (both to 100µM) the germination was not completely inhibited, reaching 32% of protrusion in presence of paclobutrazol and 48% in presence of tetcyclasis. The presence of inhibitors delayed germination onset. When fluridon was added to inhibit ABA accumulation during soaking in the presence of light (8/16h), the germination began after 22 hours of soaking, overcoming all previous times.

The second stage of the study was to evaluate desiccation tolerance. Initially, selected germinated seeds (seedlings) in relation to radicle length, submitted to controlled drying, were also separated in parts (radicle, hypocotyls and cotyledons) for further dehydration. For that, seedlings and dissected parts (radicle, hypocotyls and cotyledons) from *Tabebuia impetiginosa* and *Alliaria*

petiolata with different radicle lengths were submitted to dehydration in controlled environment using silica gel at 20% of relative humidity and temperature set at 20°C, they were then transferred to the best germination conditions to observe the re-establishment of the radicle growth rate (survival). *T. impetiginosa* seedlings with radicle length of 1.0 and 2.0mm, showed re-establishment of the desiccation tolerance with survival rates of 80% and 50% respectively. For *Alliaria petiolata* seedlings with radicle length of 0.5; 1.0 and 1.5mm, a survival rate of 57.6%; 43% and 14.8% was shown respectively. It was observed that dehydration in different parts of the seedling's radicle undergoes water removal in a shorter time compared with hypocotyls and cotyledons.

The third stage was targeted in terms of the presence of sensitivity to desiccation, which means the incapacity of seeds survive desiccation, which causes a serious problem for long term storage since storage, under humid conditions, is considered impossible. For this, *Tabebuia impetiginosa* Mart (Bignoniaceae family) seedlings were used. Samples were exposed to the drying environment, using two rates, slow drying and fast drying. For the desiccation tolerance re-induction in radicles effect, polyethylene glycol (PEG-8000) was used at 1.7MPa concentration. Parallel to this, the potential for manipulation of water through different concentrations of polyethylene glycol (-1.4, -1.7 and -2.0MPa) was studied. Besides these, the ABA effect, cold and heat shock after radicle protrusion in the re-induction of desiccation tolerance was also studied. The protocols applied were effective for the increase of the re-induction of desiccation tolerance in *Tabebuia impetiginosa* seedlings. The slow drying occurred 30 hours after exposition and allowed further growth of the radicle, and fast drying occurred after 14 hours, but in this situation, the radicles died. Seedlings treated with PEG solution at -1.7MPa showed radicle survival of 92%, 74% and 54% for a radicle length of 1.0, 2.0, and 2.5mm respectively. For the control, seedlings survival was found in 80% and 54 % in the radicle lengths of

1.0 and 2.0mm respectively. The manipulation of water potential performed at -1.7MPa allowed the survival of seedling with 2.5mm length. The presence of ABA added to PEG solution, allowed for the survival of radicles with 3.0mm of length.

The same protocol used for *T. impetiginosa* seedlings, was applied to *Alliaria petiolata* seedlings showing that when only PEG was used, survival was observed in seedlings with 2.5mm length.

Finally, the gene expression of expansina (TiExp1) in hypocotyls and radicles of *T. impetiginosa* seedlings and seeds was studied. An increase of expression in hypocotyls and radicle during imbibition (before the radicle protrusion) and re-hydration (pre-humidification after slow drying) was found in this case.

***Guidance Committee:** Dr. Amauri Alves Alvarenga - UFLA (Advisor), Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva – UFLA.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

A grande maioria das sementes é tida como “ortodoxa”. Nelas ocorre tolerância à dessecação como parte pré-programada do estágio final da fase de desenvolvimento. Sementes do tipo ortodoxas sofrem remoção de 90% a 95% do conteúdo original de água durante seu desenvolvimento e, nesse estado, desidratado, as sementes podem sobreviver às condições ambientais mais adversas e, se não dormentes, quando colocadas em condições apropriadas para germinação, reassume a completa atividade metabólica, crescimento e desenvolvimento de plântulas.

1.1 Sementes ortodoxas e recalcitrantes

Sementes ortodoxas são aquelas que podem ser armazenadas por longos períodos sob condições convencionais, ou seja, no estado seco e em baixas temperaturas (Roberts, 1973). Por outro lado, sementes recalcitrantes não sofrem secagem durante a fase de maturação, não possuindo a capacidade de serem dispersas, perdendo água na mesma magnitude como em sementes ortodoxas. Nesse caso, as sementes são dispersadas com alto conteúdo de água e são sensíveis à dessecação (Black & Pritchard, 2002). Finalizando, sementes recalcitrantes não são armazenadas sob condições adequadas, como aquelas para sementes classificadas como ortodoxas e, até quando armazenadas sob condições úmidas, sua viabilidade é frequentemente reduzida e raramente pode suportar poucos meses (Bewley & Black, 1994).

1.2 Perda de tolerância à dessecação durante a germinação

Inicialmente, durante a embebição, as sementes permanecem tolerantes à dessecação, mas, depois de alguns estágios, com a protrusão da radícula, essa

habilidade é perdida (Black & Pritchard, 2002). Nesse momento, com a perda dessa habilidade, as sementes se tornam sensíveis à dessecação como aquelas recalcitrantes. Isso sugere um modelo para estudo de espécies recalcitrantes.

Sun (1999) foi quem sugeriu o uso de sementes ortodoxas germinadas como um sistema modelo para estudo de sementes recalcitrantes, baseado no fato de que, depois que ocorre a germinação, sementes ortodoxas perdem progressivamente a tolerância à dessecação e se tornam comparáveis ao tipo recalcitrante. As evidências são as de que muitos processos, tanto no âmbito fisiológico, como celular e molecular, que ocorrem durante a perda de tolerância à dessecação em sementes ortodoxas germinadas, poderiam ser similares àqueles responsáveis pela sensibilidade à dessecação em sementes recalcitrantes. Uma grande vantagem do uso de sementes germinadas de espécies ortodoxas é sua facilidade de re-indução de tolerância à dessecação depois de perda, por meio da aplicação de efeitos de estresse osmótico (Buitink et al., 2003; Faria et al., 2005).

1.3 Descrição das espécies *Tabebuia impetiginosa* e *Alliaria petiolata*

Tabebuia impetiginosa Mart (ipê-roxo), pertencente à família Bignoniaceae, é uma espécie nativa, de porte arbóreo (Figura 1), encontrada nos biomas Floresta Atlântica, Cerrados e Caatinga, largamente utilizada em paisagismo, recuperação de áreas degradadas e também muito importante para a produção de madeira (Lorenzi, 1992). A família Bignoniaceae compreende cerca de cem espécies, com distribuição desde o México e Antilhas até o norte da Argentina (Rizzini, 1971). Suas sementes germinam logo após a dispersão, não havendo problemas quanto a efeitos de dormência (Silva et al., 2004) e são classificadas como ortodoxas (Carvalho et al., 2006), isto é, sementes que podem ser secadas e armazenadas a baixas temperaturas, por períodos prolongados, sem que haja perda da viabilidade (Roberts, 1973; Hong et al.,

1996). Além dessas características, a casca do caule de *T. impetiginosa* é de interesse para uso medicinal, pela produção de propriedades antiinflamatórias e antimicrobianas (Anesini & Perez, 1993; Koyama et al., 2000).



FIGURA 1 Aspecto geral da espécie *Tabebuia impetiginosa* Mart., durante o florescimento (imagens acima) e antes do florescimento (imagem abaixo).

Alliaria petiolata (Bieb.) Cavara Grande, também conhecida pelo nome vulgar Garlic mustard, pertence à família Brassicaceae, é uma espécie de porte herbáceo (Figura 2) nativa do continente europeu e sua presença é registrada no norte da África, Sri Lanka e Índia. Sua distribuição é bastante relatada também no norte da América, com fortes ocorrências em Quebec. Atualmente, *Alliaria petiolata* é considerada uma espécie invasora da família Brassicaceae, preferindo áreas que recebem intensa insolação. Suas sementes, em condições naturais, germinam logo no início da primavera. A característica mais marcante dessa espécie é sua agressividade ao invadir numerosos tipos de áreas de floresta natural, com capacidade de dominar camadas de solo de muitas áreas. Portanto, trata-se de uma ameaça para muitas áreas naturais, onde quer que ocorra, devido à sua capacidade de crescer excluindo outras espécies herbáceas (Nuzzo, 1999; Yates & Murphy, 2008). Sementes de *Alliaria petiolata* são classificadas como ortodoxas (Liu et al., 2008) e dormentes logo após maturação e dispersão, requerendo de 50 a 100 dias de estratificação em baixas temperaturas para a superação da dormência (Baskin et al., 1992).



FIGURA 2 Aspecto geral da espécie *Alliaria petiolata* (Bieb.) Cavara Grande, durante o florescimento (imagens acima) e antes do florescimento (imagem abaixo).

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANESINI, C.; PEREZ C. Screening of plants used in argentine folk medicine for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 39, n. 2, p. 119-128, June 1993.

BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C., CHESTER, E. W. Seed germination biology of the weedy biennial *Alliaria petiolata*. **Natural Areas Journal**, Rockford, v. 12, n. 4, p. 191-197, Oct. 1992.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum, 1994. p. 201–223.

BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford: CABI, 2002. 412 p.

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

CARVALHO, L. R.; SILVA, E. A. A. ; DAVIDE, A. C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 2, p. 15-25, 2006.

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

HONG, T. D., LININGTON, S.; ELLIS, R. H **Seed storage behaviour: a compendium**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 104 p. (Handbooks for Genebanks, n.4).

KOYAMA, J.; MORITA, I.; TAGAHARA, K.; HIRAI, K. Cyclopentene dialdehydes from *Tabebuia impetiginosa*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 53, n. 8, p. 869-872, Apr. 2000.

LIU, K.; EASTWOOD, R. J.; FLYNN, S.; TURNER, R. M.; STUPPY, W. H. 2008. **Seed Information Database** (release 7.1, May 2008). Disponível em: <<http://www.kew.org/data/sid>>. Acesso em: 09 maio 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352 p.

NUZZO, V. Invasion pattern of the herb garlic mustard (*Alliaria petiolata*) in high quality forests. **Biological Invasions**, Dordrecht, v. 1, p. 169-179, 1999.

RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**: manual de dendrologia brasileira. São Paulo: E. Blücher, 1971. 294 p.

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

SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C.; FARIA, R. M. J.; MELO, D. L. B.; ABREU, G. B. Germination studies on *Tabebuia impetiginosa* Mart. Seeds. **Cerne**, Lavras, v. 10, n. 1, p. 1-9, jan./jun. 2004.

SUN, W. Q. Desiccation sensitivity of recalcitrant seeds and germinated orthodox seeds: can germinated orthodox seeds serve as a model system for studies of recalcitrant seeds. In: IUFRO SEED SYMPOSIUM, Kuala Lumpur 1998. **Proceedings ...** Kuala Lumpur: FRIM, 1999. p. 29-42.

YATES, C. N.; MURPHY, S. D. Observations of herbivore attack on garlic mustard (*Alliaria petiolata*) in Southwestern Ontario, Canada. **Biological Invasions**, Dordrecht, v. 10, n. 5, p. 757-760, June 2008.

CAPÍTULO 2

Estudo da germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa*: temperatura ótima, luz, efeito de inibidores de giberelina (GA) e ácido abscísico (ABA)

Carlos Vinicio Vieira ¹; Edvaldo Aparecido Amaral da Silva²; Amauri Alves Alvarenga, ¹; Evaristo Mauro de Castro ¹

¹Setor de Fisiologia Vegetal - Departamento de Biologia - Universidade Federal de Lavras - e-mail: vieiracv@gmail.com; ²Laboratório de Sementes Florestais - Departamento de Ciências Florestais - Universidade Federal de Lavras - e-mail: amaral@ufla.br

Carlos V. Vieira

* **Autor correspondente:** Setor de Fisiologia Vegetal - Departamento de Biologia - Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, cep 37200-000, Lavras, MG, Brasil. Tel.: (35) 3829-1367 - e-mail: vieiracv@gmail.com

(Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal)

Resumo

O comportamento fisiológico da germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa* foi estudado, sob diferentes regimes de temperatura, na presença e ausência de luz e, também com a adição de inibidores da síntese de giberelina (GA) e ácido abscísico (ABA). A melhor temperatura para germinação nessa espécie foi 30°C na presença de luz (8/16 horas), em que a germinação foi observada iniciando com 24 horas de embebição, chegando a 100% de protrusão em 49 horas. Também, foram encontradas boas respostas de germinação para temperaturas de incubação de 15°C e 40°C. Na condição de escuro a 30°C, o início da germinação foi observada com 38 horas de embebição, atingindo os 100% com 67 horas. Mesmo usando elevadas concentrações de paclobutrazol e tetcyclacis (100µM), a germinação não foi completamente inibida, chegando a 32% de protrusão radicular na presença de paclobutrazol e 48% quando foi usado tetcyclacis. A presença dos inibidores causou atraso no tempo para iniciar a germinação. Quando adicionado o inibidor da síntese de ABA (fluridona) à embebição na presença de luz (8/16 horas), a germinação iniciou com 22 horas de embebição, superando os demais tempos.

Palavras chave: *Tabebuia impetiginosa*, germinação, giberelina (GA) e ácido abscísico (ABA).

Abstract

The physiological behaviour of *Tabebuia impetiginosa* seed germination was studied under different temperature regimes, in the presence and absence of light and also with addition of gibberellin synthesis inhibitors (GA) and abscisic acid (ABA). The best temperature for germination in this species was 30°C in the presence light (8/16h), where the germination was observed starting at 24 hours of soaking reaching 100% of protrusion in 49 hours. Also, good germination responses at incubation temperatures of 15°C and 40°C were found. In the dark at 30°C, the beginning of germination was observed at 38 hours of soaking, reaching 100% at 67 hours. Even using high concentrations of paclobutrazol and tetcyclacis (100 µM), the germination was not completely inhibited, reaching 32% root protrusion in the presence of paclobutrazol and 48% when tetcyclacis was used. The presence of inhibitors caused delay of the germination onset. When ABA (Fluridone) accumulation inhibitor was added to the soaking in the presence of light (8/16h), the germination began at 22 hours of soaking, bettering all times.

Key words: *Tabebuia impetiginosa*, germination, gibberellin (GA) and abscisic acid (ABA).

1 INTRODUÇÃO

O processo de germinação é iniciado com a entrada de água na semente, e termina com o início da elongação do eixo embrionário (Bewley, 1997). A germinação é completada quando torna se visível a emergência da raiz primária.

Diversos fatores considerados externos e internos à semente são considerados como fatores que interferem na germinação de sementes. Um dos fatores externos a ser considerado é a quantidade e qualidade da luz, que são fatores decisivos para o sucesso das etapas da germinação. Uma forma evidente é quando ocorre abertura na copa de florestas com a formação de clareiras, as quais geram mudanças na luz daquele ambiente local resultando em mudanças na qualidade da luz, temperatura e umidade do solo (Socolowski & Takaki, 2004). Plantas são dotadas com sistemas de fitocromos, os quais são usados pelas espécies pioneiras que detectam a presença de luz e são responsáveis pelos processos de indução da germinação de sementes. Esses processos são mediados pela detecção de proporções entre luz vermelha/vermelho distante (R:RF) pelo fitocromo B, que é a forma de fitocromo pré-existente em sementes (Casal & Sánchez, 1998). Todas as sementes têm fitocromos e a sensibilidade deve-se à forma do fitocromo presente (Takaki, 2001). Quando as sementes apresentam fitocromo A, a germinação é possível sob ambas as condições, luz e escuro e, quando as sementes apresentam fitocromo B, a germinação ocorre somente na presença de luz (Socolowski & Takaki, 2004).

Sementes de diferentes espécies requerem alternância de temperaturas para aperfeiçoar o processo germinativo Provavelmente, isso reflete em uma adaptação da flutuação do hábitat, de forma que o regime de temperaturas alternadas pode até suprimir os efeitos da luz sobre a germinação (Godoi & Takaki, 2004).

GAs são fitormônios essenciais que controlam muitos aspectos no desenvolvimento das plantas, incluindo a germinação de sementes, expansão foliar, alongação do caule, florescimento e desenvolvimento de sementes (Davies, 2004). GAs são diterpenóides tetracíclicos sintetizados do geranylgeranyl difosfato. A rota de biossíntese que converte geranylgeranyl difosfato para GAs biologicamente ativas, tais como GA₁ e GA₄, têm sido bem estudada.

A biossíntese de GAs representa um papel importante em promover a germinação em sementes. O efeito inibidor da biossíntese de GA por meio de compostos inibidores, como o paclobutrazol, sugere que nova síntese (síntese *de novo*) de GA é requerida durante a germinação das sementes (Davies, 2004). Essas linhas de evidências demonstram que o nível de GA é um determinante crítico para a germinação de sementes (Davies, 2004; Swain & Singh, 2005). Porém, isso permanece não esclarecido, como concentrações endógenas de GA são moduladas durante a germinação de sementes (Nambara et al., 1991; Jacobsen & Olszewski, 1993).

Pouco se sabe sobre o efeito de mecanismos moleculares fisiológicos sobre os eventos que ocorre em sementes. Em especial, ABA e GA têm se mostrado representantes de efeitos antagonísticos no controle da germinação, especialmente sobre a expressão de genes relacionados à α -amilase (Nambara & Marion-Poll, 2003).

O fitormônio ABA é um sesquiterpenóide sintetizado via xantofilas, sendo identificado acumulando em altos níveis quando uma planta é submetida a certo efeito de estresse abiótico, tal como estresse hídrico, e durante o desenvolvimento das sementes. Estudos baseados em plantas mutantes deficientes em ABA têm estabelecido que muito do ABA é sintetizado durante a fase de maturação, primeiro em tecidos maternal e, então, em baixos níveis no embrião e no endosperma. Níveis de ABA diminuem durante a dessecação de

sementes e são relativamente baixos em sementes maduras (Karssen et al., 1983; Nambara & Marion-Poll, 2003). No entanto, o controle dos processos fisiológicos em sementes por ABA depende dos níveis do hormônio ativo, os quais são modulados por meio da taxa de síntese de seus precursores, catabolismo ou sua translocação para outros locais (Nambara & Marion-Poll, 2003).

Os níveis de ABA sintetizados no endosperma e no embrião, durante o desenvolvimento das sementes, são conhecidos por estar envolvidos na regulação da germinação. No entanto, ainda existem alguns questionamentos sobre como a biossíntese de ABA é regulada em resposta ao ambiente (Seo et al., 2006).

O papel das GAs na regulação da germinação tem sido extensivamente estudado. Vários fatores ambientais são conhecidos por regular a biossíntese de GA durante a embebição de sementes, em que a regulação da biossíntese de GA por meio da luz tem mostrado ser crucial para a germinação de sementes. Não somente o metabolismo de GA mas também o metabolismo do ABA é regulado através da luz via fitocromo (Seo et al., 2006).

A luz tem sido um fator determinante crítico para a germinação em sementes pequenas, tais como as das espécies *Lactuca sativa* e *Arabidopsis*. No caso dessas duas espécies, um pulso de luz vermelha promove a germinação e um pulso de luz do vermelho distante age de forma reversível, inibindo a germinação via fitocromo. Também tem sido mostrado que a biossíntese de GAs é fotorreversivelmente regulada por fitocromo (Yamaguchi et al., 1998).

Sawada et al. (2008) relatam que a germinação de sementes de *Lactuca sativa* é regulada por fitocromo, cuja ação inclui alterações nos níveis de GA e ABA. Para essa situação, as quantificações de ABA e seus catabólitos mostraram diminuição nos níveis desse fitormônio, coincidindo com um leve aumento no nível dos catabólitos de ABA depois do tratamento com luz

vermelha. Esses pesquisadores concluíram que a regulação do metabolismo do ABA por fitocromo é mediado por mecanismos dependentes e independentes de GA via ação da luz vermelha.

