

**ESTUDOS ECOFISIOLÓGICOS DA
GERMINAÇÃO E DE REINDUÇÃO DA
TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM
PLÂNTULAS DE IPÊ-ROXO**

JOEFERSON REIS MARTINS

2009

JOEFERSON REIS MARTINS

**ESTUDOS ECOFISIOLÓGICOS DA GERMINAÇÃO E DE
REINDUÇÃO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM
PLÂNTULAS DE IPÊ-ROXO**

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

Orientador

Prof. Dr. Amauri Alves Alvarenga

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

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

Martins, Joeferson Reis.

Estudos ecofisiológicos da germinação e de reindução da tolerância à
dessecação em plântulas de Ipê-Roxo / Joeferson Reis Martins. –
Lavras : UFLA, 2009.

87 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Amauri Alves Alvarenga.

Bibliografia.

1. Citometria. 2. Índice mitótico. 3. Ciclo celular. 4. Meristema. 5.
Parede celular. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.97521

JOEFERSON REIS MARTINS

**ESTUDOS ECOFISIOLÓGICOS DA GERMINAÇÃO E DE
REINDUÇÃO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM
PLÂNTULAS DE IPÊ-ROXO**

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

APROVADA em 31 de julho de 2009

Prof. PhD Edvaldo Aparecido Amaral da Silva	UFLA
Prof. Dr. Marcelo Pólo	UNIFAL
Prof. Dr. Eduardo Alves	UFLA
Dr. Marcelo Murad Magalhães	EPAMIG

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

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus a quem eu sirvo com alegria indizível, meu amigo e minha maior razão de viver e realizar. Ele é amor e diuturnamente tem demonstrado isso a mim. Ele é quem propiciou essa trajetória e não se cansa de presentear-me com bons amigos que me auxiliam na superação de todos os obstáculos.

Aos meus eternos amigos e pais, João da Silva Reis e Efigênia Andrade Reis, que, com imenso amor e dedicação e pela incompreensível, maravilhosa e abundante graça de Deus me apresentaram meu Senhor Jesus Cristo e me ensinaram a trilhar o caminho da Salvação. Este é o maior legado que um filho pode receber.

À minha esposa Ana Paula Oliveira da Silva e meu filho Matheus Oliveira Reis que, durante esse período de muito trabalho, sempre estiveram ao meu lado sendo verdadeiros co-participantes de tudo. Vocês representam o cuidado de Deus a mim e sou muito grato de tê-los comigo, amo vocês!

Aos meus familiares, em especial, ao Adão de Oliveira da Silva e Maria das Graças da Silva pelos significativos e valorosos auxílios nessa caminhada.

Ao Professor Dr. Marcelo Polo, por um dia acreditar e depositar créditos ao meu potencial, sua contribuição à minha vida profissional e pessoal é enorme e sou muito grato a Deus por sua amizade sincera e dedicada.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização desse curso.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. Amauri Alves de Alvarenga, pela orientação e por ter me dado toda a liberdade para escolha da pesquisa a ser realizada e, por desde o mestrado ter proporcionado oportunidades para meu crescimento.

Ao professor Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, um profissional incrível, pela valiosa contribuição na orientação e por sempre se esforçar para que o crescimento pessoal e profissional de todos os seus alunos seja o melhor possível. Sou muito grato, valeu!

Ao pesquisador Dr. Peter E. Toorop, pelo auxílio na orientação e pelas construtivas sugestões à pesquisa.

Ao professor Dr. Carlos Vinicio Vieira pela amizade, por me ensinar a técnica de reindução e pelas significativas sugestões.

Ao Professor Dr. Hilton Morbec, que gentilmente providenciou a coleta e envio das sementes de Rondonópolis.

À professora Giovana Augusta Torres e ao Dr. José Marcello Salabert de Campos, pelo auxílio nos experimentos em citogenética, e ao professor Dr. Eduardo Alves, pelo auxílio nos experimentos que envolveram microscopia eletrônica.

À Primeira Igreja Batista de Lavras, o povo que se importa, vocês foram mais do que especiais à minha família e, nesse período, vocês marcaram nossa trajetória sendo um imponente alicerce que não deixa a gente esmorecer e, concomitantemente, se portaram como uma força divina que nos auxilia ao crescimento espiritual. Em especial, sou grato à família pastoral que na pessoa do Pr. Erlandi de Souza sempre nos tratou com muito carinho, atenção e dedicação.

Aos amigos e colegas do Setor de Fisiologia Vegetal, Setor de Sementes Florestais e da Citogenética, em especial: Amanda Cristiane Rodrigues, Diego Ribeiro e Giuslan Carvalho Pereira, pela ajuda na execução dos experimentos, e ao Newton Barcellos (Rede de Manejo Florestal da Caatinga), que de forma muito solícita providenciou a coleta e envio das sementes de Assú-RN.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1:	
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1 Descrição Botânica.....	2
2.2 Aspectos ecofisiológicos da germinação de sementes.....	4
2.3 Aspectos ecológicos envolvidos na tolerância à dessecação.....	8
2.4 Alterações no ciclo celular durante a perda da tolerância à dessecação	14
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
CAPÍTULO 2: Estudos ecofisiológicos da germinação de embriões de <i>Tabebuia impetiginosa</i>	
1 RESUMO.....	26
2 ABSTRACT.....	27
3 INTRODUÇÃO.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Coleta das sementes.....	30
4.2 Determinação do grau de umidade e peso de mil sementes.....	30
4.3 Determinação da fração de amido.....	30
4.4 Determinação da fração de açúcares redutores e não redutores.....	31
4.5 Determinação da fração protéica	31
4.6 Determinação da fração de lipídeos em extrato etéreo.....	32
4.7 Embebição e germinação dos embriões.....	32
4.8 Avaliação da influência dos fitormônios ABA e GA no processo germinativo.....	32
4.9 Análise estatística.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
6 CONCLUSÕES.....	44
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
CAPÍTULO 3: Reindução da tolerância à dessecação de sementes germinadas de <i>Tabebuia impetiginosa</i> procedentes de Lavras-MG, Rondonópolis-MT, Assú-RN e Penápolis-SP	
1 RESUMO.....	49

2 ABSTRACT.....	50
3 INTRODUÇÃO.....	51
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1 Análise estatística.....	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
6 CONCLUSÕES.....	58
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

CAPÍTULO 4: Estudo do controle da reindução da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *T. impetiginosa* provenientes de Lavras-MG, utilizando tratamento osmótico combinado com ácido abscísico e fluridona

1 RESUMO.....	62
2 ABSTRACT.....	63
3 INTRODUÇÃO.....	64
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	66
4.1 Avaliação da influência de ABA no restabelecimento da tolerância à dessecação nas radículas de <i>T. impetiginosa</i>	66
4.2 Análise de ciclo celular no ápice das radículas de <i>T. impetiginosa</i> através de citometria de fluxo durante o processo de reindução da tolerância à dessecação.....	67
4.3 Análise dos eventos da mitose nas células meristemáticas do cilindro central de radículas durante o processo de reindução da tolerância à dessecação.....	66
4.4 Análises ultraestruturais no ápice radicular durante a reindução da tolerância à dessecação.....	68
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
6 CONCLUSÕES.....	83
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

RESUMO GERAL

MARTINS, Joeferson Reis. **Estudos ecofisiológicos da germinação e de reindução da tolerância à dessecação em plântulas de Ipê-Roxo**. 2009. 87 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

Tabebuia impetiginosa é uma espécie arbórea de ampla distribuição geográfica, sendo encontrada na Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga. Por isso, constitui um modelo interessante para estudos fisiológicos comparativos entre as populações dos diferentes biomas. Neste sentido, esta pesquisa teve como objetivos analisar comparativamente algumas características ecofisiológicas das populações de Lavras-MG, Rondonópolis-MT, Assú-RN e Penápolis-SP. Para tanto, foi avaliado o peso de mil sementes, a composição química, a influência de GA e dos inibidores de ácido giberélico (GA) (Tetcyclasis) e de ácido abscísico (ABA) (Fluridona) sobre germinação, capacidade de reindução da tolerância à dessecação (TD) em plântulas, incubadas em PEG ou não. Nas plântulas da população de Lavras-MG, foi avaliada a influência de ABA no processo de reindução de tolerância à dessecação. A análise do peso de mil sementes revelou que o tamanho das sementes está negativamente correlacionado com a pluviosidade do período de sua formação. As populações de Lavras-MG e Assú-RN produziram sementes maiores que as populações de Rondonópolis-MT e Penápolis-SP. As sementes de *T. impetiginosa* são oleaginosas. Nas sementes de Rondonópolis-MT, foi verificada a maior quantidade de proteínas e as menores quantidades de amido e lipídeos. A porcentagem final de germinação foi semelhante para todas as populações. A inibição da síntese de GA provocou decréscimo no IVG de todas as populações, especialmente da população de Assú-RN. Por outro lado, a inibição da síntese de ABA provocou aumento no IVG de todas as populações, sobretudo nas populações de Rondonópolis-MT e Penápolis-SP. Estes resultados evidenciam que, durante a germinação, ocorre a síntese *de novo* de GA e ABA nos embriões de todas as populações. As plântulas da população de Assú-RN foram as mais TD, enquanto as plântulas da população de Penápolis-SP as menos TD. Houve uma correlação fortemente negativa entre a pluviosidade anual e a TD, indicando que *T. impetiginosa* procedentes de ambientes mais secos são mais TD. A incubação em solução de PEG melhorou a capacidade de reindução da TD nas plântulas de todas as populações em todos os comprimentos radiculares, exceto nas de Assú-RN. Nas plântulas de Lavras-MG, o crescimento radicular proporcionou o aumento do conteúdo de água na região meristemática, aumento do número

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

de células em divisão e decréscimo da capacidade das radículas em reinduzir a TD. A incubação em PEG estimulou a síntese *de novo* de ABA, paralisou o ciclo celular em G1, proporcionou aumento da porcentagem de sobrevivência radicular e foi verificada a reindução em plântulas com radícula de 3,0mm. A incubação em PEG provocou aumento do índice mitótico (IM), nas células do cilindro central, e interrompeu o ciclo celular em prófase. Nas radículas com 3,0mm, com células em metáfase, foram verificadas anomalias no alinhamento dos cromossomos. A secagem causou acentuada retração do volume celular, aparecimento de micro vacúolos e o colapso das células ao centro da radícula. A incubação prévia em PEG proporcionou a manutenção da integridade da parede e do volume celular, embora tenha ocorrido considerável retração citoplasmática.

Palavras-chave: Citometria, índice mitótico, Ciclo celular, Meristema, Parede celular.

GENERAL ABSTRACT

MARTINS, Joeferson Reis. **Ecophysiological studies of the germination and of the re-induction of desiccation tolerance in seedlings of Ipê-Roxo.** 2009. 87 p. Thesis (Doctor in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*.

Tabebuia impetiginosa is an arboreal species of wide geographical range, its being found in the Amazonia Rainforest, Mata Atlântica, Cerrado and Caatinga. For that reason, it constitutes an interesting model for comparative physiological studies among populations of different biomes. In this sense, this research had as objectives to investigate comparatively some ecophysiological features of the populations from Lavras-MG, Rondonópolis-MT, Assú-RN and Penápolis-SP, so, the weight of one thousand seeds, the chemical composition, the influence of GA and inhibitors of gibberelic acid (GA) (Tetcyclasis) and abscisic acid (ABA) (Fluridona) upon germination, capacity of re-induction to desiccation tolerance (TD) in seedlings, and also incubated in PEG or not, were investigated. In the seedlings from Lavras-MG, the influence of ABA in the process of re-induction to tolerance was evaluated. The analysis of the weight of one thousand seeds revealed that the size of the seeds is negatively correlated to the rainfall of the related period. The populations of Lavras-MG and Assú-RN produced seeds larger than the populations of Rondonópolis-MT and Penápolis-SP. The seeds of *T. impetiginosa* are oleaginous. The highest protein amounts and the lowest amounts of starch and lipids were found in the seeds of Rondonópolis-MT. The percentage of late germination was similar for all the populations. The inhibition of GA synthesis provoked a decrease in the IVG of all the populations, specially, that of Assú-RN. On the other hand, the inhibition of ABA synthesis provoked an increase in the IVG of all the populations, above all, in the populations of Rondonópolis-MT and Penápolis-SP. These results stood out that during germination, the *de novo* GA and ABA synthesis occurs in the seeds of all the populations. The seedlings of the population of Assú-RN were the most TD, while the seedlings of the population of Penápolis-SP the least TD. There was a strongly negatively correlation between annual rainfall and TD, indicating that *T. impetiginosa* coming from drier environments are more TD. The incubation in PEG solution improved the capacity of re-inducing TD in the seedlings in all the populations in all the root lengths, except in those of Assú-RN. In the seedlings of Lavras-MG, the root growth showed increased water content in the meristem region, increased number of dividing cells and decrease of the capacity of the radicles to re-induce TD.

* Guidance Committee: Amauri Alves Alvarenga - UFLA (Major Professor) and Edvaldo Aparecido Amaral da Silva – UFLA.

The incubation in PEG stimulated the *de novo* synthesis of ABA, paralyzed the cellular cycle in G1, provided increase of the percentage of root survival and the re-induction in seedling with radicle of 3.0mm was found. The incubation in PEG caused increases of mitotic index (IM), in the cells in the central cylinder and interrupted cell cycle at prophase. In the radicles of 3.0mm, with cells at metaphase, anomalies in the chromosome aligning were verified. Drying caused a marked shrinkage of the cell volume, appearance of micro vacuoles and the collapse of the cells in the center of the radicle. The previous incubation in PEG provided the maintenance of the integrity of the cell wall and volume, although, a marked cytoplasmatic shrinkage has occurred.

Keys-word: Citometry, Mitotic index, Cell cycle, Meristem, Cell wall.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

A água é uma exigência universal para a vida, como se conhece atualmente, e é o componente mais abundante em todas as células ativas (Black & Pritchard, 2002). Por isso, a disponibilidade de recurso hídrico é crucial para a sobrevivência dos organismos, fato determinante na distribuição geográfica da maioria das espécies no planeta (Oliver et al., 2005).