Várias são as evidências de que a interação entre luz, ABA e GA controlam a germinação de sementes. No entanto, a grande maioria desses estudos é direcionada para espécies já bastante conhecidas, como *Lactuca sativa* e *Arabidopsis*, as quais produzem sementes pequenas, e no caso de *Arabidopsis*, uma planta de ambiente temperado. Contando com as informações fornecidas de estudos dessas espécies, o objetivo para a realização deste trabalho foi o de observar o comportamento da germinação em sementes de *Tabebuia impetiginosa*, uma espécie tropical, dentro de uma variável faixa de temperaturas e inibidores da síntese de GA e ABA. Os resultados com usos de inibidores da síntese de GA e ABA são para tentar identificar se, realmente, processos regulados via GA é que governam a germinação de sementes em *T. impetiginosa*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta das sementes, localização e primeiros procedimentos

Frutos maduros de *Tabebuia impetiginosa* foram coletados, em outubro de 2005, a partir de dez árvores adultas e saudáveis, no bioma Cerrado, perto da cidade de Lavras, no estado de Minas Gerais, Brasil. Os frutos foram coletados nas coordenadas de 21°13'42, 05 "S e 44°58'59, 74" W e altitude de 918 metros. O clima característico da região é de transição entre Cwb e Cwa, ou seja, quente e úmido, com verões úmidos e invernos secos, de acordo com a classificação da Koppen (Koppen, 1936). Logo após coleta dos frutos, sementes foram extraídas manualmente, dos frutos e mantidas à temperatura ambiente (média 25°C) até atingirem o teor de água de 0,09gH₂O/g de matéria seca. Na sequência, as

sementes foram armazenadas em sacos plásticos à temperatura de 10°C e 55% UR (umidade relativa). Após nove meses de armazenamento, as sementes foram transferidas para o Millenium Seed Bank (Seed Conservação Departamento, Kew-Inglaterra), onde foram realizados os experimentos. Testes de germinação do lote de sementes coletado foram realizados logo após colheita dos frutos e depois da chegada das sementes no Millenium Seed Bank, após nove meses armazenados no Brasil.

2.2 Experimentos de germinação

2.2.1 Temperatura e Luz

Antes de as sementes serem transferidas para a germinação propriamente dita, essas tiveram seu tegumento removido manualmente e, depois, os embriões foram colocados em câmara de pré-umidificação, durante 24 horas, de forma a não tocar o papel úmido. Essa condição foi suficiente para gerar um ambiente com alta umidade relativa, nas mesmas temperaturas utilizadas para os experimentos de germinação. Na sequência, os embriões foram esterilizados com hipoclorito de sódio, na concentração de 1%, durante 10 minutos, lavados em água destilada três vezes e colocados para germinar em placas de Petri de 9,0 centímetros, com duas camadas de papel germitest embebidas em 5mL de água desmineralizada. Os embriões foram incubados nas temperaturas de 15°C, 20°C, 25°C, 25/15°C, 30°C, 30/20°C, 35°C a 40°C, a 8/16 horas de fotoperíodo e de 30°C no escuro. Na germinação no escuro, as avaliações foram realizadas em sala com luz verde para maior segurança dos resultados. Para cada tratamento, a germinação foi realizada com 4 repetições de 25 embriões. Germinação foi avaliada diariamente, até o crescimento visível da radícula (alongamento da radícula > 2 mm).

2.3 Inibidores da biossíntese de GA

Os testes subsequentes de germinação e efeito de inibidores da síntese de giberelina (paclobutrazol e tetcyclasis) foram realizados a 30°C, com luz 8/16 horas, a qual foi encontrada ser a melhor temperatura para germinação. Para esses experimentos, os embriões foram colocados em câmaras de pré-umidificação, conforme descrito anteriormente para os experimentos de germinação e, em seguida, foram esterilizados com hipoclorito de sódio a 1%, durante 10 minutos, lavados em água destilada por 3 vezes e transferidos para placas de Petri de 9,0 centímetros com 2 camadas de papel germitest embebidas em 5mL de água desmineralizada junto ao inibidor. Paclobutrazol e tetcyclasis foram os inibidores utilizados, os quais inibem a biossíntese de GAs durante a germinação. As soluções destes inibidores foram obtidas a partir de soluções estoque preparadas a partir de 100µM dissolvidos em acetona 0,1% (v/v). Para o experimento envolvendo paclobutrazol, foram utilizadas soluções nas concentrações de 0,01; 0,1; 1, 10, 50 e 100µM. Nos testes com tetcyclasis durante a germinação, foram utilizadas as concentrações de 10 e 100µM. Para essas situações, o critério usado para identificar a germinação também foi a identificação do crescimento visível da radícula.

2.4 Inibidores da biossíntese de ABA

Para o estudo da inibição da síntese de ABA, foi preparada uma solução de fluridona a 100µM em 0,1% (v/v) de acetona. O inibidor foi adicionado no meio de germinação na presença e na ausência de luz, a 30°C. A aplicação exógena de soluções preparadas de fluridona é conhecida por evitar o acúmulo de ABA durante o processo de embebição de sementes (Kermode, 2005).

3 RESULTADOS

3.1 Germinação: Temperatura e Luz

Os resultados apresentados na Figura 1 permitem relatar que sementes de *T. impetiginosa* germinam em larga amplitude de temperaturas, variando de de 15°C a 40°C.

Para a temperatura de 15°C, o início da germinação foi registrado com 168 horas de embebição e, ao final de 480 horas, foi atingida a média de 95% de sementes com protrusão radicular. Para 20°C, o início da germinação foi detectado com 72 horas de embebição, completando média de 98% de germinação com 140 horas. À temperatura de 25°C, o início da germinação foi observado no tempo de 42 horas de embebição, completando 100% com 74 horas de embebição. Na temperatura alternada 25°C/15°C, o início da germinação foi observado com 69 horas de embebição, causando um retardamento em relação à temperatura constante de 25°C e, ao final de 142 horas, foi observada média final de 95% de germinação. Na temperatura alternada de 30°C/20°C, o início da germinação foi registrado com 24 horas de embebição, chegando a 100% com 87 horas de embebição. Na temperatura de 40°C, a germinação sofreu danos causados por temperatura elevada, iniciando somente depois de 42 horas de embebição e, com 256 horas, atingiu-se 79% de protrusão radicular, com as demais sementes com aspecto de morte, ou seja, o eixo embrionário apresentou-se em estado necrosado.

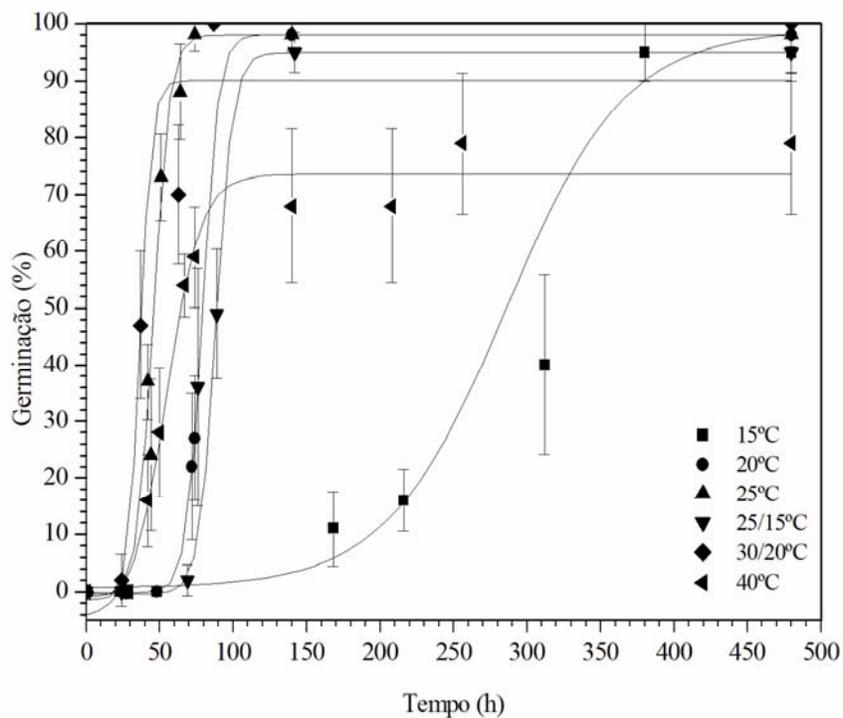


Figura 1 - Germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa* nas temperaturas de 15°C; 20°C; 25°C; 25°C /15°C; 30°C /20°C e 40°C, com fotoperíodo de 8/16 horas.

Os resultados de germinação realizados a 30°C, 35°C, sob luz (8/16 horas) e 30°C, em condição de escuro, podem ser observados na Figura 2. Germinação foi observada iniciando-se com 24 horas de embebição, para sementes a 30°C e 35°C, respectivamente, chegando a 100% de germinação em 49 horas. Na condição de escuro a 30°C, o início da germinação foi observado com 38 horas de embebição, atingindo os 100% com 67 horas.

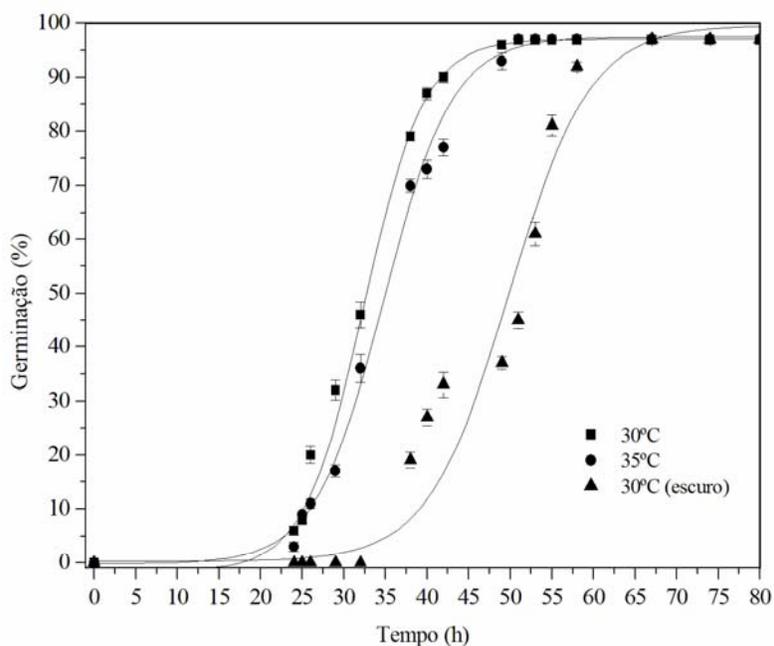


Figura 2 - Germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa* nas temperaturas de 30°C e 35°C, com fotoperíodo de 8/16 horas e 30°C, no escuro.

3.2 Inibidores da germinação

3.2.1 Efeito de paclobutrazol na germinação

Neste estudo, foram empregados inibidores da síntese de giberelina, na tentativa de mostrar o envolvimento desse fitormônio nas etapas da germinação. Com base em estudos preliminares, verificou-se que a melhor condição para estudar o efeito desse inibidor em sementes de *T. impetiginosa* foi a 30°C.

Inicialmente, o emprego de 0,01µM não foi suficiente para gerar efeitos no comportamento da germinação, quando comparado com o controle. De forma que o comportamento da germinação foi igual ao observado para o controle, com o início da germinação em 24 horas de embebição, chegando próximo de 100% com 57 horas (Figura 3A). Testes subsequentes, usando uma solução dez vezes mais concentrada (0,1µM), foram suficientes para promover um efeito de

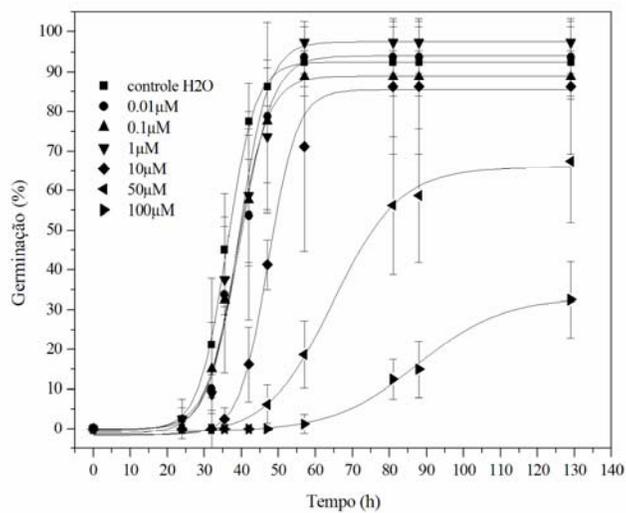
retardamento na germinação, com início em 32 horas de embebição, chegando ao máximo de germinação em 57 horas, totalizando 88%. O mesmo comportamento foi observado para a concentração de 1,0 μ M. Quando foi utilizada a concentração de 10,0 μ M, o início da germinação foi observado após 35 horas de embebição, atingindo o máximo de 86% de germinação após 81 horas. Para a concentração de 50 μ M, a germinação foi registrada com 47 horas de embebição, atingindo o máximo em 67%, com 129 horas e, quando foi empregada uma concentração ainda maior, de 100 μ M, ela só foi iniciada após 57 horas de embebição, atingindo a máxima germinação, com apenas 32%, em 129 horas de embebição. De forma que, ainda nessa condição, a concentração de paclobutrazol não foi suficiente para inibir a germinação em sua totalidade (Figura 3A).

3.2.2 Efeito de tetcyclacis na germinação

Outro inibidor da rota de biossintética das giberelinas, conhecido como tetcyclacis, também foi empregado para averiguar o possível efeito de GAs na germinação.

Dessa maneira, foram testadas duas concentrações de tetcyclacis (10 e 100 μ M) em combinação com a temperatura de germinação a 30°C e fotoperíodo de 8/16horas. Os resultados expressos na Figura 3B foram plotados junto com dados obtidos também com o uso de paclobutrazol, para permitir uma análise comparativa. Na concentração de 10 μ M de tetcyclacis, o início da germinação foi observado em 26 horas de embebição, atingindo 95% de sementes germinadas em 91 horas. Para a concentração de 100 μ M de tetcyclacis, o início da germinação ocorreu com 35 horas de embebição, alcançando 48% de protrusão em 129 horas (Figura 3B). Nessas condições de realização do experimento, constatou-se efeito similar ao encontrado para paclobutrazol.

A



B

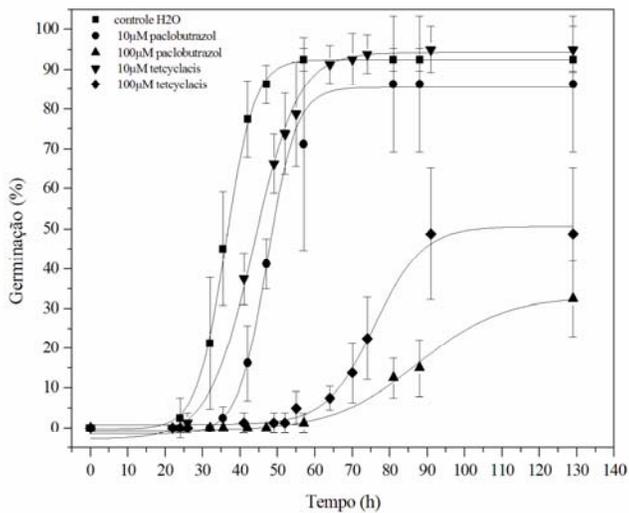


Figura 3 - Germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa*, na presença de paclobutrazol nas concentrações 0,1; 0,1; 1,0; 10; 50 e 100 μM a 30°C na presença de luz (8/16 horas) (A), e na presença de paclobutrazol e tetraciclina, nas concentrações de 10 e 100 μM, a 30°C e presença de luz (8/16 horas) (B).

Sementes embebidas em solução 10 μ M de tetcyclasis sob condição de luz (8/16 horas), a 30°C, apresentaram comportamento semelhante quanto à germinação no escuro (Figura 4). Para a germinação, tanto no escuro quanto na presença de luz, foi empregada apenas água no meio de germinação e, para essa situação, a germinação a 30°C, sob luz 8/16 horas, foi considerada como controle. Nessa situação, para o controle, a germinação iniciou-se com 24 horas de embebição e, com 71 horas, atingiu 96,3%. As outras duas situações alcançaram as mesmas porcentagens finais de germinação, porém, com pequenos intervalos para o início, de forma que a diferença ficou próxima de 10 horas. A leve inibição da síntese de GA sugere que a ausência de luz é um fator primordial para iniciar a germinação e que pode estar relacionado com a biossíntese desse fitormônio, pois, na presença do inibidor, as curvas de germinação possuem tendências de similaridades (Figura 4).

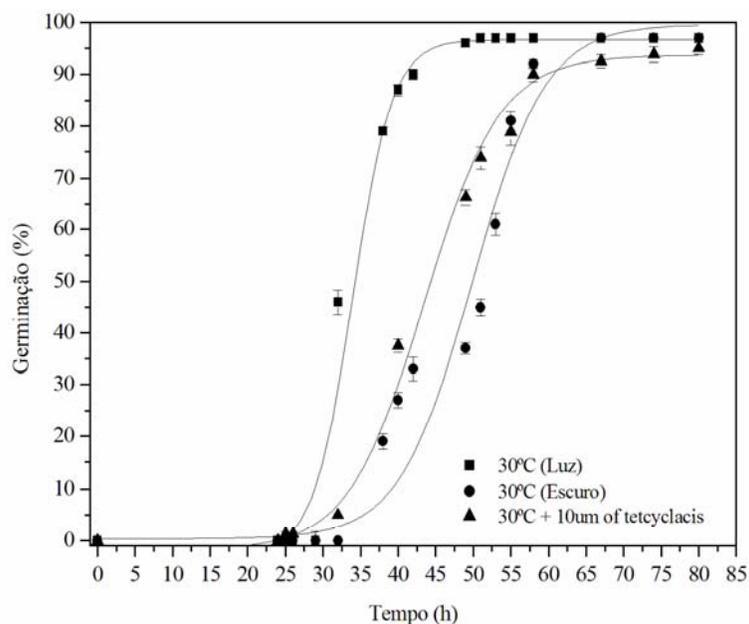


Figura 4 - Germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa*, a 30°C, sob condição de luz (8/16 horas); a 30°C, no escuro e a 30°C, na presença de luz, com tetracyclis na concentração de 10µM.

3.2.3 Efeito do fluridona na germinação

A ação do ABA na germinação de *T. impetiginosa* foi investigado utilizando-se fluridona, um inibidor da síntese de carotenóides, clorofilas e ácido abscísico (Benschop et al., 2005). Neste estudo, a germinação em água foi usada como controle na presença de luz (8/16 horas), cuja germinação teve início com 23 horas de embebição, atingindo 97% no tempo de 47 horas de embebição (Figura 5). A germinação no escuro iniciou-se com 26 horas de embebição e, em 50 horas de embebição, atingiu o máximo de 93%. Quando adicionado fluridone na concentração de 100µM, na presença de luz (8/16 horas), a germinação iniciou com 22 horas, superando os demais tempos, atingindo 100% de protrusão radicular com 37 horas de embebição. A adição de fluridona nas

sementes embebidas no escuro foi responsável por dar início na germinação com 23 horas (adiantamento) de embebição, atingindo 98% de protrusão radicular em 50 horas, assemelhando-se à germinação ocorrida somente na presença de água e luz.

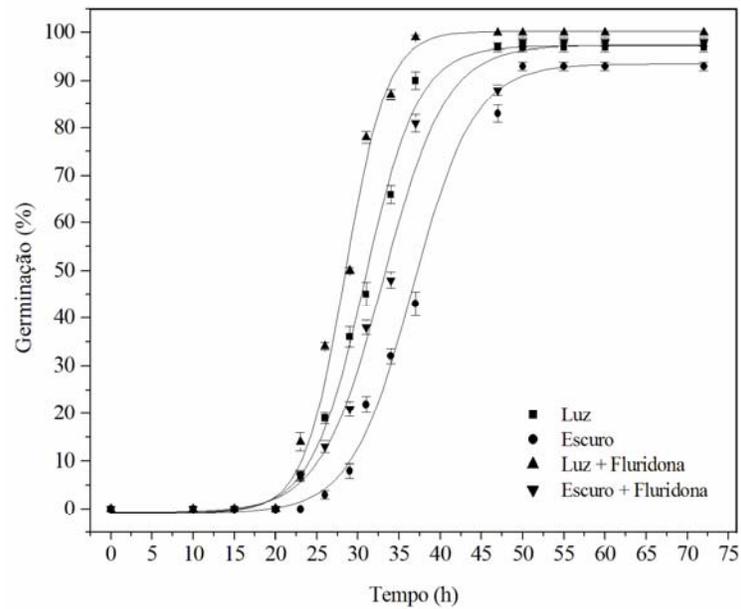


Figura 5 - Germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa*, a 30°C, na presença de luz (8/16 horas), escuro, luz combinada com fluridona e escuro combinado com fluridone.

4 DISCUSSÃO

4.1 Germinação: Temperatura e Luz

Esses resultados podem ser entendidos quando é observada a presença de plantas da *T. impetiginosa* em diversas regiões, com distribuição nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Norte com seu gênero (*Tabebuia*), pertencente à família Bignoniaceae, compreendendo cerca de cem espécies, com distribuição desde o México e Antilhas até o Norte da Argentina (Rizzini, 1971).

A temperatura ótima de germinação, para gênero *Tabebuia* e também dentro da família Bignoniaceae, parece similar, podendo variar, em um grande número de espécies, em faixas de temperaturas entre 15°C até 40°C. Santos et al. (2005), avaliando o efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Tabebuia serratifolia*, *Tabebuia chrysotricha* e *Tabebuia roseo-alba*, todos pertencentes à família Bignoniaceae, encontraram respostas para faixa de temperatura ótima entre 20°C e 30°C, com máxima entre 35°C e 40°C e mínima entre 10°C e 15°C.

Os resultados apresentados para a germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa* neste estudo revelam com exatidão o comportamento seguido por outros representantes da família, em que a temperatura ótima foi encontrada a 30°C sob condição de luz (8/16 horas) e com temperatura mínima de 15°C e máxima de 40°C. Silva et al. (2004), estudando a germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa*, encontraram a máxima germinação na temperatura de 30°C, na presença de luz constante. Oliveira et al. (2005) encontraram respostas ótimas de temperatura a 30°C e regime de luz constante na germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa* e *Tabebuia serratifolia*. Com exceção da luz constante utilizada pelos demais pesquisadores, os resultados apresentados neste trabalho revelam que o controle fotoperiódico de 8/16 horas é suficiente para manter a porcentagem final de germinação em 100%, demonstrando não haver necessidade de luz constante.

Socolowski & Takaki (2007), estudando a germinação de outro representante da família Bignoniaceae, *Tabebuia rosea* (Bertoloni), considerada espécie exótica de porte arbórea e invasora, encontraram faixa de temperatura para germinação entre 20°C a 40°C, na presença de luz e de 20°C a 35°C, no escuro. Sementes de *Tabebuia impetiginosa* apresentam 100% de germinação à temperatura de 30°C, tanto na presença de luz como no escuro. Os resultados indicam que sementes de espécies representantes do gênero *Tabebuia* podem germinar em ampla faixa de temperatura.

4.2 Germinação: Efeitos dos inibidores da síntese de GA

A grande maioria dos trabalhos relacionados com germinação destaca a importância das GAs como fator primordial nas etapas da germinação, desde a embebição até a alongação da radícula. No entanto, saber ao certo se GA é o fator de maior importância tem conduzido pesquisadores a investigarem o papel desse fitormônio antes, durante e depois que ocorre a protrusão da radícula (Debeaujon & Koornneef, 2000). No presente trabalho, os resultados em resposta à GA foram testados utilizando-se inibidores das etapas de biossíntese de GA, tais como o paclobutrazol e tetcyclacis, possuindo ambos o mesmo papel no bloqueio dos processos de biossíntese desse regulador de crescimento (Figura 3A e B). Não somente a presença do inibidor, mas também sua concentração, foi responsável pela paralisação parcial da germinação. Concentrações de paclobutrazol entre 0,01µM até 10,0µM não provocaram diferenças marcantes no valor final da germinação já, para as concentrações de 50µM e 100µM, foram observadas reduções mais acentuadas na germinação, caracterizando um efeito inibitório progressivo, porém, não inibindo a germinação como um todo.

Silva et al. (2004) encontraram resultados que mostraram que, utilizando fontes exógenas de GA na germinação de sementes de *T. impetiginosa*, é possível observar mudanças no alongamento da radícula. No trabalho desses

pesquisadores, sementes embebidas em água iniciaram a germinação em 30 horas e, quando adicionado GA à embebição, ela ocorreu em 24 horas. Após esse tempo, identificou-se que a germinação foi completamente inibida com paclobutrazol a 100 μ M, um inibidor da biossíntese de GA. Aplicações exógenas de GA₄₊₇, na concentração de 100 μ M, conduzem as sementes a retomarem a germinação imposta pelo paclobutrazol, mostrando que as GAs são sintetizadas *de novo* durante a germinação. Silva et al. (2004) reforçam, ainda, que, para sementes de *T. impetiginosa*, as GAs constituem importantes reguladores da germinação.

Diversas são as observações e as discussões sobre o papel das giberelinas no processo de germinação de sementes. A observação mais evidente é a de que existe a síntese *de novo* de GA requerida durante a embebição. Essas observações foram realizadas por meio de estudos aplicando os inibidores paclobutrazol e tetcyclacis, que evitam a germinação (Debeaujon & Koornneef, 2000).

Outro fator determinante na ação do controle de giberelinas é a presença da luz. As sugestões são de que esse fator ambiental pode induzir a biossíntese de giberelina durante as fases iniciais da germinação. Essas observações foram realizadas por Toyomasu et al. (1998), em sementes de *Lactuca sativa* e também por Yamaguchi et al. (1998), em sementes de *Arabidopsis thaliana*.

A identificação da ação de giberelinas em sementes de *Arabidopsis gal*, mutante deficiente em GA, revelou o controle da expressão de genes que codificam enzimas hidrolases induzidas por fitocromo. A partir desse momento, foram definidos dois possíveis mecanismos de ação propostos para explicar o papel das giberelinas endógenas no controle da germinação. O primeiro deles é a indução da expressão de genes que codificam enzimas de hidrólise do endosperma. O segundo mecanismo consiste de um efeito de estímulo direto sobre o potencial de crescimento do embrião, em que GA é o fitormônio

requerido para superar o estado de dormência imposto por concentrações de ABA existentes (Debeaujon & Koornneef, 2000).

Sementes de *T. impetiginosa* tiveram a germinação completada na presença e na ausência de luz. No entanto, a germinação no escuro sofreu atraso de 10 horas em relação ao controle e, possivelmente, esse intervalo foi determinado pela síntese *de novo* de giberelina. Isso porque, quando foi aplicado o inibidor de GA tetcyclacis, na concentração de 10 μ M, em combinação com luz, na mesma condição de controle fotoperiódico de 8/16 horas, o comportamento da curva de germinação observado foi semelhante ao de quando a germinação ocorreu no escuro (Figura 4). Esses resultados sugerem que a síntese *de novo* de giberelina pode ocorrer na ausência de luz, conforme resultado apresentado na Figura 4, mostrando que a germinação em sementes de *T. impetiginosa* não é completamente dependente da ação do espectro de luz.

Ogawa et al. (2003), em análises sobre a rota de biossíntese de giberelina e estudando a expressão de genes responsivos durante a germinação de sementes de *Arabidopsis*, identificaram que o principal GA ativo é o GA4, que aumenta depois da embebição da semente e que este aumento ocorre justamente antes da protrusão da radícula. Esses resultados reforçam a importância da biossíntese *de novo* de GA para o controle da protrusão da radícula em sementes de *Arabidopsis*. Além do mais, esses pesquisadores sugerem que a germinação pode ser determinada por uma combinação de fatores de efeito múltiplo de hormônios, sugerindo a ação entre giberelina, ácido abscísico, etileno e brassinosteróides.

Provavelmente, sementes de *T. impetiginosa* são dotadas de fitocromo A, pelo fato de a sua germinação ocorrer tanto na presença quanto na ausência de luz (escuro), (Figura 2 e 4). Além do fitocromo A, múltiplas espécies de fitocromos estão envolvidas na indução da germinação em resposta a variações no comprimento de onda e intensidades luminosas. O efeito sobre o

metabolismo das giberelinas nas sementes tem sido melhor estudado em condições de germinação relacionadas ao fitocromo *B*, para sementes de *Arabidopsis* e quando analisados com relação às respostas luminosas. Estudos similares foram realizados em *Lactuca sativa* L. Cv. Grand Rapids. Em sementes de *Arabidopsis*, quando essas são embebidas e expostas à luz vermelha, a germinação é iniciada, aumentando de forma significativa os níveis de giberelina. Esses níveis de giberelina são o resultado da regulação positiva de genes representantes de *GA3ox1*, *GA3ox2* (relacionados com a síntese de GA) e regulação negativa de *GA2ox2* (relacionado com a desativação da síntese de GA) (Seo et al., 2006; Yamauchi et al., 2007). Mecanismo similar é esperado que ocorra para sementes de *T. impetiginosa*, quando embebidas e submetidas ao controle fotoperiódico de 8/16 horas.

Ainda durante a formação dos frutos e o desenvolvimento das sementes, pode haver a síntese *de novo* de GAs. Hu et al. (2008) mostraram que a expressão de *GA3ox* cataliza a etapa final na síntese de GAs bioativas, durante as fases do desenvolvimento de sementes.

4.3 Efeito do fluridona durante a germinação

Ainda dentro do metabolismo germinativo para as sementes de *T. impetiginosa*, vale destacar que as sementes utilizadas neste experimento foram armazenadas por nove meses e, possivelmente, esse intervalo de armazenamento, realizado a 10°C, possibilitou um decréscimo nos níveis de ABA. Níveis de ABA são relatados por diminuir durante a dessecação e permanecer relativamente baixos em sementes no estado maduras (Karssen et al., 1983). A primeira parte do desenvolvimento da semente consiste na embriogênese. Depois que a formação do embrião cessa, ocorre a maturação das sementes, reservas de armazenamento são acumuladas, dormência é induzida e a tolerância à dessecação é adquirida. Ácido abscísico (ABA) acumula em todos

os tecidos das sementes, como um resultado de transporte via planta mãe através do floema ou sintetizado na própria semente (Namara & Marion-Poll, 2003).

A aplicação de fluridona em sementes de *T. impetiginosa* embebidas na presença de luz (8/16 horas) acelerou a germinação, reduzindo ainda mais o tempo para completar a máxima germinação (Figura 5). Quando fluridona foi aplicado em sementes embebidas no escuro, a curva de germinação foi similar àquela para germinação das sementes na presença de luz. Esses resultados inferem a possibilidade de a fluridona inibir a síntese de ABA e também possibilitam identificar com maior clareza o efeito antagonístico existente entre GA e ABA. Como discutido anteriormente, a presença de luz atua na ação do fitocromo que ativa a biossíntese de giberelinas em sementes no estado embebidas. Dois fatores atuando em conjunto, presença de luz e inibição da síntese de ABA, são responsáveis por favorecer a germinação.

Sawada et al. (2008) também discutiram a regulação do metabolismo de ABA durante a germinação de sementes fotoblásticas (positivas ou negativas) de *Lactuca sativa*. Estes autores identificaram que, nessa espécie, a germinação é regulada por fitocromo e a ação do fitocromo inclui alterações nos níveis de GA e ABA. Os resultados fornecidos por esses pesquisadores indicaram que a regulação do metabolismo de ABA por fitocromo é mediado por dois mecanismos, um dependente de GA e outro independente de GA. Nesse caso, a presença da luz vermelha causou decréscimos nas quantidades de ABA.

O período de armazenamento das sementes de *T. impetiginosa* utilizadas neste trabalho foi de nove meses, a 10°C e umidade relativa de 60%. Nesse período, sementes de *T. impetiginosa* poderiam ter sofrido catabolismo de ABA, em função da proximidade das curvas de germinação de sementes embebidas na presença de luz e luz com fluridona (Figura 5).

Aumento no catabolismo do ABA está associado com o término da dormência em sementes de várias espécies (Jacobsen et al., 2002). Em sementes

de *Pinus monticola*, quando aplicado um resfriamento úmido, elas sofrem uma diminuição significativa em ABA no embrião. Mais importante ainda é o declínio do ABA, depois de diferentes durações de refrigeração úmida correlata, bem como o aumento na capacidade de germinação das sementes quando transferidas para as condições de germinação. O declínio de ABA continua durante a germinação. Assim, refrigeração úmida não somente afeta um declínio em ABA por meio da estimulação do metabolismo de ABA, mas parece também aumentar a capacidade de catabolismo, principalmente quando as sementes são colocadas em condições de germinação (Kermod, 2005).

5 CONCLUSÕES

Portanto, sementes de *T. impetiginosa* possuem a germinação regulada parcialmente pela presença de luz e GA. No entanto, esses fatores não são os principais determinantes para que a germinação ocorra, sugerindo que sementes dessa espécie são dotadas de grande potencial de germinação em diferentes ambientes, até sob condições adversas de temperaturas. Como regra geral, a germinação de sementes em uma espécie qualquer é controlada por uma série de fatores que agem em conjunto. Dentre esses, podem ser explorados aqueles ligados ao ambiente (disponibilidade de água, luz e temperatura), aos fatores de dormência e também a presença dos fitormônios, conforme observação feita por Ogawa et al., (2003), sugerindo a ação múltipla de outras classes hormonais durante a embebição e a protrusão da radícula.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENSCHOP, J. J.; JACKSON, M. B.; GÜHL, K.; VREEBURG, R. A. M.; CROKER, S. J.; PEETERS, A. J. M. ; VOESENEK, L. A. C. J. Contrasting interactions between ethylene and abscisic acid in *Rumex* species differing in submergence tolerance. **Plant Journal**, Oxford, v. 44, n. 5, p. 756-768, Dec. 2005.
- BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 7, p. 1055-1066, July 1997.
- CASAL, J. J.; SÁNCHEZ, R. Phytochromes and seed germination. **Seed Science Research**, Wellington, v. 8, n. 3, p. 317-329, Sept. 1998.
- DAVIES, P. J. **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!** Dordrecht: Kluwer Academic, 2004. 750 p.
- DEBEAUJON, I.; KOORNNEEF, M. Gibberellin requirement for arabidopsis seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 2, p. 415-424, Feb. 2000.
- GODOI, S.; TAKAKI, M. Effects of light and temperature on seed germination in *Cecropia hololeuca* Miq. (Cecropiaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 2, p. 185-191, Apr./June 2004.
- HU, J.; MITCHUM, M. G.; BARNABY, N. ; BELAY, T; AYELE, M.; OGAWA, M.; LAI, W.C.; HANADA, A.; ALONSO, J. M. ; ECKER, J. R.; SWAIN, S. M.; YAMAGUCHI, S.; KAMIYA, Y.; SUN, T.P. **Potential sites of bioactive gibberellin production during reproductive growth in Arabidopsis. The Plant Cell**, Rockville, v. 20, n. 2, p. 320-336, Feb. 2008.
- JACOBSEN, J.V.; PEARC, D. W.; POOLE, A. T.; PHARIS, R. P.; MANDER, L. N. Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 115, n.3, p. 428-441, July 2002.
- JACOBSEN, S. E.; OLSZEWSKI, N. E. Mutations at the *SPINDLY* locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 8, p. 887-896, Aug. 1993.

KARSSSEN, C. M.; BRINKHORST, S. van der; BREAKLAND, A. E.; KOORNNEEF, M. Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies of abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Planta**, Berlin, v. 157, n. 2, p. 158-165, Mar. 1983.

KERMODE, A. R. Role of abscisic acid in seed dormancy. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 24, n. 4, p. 319-344, Dec. 2005.

NAMBARA, E.; AKAZAWA, T.; MCCOURT, P. Effects of the gibberellin biosynthetic inhibitor uniconazol on mutants of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, n. 2, p. 736-738, Oct. 1991.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. ABA action and interactions in seeds. **Trends in Plant Science**, London, v. 8, n. 5, p. 213-217, May 2003.

OGAWA, M.; HANADA, A.; YAMAUCHI, Y.; KUWAHARA, A.; KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, S. Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, n.7, p. 1591-1604, July 2003.

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

RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**: manual de dendrologia brasileira. São Paulo: E. Blücher, 1971. 294 p.

SANTOS, D. L.; SUGAHARA, V. Y.; TAKAKI, M. Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich, *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex DC.) Standl. E *Tabebuia roseo-alba* (Ridl) Sand – Bignoniaceae. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 1, p. 87-92, jun. 2005.

SAWADA, Y.; AOKI, M.; NAKAMINAMI, K., MITSUHASHI, W.; TATEMATSU, K.; KUSHIRO, T.; KOSHIBA, T.; KAMIAYA, Y.; IONUE, Y.; NAMBARA, E.; TOMONOBU, T. Phytochrome- and gibberellin-mediated regulation of abscisic acid metabolism during germination

of photoblastic lettuce seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 146, n. 3, p. 1386-1396, Mar. 2008.

SEO, M.; HANADA, A.; KUWAHARA, A.; ENDO, A.; OKAMOTO, M. YAMAGUCHI, Y.; NORTH, H.; MARION-POLL, A.; SUN, T. P.; KOSHITA, T.; KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, S. NAMBARA, E. Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. **Plant Journal**, Oxford, v. 48, n. 3, p. 354-366, Nov. 2006.

SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C.; FARIA, R. M. J.; MELO, D. L. B.; ABREU, G. B. Germination studies on *Tabebuia impetiginosa* Mart. Seeds. **Cerne**, Lavras, v. 10, n. 1, p. 1-9, jan./jun. 2004.

SOCOLOWSKI, F.; TAKAKI, M. Germinação de sementes e emergência de plântulas de *Tabebuia rosea* (Bertoloni) a.p. de candolle (Bignoniaceae), uma espécie exótica com potencial invasor. **Revista Árvore**, Viçosa v. 31, n. 2, p.229-238, mar./abr. 2007.

SOCOLOWSKI, F.; TAKAKI, M. Germination of *Jacaranda mimosifolia* (D. Don - Bignoniaceae) seeds: effects of light, temperature and water stress. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 785-792, Sept./Oct. 2004.

SWAIN, S. M.; SINGH, D. P. Tall tales from sly dwarves: Novel functions of gibberellins in plant development. **Trends in Plant Science**, London, v. 10, n. 3, p. 123-129, Mar. 2005.

TAKAKI, M. New proposal of classification of seed based on forms of phytochrome instead of photoblastism. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 1, p. 103-107, abr. 2001.

TOYOMASU, T.; KAWAIDE, H.; MITSUHASHI, W.; INOUE, Y.; KAMIYA, Y. Phytochrome regulates gibberellin biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, n. 4, p. 1517-1523, Dec. 1998.

YAMAGUCHI, S.; SMITH, M. W.; BROWN, R. G. S.; KAMIYA, Y.; SUN, T. P. Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3 β -hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 12, p. 2115-2126, Dec. 1998.