Tabebuia impetiginosa Mart, popularmente conhecida como Ipê-roxo, é uma Bignoniácea arbórea de ampla distribuição geográfica, encontrada em praticamente todo território brasileiro, tanto em ambientes úmidos como a Floresta Amazônica e Mata Atlântica, quanto em ambientes com menor disponibilidade de água como Cerrado e Caatinga (Lorenzi, 2002; Schulze et al., 2008).

Desta maneira, esta espécie constitui um modelo singular para estudos fisiológicos comparativos entre populações de diferentes biomas, uma vez que estes apresentam características edafo-climáticas contrastantes, que exigem diferentes estratégias para a sobrevivência, reprodução e estabelecimento da espécie.

Estudos sobre as variações entre populações mostram que quanto mais distanciadas elas estão, maiores são as diferenças nas frequências alélicas e nas características fenotípicas de base genética (Futuyma, 2002).

Futuyma (2002) também relata que as variações entre populações geograficamente distantes são exibidas em quase todas as características do vegetal, incluindo aquelas mais intimamente associadas com seu papel ecológico, como a capacidade de sobrevivência por meio da melhor competitividade interespecífica, seja utilizando melhor os recursos naturais, seja tolerando mais profundamente os fatores estressantes.

Um fator climático que varia profundamente nos diferentes biomas brasileiros é a disponibilidade hídrica, que se relaciona com a plasticidade adaptativa do vegetal. De acordo com Levit (1980), as plantas têm desenvolvido várias estratégias para a sobrevivência em ambientes secos, seja evitando, resistindo ou tolerando a dessecação. Estudos preliminares demonstraram que plântulas de *T. impetiginosa* procedentes de sementes coletadas em Lavras-MG, região de cerrado, são tolerantes à dessecação, ou seja, são capazes de sobreviver à desidratação protoplástica inferior a $0,1\text{g H}_2\text{O.g}^{-1}\text{MS}$ (Vieira, 2008).

Portanto, tendo em vista a ampla distribuição geográfica da espécie, questiona-se se as populações geograficamente distanciadas de *T. impetiginosa* exibem variações fisiológicas, especialmente nas sementes e plântulas, relacionadas à estratégia de germinação e tolerância à dessecação, resultantes de adaptações às condições ambientais contrastantes dos diferentes biomas onde a espécie é distribuída. Questiona-se também sobre a capacidade de tolerar à dessecação, se esse comportamento é restrito à população do cerrado, ou se é intrínseco à espécie e, se intrínseco, como ele varia entre as populações de *T. impetiginosa* presentes em diferentes regiões brasileiras.

Com isso, os objetivos dessa pesquisa foram analisar a composição química das sementes, avaliar alguns aspectos fisiológicos da germinação, caracterizar a intensidade da tolerância à dessecação em plântulas de *T. impetiginosa* procedentes de Lavras-MG, Rondonópolis-MT, Assú-RN e Penápolis-SP e, ainda, estudar a influência do ácido abscísico (ABA) no controle da reindução de tolerância nos embriões procedentes de Lavras-MG.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição botânica

Tabebuia impetiginosa é uma espécie pertencente à família Bignoniaceae, vulgarmente conhecida como ipê roxo ou pau-d'arco. Embora seja descrita como uma espécie nativa do Cerrado, é amplamente distribuída nos biomas Caatinga, Mata Atlântica e Floresta Amazônica (Lorenzi, 2002; Schulze et al., 2008). De acordo com RadamBrasil (1974), *T. impetiginosa* é amplamente distribuída na Amazônia Brasileira com densidade de aproximadamente 0,11 árvores.ha⁻¹. As plantas desta espécie são caducifólias, atingindo comumente de 10 a 35 m de altura e com caule de 30 a 40 cm de diâmetro. Rizzini (1971) relata a distribuição do gênero *Tabebuia* desde o México e Antilhas até o norte da Argentina.

A espécie apresenta flores grandes, rosadas a lilás, reunidas em panícula terminal. O fruto possui numerosas sementes codiformes, tendendo a oblonga plana, com superfície lisa lustrosa de cor marrom-clara e presença de asa membranácea transparente nas duas extremidades de até 3cm de comprimento, sendo sua dispersão anemocórica (Carvalho, 1994). Sua floração é abundante, ocorrendo, geralmente, nos meses de junho e julho, conferindo às plantas alto valor paisagístico.

O desenvolvimento das sementes ocorre comumente nos meses de julho, agosto e setembro, sendo a dispersão das sementes nos meses de setembro e outubro. De acordo com da Silva et al. (2004), Oliveira et al. (2005) e Vieira (2008), a temperatura ótima de germinação das sementes é 30°C, sob luz constante.

A madeira da *T. impetiginosa* é muito apreciada para a fabricação de móveis e assoalhos finos, tendo como principal mercado os países da América do Norte e, por isso, tem sido intensamente explorada em áreas de vegetação nativa, em especial na Amazônia Legal Brasileira (Lorenzi, 2002; Schulze et al., 2008). Como resultado desta exploração, no Estado do Pará, *T. impetiginosa* está na lista das espécies da fauna e da flora ameaçadas de

extinção, conforme Resolução do Conselho Estadual do Meio Ambiente – COEMA nº 54, de 24/10/2007.

Castellanos et al. (2009) relataram o uso etnobotânico de *T. impetiginosa* no tratamento de diversas doenças como sífilis, malária, tripanossomíases e infecções fúngicas e bacterianas, com ênfase especial à sua atividade anticâncer descrita em recentes pesquisas farmacêuticas.

2.2 Aspectos ecofisiológicos da germinação de sementes

A germinação e a emergência da plântula representam estádios críticos do biociclo vegetal e geralmente estão associados a elevadas taxas de mortalidade (Harper, 1977). Para Bewley & Black (1994) e da Silva et al. (2008), a germinação tem início com a entrada de água na semente e finaliza com o alongamento do eixo embrionário, sendo a protrusão da radícula considerada como o fim do processo germinativo pela maioria dos estudos nesta área.

Após a dispersão, as sementes são expostas a mudanças periódicas de diversos fatores ambientais, os quais interagem em magnitudes variáveis e proporcionam alterações em suas características fisiológicas e morfológicas (Olvera-Carrillo, 2009). Bewley & Black (1994) afirmam que o processo germinativo é dependente de diversos fatores endógenos e exógenos à semente como composição química, níveis hormonais, disponibilidade hídrica, luz e temperatura. Em muitas espécies, as condições ambientais atuam determinando a intensidade da dormência, a viabilidade e a velocidade de germinação, além de influenciar marcadamente o sucesso no estabelecimento da plântula (Baskin & Baskin, 1998).

De acordo com Marcos Filho (2005) e Pugnaire & Valladares (2007), a composição química das sementes é definida geneticamente e revela a estratégia reprodutiva do vegetal e, ainda, pode ser influenciada pelas condições climáticas durante a formação das sementes, de forma que variações da composição química podem ocorrer em termos quantitativos, devido a suprimentos diferenciais de assimilados. Assim, a especificidade do

acúmulo de reservas pode ser determinada pelos diversos fatores que influenciam tanto a fotossíntese, quanto o transporte de assimilados até as sementes em formação.

As sementes são constituídas de substâncias estruturais, como oligo e polissacarídeos das paredes celulares, e de substâncias de reserva, como proteínas, lipídeos e carboidratos (Begnami, 1998). De acordo com o composto de reserva predominante, as sementes podem ser classificadas como protéicas, oleaginosas ou amiláceas. Estas reservas têm como funções básicas a manutenção e o desenvolvimento do embrião até a formação de uma plântula que apresente a capacidade de se manter de forma autotrófica (Ferreira & Borghetti, 2004). As reservas de proteínas nas sementes estão relacionadas ao suprimento de nitrogênio para o desenvolvimento da plântula, enquanto os lipídeos e carboidratos têm como objetivo maior suprir o embrião de esqueletos de carbono para a síntese de macromoléculas e produção de energia (Ferreira & Borghetti, 2004; Taiz & Zeiger 2004).

A importância dos estudos sobre a composição química das sementes relaciona-se à tecnologia de sementes, pois tanto o desempenho na germinação como o potencial de armazenamento são influenciados pelo conteúdo dos compostos presentes nas mesmas (Nakagawa et al., 1990).

O desempenho da germinação é também influenciado pela participação de compostos químicos de natureza diversa, como os fitormônios, os quais podem ter ação estimuladora ou inibitória. As giberelinas (GAs) são fitormônios importantes na estimulação da germinação (Bewley, 1997), as quais constituem uma família de ácidos diterpênicos cuja biossíntese está sob um estrito controle genético, determinados pelas fases de desenvolvimento e por diversos fatores ambientais, como luz e temperatura (Taiz & Zeiger 2004; Argyris et al., 2008).

Nos processos regulatórios da germinação, a luz tem sido identificada como estímulo fundamental para a biossíntese de GAs, durante a embebição via fitocromo que absorve mais fortemente a luz na faixa do

espectro do vermelho e vermelho distante (Taiz & Zeiger, 2004). As GAs estão envolvidas no controle da hidrólise de reservas, através da síntese *de novo* da α -amilase, e da hidrólise das paredes celulares durante o alongamento do eixo embrionário, e podem atuar na indução de endo- β -mananase e endo- β -manosidase (Jacobsen et al., 1976; Bewley et al. 2000; da Silva et al., 2005).

A dependência da presença de luz para o desempenho germinativo de algumas espécies também pode estar relacionada com a temperatura de incubação das sementes. Oliveira (2005) observou em *T. impetiginosa* uma variação na relação entre o regime de luz e a temperatura para a germinabilidade em lotes de sementes de anos subsequentes.

Outro fitormônio importante na regulação da germinação é o ácido abscísico (ABA), um sesquiterpeno sintetizado durante a fase de maturação das sementes. Nambara & Marion-Poll (2003) e Cadman et al. (2006) afirmam que o controle fisiológico por ABA é dependente dos níveis do hormônio ativo, e estes são modulados pela sua síntese, catabolismo e translocação. Esses autores também reconhecem este hormônio como um dos responsáveis pela dormência e regulação do processo de germinação.

Os mecanismos de ação do ABA têm sido caracterizados como antagonistas aos das GAs. Segundo Karssen & Lacka (1986), ABA e GAs atuam em diferentes tempos e lugares durante a vida da semente: enquanto ABA induz a dormência durante a maturação das sementes, as GAs relacionam-se à promoção da germinação. Müller et al. (2006) demonstraram que a taxa ABA/GA regula o enfraquecimento por enzimas do endosperma e o conseqüente crescimento embrionário em *Lepidium* e *Arabidopsis*.

Durante os estádios fisiológicos da quiescência, dormência primária e secundária, um considerável número de genes responsivos a GA e ABA é expresso diferentemente, evidenciando o importante papel destes fitormônios na transição entre estes estádios (Cadman et al., 2006).

A regulação do processo de germinação por ABA e GA não deve ocorrer somente pela quantidade endógena, mas também pelo nível de sensibilidade das sementes aos reguladores de crescimento. Vários trabalhos demonstram que a sensibilidade embrionária ao ABA é correlacionada à intensidade da dormência (Benech-Arnold et al., 1999; Corbineau et al., 2000; Corbineau & Côme, 2000).

O conhecimento sobre a regulação da germinação através dos mecanismos que detectam os sinais ambientais é essencial quando se buscam alternativas que maximizem o estabelecimento de plântulas, particularmente em ambientes áridos. Neste contexto, as flutuações na síntese e sensibilidades das sementes aos hormônios, principalmente dos ácidos giberélico e abscísico, têm sido reportados como cruciais (Ogawa et al., 2003).

As condições hídricas do ambiente também são consideradas decisivas no sucesso da germinação e na longevidade da viabilidade das sementes no solo.

Devido às elevadas amplitudes de umidade e temperatura no solo em muitas formações vegetais, as sementes podem ter uma embebição suficiente para estimular o metabolismo, porém, insuficiente para completar a germinação. Dessa forma, as sementes de uma determinada espécie podem ser osmocondicionadas naturalmente durante uma estação de baixo recurso hídrico e, assim, com o estímulo metabólico pronto, quando as condições ambientais tornam-se favoráveis, elas podem germinar com maior velocidade e vencer a concorrência com outras espécies (Borges et al., 2002).

Além do estímulo metabólico, o osmocondicionamento geralmente reduz o potencial de água básico para valores mais negativos, aumentando a habilidade de germinação sob baixa disponibilidade de água (Bradford, 1990). Algumas pesquisas mostram a possibilidade de melhoria na germinabilidade das sementes em temperaturas sub-ótimas com o uso da

técnica de *osmopriming* com polietilenoglicol (PEG) (Foti et al., 2002; Patanè et al., 2006).

Embora sejam escassas as investigações sobre as variações morfológicas e químicas das sementes e das conseqüentes respostas fisiológicas nas fases iniciais do desenvolvimento, entre populações, resultantes das adaptações ambientais, Olvera-Carrillo et al. (2009) afirmam que é relevante a pesquisa das estratégias de sobrevivência vegetal em ambientes de características descontínuas e imprevisíveis, pois permite a identificação de padrões distintos de comportamento que revelam a existência de um espectro de diferenciação genética entre as populações (Futuyma, 2002).

2.3 Aspectos ecológicos envolvidos na tolerância à dessecação

A água compõe a maior parte da massa dos seres vivos e é essencial para vida. Entretanto, devido às elevadas flutuações na disponibilidade hídrica na maioria das regiões do planeta, os vegetais parecem ter desenvolvido várias estratégias para a sobrevivência em ambientes extremamente secos, seja evitando, resistindo ou tolerando a dessecação (Levitt, 1980).

A tolerância à dessecação (TD) é geralmente referida como a capacidade de um organismo sobreviver a um extremo de desidratação, em que seu conteúdo de água do protoplasma seja igual ou inferior a 0,1g por g de massa seca (g.g^{-1}); nesta ocasião o potencial hídrico é de aproximadamente -100 MPa (Vertucci & Farrant, 1995; Walters et al., 2005; Berjak, 2006).

Para Alpert (2000) e Le & McQueen-Mason (2006), a TD é considerada como a habilidade de um organismo equilibrar seu conteúdo interno de água com o do ar moderadamente seco, e retomar as funções normais após a reidratação. Gaff (1997) afirma que a célula vegetal em equilíbrio com o ar a 28°C com umidade relativa de 50%, experimenta uma

queda no potencial hídrico, atingindo -100MPa, sendo esta uma condição de déficit hídrico letal para 99% das fanerógamas (Black & Pritchard, 2002).

Porembski e Barthlott (2000) estimaram que existam cerca de 300 angiospermas com a capacidade de tolerar a dessecação nos tecidos vegetativos, as quais são denominadas “plantas ressurgentes”. Desta forma, as plantas TD são a minoria e as sensíveis à dessecação (SD) dominam a vegetação mundial.

A raridade da habilidade em tolerar a dessecação levanta diversas questões, inclusive, como a dessecação afeta a sobrevivência e distribuição vegetal no planeta. De acordo com Oliver et al. (2005), durante a colonização terrestre, as plantas deveriam ser TD nos vários estádios do ciclo de vida e, com a evolução, a maioria das plantas vasculares teriam perdido a TD nos tecidos vegetativos tornando-se sensíveis ao déficit hídrico. Semelhantemente, Oliver et al. (2000) e Dickie & Pritchard (2002) também propuseram que a TD nas sementes é um atributo ancestral e a SD, uma característica derivada.

O fato de várias espécies de plantas SD colonizarem ambientes áridos proporcionou indagações que levaram à identificação de diversos mecanismos que mitigam o estresse causado pelo déficit hídrico (Scott, 2000). As adaptações fisioanatômicas presentes nessas espécies SD são de amplo espectro e contemplam desde alterações estruturais para armazenamento de água e restrições na superfície dos tecidos da parte aérea, como são observados nas Cactáceas e Euforbiaceae, até a senescência total de órgãos e alterações nas rotas fotossintéticas como observadas no metabolismo ácido das crassuláceas (Smith & Bryce, 1992).

Embora a maioria das plantas terrestres não tolere a dessecação nos tecidos vegetativos, muitas delas ainda são capazes de produzir estruturas reprodutivas tolerantes como: sementes, esporos e pólenes, os quais podem permanecer viáveis no estado dessecado por décadas ou até centenas de anos (Oliver et al. 2000; Le & McQueen-Mason, 2006).

Quanto às sementes, vários estudos têm demonstrado que elas são dispersas com diferentes níveis de TD e muitas tentativas ocorreram para correlacionar esse comportamento a características ecológicas, como clima e tipo de vegetação, e características da semente como forma, tamanho e conteúdo de umidade durante a dispersão (Pritchard et al., 1995; Hong & Ellis, 1998; Dickie & Pritchard, 2002; Pritchard et al., 2004).

De acordo com a resposta à dessecação, as sementes também podem ser divididas em dois grupos: ortodoxas (TD) e recalcitrantes (SD). As sementes ortodoxas toleram a dessecação a conteúdos de água inferior a 7%, com pouco efeito na viabilidade (Robert, 1973), enquanto as sementes recalcitrantes não toleram a dessecação a um conteúdo hídrico inferior a 20-30% (Pritchard, 2004). Vale salientar que, dentre os critérios para classificar as sementes como ortodoxas ou recalcitrantes está inclusa a longevidade das mesmas ao armazenamento especialmente sob baixas temperaturas (Bewley & Black, 1994).

As sementes recalcitrantes constituem indivíduos de alto risco à estratégia de regeneração vegetal, uma vez que uma seca prolongada pode resultar em morte para uma coorte anual de sementes. Isto explica, em parte, o fato de as sementes SD serem geralmente maiores e de alta frequência em florestas tropicais úmidas (Tweddle et al., 2003).

Havia uma percepção geral que as sementes SD não fossem encontradas em ambientes áridos ou savânicos dos trópicos (Murdoch & Ellis, 2000), uma vez que, até mesmo nos meses de balanço hídrico mais positivo, os eventos de chuva nesses locais sejam esporádicos e incertos. No entanto, alguns estudos têm mostrado que tais espécies também ocorrem em ambientes secos, mas pouco ainda é conhecido sobre suas estratégias de regeneração (Danthu et al., 2000; Tweddle et al., 2003).

Tem sido sugerido que a SD municia as sementes de aptidões que minimizam a mortalidade após a dispersão, seja devido ao fato de dispersarem as sementes na época de máxima disponibilidade hídrica, seja devido à maior massa que contribui para uma menor taxa de secagem da

semente ou à rápida germinação, a qual, além de diminuir a possibilidade de predação das sementes, invariavelmente favorece a redução da probabilidade de desidratação das mesmas e o rápido acesso ao recurso hídrico disponível no solo, particularmente, em ambientes onde as chuvas são esporádicas (Pritchard, 2004).

As sementes SD são consideradas como problemas para os programas de conservação *ex-situ* e de reflorestamento, pois não suportam a secagem e, se armazenadas com conteúdo de água elevado, o crescimento do embrião não é interrompido (Pritchard, 2004). Por outro lado, as sementes TD são geralmente dispersas com baixos conteúdos de água, e isto auxilia na bioestabilidade celular e tecidual, de forma que as variações de temperatura, radiação e pressão não afetem profundamente a viabilidade das sementes armazenadas (Tunnacliffe & Ricci, 2006).

A TD é considerada como um pré-requisito necessário para que muitas plantas completem o ciclo de vida, principalmente as que vivem em áreas áridas cujas condições do ambiente tornam o recurso hídrico escasso.

A aquisição da TD pelas sementes ortodoxas ocorre durante o seu desenvolvimento, como parte do programa de maturação (Kermode, et al. 1995). E, um grande espectro de mecanismos protetores tem sido identificado como os responsáveis pela aquisição de TD (Pammenter & Berjak, 1999; Kermode & Finch-Savage, 2002; Berjak, 2006), embora os modos de operação e a interação entre eles não estejam ainda bem elucidados (Berjak et al., 2007).

De acordo com Berjak & Pammenter (2008), o primeiro conjunto de mecanismos responsáveis pela aquisição de TD envolve alterações das características físicas intracelulares, incluindo a diminuição de vacúolos, proteção à integridade do DNA e a ordenada desestruturação dos elementos do citoesqueleto que ocorre durante a desidratação; enquanto que o segundo conjunto de mecanismos relaciona-se à desdiferenciação e drástica redução do metabolismo intracelular. Estes mecanismos ocorrem mais especificamente nas sementes ortodoxas.

Diversos autores têm relacionado o acúmulo de algumas substâncias durante a dessecação como determinantes da proteção da integridade celular. O acúmulo de proteínas LEAs (*late embryogenesis accumulated*) e de oligossacarídeos da série rafínósica e sacarose no final da maturidade da semente podem proporcionar a estabilização de membranas e a formação do estado vítreo (Buitink et al., 2002; Kermode & Finch-Savage, 2002; Berjak, 2006; Berjak et al., 2007). Durante a desidratação, verifica-se também a ampliação do sistema antioxidante (Foyer & Noctor, 2005; Suzuki & Mittler, 2006; Berjak et al., 2007). Liu et al. (2007) observaram um aumento do grau de insaturação dos fosfolipídeos, enquanto Leprince et al. (1998) e Guilloteau et al. (2003) concluíram que o aumento do conteúdo de proteínas oleosinas no decorrer do período de dessecação também pode estar relacionado à manutenção da estabilidade das membranas.

As investigações que buscam elucidar as rotas de sinalização envolvidas na determinação do estabelecimento dos mecanismos citados anteriormente têm obtido progresso, sobretudo a partir de análises de mutantes no processo de embriogênese e na maturação das sementes (Raz et al., 2001).

Inúmeras são as evidências de que o fitormônio ácido abscísico seja um agente importante na aquisição de TD. Bray (2002) verificou o aumento do conteúdo de ABA endógeno em resposta à dessecação e julgou que este fato está relacionado ao aumento das enzimas de biossíntese de ABA e/ou da redução dos processos degradativos de ABA.

Vieira (2008) demonstrou que a incubação de plântulas de *T. impetiginosa* em PEG e ABA aumenta consideravelmente a capacidade de reindução à TD, indicando o papel relevante de ABA nesse processo.

Em tecidos vegetativos, Reynold & Bewley (1993) e Bagniewska-Zadworna et al. (2007) afirmam que para a maioria das plantas tolerantes à dessecação, a TD só pode ser readquirida se a desidratação da planta ocorrer lentamente, por vários dias. No entanto, Reynold & Bewley (1993) puderam estimular a reindução da TD rapidamente, em apenas 18 horas, por meio de

incubação em ABA. Tal reindução da TD foi quantificada pela sobrevivência após estresse hídrico severo.

Em *Arabidopsis*, Ooms et al. (1994) reportou que o duplo mutante *aba1* e *abi3-1*, que é insensível e incapaz de sintetizar ABA, produz sementes viáveis, porém, sensíveis à dessecação. Este resultado indica que o fitormônio ABA é necessário para aquisição da TD. No entanto, os mesmos autores demonstraram que, se a desidratação for lenta, os duplos mutantes são capazes de adquirir TD. Estes experimentos demonstraram a existência de duas rotas de regulação do programa de desenvolvimento da TD, uma dependente e outra independente de ABA.

Para Kermode (1995), a aquisição da TD é adquirida como parte do programa de maturação e é perdida progressivamente durante a germinação, sendo a radícula o primeiro órgão a perder a TD (Buitink, 2003). Na maioria das espécies, essa perda é irreversível após a protrusão radicular e torna as plântulas altamente vulneráveis às flutuações hídricas do ambiente (Bruggink & Van Der Toorn, 1995; Buitink, 2003).

A possibilidade de reinduzir a TD em plântulas oriundas de sementes ortodoxas, com comprimentos radiculares de até 4 mm tem sido demonstrada por meio da aplicação de tratamentos osmóticos sob baixa temperatura (Bruggink & Van Der Toorn, 1995; Leprince et al., 2000; Buitink et al., 2003; Faria et al., 2005). Estas pesquisas apontam para a viabilidade de outros estudos que elucidem os diversos mecanismos que proporcionam a aquisição de TD durante a maturação das sementes ortodoxas. E, devido ao fato de as sementes germinadas serem sensíveis à dessecação, tem-se sugerido que elas possam ser comparáveis às recalcitrantes e, por isso, utilizadas como modelo para estudos da recalcitrância (Sun, 1999).

O interesse na compreensão do restabelecimento da TD se baseia no fato de que um tecido dessecado apresenta uma alta bioestabilidade às variações de temperatura, pressão e radiação. E, neste contexto, o interesse industrial para a aplicação da TD é crescente, por exemplo, na produtividade

agrícola através do melhoramento de culturas com colheitas adaptadas a seca, no aumento da longevidade de sementes sob condições de armazenamento para a comercialização, na conservação de recursos genéticos *ex-situ*, incluindo bancos de células e tecidos à temperatura ambiente, e em programas de reflorestamento, uma vez que, devido à sensibilidade à dessecação, as sementes recalcitrantes não são armazenáveis a *long-term* e, até então, não há métodos eficientes em prover a longevidade das mesmas. (Pritchard et al., 2004; Haperin & Koster, 2006). Outra possível aplicação da bioestabilidade adquirida pela tolerância à dessecação está na engenharia de produtos farmacêuticos.

Os estudos relacionados à TD têm recebido muita atenção, principalmente, devido à nítida preocupação com os enormes impactos que as mudanças climáticas têm proporcionado na agricultura. Recentemente, o Hadley Center previu que 50% da superfície terrestre será afetada por seca moderada até 2100, e as áreas que atualmente apresentam secas severas sofrerão intensificação drástica.

2.4 Alterações no ciclo celular durante a perda da tolerância à dessecação

A germinação das sementes inicia-se com a embebição re-ativando vários eventos celulares que tinham sido inativados durante a fase de maturação (Jing et al., 1999). Dentre as cascatas de eventos que ocorrem no decorrer da germinação, a ativação do ciclo celular, com a replicação do DNA nuclear e extranuclear, e os eventos de reparo do DNA têm sido verificados como pré-requisito para a coordenação das funções celulares nesse processo (Osborne, 1983).

A maioria dos estudos sobre a germinação de sementes considera a protrusão radicular como fase terminal da germinação (Silva et al., 2008) e o reparo e replicação do DNA são necessários para a divisão celular que se inicia geralmente nas etapas finais da germinação das sementes (Bewley, 1997; Silva et al., 2008).

De acordo com Kermode (1995) e Buitink et al. (2003), com a progressão do processo germinativo, a TD é perdida progressivamente e, para Osborne et al. (2002), se a germinação for avaliada de acordo com a ativação do ciclo celular, a perda da TD coincide independente da espécie, com a retomada da divisão celular. No entanto, alguns autores também reportam que a perda da TD pode ser analisada de acordo com o transcorrer do tempo de embebição (Koster et al., 2003; Ren & Tao, 2003) ou comprimento radicular após protrusão (Buitink et al., 2003; Faria et al. 2005).

O ciclo celular é considerado como uma série de eventos que acontece em série cíclica e coordenada, através do qual o material celular é duplicado e dividido entre células filhas. Basicamente, o ciclo celular consiste em quatro fases sequencialmente ordenadas que, temporalmente, distingue-se pela replicação do material genético e segregação dos cromossomos duplicados entre duas células filhas. As fases lag ou gap (G1 e G2) são separadas pela fase de replicação de DNA (S) e da fase de segregação dos cromossomos (fase M, mitose), segundo prescrevem Dewitte & Murray (2003).