CAPÍTULO 3

Efeito da secagem controlada na sobrevivência de plântulas de *Tabebuia impetiginosa* e *Alliaria petiolata*

Carlos Vinicio Vieira¹; Edvaldo Aparecido Amaral da Silva²; Amauri Alves Alvarenga, ¹; Evaristo Mauro de Castro ¹

¹Setor de Fisiologia Vegetal - Departamento de Biologia - Universidade Federal de Lavras - e-mail: vieiracv@gmail.com; ²Laboratório de Sementes Florestais - Departamento de Ciências Florestais - Universidade Federal de Lavras - e-mail: amaral@ufla.br

Carlos V. Vieira

* Autor correspondente: Setor de Fisiologia Vegetal - Departamento de Biologia - Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, cep 37200-000, Lavras, MG, Brasil. Tel.: (35) 3829-1367 - e-mail: vieiracv@gmail.com

(Revista Ciência e Agrotecnologia)

Resumo

A perda de tolerância à dessecação, durante a germinação, tem sido descrita em sementes ortodoxas e os resultados extraídos servem para explicar os mecanismos que operam durante etapas de secagem e que mantêm o eixo embrionário no estado vivo. Uma característica marcante das sementes ortodoxas é essa perda da tolerância à dessecação durante a germinação. Porém, acredita-se que, quando as sementes germinadas (plântulas) são transferidas para ambientes adequados de secagem, a tolerância à dessecação seja restabelecida e elas permaneçam com o eixo embrionário vivo. Na busca de descobrir se esse comportamento pode ser observado em plântulas com radícula em desenvolvimento, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da secagem controlada em plântulas e também de identificar que parte delas (radícula, hipocótilo e cotilédones) sofre os primeiros efeitos da desidratação. Para isso, plântulas e partes dissecadas (radícula, hipocótilo e cotilédones) de *Tabebuia impetiginosa* e *Alliaria petiolata*, com diferentes comprimentos de radícula, sofreram desidratação em ambiente controlado com sílica gel a 20%UR e temperatura regulada em 20°C. Em seguida, foram transferidos para condições ideais de germinação para observar o re-estabelecimento do crescimento da radícula (taxa de sobrevivência). Plântulas de *T. impetiginosa*, com comprimentos de radícula de 1,0 e 2,0mm, apresentaram restabelecimento da tolerância à dessecação com taxas de sobrevivência de 80% ($\pm 17,3$) e 50% ($\pm 16,7$), respectivamente. Para as plântulas de *Alliaria petiolata*, os comprimentos de radícula de 0,5; 1,0 e 1,5mm, tiveram taxa de sobrevivência de 57,6 ($\pm 14,0$), 43% ($\pm 16,4$) e 43% ($\pm 16,4$), respectivamente. A desidratação nas diferentes partes das plântulas revelou que a radícula sofre remoção da água em um tempo mais curto, comparada a regiões de hipocótilo e cotilédones. A seqüência de desidratação para as plântulas das duas espécies seguiu a ordem; radícula, hipocótilo e cotilédones. Nestes, tolerância à dessecação pode ser

parcialmente recuperada, no entanto, acredita-se que a não sobrevivência das plântulas com maiores comprimentos de radícula, superior a 2,0mm para *T. impetiginosa* e 1,5mm para *Alliaria petiolata*, seja devido a danos causados ao meristema radicular.

Palavras chave: Tolerância à dessecação, taxa de secagem, *Tabebuia impetiginosa*, *Alliaria petiolata*, plântulas.

Abstract

The loss of desiccation tolerance during the germination has been described in orthodox seeds, and the results obtained are used to understand the mechanisms that operate during drying stages and that keep the embryonic axis in a live state. The main feature of orthodox seeds is exactly that loss of desiccation tolerance during seed germination. However, it is believed that when the germinated seeds (seedlings) are transferred to a suitable environment for drying, the desiccation tolerance is re-established and the seedlings remain with the embryonic axis alive. In the search to find if this behaviour can be observed in the seedlings with radicle under development, the objective of this study was to evaluate the effect of controlled drying in seedlings, and also to identify which of these seedlings (radicle, and hypocotyls cotyledons) undergoes the first effects of dehydration. For this purpose, seedlings and dissected parts (radicle, hypocotyls and cotyledons) from *Tabebuia impetiginosa* and *Alliaria petiolata* with different radicle lengths underwent dehydration in a controlled environment with silica gel at 20% relative humidity and temperature set at 20°C, and then were transferred to the best conditions for germination to observe the re-establishment of the radicle growth rate (survival). As a result, seedlings from *T. impetiginosa* with the radicle lengths of 1.0 and 2.0mm, presented the re-establishment of the desiccation tolerance with survival rates of 80% (± 17.3) and 50% (± 16.7) respectively. For *Alliaria petiolata* seedlings, with radicle lengths of 0.5, 1.0 and 1.5mm, showed a survival rate of 57.6 (± 14.0), 43% (± 16.4) and 43% (± 16.4) respectively. The dehydration in different parts of seedlings revealed that the radicle undergoes water removal in a shorter time compared with hypocotyls and cotyledons. The dehydration sequence for seedlings of the two species was; radicle, hypocotyls and cotyledons. In seedlings of these species, the desiccation tolerance can be partially recovered, however, it is believed that non-survival of seedlings with greater radicle lengths, exceeding 2.0mm for *T. impetiginosa* and

1.5mm for *Alliaria petiolata* could be due to damage caused in the root meristem.

Key words: Desiccation tolerance, drying rate, *Tabebuia impetiginosa*, *Alliaria petiolata*, seedlings.

1 INTRODUÇÃO

Tabebuia impetiginosa Mart (ipê-roxo), pertencente à família Bignoniaceae, é uma espécie nativa, de porte arboreo, encontrada nos biomas Floresta Atlântica, Cerrados e Caatinga, largamente utilizada em paisagismo e na recuperação de áreas degradadas (Lorenzi, 1992). A família Bignoniaceae compreende cerca de cem espécies, com distribuição desde o México e Antilhas até o norte da Argentina (Rizzini, 1971). Suas sementes germinam logo após a dispersão, não havendo problemas quanto a efeitos de dormência (Silva et al., 2004) e são classificadas como ortodoxas (Carvalho et al., 2006), isto é, sementes que podem ser secadas e armazenadas a baixas temperaturas por períodos prolongados, sem que haja perda da viabilidade (Roberts, 1973; Hong et al., 1996).

Alliaria petiolata (Bieb.) Cavara Grande, também conhecida pelo nome vulgar Garlic mustard, pertencente à família Brassicaceae, é uma espécie de porte herbáceo nativa do continente europeu e sua presença é registrada no norte da África, Sri Lanka e Índia. Sua distribuição é bastante relatada também no norte da América do Norte, com fortes ocorrências em Quebec. Atualmente, *Alliaria petiolata* é considerada uma espécie invasora da família Brassicaceae, preferindo áreas que recebem intensa insolação. Suas sementes, em condições naturais, germinam logo no início da primavera. A característica mais marcante dessa espécie é sua agressividade ao invadir numerosos tipos de áreas de floresta natural, com capacidade de dominar camadas de solo de muitas áreas. Portanto, trata-se de uma ameaça para muitas áreas naturais, onde quer que ocorra, devido à sua capacidade de crescer excluindo outras espécies herbáceas (Nuzzo, 1999; Yates & Murphy, 2008). Sementes de *Alliaria petiolata* são classificadas como ortodoxas (Liu et al., 2008) e dormentes logo após maturação e dispersão,

requerendo de 50 a 100 dias de estratificação em baixas temperaturas para a superação da dormência (Baskin et al., 1992).

Caracteristicamente, são duas espécies completamente diferentes quanto à classificação botânica. No entanto, produzem sementes que são classificadas como ortodoxas.

A germinação envolve todos os eventos metabólicos que se iniciam com a entrada de água na semente no estado quiescente e seca, terminando com a alongação do eixo embrionário (Bewley & Black, 1994). Durante a germinação, para espécies que produzem sementes ortodoxas, a capacidade de tolerância à dessecação é perdida gradativamente. Após a embebição das sementes, a radícula é a primeira parte a perder a tolerância à dessecação e, em geral, isso ocorre logo após a protrusão (Buitink et al., 2003). Nesse momento, a tolerância à dessecação, que foi adquirida durante as etapas finais da maturação, pode ser restabelecida em sementes ortodoxas germinadas. Estudos com a espécie *Medicago truncatula* revelaram que plântulas com até 2,0mm de comprimento seguidas de secagem, retomaram o crescimento da radícula, em condições apropriadas de germinação (Buitink et al., 2003; Faria et al., 2005).

Tabebuia impetiginosa é uma espécie de região tropical e *Alliaria petiolata*, espécie do continente europeu de áreas temperadas, que têm comportamento ortodoxo. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da secagem controlada em sementes germinadas (plântulas) e também para identificar quais partes da plântula (radícula, hipocótilo e cotilédones) sofrem os primeiros efeitos da desidratação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nas dependências do Millennium Seed Bank (Seed Conservation Department, Royal Botanic Garden, Kew -England - UK).

Sementes de ambas as espécies foram coletadas e previamente armazenadas para depois serem submetidas aos experimentos.

2.1 Local de coleta e beneficiamento das sementes de *T. impetiginosa* e *Alliaria petiolata*

Frutos maduros de *T. impetiginosa* foram coletados, em outubro de 2005, de dez árvores em região de Cerrado (bioma), localizada próximo à cidade de Lavras, estado de Minas Gerais, Brasil. Logo após a coleta dos frutos, esses frutos tiveram suas sementes extraídas manualmente e mantidas à temperatura ambiente até alcançarem conteúdo de água de 0,09gH₂O/g matéria seca. Em seguida, as sementes foram armazenadas dentro de sacos plásticos, à temperatura regulada para 10°C, com umidade relativa de 60%. Depois de nove meses de armazenamento, no Brasil, as sementes foram enviadas para o Millennium Seed Bank (Seed Conservation Department, Kew-England), onde os experimentos de germinação foram realizados. Testes de germinação foram realizados no momento de coleta dos frutos e também logo após a chegada das sementes no Millennium Seed Bank.

Sementes de *Alliaria petiolata* foram obtidas de plantas cultivadas em casa de vegetação, nas dependências do Millennium Seed Bank, safra 2006, armazenadas durante três meses dentro de sacos de papel, em câmara fria regulada a 10°C, com 30% de umidade relativa.

2.2 Germinação de sementes de *T. impetiginosa*

Para a germinação, sementes de *T. impetiginosa* foram selecionadas e tiveram seu tegumento removido manualmente, tendo sido utilizados embriões (cotiledóne + eixo embrionário) para a germinação. Depois dessa etapa, os embriões foram colocados em uma câmara para sofrerem pré-umidificação, por um período de 24 horas. A pré-umidificação foi realizada na mesma temperatura

de germinação (30°C), criando-se um ambiente com umidade relativa de 100% por meio do uso de papel germitest umidificado, porém, não permitindo o contato direto dos embriões com o papel umedecido. Após 24 horas de pré-umidificação, os embriões foram esterilizados com hipoclorito de sódio a 1%, por 10 minutos, lavados em água destilada por três vezes e transferidos para placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, com duas camadas de papel germitest adicionado 5mL de água destilada. Os embriões foram incubados, à temperatura de 30°C, com fotoperíodo de 8/16 horas e coletados assim que foi observada protrusão da radícula, quando foram transferidos para câmaras de secagem.

2.3 Germinação de sementes de *Alliaria petiolata*

Inicialmente, as sementes foram esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio a 1%, por 10 minutos, seguindo-se lavagem em água destilada, por três vezes. Em seguida, foram incubadas em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, com duas camadas de papel germitest adicionado de 5mL de solução de KNO₃, na concentração de 500mM de nitrato de potássio, para a quebra de dormência (Finch-Savage et al., 2007). Depois, as sementes foram transferidas para câmara de germinação regulada para 5°C, com fotoperíodo de 8/16 horas.

2.4 Método de secagem

Sementes germinadas (plântulas) tiveram o comprimento da radícula medido com uma régua metálica, com escala de divisão de 0,5mm, para medir o comprimento exato determinado para cada espécie. Para *T. impetiginosa*, foram utilizadas plântulas com comprimentos da raiz primária de 1,0; 2,0 e 2,5mm e, para a espécie *Alliaria petiolata*, foram selecionadas plântulas com comprimentos de raiz primária de 0,5; 1,0 e 1,5mm.

Em seguida, plântulas com os diferentes comprimentos de raiz primária foram secas. Um mesmo método de secagem foi utilizado para as duas espécies

estudadas. Para isso, foram adaptadas caixas de plástico, nas dimensões de 20x10x10cm, com a tampa vedada. Dentro da caixa foi depositada sílica gel, com controle de umidade relativa de 20% e, sobre a sílica gel, foi colocada uma camada de folha de alumínio, para evitar o contato direto entre ela e as sementes germinadas. Todo esse processo foi realizado em uma sala com temperatura controlada a 20°C. A secagem foi realizada durante 48 horas e, durante intervalos de tempos, amostras eram retiradas para o acompanhamento da redução na umidade das plântulas, até essas atingirem 0,09gH₂O/g matéria seca.

2.5 Rehidratação das plântulas após a secagem

Para verificar se a secagem foi danosa às plântulas ou se elas podem sofrer desidratação sem perder o potencial de restabelecer o crescimento da radícula, mesmo depois de sofrer um efeito de estresse por secagem após a germinação, aquelas com comprimentos da raiz primária de 1,0; 2,0 e 2,5mm, para *T. impetiginosa* e 0,5; 1,0 e 1,5mm, para *Alliaria petiolata*, foram submetidas ao processo de pré-umidificação, por 24 horas, a 30°C, para *T. impetiginosa* e 5°C para *Alliaria petiolata*. Seguiu-se a reembebição em placas de Petri, contendo água destilada e papel germitest. As temperaturas utilizadas para o restabelecimento do crescimento da raiz primária foram as mesmas empregadas na germinação, 30°C para *T. impetiginosa* e 5°C para *Alliaria petiolata*, ambas com fotoperíodo de 8/16 horas. Foram utilizadas 5 repetições de 10 plântulas, para cada comprimento de raiz primária.

2.6 Secagem das diferentes partes das plântulas (raiz primária, hipocótilo e cotilédones)

Este experimento foi realizado paralelamente ao anterior, para identificar em qual das partes da plântula existe maior quantidade de água e qual sofre secagem mais rápida. Para isso, o acompanhamento da desidratação em

diferentes partes da plântula foi isolado em raiz primária, hipocótilo e cotilédones. Neste estudo, foram utilizadas plântulas com 3,0mm de comprimento de raiz primária. As medições foram obtidas usando lupas apropriadas para a dissecação de tecidos com auxílio de bisturi e régua metálica com escala de divisão de 0,5mm. A opção por plântulas com 3,0mm de comprimento da raiz primária ocorreu em função da fácil identificação das partes já mais diferenciadas dos tecidos. Nessa etapa, também, o método de secagem empregado para as duas espécies foi o mesmo, seguindo como descrito anteriormente no item método de secagem. A secagem foi realizada até que as partes dissecadas atingissem peso constante em cinco réplicas de cada comprimento de raiz primária. Em intervalos regulares de tempo (2 horas), amostras foram retiradas cuidadosamente e pesadas em balança analítica digital para o acompanhamento da desidratação. Ao final de 48 horas, as mesmas amostras foram colocadas para secagem em estufa regulada 103°C, durante 17 horas conforme INTERNATIONAL RULES FOR SEED TESTING (ISTA, 1996), sendo o resultado final expresso em base de peso seco (gH₂O/g MS).

3 RESULTADOS

3.1 Desidratação e sobrevivência das plântulas de *T. impetiginosa* e *Alliaria petiolata*

Plântulas de *T. impetiginosa*, provenientes dos comprimentos de raiz primária de 1,0 e 2,0mm, apresentaram respostas de sobrevivência quando desidratadas até atingirem peso constante de 0,09gH₂O/g MS. Plântulas com 1,0mm de comprimento tiveram 80% ($\pm 17,3$) de restabelecimento (sobrevivência) do crescimento da raiz primária (Figura 1A) e, quando as plântulas atingiram 2,0 mm de comprimento, seguindo-se a desidratação, foi observada redução na porcentagem final de restabelecimento do crescimento da

raiz primária. Nesta situação foi observada apenas 50% ($\pm 16,7$) de sobrevivência (Figura 1A). No comprimento de 2,5mm, não foi observada sobrevivência da radícula, indicando morte do meristema radicular, com aspecto de cor escura, necrosada (Figura 1C).

No estudo aplicado para as plântulas de *Alliaria petiolata*, os comprimentos de raiz primária selecionados foram menores, em função do comprimento reduzido das sementes, as quais possuíam tamanho médio de 3,0mm (Figura 1D). Plântulas dessa espécie também seguiram ordem decrescente de restabelecimento do crescimento da raiz primária, com o aumento dos comprimentos após desidratação, até atingirem peso constante de 0,05gH₂O/g MS. Para plântulas com 0,5mm de comprimento, observou-se porcentagem final de restabelecimento do crescimento da raiz primária de 57,6 ($\pm 14,0$). Permitindo o crescimento da raiz primária para o dobro, ou seja, 1,0mm, a porcentagem final observada foi de 43% ($\pm 16,4$). Nessa situação, não foram observadas quedas muito acentuadas. No entanto, o crescimento da raiz primária, três vezes superior (1,5mm), não evitou queda na porcentagem final do restabelecimento do crescimento da raiz primária depois da desidratação, atingindo valores de 14,8% ($\pm 13,7$) (Figura 1B).

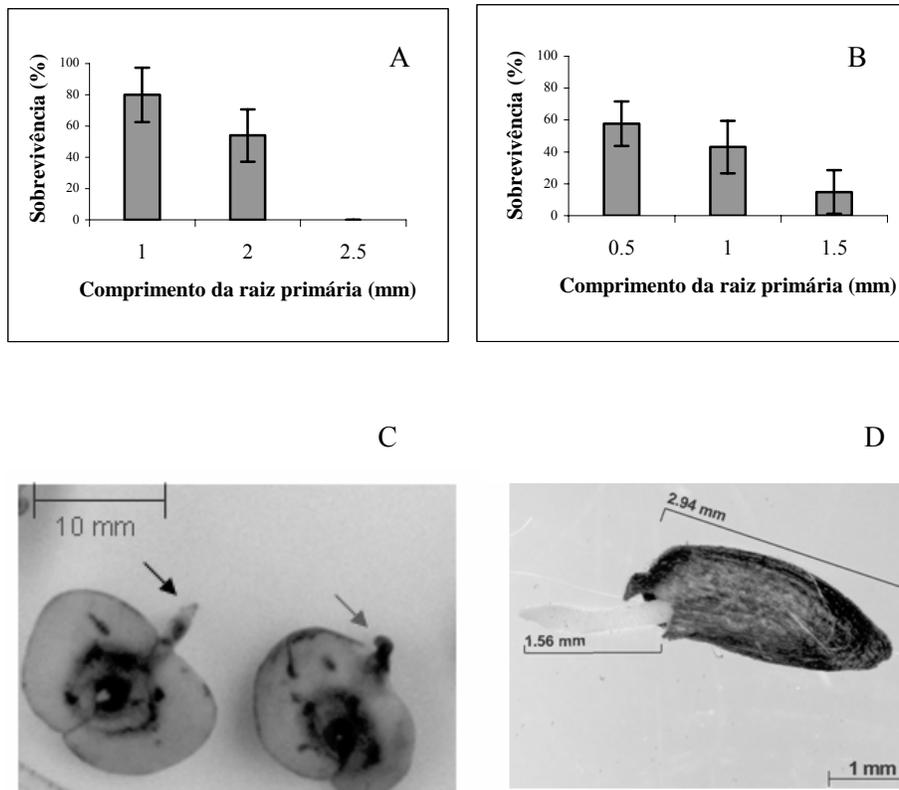


FIGURA 1. Porcentagem final de sobrevivência de plântulas nos comprimentos de raiz primária de 1,0; 2,0 e 2,5mm para *Tabebuia impetiginosa* (**A**) e nos comprimentos de raiz primária de 0,5; 1,0 e 1,5mm para *Alliaria petiolata* (**B**). Seta vermelha indicando detalhes de morte (necrose) da raiz primária em plântulas de *T. impetiginosa* (**C**) e seta na cor preta indicando plântulas com raiz primária de coloração branca com meristema radicular em crescimento. (**D**) imagem ilustrativa indicando o tamanho das sementes da espécie *Alliaria petiolata*.

Para plântulas em que não foi observada morte do meristema radicular, o acompanhamento do desenvolvimento da raiz primária e da sobrevivência mostrou-se normal quando as mesmas foram colocadas em condições ideais de crescimento, 30°C para *T. impetiginosa* e 5°C para *Alliaria petiolata* (Figura 2).

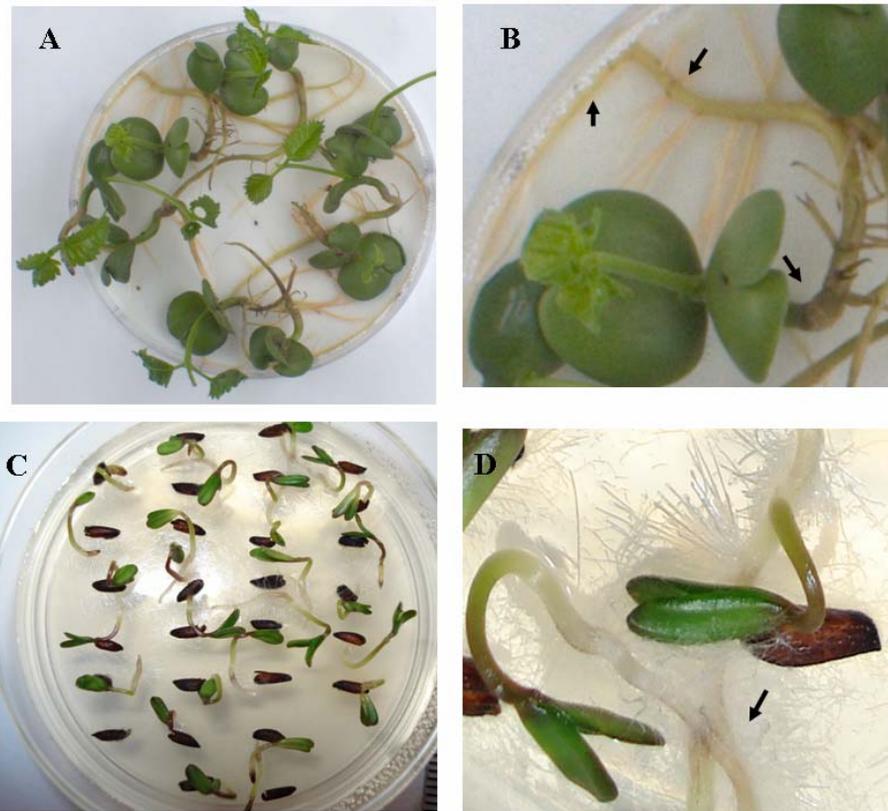


FIGURA 2. Aspectos da raiz primária de plântulas de *T. impetiginosa* (A e B) e *Alliaria petiolata* (C e D), após secagem e posterior transferência das plântulas para as condições ideais de crescimento. Setas indicam o desenvolvimento da raiz primária. B e D indicam os detalhes.

3.2 Secagem da radícula, hipocótilo e cotilédones de plântulas de *T.*

impetiginosa

Raízes primárias de *T. impetiginosa*, após a germinação e o crescimento até 3,0mm, apresentaram 6,1gH₂O/g MS. Logo depois, as raízes foram submetidas à secagem, chegando a 4,6gH₂O/g MS, com duas horas de secagem; em quatro horas de secagem, alcançaram 2,6gH₂O/g MS. A partir desse momento, o tempo de secagem foi prolongado até 21 horas, que foi suficiente para que as raízes primárias atingissem peso constante 0,12gH₂O/g MS, permanecendo com esse peso até completar 48 horas (Figura 3).

Para a região do hipocótilo, o peso inicial verificado foi de 3,5gH₂O/g MS. Com 2 horas de secagem, observou-se redução para 2,8gH₂O/g MS, caindo para 2,13gH₂O/g MS, em 4 horas de secagem. Em 21 horas de desidratação, foi observada redução para 0,15gH₂O/g MS, nas partes selecionadas do hipocótilo, atingindo peso constante de 0,07gH₂O/g MS em 48 horas de desidratação (Figura 3).

Nos cotilédones, observou-se a menor quantidade inicial de água. Nessa parte das plântulas, a umidade inicial foi de 0,75gH₂O/g MS, sofrendo leve queda até atingir 0,33gH₂O/g MS, com 21 horas de desidratação, chegando ao peso constante de 0,04gH₂O/g MS, em 48 horas de desidratação (Figura 3).

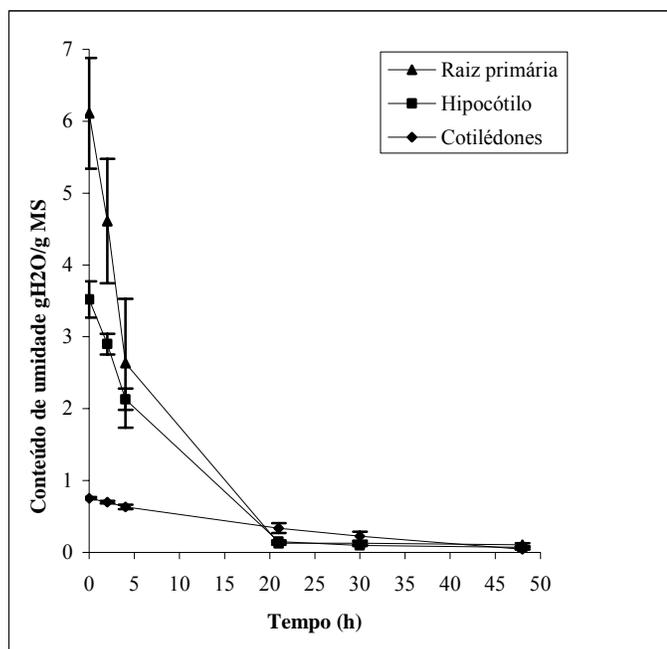


FIGURA 3. Teor de água durante a secagem para as diferentes partes das plântulas de *T. impetiginosa* com 3,0mm de comprimento. Valores em gH₂O/g MS.

3.3 Secagem da radícula, hipocótilo e cotilédones de plântulas de *Alliaria petiolata*

Para *Alliaria petiolata*, também foram utilizadas plântulas com 3,0mm de comprimento de raiz primária, dissecadas nas diferentes partes, compreendendo radícula, hipocótilo e cotilédones. A desidratação nas diferentes partes das plântulas de *Alliaria petiolata* seguiu a seguinte ordem: raiz primária, hipocótilo e cotilédones. A quantidade inicial de água encontrada na raiz primária de *Alliaria petiolata* foi de 10,4gH₂O/g MS. Após aferido esse valor, amostras de raiz primária foram transferidas para câmara de secagem, onde, em 2 horas, atingiram 3,18gH₂O/g MS, sofrendo uma queda ainda mais acentuada após 4 horas de desidratação, chegando a 0,45gH₂O/g MS. Em 21 horas de

secagem, foi observada queda do conteúdo de água para 0,14gH₂O/g MS. Essas raízes primárias atingiram peso constante a 0,08 gH₂O/g MS, em 48 horas de desidratação (Figura 4).

A quantidade inicial de água observada para a região do hipocótilo de *Alliaria petiolata* foi similar à observada na raiz primária. Para essa situação, a quantidade de água observada no hipocótilo, logo após a germinação, foi de 10,39 gH₂O/g MS. Quando transferido para secagem e mantido por 2 horas, a desidratação inicial foi responsável pela remoção de água, até atingir 7,66gH₂O/g MS. O padrão de desidratação seguiu de forma constante, tendo, após 4 horas de secagem, atingido 5,59gH₂O/g MS. No entanto, a desidratação foi mais acentuada depois de 21 horas de secagem, chegando à média dos valores a atingir 0,69gH₂O/g MS. O peso constante observado foi de 0,14gH₂O/g MS de hipocótilo, às 48 horas de desidratação (Figura 4). Cotilédones de *Alliaria petiolata* apresentaram umidade inicial de 4,0gH₂O/g MS. A secagem entre 2 e 4 horas promoveu desidratação para conteúdos de umidade de 2,38 e 1,11gH₂O/g MS, respectivamente e, ao final de 48 horas, foi observada redução até 0,04 gH₂O/g MS de cotilédones (Figura 4).

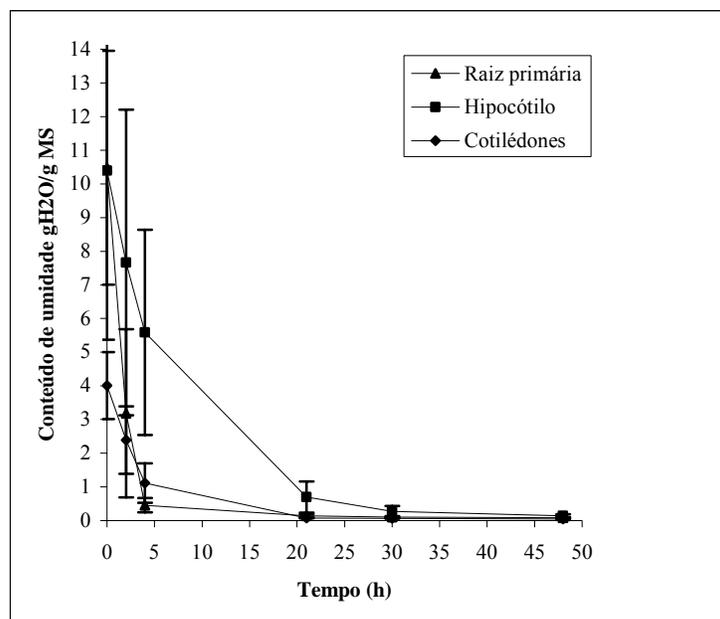


FIGURA 4. Taxa de secagem nas diferentes partes das plântulas com 3,0mm de comprimento. Valores em gH₂O/g MS.

4 DISCUSSÃO

Como caracterizado inicialmente, as espécies *T. impetiginosa* e *Alliaria petiolata* produzem sementes ortodoxas. Teoricamente, sementes, quando embebidas, tendem a perder a tolerância à dessecação, ou seja, sua viabilidade é comprometida, de forma que, quando ocorre a protrusão da radícula, se surgir uma condição adversa no ambiente, tal como períodos de seca (desidratação), as plântulas caminham para um processo de morte do meristema radicular, como consequência da perda de tolerância à dessecação (Hong & Ellis, 1992; Buitink et al., 2003).

Quando plântulas são colocadas em condições apropriadas de secagem, com controle de temperatura e de umidade relativa do ambiente adequadas a

uma desidratação segura, lenta e homogênea, algumas espécies têm demonstrado ser dotadas de mecanismos capazes de resgatar essa capacidade de tolerância à dessecação e permanecerem com o meristema radicular vivo. Isso foi observado em plântulas de *Medicago truncatula* cv. Paraggio, nas quais a perda de tolerância à dessecação ocorreu com 2,0mm de comprimento de radícula (Buitink et al., 2003; Faria et al., 2005).

Plântulas de *T. impetiginosa* e *Alliaria petiolata* apresentaram diferentes respostas quanto à secagem, em função do comprimento da radícula. Entretanto, nessas duas espécies, especificamente, há uma diferença evidente quanto ao tamanho das sementes. Sementes de *T. impetiginosa* possuem 10,0mm no seu maior eixo, enquanto sementes de *Alliaria petiolata* apresentam 3,0mm no maior eixo (Figuras 1C e 1D). Naturalmente, esperavam-se respostas de sobrevivência da radícula em maiores comprimentos para *T. impetiginosa* (Figura 1A), com limite registrado a 2,0mm, enquanto, para plântulas de *Alliaria petiolata*, o limite de sobrevivência foi encontrado para aqueles com radícula de até 1,5mm de comprimento. Portanto, sempre serão encontradas respostas diferentes quanto ao comprimento de radícula, em função da diferença de tamanho de sementes. Faria et al. (2005) discutem que respostas a diferentes comprimentos de radícula variam de espécie para espécie, podendo também ser em função dos procedimentos experimentais adotados, especificamente a taxa de secagem que, no presente caso, certamente pode ter sido a causa das diferenças encontradas.

As condições de secagem utilizadas para *T. impetiginosa* e *Alliaria petiolata* foram as mesmas (20%UR e 20°C), tendo a tolerância à dessecação sido parcialmente restabelecida nos comprimentos de radícula relatados na Figura 1A e B. O período de desidratação foi de 48 horas, sendo caracterizado como secagem lenta. Certamente, esse tipo de secagem foi suficiente para permitir a síntese *de novo* de componentes considerados de proteção a danos decorrentes da secagem. Essa observação foi feita em sementes germinadas

submetidas à desidratação lenta (Sun, 1999) e também em sementes ortodoxas em desenvolvimento (Kermode & Finch-Savage, 2002; Berjak & Pammenter, 2008).

Soeda et al. (2005), estudando indicadores dos níveis de tolerância de estresse, identificaram que, quando sementes ortodoxas da espécie *Brassica oleracea* foram submetidas à secagem rápida após o tratamento de *priming* (prática utilizada para permitir a entrada controlada de água na semente, porém, não permitindo a protrusão radicular visando ao sincronismo da germinação), utilizando condicionamento osmótico com solução de polietileno glicol na concentração de -1,0MP, foi observada redução na longevidade e na velocidade de germinação. O oposto ocorreu quando foi utilizada secagem lenta, mostrando uma situação favorável aos mecanismos de reparo e proteção a danos. Muito provavelmente, os mecanismos de tolerância à dessecação requerem secagem lenta, tal como a desidratação ocorre no final da fase de maturação, embora os modos de funcionamento e de interação permaneçam largamente hipotéticos (Berjak & Pammenter, 2008).

Experimentos considerando a semente inteira podem levar a erros em função da possibilidade de existirem diferentes conteúdos de água nas diferentes partes do embrião, não sendo possível identificar com exatidão se os conteúdos de umidade são os mesmos para todas as partes das plântulas. Assim, foram estudadas partes separadas das plântulas de *T. impetiginosa* e *Alliaria petiolata*, como o eixo embrionário (radícula + hipocótilo) e os cotilédones.

Por exemplo, partes em que a água pode ser desprendida mais rápido ou mais lentamente, podem conduzir a danos.

Reisdorph & Koster (1999), estudando a perda progressiva de tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Pisum sativum*, encontraram maior sensibilidade à dessecação para a região da raiz primária, mostrando ser essa a primeira a sofrer os danos de secagem.

Evidentemente, tecidos da radícula são dotados de maior volume de água (Figuras 3 e 4), sendo esses caracterizados por células meristemáticas, sensíveis a danos por estresse. Em plântulas de *T. impetiginosa*, com 21 horas de desidratação, radículas atingiram 99% de remoção do conteúdo inicial de água, hipocótilos 96% e cotilédones 55%. Nesse momento de desidratação, as partes correspondentes à raiz primária e ao hipocótilo praticamente estão próximas de atingirem peso constante, enquanto os tecidos dos cotilédones ainda sofreram redução de apenas metade do conteúdo de umidade (Figura 3). O comportamento observado para as plântulas de *Alliaria petiolata* foi semelhante ao encontrado para *T. impetiginosa*, quanto à perda de água durante o período de desidratação.

Assim como para os cotilédones de *T. impetiginosa*, também para os cotilédones de *Alliaria petiolata* foram observados os menores valores de conteúdo de umidade. Plântulas selecionadas de *Alliaria petiolata* apresentaram cotilédones com conteúdo de umidade inicial de 4,0gH₂O/g MS e, para essa situação, a desidratação em 4 horas gerou a remoção de 2,89 gH₂O/g MS, correspondendo a 72,25%.

Quando a secagem foi prolongada para 21 horas, para as partes separadas das plântulas de *Alliaria petiolata*, as porcentagens de remoção foram de 98,6% na raiz primária, 93,3% para o hipocótilo e 98,0% nos cotilédones. Para essa situação, existe uma remoção do conteúdo de umidade similar para as diferentes partes em um mesmo momento. Porém, essa similaridade é observada somente depois de 21 horas de desidratação (Figura 4), sendo importante destacar que, antes desse ponto, a radícula também sofre reduções mais acentuadas na remoção de água.

Plântulas de *T. impetiginosa* e *Alliaria petiolata* apresentaram alta capacidade de tolerância à dessecação, quando submetidas à secagem controlada (Figura 1A e 1B). Acredita-se que a não sobrevivência das plântulas com

maiores comprimentos de radícula seja por causa do dano causado no meristema radicular, visto que, após a reidratação, esses apresentaram a região do meristema radicular necrosado (Figura 1C).

As respostas encontradas neste trabalho representam uma adaptação de sobrevivência dessas espécies porque o mesmo não ocorre para muitas outras espécies que já perdem a capacidade de tolerância à dessecação, mesmo antes da protrusão da radícula, ou seja, durante a embebição (Daws et al., 2007).

5 CONCLUSÕES

A tolerância à dessecação em plântulas de *T. impetiginosa* e *Alliaria petiolata* é perdida em uma proporção constante, na medida em que ocorre o progresso da germinação e da protrusão da radícula e o crescimento da raiz primária. Assim, sugere-se que, para estas espécies, nas condições adversas que podem ocorrer no campo, períodos de secas não sejam danosos antes da protrusão da radícula, mas o risco de morte pode ser maior depois que as sementes germinadas atingirem comprimentos de radícula superiores a 2,0mm, para *T. impetiginosa* e 1,5mm em *Alliaria petiolata*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C.; CHESTER, E. W. Seed germination biology of the weedy biennial *Alliaria petiolata*. **Natural Areas Journal, Rockford**, v. 12, n. 4, p. 191-197, Oct. 1992.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, London, v. 101, n. 2, p. 213-228, Jan. 2008.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
- BUITINK, J.; VU, L. B.; SATOUR, P.; LEPRINCE, O. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. **Seeds. Seed Science Research**, Wellington, v. 13, n. 4, p. 273-286, Dec. 2003.
- CARVALHO, L. R.; SILVA, E. A. A. ; DAVIDE, A. C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 2, p. 15-25, 2006.
- DAWS, M. I.; BOLTON, S.; BURSLEM, D. F. R. P. Loss of desiccation tolerance during germination in neo-tropical pioneer seeds: implications for seed mortality and germination characteristics. **Seed Science Research**, Wellington, v. 17, n. 4, p. 273-281, Dec. 2007.
- FARIA, J. M. R.; BUITINK, J.; VAN LAMMEREN, A. A. M. AND HILHORST, H. W. M. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 418, p. 2119-2130, Aug. 2005.
- FINCH-SAVAGE, W. E.; CADMAN, C. S. C.; TOOROP, P. E.; LYNN, J. R. HILLORST, H. W. M. Seed dormancy release in *Arabidopsis Cvi* by dry afterripening, low temperature, nitrate and light shows common quantitative patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing. **The Plant Journal**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 60-78, July 2007.
- HONG, T. D.; ELLIS, R. H. The survival of germinating orthodox seeds after desiccation and hermetic storage. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, n. 247, p. 239-247, Feb. 1992.

HONG, T. D., LININGTON, S.; ELLIS, R. H. **Seed storage behaviour: a compendium**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 104 p. (Handbooks for Genebanks, 4).

INTERNATIONAL RULES FOR SEED TESTING. **Seed science and technology**. Zurich: 1996. 336p. (ISTA. Supplement, n. 24).

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

LIU, K.; EASTWOOD, R. J.; FLYNN, S.; TURNER, R. M.; STUPPY, W. H. 2008. **Seed Information Database** (release 7.1, May 2008). Disponível em: <<http://www.kew.org/data/sid>>. Acesso em: 09 maio 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352 p.