A maioria das pesquisas tem demonstrado que, ao final do processo de maturação das sementes, a maior parte dos núcleos celulares é retida na fase G1 (Bino et al., 1993; Sliwinska, 2003; Faria et al., 2005). A razão para a manutenção da maioria dos núcleos na fase G1 não é clara, mas têm-se sugerido que, durante a dessecação das sementes nas fases finais da maturação, a diminuição do conteúdo hídrico e o aumento das concentrações de ácido abscísico (ABA) favorecem a interrupção do ciclo celular em eventos que antecedem o início da fase S (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

A transição de G1 para S é o marco central entre ativação do ciclo celular (Barrôco et al., 2005). Sliwinska (2003) sugere que a progressão do ciclo celular durante a germinação esteja relacionada à perda da TD. Em *Medicago truncatula*, Faria et al. (2005) argumenta que, com a progressão

da germinação e crescimento radicular superior a 3mm, ocorre uma drástica perda da capacidade de re-induzir a TD, e isto deve-se à reativação e progressão do ciclo celular.

Os autores Deltour (1985), Bino et al. (1993) e Sliwiska (2003) relatam evidências que mostram que as células na fase S e na fase G2 são mais sensíveis aos fatores estressantes que alteram a divisão celular e morfologia dos cromossomos e, por isso, as sementes são dispersas, preferencialmente, com o ciclo celular na fase G1.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPERT, P. The discovery, scope, and puzzle of desiccation tolerance in plants. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 151, n. 1, p. 5-17, Nov. 2000.

ARGYRIS, J.; DAHAL, P.; HAYASHI, E.; STILL, D. W.; BRADFORD, K. J. Genetic variation for lettuce seed thermoinhibition is associated with temperature-sensitive expression of abscisic acid, gibberellin, and ethylene biosynthesis, metabolism, and response genes. **Plant Physiology**, Washington, v. 148, n. 2, p. 926-947, Aug. 2008.

BAGNIEWSKA-ZADWORNA, A.; ZENKTELER, E.; CZACZYK, K.; OSIŃSKA, M. The effect of dehydration with or without abscisic acid pretreatment on buds regeneration from *Polypodium vulgare* L. rhizomes. **Acta Physiology Plant**, New York, v. 29, n. 1, p. 47-56, Feb. 2007.

BARRÔCO, R. M.; POUNKE, K. van; BERGERVOET, J. H. W.; VEYLLER, L. de; GROOT, S. P. C.; INZÉ, D. The role of the cell cycle machinery in resumption of postembryonic development. **Plant Physiology**, Washington, v. 137, n. 1, p. 127-140, Jan. 2005.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. San Diego: Academic, 1998. 666 p.

BEGNAMI, C. N. **Alterações estruturais, ultraestruturais e bioquímicas durante a perda da viabilidade de sementes de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho**. 1998. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- BENECH-ARNOLD, R. L.; GIALLORENZI, M. C.; FRANK, J.; RODRIGUEZ, V. Termination of hull-imposed dormancy in developing barley grains is correlated with changes in embryonic ABA levels and sensitivity. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 1, p. 39-47, Jan. 1999.
- BERJAK, P. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 16, n. 1, p. 1-15, Mar. 2006.
- BERJAK, P.; FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W. Seed desiccation tolerance mechanisms. In: JENKS, M. (Ed.). **Plant desiccation tolerance**. Wallingford: CAB International, 2007. chap. 6, p. 121-139, 311 p.
- 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. Seed germination and dormancy. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 7, p. 1055-1066, July 1997.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.
- BEWLEY, J. D.; BANIK, M.; BOURGAULT, R.; FEURTADO, J. A.; TOOROP, P. E.; HILHORST, H. W. M. Endo- β -mannanase activity increases in the skin and outer pericarp of tomato fruits during ripening. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 344, p. 529-538, Mar. 2000.
- BINO, R. J.; LANTERI, S.; VERHOEVEN, H. A.; KRAAK, H. L. Flow cytometric determination of nuclear replication stages in seed tissues. **Annals of Botany**, London, v. 72, n. 2, p. 181-187, Aug. 1993.
- BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Ed.). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. New York: CAB International, 2002. 382 p.
- BORGES, E. E. L.; PEREZ, S. C. J. G. A.; BORGES, R. C. G.; REZENDE, S. T.; GARCIA, S. R. Comportamento fisiológico de sementes osmocondicionadas de *Platymiscium pubescens* Micheli (tamboril-da-mata). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 26, n. 5, p. 603-613, set./out. 2002.
- BRADFORD, K. J. A water relation analysis of seed germination rates. **Plant Physiology**, Washington, v. 94, n. 2, p. 840-849, Feb. 1990.

- BRAY, E. A. Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the Arabidopsis genome. **Plant Cell Environment**, Dordrecht, v. 25, n. 2, p. 153-161, Feb. 2002.
- BRUGGINK, T.; TOORN, P. van der. Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 5, n. 1, p. 1-4, Jan. 1995.
- BUITINK, J.; VU, B. L.; SATOUR, P.; LEPRINCE, O. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 13, n. 4, p. 273-286, Apr. 2003.
- CADMAN, C. S. C.; TOOROP, P. E.; HILHORST, H. W. M.; FINCH-SAVAGE, W. E. Gene expression profiles of Arabidopsis Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. **The Plant Journal**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 805-822, June 2006.
- CARVALHO, P. H. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1994. 674 p.
- CASTELLANOS, J. R. G.; PRIETO, J. M.; HEINRICH, M. Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*) global ethnopharmacological commodity? **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 121, n. 1, p. 1-13, Nov. 2009.
- CORBINEAU, F.; BENAMAR, A.; CÔME, D. Changes in sensitivity to ABA of the developing and maturing embryo of two wheat cultivars with different sprouting susceptibility. **Israel Journal Plant Science**, The Aviv, v. 48, n. 3, p. 189-197, 2000.
- CORBINEAU, F.; CÔME, D. Dormancy of cereal seeds as related to embryo sensitivity to ABA and water potential. In: VIEMONT, J. D.; CRABBÉ, J. **Dormancy in plants: from whole plant behaviour to cellular control**. Oxon: CAB International, 2000. p. 183-194.
- DANTHU, P. A.; GUEYE, A.; BOYE, D.; BAUWENS, A.; SAR, R. Seed storage of four Sahelian and Sudanian tree species (*Boscia senegalensis*, *Butyrospermum parkii*, *Cordyla pinnata* and *Saba senegalensis*). **Seed Science Research**, Wallingford, v. 10, n. 2, p. 183-187, June 2000.
- DELTOUR, R. Nuclear activation during early germination of the higher plant embryo. **Journal of Cell Science**, London, v. 75, n. 1, p. 43-83, Apr. 1985.

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

DICKIE, J. B.; PRITCHARD, H. W. Systematic and evolutionary aspects of desiccation tolerance in seeds. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Ed.). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford: CAB International, 2002. p. 239-259.

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.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 7, p. 1866-1875, July 2005.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323 p.

FOTI, S.; COSENTINO, S. L.; PATANÈ, C.; AGOSTA, G. d'. Effect of osmoconditioning upon seed germination of sorghum (*S. bicolor* (L.) Moench) under low temperatures. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 30, n. 3, p. 521-533, June 2002.

FUTUYMA, D. J. **Evolutionary biology**. 3. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. 763 p.

GAFF, D. F. Mechanisms of desiccation tolerance in resurrection vascular plants. In: BASRA, A. S.; BASRA, R. K. (Ed.). **Mechanisms of environmental stress resistance in plants**. Amsterdam: Harwood Academic, 1997. p. 43-58.

GUILLOTEAU, M.; LALOI, M.; BLAIS, D.; CROUZILLAT, D. M. C.; CARTHY, J. Oil bodies in *Theobroma cacao* seeds: cloning and characterization of cDNA encoding the 15.8 and 16.9 kDa oleosins. **Plant Science**, Shannon, v. 164, n. 4, p. 597-606, Apr. 2003.

HARPER, J. L. **Population biology of plants**. London: Academic, 1977. 892 p.

HALPERIN, S. J.; KOSTER, K. L. Sugar effects on membrane damage during desiccation of pea embryo protoplasts. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 208, n. 1, p. 1-9, Jan. 2006.

- HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Contrasting seed storage behavior among different species of Meliaceae. **Seed Science Technology**, Wallingford, v. 26, n. 1, p. 77-95, Jan. 1998.
- JACOBSEN, J. V.; PRESSMAN, E.; PYLIOTIS, N. A. Gibberellin-induced separation of cells in isolated endosperm of celery seed. **Planta**, Berlin, v. 129, n. 2, p. 113-122, Jan. 1976.
- JING, H. C.; LAMMEREN, A. M. van; CASTRO, R. D. van; BINO, R. J.; HILHORST, H. W. M.; GROOT, S. P. C. β -tubulin accumulation and DNA synthesis are sequentially resumed in embryo organs of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds during germination. **Protoplasma**, New York, v. 208, n. 1/4, p. 230-239, Mar. 1999.
- KARSSSEN, C. M.; LACKA, E. A revision of the hormone balance theory of seed dormancy: studies on gibberellin and/or abscisic acid deficient mutants in *Arabidopsis thaliana*. In: BOPP, M. (Ed.). **Plant growth substances**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1986. p. 315-323.
- KERMODE, A. R. Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: interactions between the embryo and the seed environment. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: M.Dekker, 1995. p. 273-332.
- KERMODE, A. R.; FINCH-SAVAGE, W. 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.
- KOSTER, K. L.; REISDORPH, N.; RAMSAY, J. L. Changing desiccation tolerance of pea embryo protoplasts during germination. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 387, p. 1607-1614, June 2003.
- LE, T. N.; MCQUEEN-MASON, S. J. Desiccation-tolerant plants in dry environments. **Review Environment Science Biotechnology**, Clifton, v. 5, n. 2/3, p. 269-279, Aug. 2006.
- LEPRINCE, O.; HOEKSTRA, F. A. The responses of cytochrome redox state and energy metabolism to dehydration support a role for cytoplasmic viscosity in desiccation tolerance. **Plant Physiology**, Washington, v. 118, n. 4, p. 1253-1264, Dec. 1998.

LEPRINCE, O.; HOEKSTRA, F. A.; HARREN, F. J. M. Unravelling the responses of metabolism to dehydration points to a role for cytoplasmic viscosity in desiccation tolerance. In: BLACK, M.; BRADFORD, K. J.; VASQUEZ-RAMOS, J. (Ed.). **Seed biology**: advances and application. New York: CABI, 2000. p. 57-66.

LEVITT, J. **Responses of plants to environmental stresses**. 2. ed. New York: Academic, 1980. 256 p.

LIU, Y. B.; ZHANG, T. G.; LI, X. R.; WANG, G. Protective mechanism of desiccation tolerance in *Reaumuria soongorica*: leaf abscission and sucrose accumulation in the stem. **Science**, Beijing, v. 50, n. 1, p. 15-21, Feb. 2007.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v. 2, 384 p.

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

MÜLLER, K.; TINTELNOT, S.; LEUBNER-METZGER, G. Endosperm-limited Brassicaceae seed germination: abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 47, n. 7, p. 864-877, July 2006.

MURDOCH, A. J. R.; ELLIS, H. Dormancy, viability and longevity. In: FENNER, M. (Ed.). **Seeds**: the ecology of regeneration in plant communities. Wallingford: CAB International, 2000. p. 183-214.

NAKAGAWA, J.; IMAIZUMI, J.; ROSSETO, C. A. V. Efeitos de algumas fontes de fósforo e da calagem na qualidade de sementes de amendoim. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 4, p. 505-512, abr. 1990.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. ABA action and interactions in seeds. **Trends in Plant Science**, Oxford, 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.

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

OLIVER, M. J.; VELTEN, J.; MISHLER, B. D. Desiccation tolerance in Bryophytes: a reflection of the primitive strategy for plant survival in dehydrating habitats? **Integrative and Comparative Biology**, New York, v. 45, n. 5, p. 788-799, May 2005.

OLVERA-CARRILLO, Y.; MÉNDEZ, I.; SÁNCHEZ-CORONADO, M. E.; MÁRQUEZ-GUZMÁN, J.; BARRADAS, V. L.; HUANTE, P.; OROZCO-SEGOVIA, A. Effect of environmental heterogeneity on field germination of *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae) seeds. **Journal of Arid Environments**, Amsterdam, v. 73, n. 4/5, p. 414-420, Apr./May 2009.

OOMS, J. J. J.; WILMER, J. A.; KARSSSEN, C. M. Carbohydrates are not the sole factor determining desiccation tolerance in seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Physiology Plant**, Minneapolis, v. 90, n. 3, p. 431-436, Sept. 1994.

OSBORNE, D. J. Biochemical control systems operating in the early hours of germination. **Canada Journal Botany**, Ottawa, v. 61, n. 12, p. 3568-3577, Dec. 1983.

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

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

PATANÈ, C.; CAVALLARO, V.; AVOLA, G.; AGOSTA, G. d'. Seed respiration of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] during germination as affected by temperature and osmoconditioning. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 16, n. 4, p. 251-260, Dec. 2006.

POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as centers of diversity for desiccation-tolerant vascular plants. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 151, n. 1, p. 19-28, Nov. 2000.

PRITCHARD, H. W.; DAWS, M. I.; FLETCHER, B. J.; GAMÉNÉ, C. S.; MSANGA, H. P.; OMONDI, W. Ecological correlates of seed desiccation tolerance in tropical african dryland trees. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 91, n. 6, p. 863-870, June 2004.

PRITCHARD, H. W.; TOMPSETT, P. B.; MANGER, K.; SMIDT, W. J. The effect of moisture content on the low temperature responses of *Araucaria huntsteinii* seed and embryos. **Annals of Botany**, London, v. 76, n. 1, p. 79-88, July 1995.

PROJETO RADAMBRASIL. **Projeto Radam, programa de integração nacional**: levantamento de recursos naturais. Rio de Janeiro: Ministério das Minas e Energia-Departamento Nacional de Produção Mineral, 1974. 258 p.