NUZZO, V. Invasion pattern of the herb garlic mustard (*Alliaria petiolata*) in high quality forests. **Biological Invasions**, Dordrecht, v. 1, p. 169-179, 1999.

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

RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: E. Blücher, 1971. 294p.

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

SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C.; FARIA, R. M. J.; MELO, D. L. B.; ABREU, G. B. Germination studies on *Tabebuia impetiginosa* Mart. seeds. **Cerne**, Lavras, v. 10, n. 1, p. 1-9, jan./jun. 2004.

SOEDA, Y.; KONINGS, M. C. J. M.; VORST, O.; HOUWELINGEN, A. M. M. L. van; STOOPEN, G. M.; MALIEPAARD, C. A.; KODDE, J.; BINO, R. J.; GROOT, S. P.C.; GEEST, A. H.M. van der. Gene Expression Programs during *Brassica oleracea* seed saturation, osmopriming, and germination are indicators of progression of the germination process and the

stress tolerance level. **Plant Physiology**, Rockville, n.1, v. 137, p. 354-368, Jan. 2005.

SUN, W. Q. Desiccation sensitivity of recalcitrant seeds and germinated orthodox seeds: can germinated orthodox seeds serve as a model system for studies of recalcitrant seeds. In: IUFRO SEED SYMPOSIUM, Kuala Lumpur 1998. **Proceedings ...** Kuala Lumpur: FRIM, 1999. p. 29-42.

YATES, C. N.; MURPHY, S. D. Observations of herbivore attack on garlic mustard (*Alliaria petiolata*) in Southwestern Ontario, Canada. **Biological Invasions**, Dordrecht, v. 10, n. 5, p. 757-760, June 2008.

CAPÍTULO 4

The re-induction of desiccation tolerance in germinated seeds of *Tabebuia impetiginosa* Mart e *Alliaria petiolata*.

Carlos Vinicio Vieira ¹; Edvaldo Aparecido Amaral da Silva²; Amauri Alves Alvarenga, ¹; Evaristo Mauro de Castro, ¹; Peter E. Toorop³

¹Setor de Fisiologia Vegetal - Departamento de Biologia - Universidade Federal de Lavras - e-mail: vieiracv@gmail.com; ²Laboratório de Sementes Florestais - Departamento de Ciências Florestais - Universidade Federal de Lavras - e-mail: amaral@ufla.br; ³Seed Conservation Department, Royal Botanic Gardens, Kew, Wakehurst Place, Ardingly, Haywards Heath, West Sussex RH17 6TN, UK; - e-mail: p.toorop@rbgkew.org.uk

Peter E. Toorop

* **Corresponding author:** Seed Conservation Department, Royal Botanic Gardens, Kew, Wakehurst Place, Ardingly, Haywards Heath, West Sussex RH17 6TN, UK; e-mail: p.toorop@rbgkew.org.uk

(Formatted according to *Annals of Botany*)

Abstract

The presence of desiccation sensitivity, i.e. the inability of seeds to survive desiccation, poses a serious problem for long-term storage since storage under wet or moist conditions is considered impossible. Seedlings from orthodox seeds of *Tabebuia impetiginosa* Mart. (Bignoniaceae) were used in this work. Different drying rates, slow and fast, were used. Polyethylene glycol (PEG-8000) at the concentration of -1.7MPa was used to re-induce desiccation of the primary roots. In parallel, the manipulation of water potential by different concentration of polyethylene glycol (-1.4; -1.7 and -2.0MPa) was studied. The ABA effect, cold and heat shock was also carried out to investigate what effect they may have on re-induction desiccation tolerance. The different protocols used showed that desiccation tolerance in *Tabebuia impetiginosa* seedlings was improved. Slow drying conditions took 30 hours and allowed radicle growth, on the other hand, fast drying conditions took 14 hours but the radicle died. Seedlings with PEG at -1,7 MPa showed survival of the primary roots at 92%, 74% and 54% with radicle lengths of 1.0; 2.0 and 2.5mm, respectively. The control showed survival of seedlings at 80% and 54% with radicle lengths of 1.0 and 2.0mm, respectively. The water potential manipulation at -1.7MPa allowed survival of radicles as long as 3.0mm. PEG at the water potential of -1.7 MPa plus ABA allowed survival of radicles with 3.0mm. Treatment with one hour of cold shock and heat shock followed by PEG allowed survival of the radicles with 3.0mm. The same protocol used for *Tabebuia impetiginosa* seedlings was applied in *Alliaria petiolata* seedlings. The results showed limited survival for radicle <2.0mm and PEG improved survival of all radicles with length up to 2.5 mm. The expression study of the expansin gene (*TiExpI*) analyzed in the hypocotyls and radicles of *T. impetiginosa* seeds and seedlings showed an increase in the expression in the hypocotyls and radicle during imbibition

(before radicle protrusion) and re-hydration (pre-humidification upon slow drying).

Key words: desiccation tolerance, desiccation sensitive, osmotic stress, cold shock, heat shock, abscisic acid and expansin gene.

1 INTRODUCTION

Seed development can be divided into distinct stages such as pattern formation, growth, seed filling, followed by acquiring the desiccation tolerance before the dispersal of the seed from the mother plant. During the course of seed maturation various events take place including the accumulation of storage product, suppression of the early germination, the acquisition of desiccation tolerance, and in some case the induction of dormancy (Bewley & Black, 1994). Usually, orthodox seeds, when mature, have low water content, low metabolic activity and accumulation of compounds for protection, which help survival under severe conditions. For seeds known as recalcitrant, the initial pattern of histodifferentiation follows in similarity to the one described for orthodox seeds until the moment when they reach maximum dry weight. During the development, recalcitrant seeds have as a main feature, almost no net water loss; they may also accumulate dry weight; remain with high metabolic activity; remain sensitive to desiccation and no requesting of desiccation for subsequent germination (Kermode & Finch-Savage, 2002).

The literature reports that seeds are divided into orthodox and recalcitrant regarding their response to desiccation and to the storage behavior. Orthodox seeds are able to tolerate desiccation and drying even below 7% moisture content with no effect on viability (Roberts, 1973). On the other hand, recalcitrant seeds loose viability when seeds or embryos are dried to water content as high as 20-30% (Pritchard, 2004). There is another category between orthodox and recalcitrant seeds which is known as intermediate behavior which present seeds relatively tolerant to drying, but do not withstand the removal of water to low levels, as in orthodox seeds, and these seeds, particularly, if they have tropical origin, may also show sensitivity to low temperatures, even in the dehydrated state (Hong & Ellis, 1996).

The presence of desiccation sensitivity, *i.e.* the inability of seeds to survive desiccation, poses a serious problem for long-term storage since storage under wet or moist conditions in warm temperatures is virtually impossible. Induction of desiccation tolerance via a commonly applicable protocol would form a breakthrough in seed banking, possibly enabling the safe storage of recalcitrant seeds that currently cannot be dried. Recently, induction of desiccation tolerance in seedlings from orthodox seeds has been described (Buitink et al., 2003; Faria et al., 2005). Some researchers say that the lack of a model system to easily manipulate and study desiccation tolerance was responsible for the slow progress in science related to recalcitrant seeds. However, Sun (1999) proposed that germinated orthodox seeds might serve as a model system to study and understand the recalcitrance behavior. Since then, studies have been carried out in this direction where seedlings from orthodox seeds are used to understand the sensitivity to desiccation. This type of approach allows the continuous supply of experimental material at the physiological, cellular and molecular levels, which occur during loss of desiccation tolerance in germinated orthodox seeds. These results may be compared to those for recalcitrant seeds during drying after shedding.

Thus, we used *Tabebuia impetiginosa*, from the Bignoniaceae family, which is a tropical species and had its seeds classified as orthodox according to (Carvalho et al., 2006), aiming to: i) develop a protocol for induction of desiccation tolerance in *Tabebuia impetiginosa* seedlings; ii) characterize the expression of the expansin gene (*TiExp1*) related to germination and ii) investigate the application of such protocol in temperate *Alliaria petiolata* species from the Brassicaceae family.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material

Mature fruits of *Tabebuia impetiginosa* were collected in October of 2005 from ten adult and healthy trees in the Cerrado biome near the city of Lavras in the State of Minas Gerais, Brazil. The fruits were collected at the coordinates of 21°13'36,59"S and 44°58'54,39"W, and at an altitude of 918 meters. The climate is a transition between Cwb and Cwa, *i.e.* hot and humid summers with mild and dry winters, according to Koppen's classification (Koppen, 1936). Immediately after fruit collection, seeds were extracted manually from the fruits and kept at room temperature until the water content of 0.09gH₂O/g dry matter was reached. The seeds were stored in plastics bags at 10°C and 55% RH. After nine months of storage, the seeds were shipped to the Millennium Seed Bank (Seed Conservation Department, Kew-England), where experiments were carried out. Seed germination was performed immediately after fruit collection and soon after arrival of the seeds at the Millennium Seed Bank. All germination experiments showed maximum viability of 100% germination (data not shown).

2.2 Germination experiments

Embryos were placed in a pre-humidification chamber during 24 hours without direct contact with the moist paper in an atmosphere of high relative humidity at the same temperatures used for the germination experiment. Embryos were surface sterilized by washing with 1% sodium hypochlorite for 10 minutes, rinsed in distilled water three times and placed in 9.0 cm Petri dishes on 2 filter papers (Whatman no.1) with 5mL of demineralised water. The seeds were incubated either at constant temperatures (15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C) or alternating temperatures (day/night: 25/15°C, 30/20°C) with an 8 h

photoperiod coinciding with the day temperature. In addition, for dark-control, seeds were incubated at 30°C in the dark. For each treatment, germination was carried out with four replicates composed of 25 seeds. Germination was scored daily. Seeds were considered to have completed germination when radicle protrusion and elongation >1 mm was observed.

2.3 Desiccation methods

Seeds were germinated on filter papers as previously described at 30°C with an 8 h photoperiod. Seedlings with radicles of 2.5mm length were selected and incubated in a PEG solution at -1.7MPa for 72 hours in the dark. Seedlings were then rinsed in distilled water for 20 seconds and blotted dry on paper towel to remove excess water. The seedlings were dried at two different drying rates at 20°C using silica gel at 20% of RH. Slow drying was performed in a closed box for 48 h by placing seedlings on aluminum foil in order to avoid direct contact with the silica gel and to reduce the speed of dehydration. Fast drying at 20%RH followed the same procedure as described for slow drying, but in this case the seedlings were placed on a fine mesh, which facilitated fast exchange of dry air between the air above the seedlings and the silica gel. Water content of the seedlings was determined with a four-place balance by weighing four replicates of ten seedlings before and after drying in an oven at 103°C for 17 hours (ISTA, 1996). The results were expressed on a dry weight basis.

2.3.1 PEG treatment

Three different solutions of polyethylene glycol 8000 (PEG) at the osmotic potential of -1.4; -1.7 and -2.0 MPa according to Michel (1983) were used at 5°C for optimization. Seedlings were placed at 5° C in the dark to avoid growth. Four replicates of ten seedlings each were collected during incubation to determine water content. Subsequently, seedlings were rinsed in distilled water

and dehydrated on silica gel at 20% eRH, followed by pre-humidification and germination. A seedling of which the primary root survived and resumed growth was considered desiccation tolerant.

To investigate the re-establishment of desiccation tolerance, germinated seeds were selected for the indicated length of the protruded radicle and dried directly or submitted to an osmotic treatment by incubation in a PEG solution with a water potential of -1.7MPa at 5°C in the dark (Buitink et al., 2003). Seedlings that were selected on the basis of their radicle length (1.0; 2.0; 2.5 and 3.0mm) were first submerged in the PEG solution at room temperature for five minutes, then placed with the radicle downwards in the Petri dish (9.0 cm diameter) with two filter papers (Whatman no.1) and 15 ml of PEG solution at 5°C. Under these conditions, embryos were not completely submerged in order to avoid possible hypoxic conditions. After 72 hours embryos were removed from the PEG solution, rinsed in distilled water, dried on silica gel (see above), and re-imbibed on wet filter paper as described under 'Germination'. Seedlings were considered desiccation tolerant when their primary roots survived and resumed growth after drying and rehydration. Three independent experiments were performed with 40 seedlings for each length. Apart from the influence of the drying processes on development and growth of the primary root, the formation of new roots from hypocotyls was observed by seedlings during a period of six days.

The same protocol was also applied to *Alliaria petiolata* seedlings with primary roots that were 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5mm long, which were incubated in PEG solution at the osmotic potential of -1.7 MPa as described for *Tabebuia impetiginosa* seedlings

2.3.2 ABA treatment

The effect of ABA was tested on the survival of primary roots. Thus, seedlings with a radicle length of 2.0; 2.5 and 3.0mm were incubated in PEG or ABA+PEG solutions with an osmotic potential of -1.7MPa. An ABA stock solution of 100 μ M was dissolved in 0.1% ethanol. The treatments used were PEG solution at -1.7MPa; PEG at -1.7MPa plus ABA 1 μ M; PEG at -1.7MPa plus ABA 10 μ M; PEG at -1.7MPa plus ABA 100 μ M; and ABA solution 100 μ M without PEG as a control. All treatments were incubated at 5°C in the dark. After 72 hours of incubation the seedlings were dried and re-hydrated as described above. The lengths of the primary roots were measured using a caliper with 0.5mm scale divisions. Three independent experiments with 40 seedlings for each length (2.0; 2.5 and 3.0mm) were used.

2.3.3 Cold and heat shock effect

The effect of cold shock and heat shock on survival of the primary root was determined by incubation of seedlings with 2.0; 2.5 and 3.0mm length during one or two hours at 1°C (cold shock) or at 45°C (heat shock). Thereafter, they were transferred to PEG-solution (-1.7MPa) and incubated for 72 hours at 5°C in the dark, rinsed in distilled water, dried and germinated as described above.

2.4 Growth and development of seedlings

Seedlings with radicle length of 1.0; 2.0; 2.5; 3.0; 4.0 and 5.0mm were placed in PEG-solution at the osmotic potential of -1.7MPa at 5°C in the dark for 72 hours. The seedlings were dried, pre-humidified and placed in a plastic box to germinate on 1% agar, which allowed rectilinear growth of the seedlings and made measurement of the seedling more precise. For each treatment four replicates with five seedlings each were used. The measurements were made at intervals of 7 days until 21 days using a caliper with scale division of 0.5mm.

2.5 RNA extraction

Total RNA was extracted from dry seeds; seeds after 24 hours of pre-humidification; seeds after 20 hours imbibition; seedlings with 2.5mm long radicles (after radicle protrusion); after subsequent PEG-incubation (-1.7MPa) for 72 hours at 5°C in the dark; after subsequent drying for 48 hours with 20%RH (silica gel); seedlings that turned white after pre-humidification; seedlings that turned black after pre-humidification. Total RNA was extracted from radicles and hypocotyls together using a hot borate method (Toorop et al., 2005). Samples were first frozen in liquid nitrogen and ground with a mortar and pestle. The homogenate was suspended in XT-buffer (0.2M sodium tetraborate decahydrate, 30mM EGTA, 1%SDS and 1% sodium deoxycholate, pH 9.0) with 1mg dithiothreitol and 14mg polyvinyl pyrrolidone per sample of 700µL, added to 1mg proteinase K and incubated at 42°C for 2h. Nucleic acids were precipitated with potassium chloride (final concentration 0.15M) on ice for 1h. Samples were centrifuged in a microfuge at 5°C for 20 min and lithium chloride was added to the supernatant in a final concentration of 2M. The samples were incubated overnight on ice, specifically to precipitate the RNA. Samples were centrifuged in a microfuge at 5°C for 20 min to pellet the RNA. The pellet was suspended in 2M cold lithium chloride and the samples were centrifuged at 5°C for 20 min. Upon decanting the supernatant, the pellet was washed in 2M cold lithium chloride twice by re-suspending the pellet and centrifuging at 5°C for 10 min. The pellets were re-suspended in 10mM Tris, potassium acetate was added to a concentration of 0.2M and samples were centrifuged at 5°C for 10 min to precipitate polysaccharides. To the supernatant, cold ethanol was added and the RNA was precipitated for 3h at - 80°C. The samples were centrifuged at 5 °C for 30 min to pellet the RNA. The pellet was washed with 70% cold ethanol, dried and re-suspended water. For further

purification, sodium acetate, in a final concentration of 0.3M, and ethanol were added, and RNA was precipitated overnight at -20°C . The samples were centrifuged at 5°C for 20 min to pellet the RNA. The pellet was washed with 70% cold ethanol, dried and resuspended in water. RNA was quantified with a spectrophotometer at 260 nm using Genequant (WPA – Light wave S 2000 UV/Vis spectrophotometer) and run an agarose gel 1.5% to observe the quality of the total RNA.

2.6 cDNA synthesis

The cDNA synthesis was performed using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche). RNA was incubated for 10 min at 65°C in a DYAD PCR machine with a heated lid (MJ Research). Immediately, the samples were placed on ice. Master mix was added according to the cDNA synthesis kit and samples were incubated in a DYAD PCR machine for 30 min at 55°C . Inactivation of Reverse Transcriptase was performed by heating at 85°C for 5 minutes.

2.7 PCR reaction

cDNA was used as a template for PCR reactions. In order to clone expansin homologues, PCR reactions were performed in a DYAD thermal cycler with heated lid using expansin (*Exp*) primers designed for cDNA of *Arabidopsis thaliana*. Initial denaturation for 4 min at 94°C , followed by 36 cycles of 1 minute at 94°C , 50 seconds at 55°C and 1 min at 72°C and a final elongation step of 10 minutes at 72°C and cooling to 10°C . Amplified cDNAs were separated on a 1.5% agarose gel to observe the quality of the PCR products and excise bands for cloning.

The pGEM^R – T Easy (Promega) kit was used for cloning and transformation to *Escherichia coli* strain JM109. Cells were plated on LB plates

with ampicillin. Colonies were selected for plasmid isolation and insert size was verified on 1.5% agarose gel. Samples were sequenced and the results were used to design specific primers for the expression studies

2.8 Gene expression studies through quantitative real-time PCR reactions

Embryonic axes from the treatments described under 2.8 were used to study gene expression in a quantitative real-time PCR (LightCycler, Roche) with gene specific primer, cDNA and SYBR Green master mix (LightCycler Faststart Master SYBR Green kit, Roche).

Gene specific primers were used during expression studies. Specific primers for an expansin from *T. impetiginosa* were designed using the PrimerSelect package of DNASTAR. The real time PCR-reaction was performed at 3 min at 95°C; then 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C, followed by 1 min at 95°C and 1 min at 55°C. Meltcurve analysis was performed to determine specificity. Specific primer for the *T. impetiginosa* 18S gene was used for normalization, and water was used as a negative control in every round of PCR. Three biological replicates were used for every sample condition. The $\Delta\Delta C_t$ method was used to express normalized differences in gene expression (Livak, 1997).

2.9 Statistical analysis

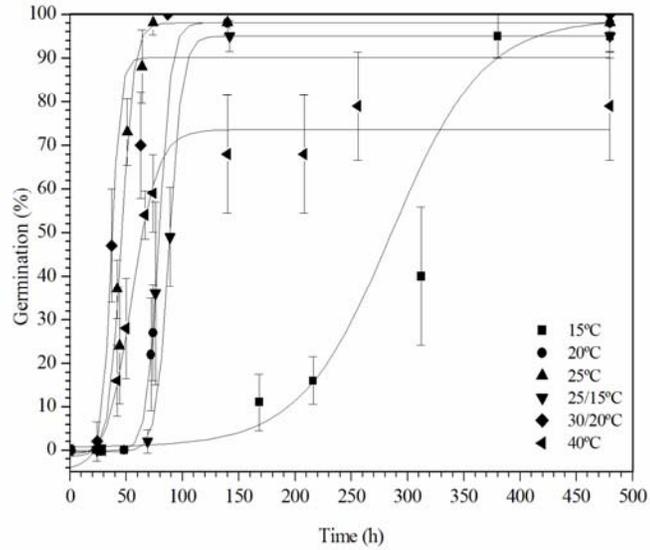
Analysis of variance was applied for the data obtained in all methodologies, without any transformation. The Scott-Knott (1974) test ($P \leq 0.05$) was applied.