PUGNAIRE, F. I.; VALLADARES, F. **Functional plant ecology**. 2. ed. New York: CRC, 2007. 724 p.

RAZ, V.; VOET, J. H. W. B.; KOORNNEEF, M. Sequential steps for developmental arrest in Arabidopsis seeds. **Development**, New York, v. 128, n. 2, p. 243-252, June 2001.

REN, J.; TAO, L. Effect of hydration-dehydration cycles on germination of seven Calligonum species. **Journal of Arid Environments**, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 111-122, Sept. 2003.

REYNOLDS, T. L.; BEWLEY, J. D. Abscisic acid enhances the ability of the desiccation-tolerant fern Polypodium virginianum to withstand drying. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 12, p. 1771-1779, Dec. 1993.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**. 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.

SCHULZE, M.; GROGAN, J.; UHL, C.; LENTINIA, M.; VIDAL, E. Evaluating ipê (Tabebuia, Bignoniaceae) logging in Amazonia: sustainable management or catalyst for forest degradation? **Biological Conservation**, Essex, v. 141, n. 8, p. 2071-2085, Aug. 2008.

SCOTT, P. Resurrection plants and the secrets of eternal leaf. **Annals of Botany**, London, v. 85, n. 2, p. 159-166, Feb. 2000.

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.

SILVA, E. A. A.; TOOROP, P. E.; LAMMEREN, A. A. M. V.; HILHORST, H. W. M. ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. **Annals of Botany**, London, v. 102, n. 3, p. 425-433, Sept. 2008.

SLIWINSKA, E. Cell cycle and germination of fresh, dried and deteriorated sugarbeet seeds as indicators of optimal harvest time. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 13, n. 2, p. 131-138, June 2003.

SMITH, J. A. C.; BRYCE, J. H. Metabolite compartmentation and transport in CAM plants. In: TOBIN, A. K. (Ed.). **Plant organelles**. Cambridge: Cambridge University, 1992. p. 141-167.

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, 1., 1998, Kuala Lumpur. **Proceedings...** Kuala Lumpur: FRIM, 1999. p. 29-42.

SUZUKI, N.; MITTLER, R. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. **Plant Physiology**, Washington, v. 126, n. 1, p. 45-51, Jan. 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TUNNACLIFFE, A.; RICCI, R. **ESF LESC exploratory workshop: mechanisms of desiccation tolerance: European Science Foundation standing committee for life, earth and environmental sciences (LESC)**. Cambridge: Pembroke College, 2006. 10 p.

TWEDDLE, J. C.; DICKIE, J. B.; BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 91, n. 2, p. 294-304, Apr. 2003.

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

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

VIEIRA, C. V. **Germinação e re-indução de tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Tabebuia impetiginosa* e *Alliaria petiolata***. 2008. 98 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

WALTERS, C.; HILL, L. M. A.; WHEELER, L. M. Dying while dry: kinetics and mechanisms of deterioration in desiccated organisms. **Integrative and Comparative Biology**, New York, v. 45, n. 5, p. 751-758, Nov. 2005.

CAPÍTULO 2

Estudos ecofisiológicos da germinação de embriões de *Tabebuia impetiginosa*

1 RESUMO

Tabebuia impetiginosa é uma espécie arbórea de ampla distribuição geográfica e constitui um modelo interessante para estudos fisiológicos comparativos entre as populações dos diferentes biomas. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar algumas características ecofisiológicas, como o peso de mil sementes, na composição química e analisada influência de GA e dos inibidores de GA (Tetcyclasis) e ABA (Fluridona) sobre germinação de embriões procedentes das populações de árvores de Lavras-MG, Rondonópolis-MT, Assú-RN e Penápolis-SP. A análise do peso de mil sementes revelou que as sementes de Lavras-MG e Assú-RN são maiores que as sementes de Rondonópolis-MT e Penápolis-SP. Esta característica foi fortemente e negativamente correlacionada com a pluviosidade do período de formação das sementes dos habitats. As sementes de *T. impetiginosa* são oleaginosas, no entanto, há variações quantitativas das reservas entre as populações. As menores quantidades de amido e lipídeos e a maior quantidade de proteínas foram constatadas nas sementes de Rondonópolis-MT. Esta pode ser a razão para as fases mais rápidas de embebição e germinação. A porcentagem de final de germinação foi semelhante para todas as populações. O tratamento com GA aumentou a velocidade de germinação apenas dos embriões de Lavras, entretanto, a inibição da síntese de GA prejudicou a germinação de todas as populações, especialmente Assú-RN. A inibição da síntese de ABA favoreceu a rapidez da germinação de todas as populações, sobretudo nas populações de Rondonópolis-MT e Penápolis-SP. Portanto, durante a germinação dos embriões de *T. impetiginosa* ocorre a síntese *de novo* de GA e ABA, e a sensibilidade aos fitormônios é variável entre as populações.

2 ABSTRACT

Tabebuia impetiginosa is an arboreal species of wide geographical range and constitutes an interesting model for comparative physiological studies among the populations of the different biomes. The purpose of this work was to evaluate some ecophysiological features, such as weight of one thousand seeds, in the chemical composition and investigate the influence of GA and of the inhibitors of GA (Tetcyclasis) and ABA (Fluridona) on germination of seeds coming from the tree populations from Lavras-MG, Rondonópolis-MT, Assú-RN and Penápolis-SP. The study of the weight of one thousand seeds revealed that the seeds from Lavras-MG and Assú-RN are greater than the seeds of Rondonópolis-MT and Penápolis-SP. This feature was strongly and negatively correlated with the rainfall of the period of seed set of the habitats. The seeds of *T. impetiginosa* are oleaginous; nevertheless, there are quantitative variations of the stores among the populations. The lowest amounts of starch and lipids and the highest amounts of proteins were found in the seeds from Rondonópolis-MT. This fact can explain the fastest imbibition and germination found. The percentage of late germination was similar for all the populations. The incubation in GA solution improved the velocity speed only of the embryos of Lavras, nevertheless, the inhibition of GA synthesis harmed the germination of all the populations, especially those of Assú-RN. The inhibition of ABA synthesis supported the fastness of the germination of all the populations, above all, in the populations of Rondonópolis-MT and Penápolis-SP. Therefore, during the germination of embryos of *T. impetiginosa*, the *de novo* synthesis of GA and ABA occurs, and that the sensitivity to plant hormones is variable among the populations.

3 INTRODUÇÃO

A germinação é um processo complexo que representa um estágio crítico do biociclo vegetal correlacionado a elevadas taxas de mortalidade (Harper, 1977), sendo os fatores ambientais cruciais para o sucesso germinativo. Segundo Bewley & Black (1994) e Silva et al. (2008), a germinação tem início com a entrada de água na semente e finaliza-se com o alongamento do eixo embrionário e a protrusão da radícula, fato este considerado como fim do processo no contexto fisiológico.

Dentre os fatores endógenos e exógenos à semente determinantes da germinação destacam-se: a composição química, níveis hormonais, disponibilidade hídrica, luz e temperatura (Bewley & Black, 1994).

De acordo com Marcos Filho (2005) e Pugnaire & Valladares (2007), a composição química das sementes é definida geneticamente, mas, devido à plasticidade adaptativa dos vegetais, ela pode variar quantitativamente conforme as condições edafo-climáticas do ambiente onde o vegetal está inserido. Isso ocorre sobretudo porque a disponibilidade hídrica influencia profundamente a biossíntese e o transporte de fotoassimilados utilizados como precursores de reservas nos diferentes órgãos-dreno.

Os hormônios, em especial o ácido giberélico (GA) e o ácido abscísico (ABA), constituem os principais sinais internos que regulam a hidrólise de reservas, os quais exercem papel crucial na regulação da germinação: enquanto GA estimula o processo germinativo, ABA inibe (Davies, 2004). Nambara e Marion-Poll (2003) afirmam que o controle da germinação é dependente dos níveis dos hormônios ativos, os quais são modulados por meio da taxa de síntese de seus precursores, catabolismo e/ou sua translocação.

Há várias evidências de que GA regula negativamente a concentração do ABA endógeno (Zentella et al., 2007; Sawada et al., 2008; Seo et al., 2009). Diversas pesquisas demonstram a importância do ABA

também no estabelecimento e profundidade da dormência (Cadman et al., 2006). Entretanto, estudos que investigam a influência dos fatores ambientais na biossíntese e acúmulo de GA e ABA durante a formação de sementes e germinação são escassos, sobretudo os que investigaram comparativamente populações de uma mesma espécie geograficamente distinta.

Neste contexto, a espécie *T. impetiginosa* constitui um interessante modelo para a pesquisa por ser encontrada em praticamente todo o território brasileiro, tanto em ambientes úmidos como a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica, quanto em ambientes mais secos como o Cerrado e a Caatinga, sendo que a floração da espécie ocorre nos meses de junho e julho e o desenvolvimento das sementes ocorre comumente nos meses de julho, agosto e setembro. A dispersão das sementes ocorre nos meses de setembro e outubro (Lorenzi, 2002; Schulze et al., 2008).

Diante disso, o objetivo desse estudo foi analisar algumas características ecofisiológicas da reprodução de populações de *T. impetiginosa* localizadas em Lavras-MG, Rondonópolis-MT, Assú-RN e Penápolis-SP. As características analisadas foram o peso de mil sementes, a composição química das sementes e a influência de GA e dos inibidores de GA (Tetcyclasis) e ABA (Fluridona) sobre a germinação de embriões.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das sementes

As sementes de *T. impetiginosa* foram obtidas a partir de frutos maduros, amarronzados, de no mínimo 6 plantas adultas, durante o período de dispersão de sementes em 2007. Os frutos foram coletados na primeira quinzena de outubro, em Lavras-MG (21°13'S, 44°58'W), cuja altitude é de 918 m; em Rondonópolis-MT (16° 27'S, 54°34'W), a 284 m, na segunda quinzena de setembro; em Assú-RN (5°34'S, 36°54'W), 23 metros, na segunda quinzena de setembro e em Penápolis-SP (21°25'S, 50°04'W), 416 m, na primeira quinzena de outubro.

Após coleta, as sementes foram retiradas manualmente dos frutos e mantidas à temperatura ambiente até atingirem 6% de umidade e, em seguida, armazenadas em câmara fria a 10 °C e 50% de umidade relativa.

4.2 Determinação do grau de umidade e peso de mil sementes

As análises foram realizadas empregando-se estufa a 105±3 °C, durante 24 horas, segundo as instruções das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), utilizando-se quatro repetições, com 10 g de sementes cada. Os resultados foram expressos em porcentagem de umidade.

O peso médio de mil sementes foi determinado utilizando-se oito amostras de 100 unidades cada (Brasil, 1992).

4.3 Determinação da fração de amido

A determinação do teor de amido foi realizada a partir de quatro repetições de 2 g de sementes frescas, as quais foram maceradas. Após lavagem em etanol, as amostras foram centrifugadas para a obtenção de extrato alcoólico. Com o resíduo da centrifugação, realizou-se a hidrólise ácida para a determinação do teor de amido segundo o método descrito por McCready et al. (1950).

4.4 Determinação da fração de açúcares redutores e não redutores

Os açúcares redutores e não redutores foram extraídos pelo método de Lane-Enyon (AOAC, 1990) e determinados pela técnica de Somogy, adaptada por Nelson (1944). Para a verificação da quantidade de açúcares redutores, foram pesados 5 g de amostra, aos quais adicionaram-se 50 mL de etanol 70%, seguido de neutralização com ácido acético glacial e, finalmente, foi completado volume para 100 mL. Em seguida, foi feita leitura de absorvância em espectrofotômetro a 510 nm. Para a determinação dos açúcares totais, foi realizada a hidrólise ácida da sacarose, acidificando o filtrado anterior com 0,5 mL de ácido clorídrico concentrado. Em seguida, as amostras foram levadas para banho-maria fervente por 15 minutos e, posteriormente, neutralizadas em solução saturada de carbonato de sódio. Seguiu-se a desproteinização do extrato com água destilada, solução de hidróxido de bário 0,3 N e solução de sulfato de zinco 5%. Os tubos foram agitados em vórtex e seu conteúdo filtrado, para leitura de absorvância feita a 510 nm. A determinação dos açúcares não redutores foi realizada pela diferença entre valor apresentado para açúcares totais e açúcares redutores, convertida para o valor real multiplicado pelo fator 0,95.

4.5 Determinação da fração protéica

Na determinação da fração protéica, pesaram-se quatro repetições de 0,1 g de material desengordurado, sendo a amostra transferida para tubo de digestão aos quais foram adicionados 1,5 g de sulfato de potássio e 0,3 g de sulfato de cobre, sendo, posteriormente, acrescentados 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram levados para o bloco digestor a 50 °C, com aumento progressivo lento da temperatura até atingir 370 °C. A mistura permaneceu no bloco digestor até a solução apresentar cor verde-clara. Após esfriamento, foram adicionados 30 mL de água destilada, seguindo-se de agitação até dissolver o resíduo. Na determinação do teor de nitrogênio total, foi utilizado o método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1990), aplicando-se o fator 6,25 para o cálculo do teor de proteína bruta por matéria seca.

4.6 Determinação da fração de lipídeos em extrato etéreo

Para a determinação da fração lipídica das sementes, utilizaram-se quatro repetições de 2 g de sementes frescas. A extração foi realizada com éter etílico em extrator contínuo de Soxhlet, utilizando reboiler previamente seco e pesado. Após a extração, o reboiler contendo o resíduo foi levado para a estufa a 65 °C, por 24 horas, sendo posteriormente pesado, e os resultados foram expressos em porcentagem de lipídeos por matéria seca (AOAC, 1990).

4.7 Embebição e germinação dos embriões

Para a obtenção das curvas de embebição, as sementes de *T. impetiginosa* procedentes das quatro localidades foram desprovidas de tegumentos e desinfestadas em solução com 2% de hipoclorito de sódio, por 30 segundos, e posteriormente, lavadas em água destilada, por 20 segundos. Em seguida, os embriões foram dispostos em placas de Petri de 8,5 cm com dupla camada de papel de filtro, sobre a qual foram adicionados 5 mL de água destilada. Foram utilizadas quatro repetições com 10 embriões para cada tratamento, mantidos em câmara BOD a 30 °C sob luz contínua. A embebição foi avaliada em diferentes tempos até 48 horas.

4.8 Avaliação da influência dos fitormônios ABA e GA no processo germinativo

Após remoção manual dos tegumentos das sementes, os embriões foram dispostos em câmara de pré-umidificação, durante 24 horas a 30 °C em ambiente com 100% de umidade relativa. Na seqüência, os mesmos foram desinfestados com hipoclorito de sódio, na concentração de 1%, durante 3 minutos, seguida de tripla lavagem em água destilada. Os embriões foram, então, colocados para germinar em placas de Petri de 8,5 cm, com duas camadas de papel germitest embebidas em 4 mL de água destilada, mantidos em câmara BOD a 30 °C sob luz contínua..

Para as avaliações da influência dos fitormônios ABA e GA no processo germinativo, diferentes amostras de embriões foram incubados conforme mencionado anteriormente, porém, em soluções de GA a 0,1 mM, tetcyclasis a 0,1 mM e fluridona a 0,1 mM. A escolha dessas concentrações foi baseada nos estudos anteriores de Silva et al. (2004) e Vieira (2008), pois proporcionaram as respostas fisiológicas mais marcantes e, portanto, úteis para a elucidação das variações entre as populações.

A solução estoque de GA foi preparada em KOH, 1 N, com pH ajustado para 7 com HCl. As soluções estoque dos inibidores fluridona e tetcyclasis foram preparadas a partir da dissolução em 0,1% de acetona (v/v).

Para cada tratamento, a germinação foi realizada com 4 repetições de 20 embriões. A germinação foi avaliada por 6 dias, até o crescimento visível da radícula (alongamento > 2 mm). A porcentagem de germinação foi calculada pela seguinte fórmula: $\%G = (\sum ni \cdot N-1) \cdot 100$. Em que $\sum ni$ é o número total de embriões germinados em relação ao número de embriões dispostos para germinar (N-1). O índice de velocidade de germinação foi calculado pela seguinte fórmula: $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots Gn/Nn$. Em que G é o número de embriões germinados e N é o número de dias após a semeadura.

4.9 Análise estatística

A correlação entre o peso de mil sementes e as condições pluviométricas dos habitats foi determinada pelo cálculo do coeficiente de correlação de Pearson (Bussab & Morettin, 2002). Os dados de germinabilidade dos diferentes tratamentos foram submetidos à análise de variância (ANAVA), seguido de teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5% (Sokal & Rohlf, 1981).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do peso de mil sementes, da composição química e da dinâmica da germinação dos embriões foram significativamente destoantes entre as populações analisadas e revelam diferentes estratégias associadas com seu papel ecológico, sobretudo em relação à capacidade reprodutiva da *T. impetiginosa*.

O fator climático que destoa profundamente nas diferentes regiões brasileiras e que se relaciona com a plasticidade adaptativa do vegetal é a disponibilidade hídrica. Os dados de pluviosidade dos ambientes de onde as sementes foram coletadas estão dispostos na Tabela 1.

TABELA 1 Dados pluviométricos dos locais de coleta de sementes referentes ao ano de 2007.

Precipitação	Lavras	Rondonópolis	Assú	Penápolis
Anual	1248,0	1249,8	750,8	1219,4
Época de desenvolvimento das sementes	17,6	43,5	6,8	107,0
Época de dispersão das sementes	130,1	158,0	0,0	49,4

*Fontes: Estação Climatológica da UFLA, INMET, SLAB-DAEP, Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte S/A (EMPARN).

O peso de mil sementes variou expressivamente entre as populações analisadas, indicando modificações nas características biométricas, especialmente quanto a massa e tamanho. O peso de mil sementes das populações de Lavras-MG, Rondonópolis-MT, Assú-RN e Penápolis-SP corresponderam a 109,70; 74,75; 93,24 e 56,79 g, respectivamente. Isto permite inferir que as sementes procedentes da população de plantas de Lavras-MG são as maiores dentre as avaliadas, enquanto as sementes provenientes de Penápolis-SP são as menores.

A análise da correlação entre o peso de mil sementes e a pluviosidade anual dos ambientes apresentou-se baixa ($r: -0,2247$). Semelhantemente, a correlação com a pluviosidade logo após a dispersão das

sementes também foi baixa (0,1248). Entretanto, houve uma alta correlação negativa ($r: -0,82919$) entre o peso de mil sementes e a pluviosidade do período de desenvolvimento das sementes, indicando que este período é crucial para o desenvolvimento das sementes, e a menor disponibilidade hídrica no solo proporcionou o maior investimento da planta na produção de sementes maiores.

Para Pugnaire & Valladares (2007), o tamanho das sementes geralmente é resultado de numerosas pressões de seleção que frequentemente operam em direções opostas e, por isso, é recomendável avaliar essas variações em massa, entre as populações, correlacionando-as também com estratégias de reprodução do vegetal.

De acordo com Geritz (1995), Ezoë (1998) e Moles & Westoby (2004), o maior investimento em sementes pequenas objetiva favorecer a dispersão, enquanto que a produção de sementes maiores constitui investimento no estabelecimento da futura plântula. Sementes com maior massa podem também contribuir para uma menor taxa de secagem da semente no ambiente ou favorecer uma rápida germinação, a qual, além de diminuir a possibilidade de predação das sementes, invariavelmente favorece a redução da probabilidade de desidratação das mesmas e o rápido acesso ao recurso hídrico disponível no solo, particularmente, em ambientes onde as chuvas são esporádicas (Pritchard, 2004).

O maior tamanho das sementes pode também contribuir para produzir plântulas maiores, cujas folhas possam superar a camada de serrapilheira disposta no solo e, assim, ter maiores possibilidades de competir por luz (Molofsky & Augspurger, 1992). Ibarra-Manriquez et al. (2001) e Zanne et al. (2005) verificaram que o tamanho das sementes pode relacionar-se à morfologia da plântula, sobretudo na produção de cotilédones maiores que possibilitem plântulas mais longevas, por possuírem maior conteúdo de reservas e serem mais funcionais fotossinteticamente.

Assim, os maiores tamanhos das sementes procedentes das populações de Lavras-MG e Assú-RN, além de refletir a pouca precipitação

durante o período de desenvolvimento, também podem indicar uma maior adaptação da população ao déficit hídrico, uma vez que a secagem de uma semente maior ocorrerá a uma taxa menor quando esta for dispersa no ambiente e, dessa forma, resistirá mais intensamente à dessecação (Pritchard, 2004). Por outro lado, os menores pesos e tamanhos das sementes procedentes de Rondonópolis-SP e Penápolis-SP, além de estarem correlacionados com a maior abundância hídrica durante o desenvolvimento, pode também constituir-se numa estratégia reprodutiva que proporciona sementes mais leves, favorecendo a dispersão por anemocoria.

A partir das análises da composição química das sementes de *T. impetiginosa*, foi possível caracterizar as sementes como oleaginosas, pois os constituintes majoritários foram lipídeos, com quantidade superior a 30% (Tabela 2). A composição química das sementes do gênero *Tabebuia* varia conforme a espécie: *T. roseo-alba* possui sementes protéicas enquanto as de *T. serratifolia*, são oleaginosas (Freitas et al., 1979; Degan et al., 1997).

TABELA 2 Constituintes químicos das sementes de *T. impetiginosa*. Valores médios em mg.g⁻¹.

Constituintes	Lavras	Rondonópolis	Assú	Penápolis
Amido	36,3 a	30,5 b	30,8 b	37,6 a
Açúcares Solúveis Totais	149,2 a	96,7 b	95,5 b	97,4 b
Açúcares redutores	1,8 a	1,5 b	2,3 a	1,9 a
Açúcares não redutores	140,1 a	90,4 b	90,3 b	89,0 b
Proteína	206,5 d	254,4 a	238,6 c	240,9 b
Lipídeos	394,1 a	318,5 c	343,8 b	348,0 b

*As letras comparam as variações de cada constituinte químico nas sementes procedentes dos diferentes locais de coleta. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scoot-Knott a 5% de probabilidade.

As proporções entre as quantidades das reservas presentes nas sementes variaram nas diferentes populações. As sementes procedentes de Lavras-MG destacaram-se pela maior quantidade de reservas de açúcares solúveis e de lipídeos. Os açúcares solúveis podem constituir os substratos iniciais para a respiração durante fase inicial da germinação, favorecendo o rápido crescimento e estabelecimento de plântulas (Martins et al., 2008). Além disso, a maior quantidade de lipídeos verificada nessas sementes pode estar relacionada à maior longevidade das plântulas, característica esta marcante em populações adaptadas a ambientes sombreados (Kitajima, 1992). Outra vantagem do acúmulo de lipídeos nas sementes, relatada por Penning de Vries & Van Laar (1977), é que uma unidade de massa de lipídeos é convertida em maior quantidade de massa de plântula que uma unidade de massa de amido; portanto, energeticamente mais conveniente a plântulas longevas.

Nas sementes procedentes de Rondonópolis-MT, foi verificada menor quantidade de amido e lipídeos e maior quantidade de proteínas. Isto indica uma preferência desta população em armazenar substâncias de reservas com elevada afinidade com a água em detrimento àquelas menos higroscópicas. O maior conteúdo de proteínas favorece a embebição mais rápida, embora, ao mesmo tempo, favoreça a ocorrência de processos degradativos que limitam o tempo de armazenamento dessas sementes (Marcos Filho, 2005).

As curvas de embebição demonstram que os embriões procedentes de Rondonópolis-MT apresentam embebição mais rápida que os embriões dos demais ambientes e alcançam maior conteúdo de água após 48 horas de embebição (Figura 1). Estas discrepâncias nas características fenotípicas de base genética entre os embriões da mesma espécie revelam alterações fisiológicas que fluem para uma melhor competitividade interespecífica, seja utilizando melhor os recursos naturais, seja tolerando mais profundamente os fatores estressantes.

De acordo com Müntz et al. (2001), o acúmulo de proteínas constitui importante fonte de nitrogênio para o rápido estabelecimento da plântula em formação, pois, na maioria das espécies, a degradação dessa reserva só é mensurável após a protrusão radicular.

As curvas de embebição não demonstraram um padrão trifásico. A não observação do padrão trifásico nesta pesquisa deve-se possivelmente ao fato de a curva de embebição ter sido feita com embriões e não com sementes. Em estudos com sementes de *T. impetiginosa* coletadas em Lavras-MG, Silva (2004) verificou um padrão trifásico de embebição em que a fase II foi alcançada em 24 horas e a fase III, em 72 horas.

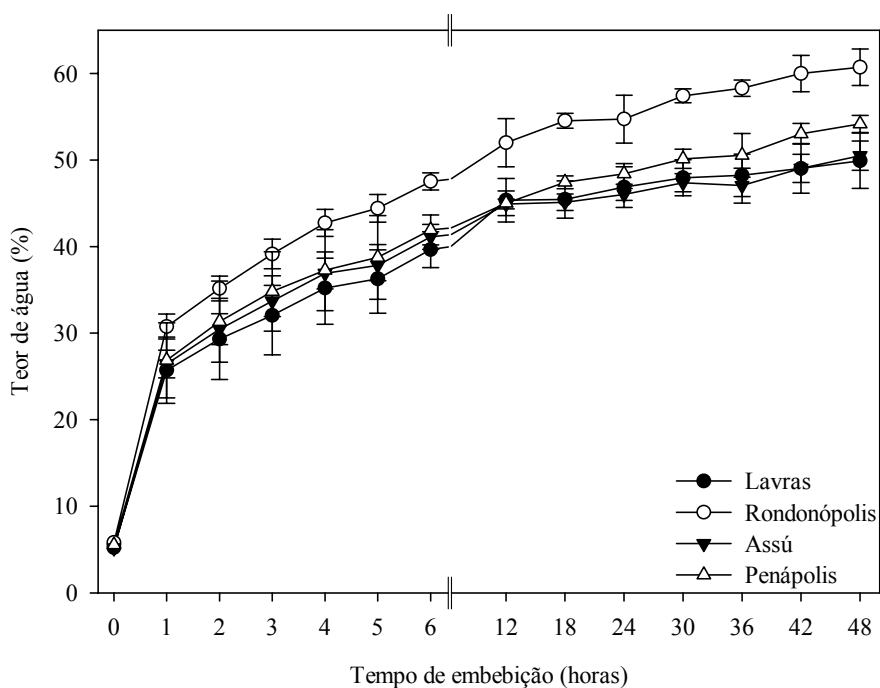


FIGURA 1 Curva de embebição de embriões de *T. impetiginosa*, a 30°C. As barras indicam o desvio padrão da média.

Nos embriões procedentes de Rondonópolis-MT, a protrusão radicular iniciou-se por volta de 25 horas do início da embebição e a máxima porcentagem de germinação ocorreu próximo de 35 horas. Entretanto, nos

embriões procedentes de Lavras-MG e Assú-RN, a protrusão radicular só pode ser verificada por volta de 30 horas e atingiu a máxima porcentagem somente após 72 horas (Figura 2). O padrão de germinação verificado nos embriões de Lavras-MG foi similar ao verificado por Silva (2004) em sementes coletadas na mesma região, indicando que o comportamento dessa população nesta característica permaneceu estável e, portanto, as variações observadas entre as populações estão revelando uma adaptação fisiológica às pressões seletivas presentes em cada habitat.