3 RESULTS

3.1 Germination

Seed germination took place at a wide range of temperatures (Fig.1). The optimum temperature, which resulted in the fastest germination, was 30 °C in the presence of 8h of white light. Under such temperatures, germination started as soon as 24 hours after imbibition and reached 100% within 48 hours (Fig. 1B). At 30°C in the dark, germination was also high, although slower: it took 65 hours to reach 100% germination. The optimal germination temperature (30°C in the presence of 8h of white light) was used for subsequent experiments.

A



B

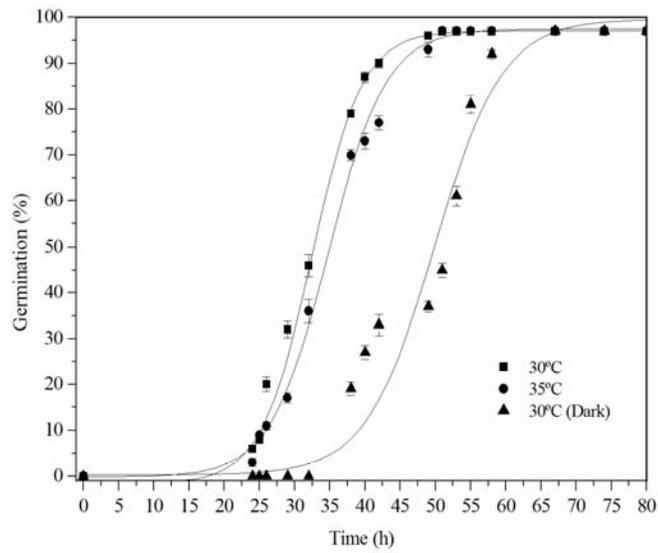


Figure 1- Germination curve of *Tabebuia impetiginosa* seeds. **A)** Germination at 15; 20; 25; 25/15; 30/20 and 40°C with 8 h of light. **B)** Germination at 30; 35°C with 8 h of light and 30°C in the dark.

3.2 Re-establishment of desiccation tolerance

3.2.1 Desiccation methods

Figure 2 shows that before imbibition, pre-humidification of the seeds for 24 h at 100% relative humidity at 30°C allowed the increase in water content. After that, the seeds germinated and reached a length of 2.5mm after approximately 48 h from the beginning of the pre-humidification treatment. At the same time, the seeds were immediately exposed to osmotic stress for 72 hours, which consisted of a PEG-treatment with or without ABA, with or without a cold shock or heat shock. Subsequently, osmotically treated seedlings were exposed to two different drying speeds: slow and fast as indicated in figure 2. To reach a water content of 0.05 gH₂O/g of dry matter, the slow drying conditions took 30 h and the fast drying conditions took 14 h. Slow-dried radicles survived and continued to grow, whereas fast-dried radicles died.

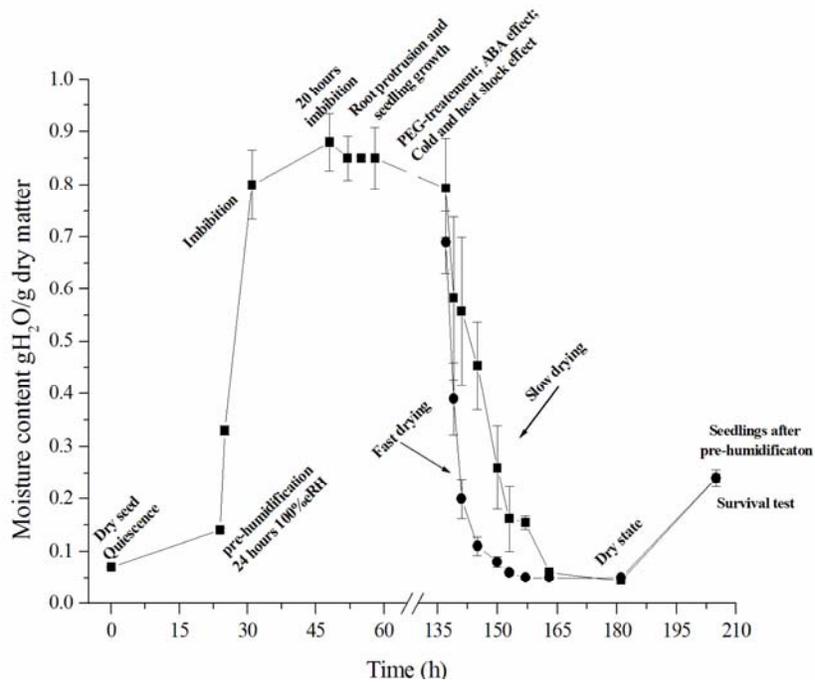


Figure 2- Water content during germination and growth of *T. impetiginosa* seeds and seedlings at 30°C. Fast drying is shown in red symbols and slow drying is shown in black.

3.2.2 Polyethylene glycol treatment

After PEG-treatment, radicles with a length of 1.0; 2.0 and 2.5mm length showed survival of 92, 74 and 65% respectively. For untreated seedlings, survival was 80, 54 and 0%, respectively (Figure 3). Protruded radicles with a length of 3 mm did not survive desiccation, either with or without PEG.

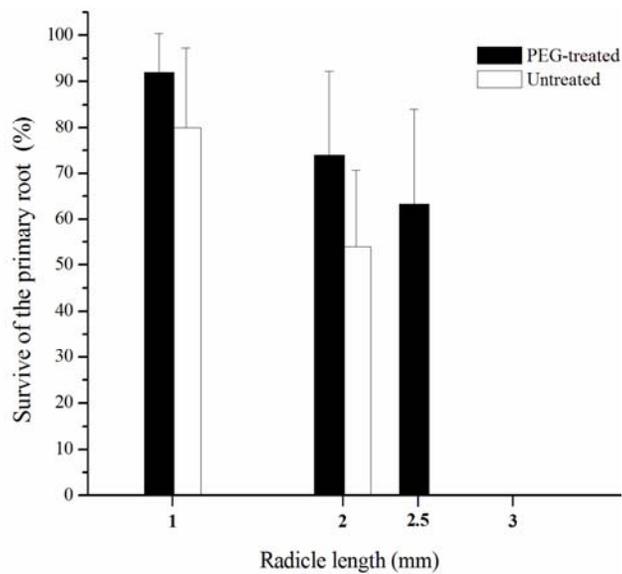
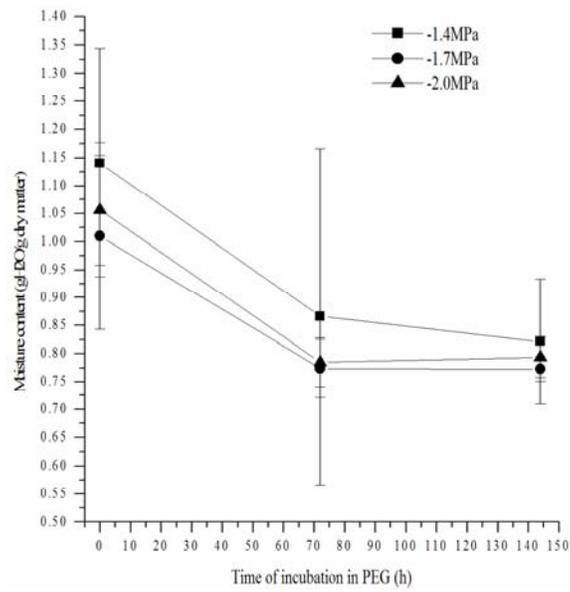


Figure 3- Seedlings survival from *T. impetiginosa* seeds after polyethylene glycol treatment (PEG-8000) at the concentration of -1.7MPa.

Among the different concentration of PEG solutions used, the concentration of -1.7MPa allowed the fastest decreased in water content. Under this concentration 72 h was the time sufficient to achieve reduced water content indicating the effectiveness of this protocol and allowed for the survival of the radicles (Figures 4 A and B) .

A



B

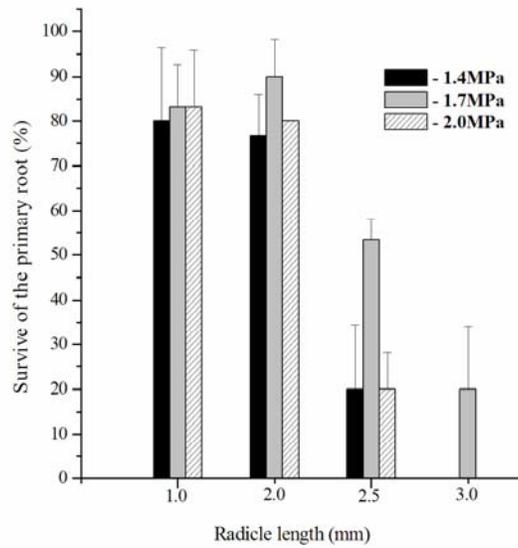


Figure 4- Effect of the different concentrations of polyethylene glycol (PEG 8000) on primary roots of *T. impetiginosa* seedlings. (A): on water content (B) on seedling survival.

Seedlings submitted or not, to polyethylene glycol treatment, which were considered tolerant and non-tolerant to desiccation, all showed formation of new roots or secondary roots. The roots were grown from hypocotyls and all had normal development forming a normal seedling. The results showed no statistical difference regarding the number of new secondary roots formed (Figure 5).

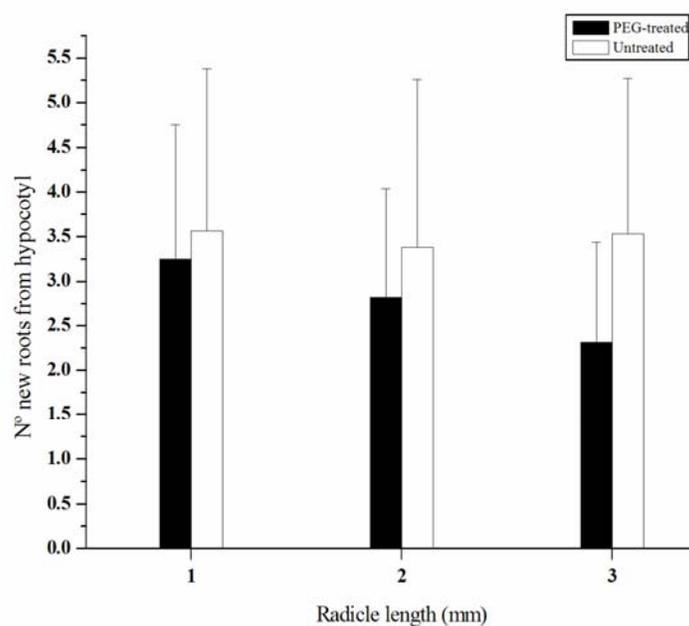


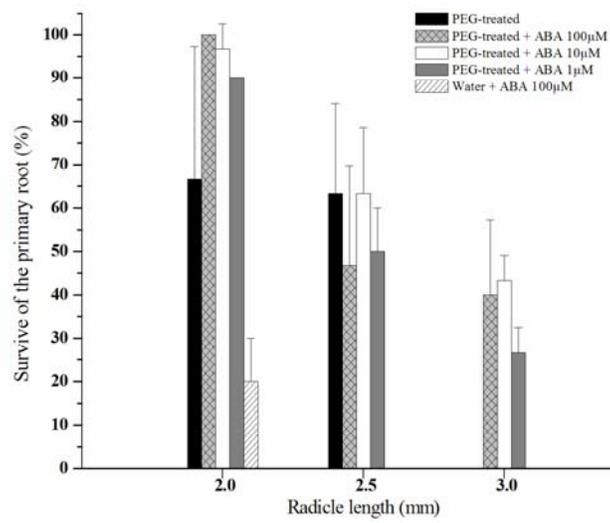
Figure 5- Number of new roots or secondary roots grown from hypocotyls of *T. impetiginosa* seedlings with or without polyethylene glycol treatment.

3.2.3 ABA in combination with polyethylene glycol

ABA when added during osmotic treatment had a desiccation tolerance re-establishment effect (Figures 6 A and B). However, ABA considerably improved survival when added to PEG if the radicle had protruded with 3 mm of

length, compared to PEG without addition, which showed 0% survival (Figure 6A). A concentration of 100 μM ABA resulted in 98% survival, 10 μM showed 96% of survival and 1 μM allowed 90% survival. This indicates the involvement of ABA in the induction of desiccation tolerance of seedlings. ABA did not inhibit or delay subsequent growth after re-hydration (Figure 6 B).

A



B

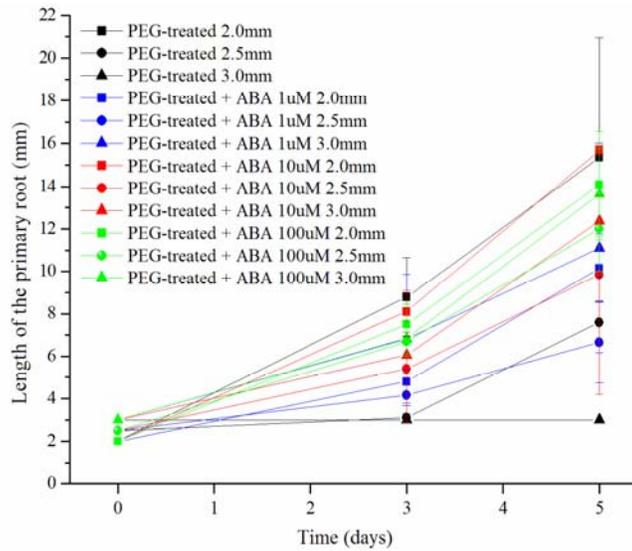


Figure 6- Effect of the different concentrations of ABA plus polyethylene glycol solution (PEG 8000) at -1.7MPa on primary root survival of *T. impetiginosa* (A) growth of the primary root after rehydration (B) length of the of primary roots.

3.2.4 Cold shock and heat shock

Cold shock (CS) and heat shock (HS) applied just prior to PEG treatment showed effect on re-establishment of desiccation tolerance. One hour of CS and HS improved survival of all radicle lengths studied. There was a statistical difference between the treatments applied. The average survival of the primary roots was 9.6% for radicles with 3.0mm, 61% for radicles with 2.5mm length and 87% for radicles with 2.0mm.

The radicle length of 2.0mm submitted to cold and heat shock for a period of 1 hour showed an average survival of 98% and 95%, which were statistically different from other treatments. For the same radicle length, however with 2 hours of treatment, heat shock presented survival of 83% and cold shock 80%. The control showed 78% survival of the primary root. Regarding the radicles with 2.5mm length, there was only a statistical difference for the cold shock treatment applied during 2 hours with the average of 26%. For radicles with 3.0mm length there was a statistical difference on the survival percentage to cold and heat shock. Heat shock during 1 hour showed 30% survival, cold shock during 1 hour showed 13.3% and heat shock during 2 hours showed 5% of survival (Figure 7).

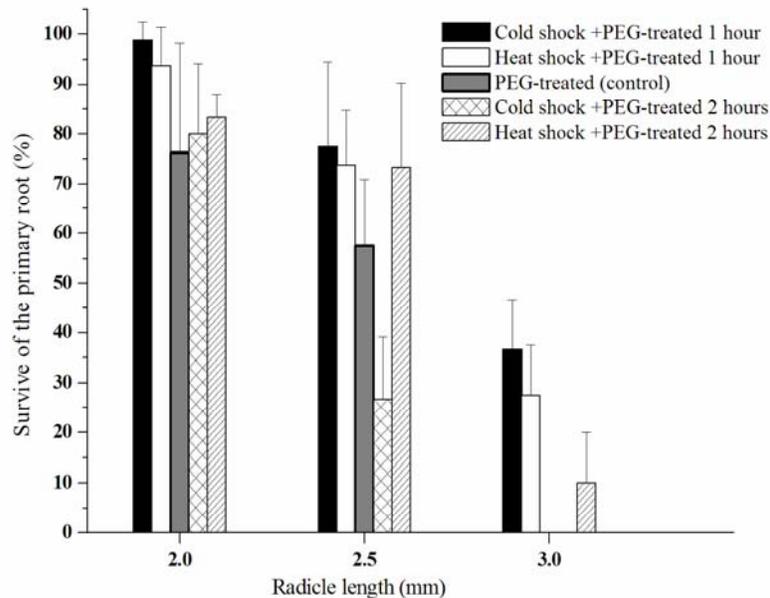


Figure 7- Cold and heat shock effect on the primary root survival of of *T. impetiginosa* seedlings.

3.3 Growth and development of the seedlings

Seedlings with radicle lengths of 1.0; 2.0; 2.5; 3.0; 4.0 and 5.0mm showed normal development and grew after desiccation. For radicles with up to 2.5mm of length, primary root survival the was verified, but for 3.0, 4.0 and 5.0mm the part corresponding to the root meristem showed dark coloration, indicating that the shoot meristem died. However, secondary roots were formed from the hypocotyls allowing normal seedling development (Figure 8). Secondary roots were formed from hypocotyls were 7-10 cm long after 21 d for all tested conditions. Seedlings with a radicle length of 1.0; 2.0 and 2.5mm resumed growth after 2 d, whereas seedlings with a radicle length of 3.0; 4.0 and 5.0mm showed delayed resumption of growth starting after 7 d (Figure 8D, E and F respectively).

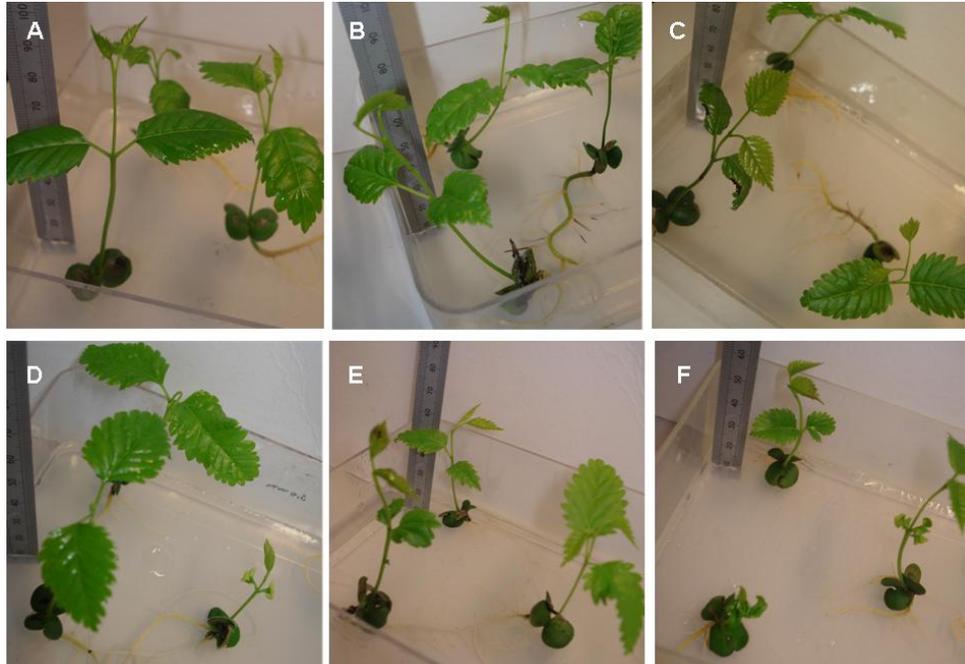


Figure 8- Seedlings of *T. impetiginosa* after desiccation. Radicle length before desiccation was (A); 1.0mm (B); 2.0mm (C); 2.5mm; (D); 3.0mm (E); 4.0mm and (F) 5.0mm.