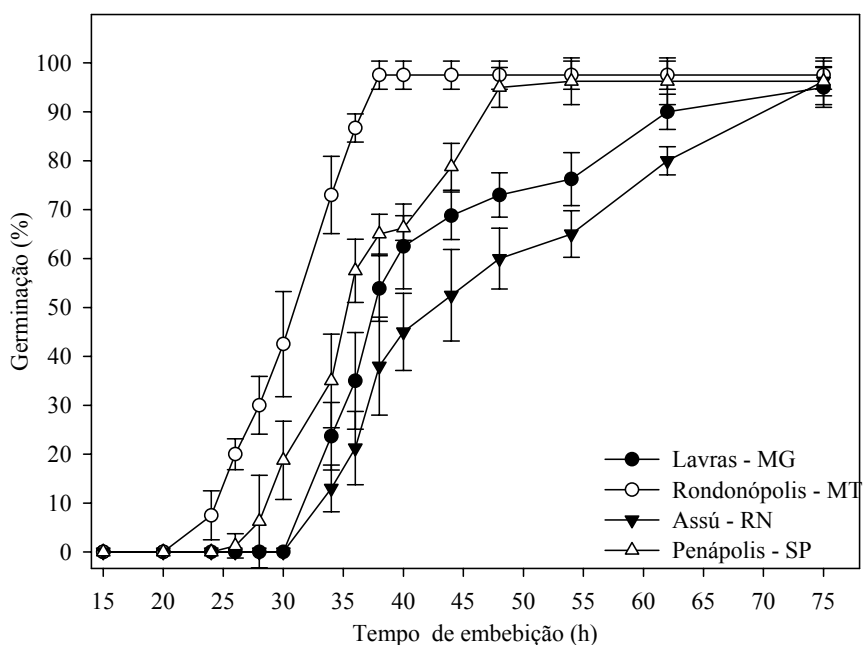


FIGURA 2 Germinação de embriões de *T. impetiginosa*, a 30°C, sob luz constante. As barras indicam o desvio padrão da média.

Os embriões de Rondonópolis-MT e Penápolis-SP apresentaram os maiores índices de velocidade de germinação (IVG), embora não diferindo entre si. Os embriões de Lavras-MG e de Assú-RN tiveram os menores IVG e também não diferiram entre si (Tabela 3). A porcentagem final de germinação não destoou significativamente entre as populações e superou 95%.

As variações na velocidade de germinação revelam tendências de alterações nas estratégias de estabelecimento de plântulas nas diferentes populações.

A adição exógena de GA ao processo de germinação aumentou a velocidade de germinação dos embriões da população de Lavras-MG, de forma que o IVG tornou-se semelhante aos das populações de Rondonópolis-MT e Penápolis-SP, mas não afetou o IVG das demais populações (Tabela 3).

TABELA 3 Dados relativos ao índice de velocidade de germinação dos embriões incubados em água destilada e soluções a 0,1mM de ácido giberélico (GA), tetcyclasis e fluridona.

Locais de coleta de sementes	Tratamentos			
	Água	GA	Tetcyclasis	Fluridona
Lavras-MG	2,30 Bc	2,64 Ab	1,15 Bd	3,74 Ba
Rondonópolis-MT	3,13 Ab	3,20 Ab	1,80 Ac	4,70 Aa
Assú-RN	2,10 Bb	2,36 Bb	0,75 Cc	3,06 Ca
Penápolis-SP	2,62 Ab	2,83 Ab	1,23 Bc	4,44 Aa

* As letras maiúsculas comparam cada local de coleta em cada tratamento. As letras minúsculas comparam os tratamentos em cada local de coleta. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scoot-Knott a 5% de probabilidade.

De acordo com Silva (2004), o ácido giberélico é sintetizado *de novo* durante a germinação e pode atuar sobre o alongamento radicular de *T. impetiginosa* durante as primeiras 24 horas da embebição. Deste modo, a não alteração do IVG na germinação das populações de Rondonópolis-MT, Penápolis-SP e Assú-RN revelam que a velocidade da síntese *de novo* de GA nos embriões não constitui fator limitante para a rápida germinação. Por outro lado, a mudança na velocidade de germinação dos embriões procedentes de Lavras-MG indica que, ou a velocidade da síntese *de novo* de GA é mais lenta, ou não proporciona quantidade de GA suficiente para uma

rápida germinação como nos embriões das demais populações, ou a sensibilidade ao hormônio é mais baixa nos embriões dessa localidade.

Verificou-se ainda que a adição de GA provavelmente tornou a germinação mais sincronizada para todas as populações, uma vez que houve um encurtamento do tempo em que foram observados o início e o fim da protrusão radicular (Figura 3).

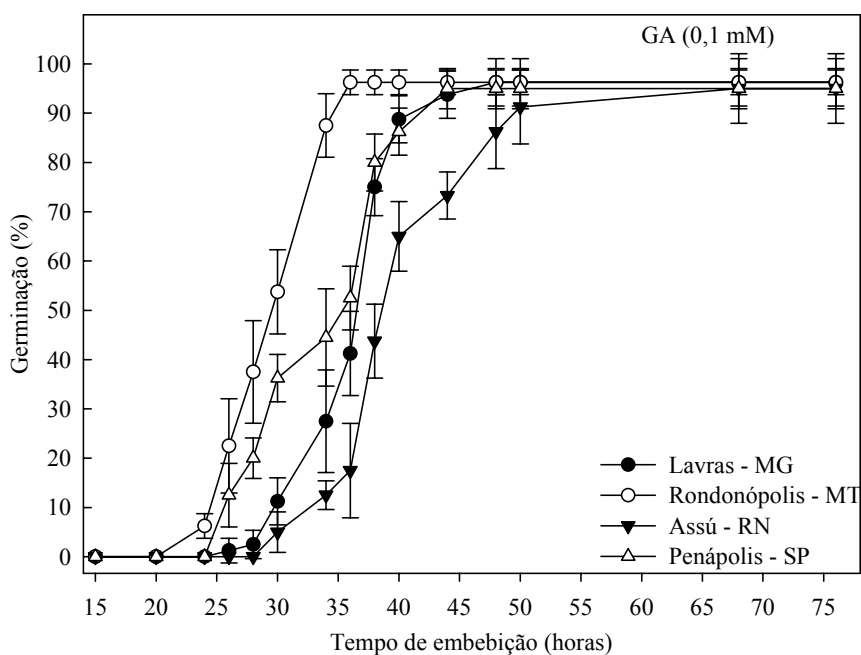


FIGURA 3 Germinação de embriões de *T. impetiginosa*, a 30°C, sob luz constante, na presença de 0,1mM de GA. As barras indicam o desvio padrão da média.

A inibição da síntese de GA durante o processo germinativo promoveu respostas diferentes em cada população de *T. impetiginosa* (Figura 4). Houve inibição total da germinação dos embriões de Lavras-MG, Assú-RN e Penápolis-SP nas primeiras 50 horas de embebição. No entanto, a germinação destas populações ao final de 144 horas superou 90%. Isto ratifica que ocorre a síntese *de novo* de GA durante o processo germinativo, como relatado por Silva (2004) e Vieira (2008).

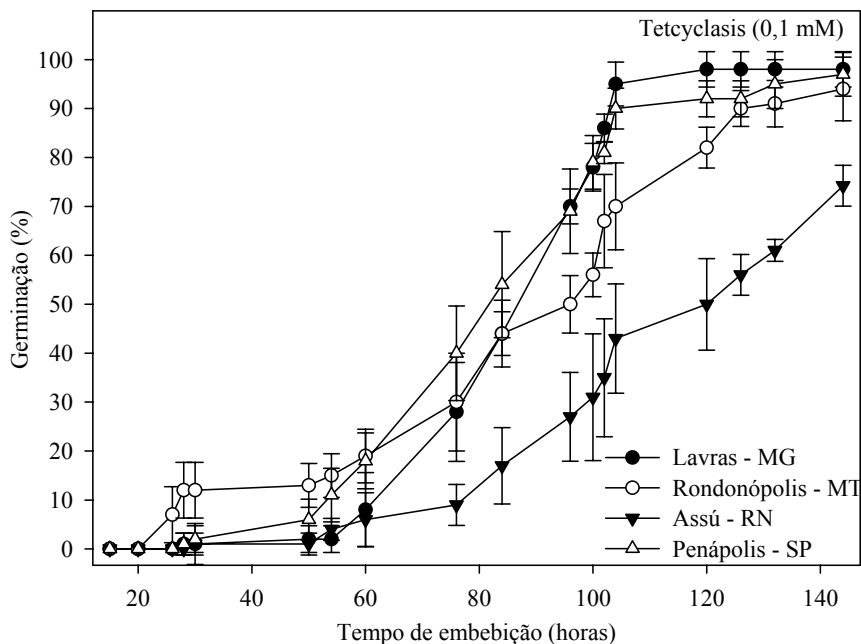


FIGURA 4 Germinação dos embriões de *T. impetiginosa*, a 30°C, sob luz constante, na presença de 0,1mM de tetcyclasis. As barras indicam o desvio padrão da média.

A germinação tardia dos embriões de Lavras-MG, Assú-RN e Penápolis-SP, posterior a 50 horas, deve-se, possivelmente, à degradação do inibidor após esse período, ou ao tempo necessário para conversão e descompartimentalização de GA inativa em GA ativa, já presentes nas sementes (Figura 4).

O inibidor tetcyclasis inibiu parcialmente a germinação dos embriões procedentes de Rondonópolis-MT, uma vez que 10% dos embriões tiveram a capacidade de germinar normalmente, iniciando a protrusão por volta de 25 horas de embebição. Este resultado permite inferir que a população de Rondonópolis-MT apresenta uma característica em dispersar as sementes com um nível GA capaz de até promover a germinação sem a dependência completa da síntese *de novo*.

Hu et al. (2008) mostraram que a expressão de GA3ox catalisa a etapa final na síntese de GAs bioativas, ainda durante as fases do

desenvolvimento de sementes, sugerindo que as GAs produzidas antes da dispersão podem estar disponíveis à semente para uma rápida germinação.

Com a adição de fluridona, um inibidor da síntese de ABA, durante a embebição dos embriões foi possível verificar que a protrusão radicular de todas as populações iniciou-se a partir de 20 horas de embebição e alcançou 90% por volta de 40 horas (Figura 5). A antecipação do processo germinativo e sua maior velocidade indicaram que o ácido abscísico é sintetizado durante a embebição e age como um regulador negativo do processo germinativo. De acordo com a Tabela 3 a inibição da síntese de ABA promoveu acréscimo das velocidades de germinação para os embriões de todas as populações.

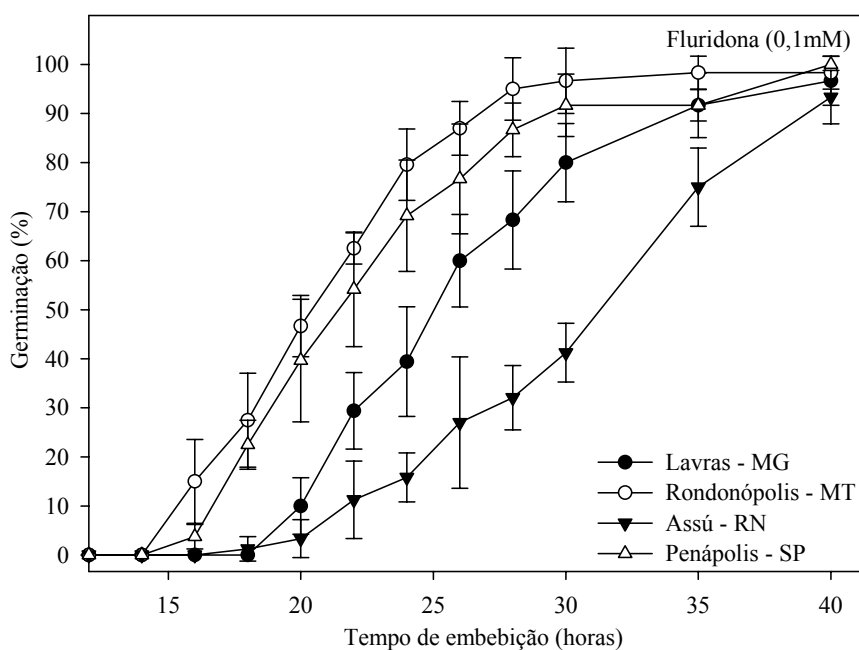


FIGURA 5 Germinação de embriões de *T. impetiginosa*, a 30°C, sob luz constante, na presença de 0,1mM de fluridona. As barras indicam o desvio padrão da média.

As funções da síntese de ABA durante a germinação não são conhecidas, mas sabe-se que os sistemas de proteção contra a dessecação são progressivamente perdidos durante a germinação e, de acordo com estudo de

Gusta et al. (2006) com sementes de canola, essa perda relaciona-se ao catabolismo do ABA. Em *T. impetiginosa*, provavelmente, a síntese de ABA pode estar relacionada à manutenção dos mecanismos de tolerância à dessecação durante a fase inicial do desenvolvimento da plântula, como proteção contra as intempéries climáticas comuns nas regiões tropicais, especialmente nas regiões com maior escassez de água, ou chuvas esporádicas.

A inibição da síntese de ABA não proporcionou similaridade entre os IVGs das populações, pois, nesta condição, a germinação dos embriões de Assú-RN foi mais lenta que as demais, indicando que, provavelmente, nesta população as sementes sejam dispersas com maior conteúdo de ABA que as demais.