3.4 Application of protocol on re-establishment of desiccation tolerance in seedlings of *Alliaria petiolata* (*Brassicaceae*)

Survival of *Alliaria petiolata* seedlings was tested with the same protocol that was used for *Tabebuia impetiginosa* seedlings. Limited survival occurred in radicles with <2.0 mm length. PEG improved survival in all radicle lengths that were tested up to 2.5 mm (Figure 9).

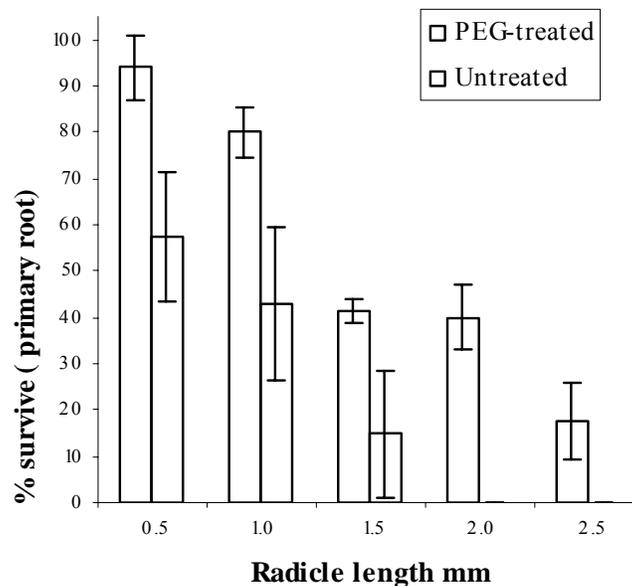


Figure 9- Effect of polyethylene glycol (PEG 8000) at the concentration of -1.7MPa on primary roots with 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 and 2.5mm length from *Alliaria petiolata*.

3.5 Gene expression studies in *Tabebuia impetiginosa* seedlings

RNA samples showed sufficient quality; bands of expected size were formed after amplification using cDNA as a template in a conventional PCR reaction with 18s primers as well as expansin primers. The expression studies showed an increase in *TiExp1* gene in seeds, hypocotyls and radicles after 1 d of

pre-humidification and upon 1d pre-humidification after PEG treatment and desiccation. However, expression decreased upon imbibition (20h) and radicle protrusion (2.5mm), as well as during osmotic treatment and desiccation. Upon desiccation and pre-humidification radicles turned either black or remained white. Radicles that turned black did not survive and secondary roots were formed upon re-imbibition, while those that remained white survived. Higher expression of *TiExp1* gene in the seedlings with a black colour indicates increased in transcription in the hypocotyl, rather than loss of viability (Figure 10).

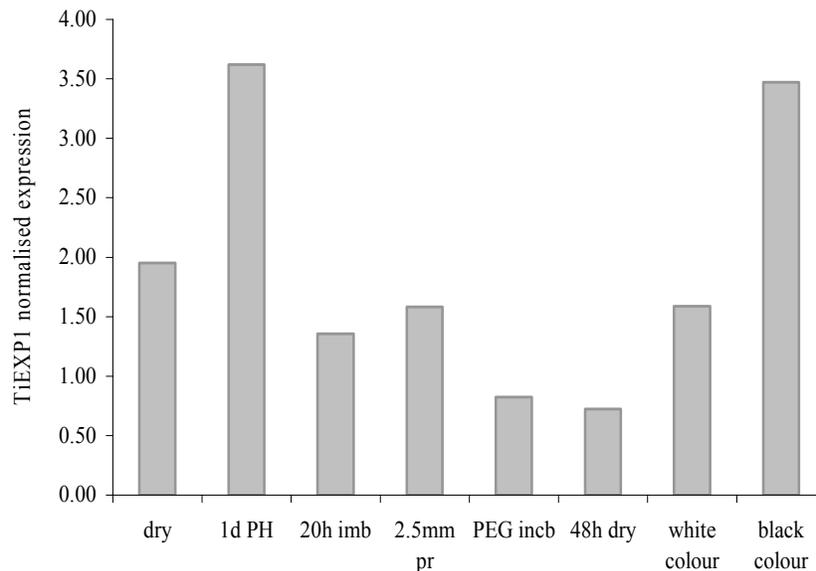


Figure 10 Expression of *TiExp1* gene in seeds and seedlings (hypocotyls and radicles) of *T. impetiginosa*. Dry seeds as control (dry); seeds after 24 hours with pre-humidification (1d PH); seeds after 20 hours imbibitions (20h imb); seedlings with 2.5mm of radicle protrusion (2.5mm pr); seedlings (2.5mm) after PEG-incubation 72 hours, 5°C dark (PEG incb); seedlings (2.5mm) after dry 48 hours with 20%RH - silica gel - (48h dry); seedlings (2.5mm) after pre-

humidification (white colour); seedlings (2.5mm) after pre-humidification (black colour).

4 DISCUSSION

This work confirmed the same conditions for seed germination as previously related by the work of da Silva et al. (2004). This study also showed that the re-establishment of desiccation tolerance in seedlings can be reached in tall plants from tropical climates such as *T. impetiginosa*. This result slightly differs from studies already carried out with others species, which are adapted to a temperate climate (Bruggink & Toorn, 1995; Leprince et al., 2000; Buitink et al., 2003; Faria et al., 2005;). For instance, McKee & Savage-Finch (1989) showed that germinated seeds of *Brassica sp* with length up to 1,5mm withstand drying up 0,34g H₂O/g dw without significant loss of viability. In this work, was observed that 50% of the seeds remained desiccation tolerant when the amount of water was 0,18g/g dw. In addition, Buitink et al. (2003), working with *M. truncatula* found that 2.7 mm radicle lengths were considered the limit to the desiccation tolerance, it was equivalent to 50% of loss of viability achieved at 0.15 g H₂O / g dw. In the same species, a survival (desiccation tolerance) of 33% of radicles with length of up to 3.0 mm (Faria et al. 2005). The researchers cited earlier discuss the possibility of a range during the initial development and growth, where the desiccation tolerance is maintained until the establishment of the seedlings. In seedlings of *T. impetiginosa*, this window corresponds to the radicle length up to 2.5 mm in conditions of PEG-treatment, but that survival is reported only when the primary root was evaluated. For the conditions under which primary root death was found, the hypocotyls remained alive; there was growth of secondary roots and normal development of seedlings for radicle lengths of up to 5.0 mm (Figure 8).

For seedlings of *T. impetiginosa*, the application of exogenous ABA showed beneficial effect on allocate desiccation tolerance (survival of primary root) in radicle lengths up to 3.0 mm and that this result can not be achieved only with the use of PEG. Lopez-Molina et al. (2001) studied the role of the ABA of *Arabidopsis* seeds and showed that ABI5 was characterized by maintaining germinated embryos in a quiescent state and after that serve as drought protection for the plants. In addition, dry seeds from *abi5 Arabidopsis* mutants showed reduction in the quantity of transcript genes responsive to ABA and LEA (Group 1). Thus, we may speculate that this may happen in *T. impetiginosa* seedlings. However, it is not known if the osmotic treatment in combination with ABA has an effect directly on the induction of the desiccation tolerance too. There are many factors that in certain situations, respond to water stress that are also mediated by mechanisms independent of ABA (Knight & Knight, 2001). The work done by Buitink et al. (2003) suggested that ABA and osmotic stress operate as two independent stimuli that are needed to induce desiccation tolerance in plants.

The desiccation tolerance was also achieved in seedlings of *T. impetiginosa* through slow drying by osmotic solution of PEG at -1.7 MPa. The method used for fast drying after treatment with PEG to -1.7 MPa, was not effective in ensuring desiccation tolerance. The difference between the methods may be due to the fact that fast drying cause damages to the embryonic axis causing death of the primary root. Ooms et al. (1994) showed that *Arabidopsis* mutant insensitive are unable to synthesize ABA producing seeds sensitive to desiccation. However, the desiccation tolerance of a double mutant can be induced only through slow drying or osmotic stress. Buitink et al. (2003) showed that when PEG-solution at -1.7MPa was applied in *M. truncatula* seedlings a decrease in the water content of 4.2 to 3.1 g H₂O / g dry matter was observed, which corresponded to a decrease in 5.2% based on fresh weight. In *T.*

impatiginosa seedlings (radicle, hypocotyl and cotyledons) from 1.01 to 0.77 g H₂O / g dry matter corresponds to a decrease in 17% in fresh weight. Although, this value may represent a high value, the result shows that the amount of water removed was enough to induce desiccation tolerance. However, the exact derivation of the receptor that senses the osmotic stress and the functional role of the following cascades that induce desiccation tolerance, still remain a matter for speculation. It is discussed that it could be possible that the reduction in the water potential induces changes in the membrane which in turn induces a signaling cascade (Buitink et al. 2003).

Some protective molecules are known to accumulate precisely at the time of acquisition of desiccation tolerance; these molecules are known to have multiple functions. Hoekstra et al. (2001), Buitink et al. (2003) reports for *M. truncatula* seeds, that the accumulation of sucrose was detected before the induction of desiccation tolerance. It was suggested that the presence of sucrose alone was not sufficient to maintain the desiccation tolerance, and that one of the possible hypothesis for the presence of sucrose would be the immediate breakdown of the reserves from cotyledons and transported immediately to the mobilization during osmotic treatment effect. However the authors found that in the absence of cotyledons, roots alone became desiccation tolerant and accumulated sucrose upon osmotic treatment. They believe that the osmotic treatment by PEG is able to activate a different metabolic pathway. Thus, possibly it is most likely that there was an accumulation of sugars and dehydrins as reported by Buitink et al. (2003), in which certainly during slow drying allows synthesis *de novo* and protection.

The radicle lengths of of *T. impetiginosa* seedlings that lost desiccation tolerance varies between 2.5 to 3.0 mm. In tomato and *M. truncatula* cv. Paraggio radicles with length of 2.0 mm was reported to lose desiccation tolerance (Lin et al., 1998; Buitink et al., 2003). It has been suggested that this

variation exists because of different experimental condition procedures used. The slow loss of water may allow changes in the protection system withstanding subsequent dehydration during germination, during development in orthodox seeds (Kermode-Finch & Savage, 2002), in somatic embryos (Senaratna et al., 1989) and also in the whole plant (Oliver et al., 1998).

Another interesting result was observed when radicles of 1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 and 5,0mm length were submitted to the same dehydration and slow drying scheme. The re-establishment was shown, of the ability to grow under normal conditions emitting new roots, which had normal stem and leaf development (Figure 8A to 8F). The newly formed roots originated from the hypocotyls and not from the root meristems, which were apparently dead. The growth of secondary roots may be explained by the requirement of growth needed to replace the death of the primary root. Faria et al. (2005), showed by using tetrazolium, that parts of the *M. truncatula* seedlings, treated and untreated with PEG, showed dark red staining in the hypocotyl region ensuring that these regions were still alive even when the seedlings were not desiccation tolerant. *T. impetiginosa* seedlings showed different behavior to this feature, because even if the primary root meristem is dead, the development of seedling is allowed by the growth of new roots from the hypocotyls. It was possible to see, because when they black parts were evidenced, they were followed by necrosis, dryness and rupture of the root tip. The reasons as to what promote the emergence of these new roots and how this process occurs is still obscure. However, this is probably related to the tropical origin of the species, when during germination and growth short dry periods during the raining season occur. Thus, this would be a strategy to escape from lack of water or rain. This would allow the species to escape from the restrictive environment and ensure seedling survival and establishment.

Currently the use of PEG has been in studies related to desiccation tolerance. Initially, the studies were performed in radicles of species sensitive to

desiccation and in species whose seeds are rich in oils, such as cucumber and *Impatiens* (Bruggink & Toorn, 1995; Leprince et al., 2000), *Medicago truncatula* (Buitink et al., 2003; Faria et al., 2005). However, in this work we showed that the re-establishment of desiccation tolerance can be achieved in *T. impetiginosa* seedlings, which is a tropical tall plant (tree). This shows the potential of the method. In parallel, the method was used in other species from a temperate region of the globe such as *Alliaria petiolata* (Brassicaceae). Thus, we may consider this method a universal method for re-induction of desiccation tolerance. In addition, *T. impetiginosa* shows an interesting adaptation mechanism related to survival of its seedlings after death of the root meristem, by emitting secondary roots or adventitious roots from the hypocotyls above the root meristem.

In the expression studies by real time PCR, we identified expansins gene activities that had expression upon imbibition (20h) and radicle protrusion (2.5mm), as well as during osmotic treatment and desiccation. This indicates the expression of the expansins gene (*TiExp1*) is transiently induced shortly after water uptake and also a possible role for *TiExp1* in the growth of the secondary root meristems. Expansins have been described to play a role as a cell growth mediator (McQueen-Mason et al., 1992). The link between growth and the expression of expansin proteins has been studied extensively (Cosgrove et al., 2002). Moreover, in some cases expansins may play a role in cell differentiation rather than in cell growth (Reidy et al., 2001). The result for *TiExp1* expression in *T. impetiginosa* seeds/seedlings indicates involvement in cell division and form a marker for viability of the dry seed.

5 CONCLUSIONS

This study shows that upon radicle protrusion, desiccation tolerance can be re-established in seedlings of *T. impeginosa* using PEG treatment. This result was enhanced by addition of ABA and a preceding cold or heat shock. It further demonstrated the potential of the protocol to improve desiccation tolerance in *Alliaria petiolata* seedlings and indicates the use of such a protocol in a larger range of species including tropical species. Expression of the expansin gene (*TiExp1*) may be used as a marker for seed germination and viability after desiccation.

6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Seed Conservation Department, Royal Botanic Gardens, Kew (Millennium Seed Bank Project) and KLARF program for financial support. We also thank the staff at the Department of Seed Conservation.

7 REFERENCES

- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. p. 201-223.
- BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. 412 p.
- BRUGGINK, T.; TOORN, P. van der. Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. **Seed Science Research**, Wellington, v. 5, n. 1, p. 1-4, Mar. 1995.
- BUITINK, J.; VU, B. L.; SATOUR, P.; LEPRINCE, O. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. **Seed Science Research**, Wellington, v. 13, n. 4, p. 273-286, Dec. 2003.
- CARVALHO, L. R.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 2, p.15-25, 2006.
- COSGROVE, D. J.; LI, L. C.; CHO, H. T.; HOFFMANN-BENNING, S.; MOORE, R. C.; BLECKER, D. The growing world of expansins. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 43, n. 12, p. 1436-1444, Dec. 2002.
- FARIA, J. M. R.; BUITINK, J.; LAMMEREN, A. A. M. van; HILHORST, H. W. M. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 418, p. 2119-2130, Aug. 2005.
- HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, London, 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. 55 p. (IPGRI. Technical Bulletin, 1).
- INTERNATIONAL RULES FOR SEED TESTING. **Seed Science and Technology**, Zurich, 1996. 336 p. (ISTA. Supplement, v. 24).

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

KNIGHT, H.; KNIGHT, M. R. Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, n. 6, p. 262-267, June 2001.

KÖPPEN, W. Das geographische system der klimat. In: KÖPPEN, W.; GEIGER, R. (Ed.). **Handbuch der klimatologie**. Berlin: Gebrüder Bornträger, 1936. v.1, pt. c, 44 p.

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

LIN, T. P.; YEN, W. L.; CHEN, 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. 342, p. 1203-1212, July 1998.

LIVAK, K. J. **Comparative Ct method**: ABI Prism 7700 Sequence Detection System. Foster City: PE Applied Biosystems, 1997. (User Bulletin, n. 2).

LOPEZ-MOLINA, L.; MONGRAND, S.; CHUA, N. H. A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, n. 8, p. 4782-4787, Apr. 2001.

MCKEE, J. M. T.; FINCH-SAVAGE, W. E. The effect of abscisic acid on the growth and storage of germinating rape (*Brassica napus* L.) seed dried following selection on the basis of a newly-emerged radicle. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 8, n. 1, p. 77-83, Mar. 1989.

MCQUEEN-MASON, S. J.; DURACHKO, D. M.; COSGROVE, D. J. Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 4, n. 11, p.1425-1433, Nov. 1992.

MICHEL, B. E. Evaluation of the water potentials of solutions of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 72, n. 1, p. 66-70, Jan. 1983.

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

OOMS, J. J. J., VEEN, R. van der; KARSSSEN, C. M. Abscisic acid and osmotic stress or slow drying independently induce desiccation tolerance in mutant seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, v. 92, n. 3, p. 506-510, Nov. 1994.

PRITCHARD, H. W. Classification of seed storage 'types' for ex situ conservation in relation to temperature and moisture. IN: GUERRANT, E. O.; HAVENS, K.; MAUNDER, M. **Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild**. Washington: Island Press, 2004. p. 139-161.

REIDY, B.; MCQUEEN-MASON, S.; NÖSBERGER, J.; FLEMING, A. Differential expression of α and β expansin genes in elongating leaf of *Festuca pratensis*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 46, n. 4, p. 491-504, July 2001.

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

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SENARATNA, T.; MCKERSIE, B. D.; BOWLEY, S. R. Desiccation tolerance of alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos: influence of abscisic acid, stress pretreatments and drying rates. **Plant Science**, Clare, v. 65, n. 2, p. 253-259, 1989.

SILVA, E. A. A., DAVIDE, A. C., FARIA, J. M., MELO, D. L. B., ABREU, G. B. Germination studies on *Tabebuia impetiginosa* Mart. Seeds. **Cerne**, Lavras, v. 10, n. 1, p. 1-9, jan./jun. 2004.

SUN, W. Q. Desiccation sensitivity of recalcitrant seeds and germinated orthodox seeds: can germinated orthodox seeds serve as a model system for studies of recalcitrant seeds. In: IUFRO SEED SYMPOSIUM, Kuala Lumpur 1998. **Proceedings ...** Kuala Lumpur: FRIM, 1999. p. 29-42.

TOOROP, P. E., BARROCO, R. M., ENGLER, G., GROOT, S. P. C., HILHORST, H. W. M. Differentially expressed genes associated with dormancy or germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. **Planta**, v. 221, n. 5, p. 637-647, July 2005.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espécie *Tabebuia impetiginosa* foi utilizada neste estudo pelo fato de suas sementes apresentarem características ortodoxas quanto à secagem e ao armazenamento, facilidade de manipulação e separação do eixo embrionário, e também por ser uma espécie tropical. Inicialmente, no estudo voltado para investigações sobre a germinação dessa espécie, identificou-se que a germinação é regulada parcialmente pela presença de luz e GA, sendo esses caracterizados como não sendo os fatores determinantes. Ou seja, a germinação pode ocorrer na limitação desses fatores e dentro da faixa de temperatura entre 15°C e 40°C.

A segunda etapa possibilitou a identificação das plântulas de *T. impetiginosa* como capazes de restabelecer a tolerância à dessecação, em condição de secagem controlada, por meio da elaboração de um simples protocolo usando sílica gel, podendo o mesmo ser aplicado em espécie tropical (*T. impetiginosa*) e temperada (*Alliaria petiolata*). Plântulas dessas espécies possuem características que permitem inferir sobre a sua capacidade de sobreviver sob condições adversas no campo.

Na terceira etapa deste estudo, o emprego de solução osmótica de PEG a -17MPa destacou ainda mais a capacidade das plântulas de *T. impetiginosa* e *Alliaria petiolata* na re-indução de tolerância à dessecação. Nessa parte do estudo, verificou-se também efeito de ABA, estresse por calor e frio, fornecendo respostas ainda mais positivas quanto ao aumento da capacidade de re-indução de tolerância à dessecação e sobrevivência do meristema radicular. Como marcador molecular de germinação e viabilidade depois da dessecação, o estudo de expressão gênica com expansina (*TiExp1*) apresentou potencial de uso na identificação de plântulas viáveis.