6 CONCLUSÕES

O tamanho e massa das sementes de *T. impetiginosa* está negativamente correlacionado com a pluviosidade do período de sua formação. As sementes são oleaginosas e suas composições químicas influenciam a velocidade de embebição e germinação. Durante o processo germinativo ocorre a síntese *de novo* de GA e ABA.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of the Association of the Agricultural Chemists**. 15. ed. Washington, 1990. 1094 p.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.
- BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. **Estatística básica**. São Paulo: Atual, 1986. 136 p.
- CADMAN, C. S. C.; TOOROP, P. E.; HILHORST, H. W. M.; FINCH-SAVAGE, W. E. Gene expression profiles of Arabidopsis Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. **The Plant Journal**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 805-822, July 2006.
- DAVIES, P. J. **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!** Dordrecht: Kluwer Academic, 2004. 750 p.
- DEGAN, P.; AGUIAR, I. B.; SADER, R.; PINTO, L. R. Composição química, sanidade, secagem e germinação de sementes de ipê-branco (*Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand. - *Bignoniaceae*). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 3, n. 1, p. 41-47, jan. 1997.
- EZOE, H. Optimal dispersal range and seed size in a stable environment. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 190, n. 3, p. 287-293, Feb. 1998.
- FREITAS, S. C.; CANDIDO, J. F.; CONDE, A. R.; HARA, T. Determinação de equilíbrio higroscópico e viabilidade de sementes de ipê-amarelo *Tabebuia serratifolia* (Vahl Nichols) armazenadas em diferentes umidades relativas. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 3, n. 2, p. 135-144, 1979.
- GERITZ, S. A. Evolutionarily stable seed polymorphism and small-scale spatial variation in seedling density. **American Naturalist**, Chicago, v. 11, n. 1, p. 685-707, Jan. 1995.
- GUSTA, L. V.; GAO, Y. P.; BENNING, N. T. Freezing and desiccation tolerance of imbibed canola seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 127, n. 2, p. 237-246, June 2006.

- HARPER, J. L. **Population biology of plants**. London: Academic, 1977. 892 p.
- 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.
- IBARRA-MANRIQUEZ, G.; RAMOS, M. M.; OYAMA, K. Seedling functional types in a lowland rain forest in Mexico. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 88, n. 10, p. 1801-1812, Oct. 2001.
- KITAJIMA, K. Relationship between photosynthesis and thickness of cotyledons for tropical tree species. **Functional Ecology**, Oxford, v. 6, n. 5, p. 582-589, Nov. 1992.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v. 2, 384 p.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.
- MARTINS, J. R.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; BATISTA, L. A.; SILVA, A. P. O. Influência da luz, temperatura e ácido giberélico na germinação de sementes de *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) e avaliação da qualidade fisiológica pelo teste de raios-X. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.10, n.2, p.44-49, 2008.
- McCREADY, R. M.; GUGGOLZ, A.; SILVEIRA, V.; OWENS, H. S. Determination of starch and amylase in vegetables: application to peas. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 22, n. 9, p. 1156-1158, Sept. 1950.
- MOLES, A. T.; WESTOBY, M. Seedling survival and seed size: a synthesis of the literature. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 92, n. 3, p. 372-383, June 2004.
- MOLOFSKY, J.; AUGSPURGER, C. K. The effect of litter on early seedling establishment in a tropical forest. **Ecology**, Durham, v. 73, n. 1, p. 68-77, Feb. 1992.

MÜNTZ, K.; BELOZERSKY, M. A.; DUNAEVSKY, Y. E.; SCHLERETH, A.; TIEDEMANN, J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 362, p. 1741-1752, Sept. 2001.

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

NELSON, N. A. A photometric adaptation of Somogy method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 135, n. 2, p. 136-175, May 1944.

PENNING DE VRIES, F. W. T.; LAAR, H. H. van. Substrate utilization in germinating seeds. In: LANDSBERG, J. J.; CUTTING, C. V. (Ed.). **Environmental effects on crop physiology**. London: Academic, 1977. p. 217-228.

PRITCHARD, H. W.; DAWS, M. I.; FLETCHER, B. J.; GAMÉNÉ, C. S.; MSANGA, H. P.; OMONDI, W. Ecological correlates of seed desiccation tolerance in tropical African dryland trees. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 91, n. 6, p. 863-870, June 2004.

PUGNAIRE, F. I.; VALLADARES, F. **Functional plant ecology**. 2. ed. New York: CRC, 2007. 724 p.

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**, Washington, v. 146, n. 3, p. 1386 -1396, Mar. 2008.

SCHULZE, M.; GROGAN, J.; UHL, C.; LENTINIA, M.; VIDAL, E. Evaluating ipê (*Tabebuia*, Bignoniaceae) logging in Amazonia: sustainable management or catalyst for forest degradation? **Biological Conservation**, Essex, v. 141, n. 8, p. 2071-2085, Aug. 2008.

SEO, M.; NAMBARA, E.; CHOI, G.; YAMAGUCHI, S. Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 4, p. 463-472, Nov. 2009.

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.

SILVA, E. A. A.; TOOROP, P. E.; LAMMEREN, A. A. M. V.;
HILHORST, H. W. M. ABA inhibits embryo cell expansion and early cell
division events during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination.
Annals of Botany, London, v. 102, n. 3, p. 425-433, Sept. 2008.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**. 2. ed. San Francisco:
W.H. Freeman, 1981. 219 p.

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

ZANNE, A. E.; CHAPMAN, C. A.; KITAJIMA, K. Evolutionary and
ecological correlates of early seedling morphology in East African trees and
shrubs. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 92, n. 6, p. 972-978,
Dec. 2005.

ZENTELLA, R.; ZHANG, Z. L.; PARK, M.; THOMAS, S. G.; ENDO, A.;
MURASE, K.; FLEET, C. M.; JIKUMARU, Y.; NAMBARA, E.;
KAMIYA, Y.; SUN, T. P. Global analysis of DELLA direct targets in early
gibberellin signaling in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 10, p.
3037-3057, Oct. 2007.

CAPÍTULO 3

Reindução da tolerância à dessecação de plântulas de *Tabebuia impetiginosa*

1 RESUMO

A espécie *Tabebuia impetiginosa* é amplamente distribuída por quase todo o território brasileiro, sendo encontrada na Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga. Estes ambientes apresentam diferenças marcantes quanto à disponibilidade hídrica, por isso, esta pesquisa objetivou avaliar a capacidade de TD em plântulas de populações de *T. impetiginosa* geograficamente distanciadas e correlacioná-la com a pluviosidade dos habitats onde as populações estão inseridas. Foram coletadas sementes procedentes das seguintes localidades: Lavras-MG, Rondonópolis-MT, Assú-RN e Penápolis-SP. A tolerância à dessecação foi avaliada pela sobrevivência da raiz primária após secagem até $0,07\text{gH}_2\text{O.g}^{-1}\text{MS}$. O efeito da incubação em PEG (6000) previamente à secagem foi avaliado. A maior capacidade em reinduzir a TD foi observada nas plântulas procedentes da população de Assú-RN, por outro lado, as plântulas menos TD são as procedentes de Penápolis-SP. Houve uma correlação fortemente negativa entre a pluviosidade anual e a TD, indicando que em ambientes mais secos a TD é maior. A incubação em solução de PEG melhorou a capacidade de reindução da TD das plântulas de todas as populações em todos os comprimentos radiculares, exceto aquelas procedentes de Assú-RN.

2 ABSTRACT

The species *Tabebuia impetiginosa* is widely distributed over almost the Brazilian territory, its being found in the Amazon Forest, Mata Atlântica, Cerrado and Caatinga. These environments present outstanding differences as to water availability, therefore, this research aimed to evaluate the depth of TD of seedlings of populations of *T. impetiginosa* geographically distant and to correlate them to the rainfall of the habitats where the populations are inserted. Seeds coming from the following places: Lavras-MG, Rondonópolis-MT, Assú-RN and Penápolis-SP were collected. The desiccation tolerance was evaluated by the survival of the primary root after drying up to $0.07\text{gH}_2\text{O.g}^{-1}\text{DM}$. The effect of the incubation in PEG (6000) previously to drying was evaluated. The greatest capacity to re-induce TD was found in the seedlings coming from the population of Assú-RN, on the other hand, the seedling least TD are the ones coming from Penápolis-SP. there was a strongly negative correlation between the annual rainfall and TD, indicating that in drier environments, TD is higher. The incubation in PEG solution improved the capacity of re-inducing of TD of seedlings of all the populations in all the root lengths, except those coming from Assú-RN.

3 INTRODUÇÃO

A água é uma exigência universal para a vida, como se conhece atualmente, e é o componente mais abundante em todas as células ativas. Na maioria dos habitats, a disponibilidade de recurso hídrico é crucial para a sobrevivência dos organismos (Black & Pritchard, 2002). Neste contexto, a tolerância à dessecação (TD) tem sido considerada como um pré-requisito necessário para que muitas plantas completem seu ciclo de vida.

A TD é geralmente referida como a capacidade de um organismo sobreviver a um extremo de desidratação, em que o conteúdo de água do protoplasma seja igual ou inferior a 0,1g por grama de massa seca ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (Vertucci & Farrant, 1995; Walters et al., 2005; Berjak, 2006). Outros autores a interpretam como uma estratégia adaptativa que objetiva proporcionar a sobrevivência das sementes ao armazenamento, sobretudo em condições ambientais severas, uma vez que os tecidos dessecados são mais bioestáveis (Pritchard et al., 2004; Garnczarska et al. 2009).

A raridade da TD, especialmente nos tecidos vegetativos das plantas, levanta questões sobre como ela afeta a sobrevivência e distribuição vegetal no planeta (Oliver et al., 2005). Tweddle et al. (2003) verificaram que as sementes sensíveis à dessecação estão em alta frequência em florestas tropicais úmidas, por outro lado, Murdoch & Ellis (2000) afirmam que a frequência de sementes tolerantes à dessecação é maior em ambientes áridos e savânicos dos trópicos.

Vários estudos têm mostrado que as sementes são dispersas com diferentes níveis de TD e muitas tentativas têm sido feitas com o desígnio de correlacionar esse comportamento a características ecológicas, como clima e tipo de vegetação, latitude e a biometria da semente, ou seja, forma e tamanho (Pritchard et al., 1995; Hong & Ellis, 1998; Pritchard et al., 2004).

De acordo com Bruggink & Toorn (1995) e Kermode (1995), a TD é adquirida durante a fase de maturação das sementes, após a embriogênese. Com o decorrer do processo germinativo e conseqüente

formação da plântula, ela é progressivamente perdida. Essa perda geralmente é irreversível e proporciona às plântulas a condição de organismos altamente vulneráveis às flutuações hídricas do ambiente.

Diante disso, diversas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de identificar os mecanismos promotores da TD e elucidar a forma como eles operam. A partir dos estudos realizados por Bruggink e van der Toorn (1995), verificou-se a possibilidade de estudar a reindução da TD em plântulas procedentes de sementes ortodoxas. Estes autores demonstraram a possibilidade de reinduzir a TD em plântulas com diferentes comprimentos radiculares por meio de tratamentos osmóticos sob baixa temperatura. Diversos autores também constataram a possibilidade de reindução da TD em plântulas de diversas espécies, utilizando protocolos similares (Leprince et al., 2000; Buitink et al., 2003; Faria et al., 2005; Viera, 2008).

Buitink et al. (2003) e Berjak & Pammenter (2008) afirmam que a reaquisição da TD ocorre devido à operação de uma série de mecanismos fisiológicos e estruturais regulados geneticamente. Diante disso, a avaliação da profundidade da TD entre populações de diferentes habitats revela mudanças de caracteres de base genética e, assim, permite a avaliação da adaptabilidade do vegetal ao ambiente no qual está inserido.

Segundo Faria et al. (2005), a capacidade de reativação dos mecanismos promotores da TD pode ser avaliada pela sobrevivência e retomada do crescimento da raiz primária após a dessecação, e a profundidade da TD é possível de ser analisada pela capacidade de reindução de diferentes comprimentos radiculares.

A possibilidade de reinduzir a TD em plântulas de *T. impetiginosa*, relatada por Vieira (2008), torna essa espécie um interessante modelo para estudos que visam a avaliar as variações da profundidade da TD entre populações, uma vez que a *T. impetiginosa* é amplamente distribuída por quase todo o território brasileiro e encontrada tanto em ambientes úmidos, como a Floresta Amazônica e Mata Atlântica, quanto em ambientes mais secos, como Cerrado e Caatinga (Lorenzi, 2002; Schulze et al., 2008).

Neste contexto, o presente estudo objetivou analisar a capacidade de reindução da TD em plântulas procedentes de sementes coletadas em populações de árvores em Lavras-MG, Rondonópolis-MT, Assú-RN e Penápolis-SP e correlacioná-la com a pluviosidade do habitat de cada população.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo da reindução da TD, procedeu-se o teste de germinação dos embriões que se seguiu da seguinte forma: as sementes provenientes de cada localidade (Lavras-MG, Rondonópolis-MT, Assú-RN e Penápolis-SP) tiveram o tegumento removido manualmente e foram imediatamente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos. Em seguida, os embriões foram pré-germinados em ambiente com umidade relativa a 100% a 30 °C, por 24 horas. A seguir, os embriões foram dispostos em placas de Petri de 8,5 cm com dupla camada de papel de filtro, umedecidos com 4 mL de água destilada por placa.

As plântulas foram coletadas com 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 mm de raiz primária, medidas com paquímetro. Após a coleta, As plântulas foram divididas em dois lotes, os quais foram submetidos a diferentes tratamentos de secagem. Um lote de plântulas foi submetido à secagem em placas de petri abertas, sobre sílica gel, com controle de umidade relativa (UR) de 20%, em caixas plásticas. A secagem foi realizada por aproximadamente 48 horas até a redução na umidade nas plântulas atingir 0,07 g de H₂O/g de MS, aproximadamente, 6,5%. Esse processo de secagem foi realizado em uma sala com temperatura controlada a 20 °C.

O outro lote de plântulas foi incubado em solução de polietilenoglicol 6000, a -1,7 MPa, em placas de Petri com dupla camada de papel filtro. A incubação foi a 5 °C por um período de 72 horas, em geladeira. Em seguida, efetuou-se a secagem em placas de Petri abertas,

sobre sílica gel a 20% UR por 48 horas, conforme anteriormente descrito por Buitink et al. (2003), Faria et al. (2005) e Viera (2008).

Após a secagem, as plântulas foram novamente pré-embebidas por 24 horas e submetidas ao teste de germinação conforme anteriormente descrito. A reindução da TD foi avaliada com a retomada do crescimento da raiz primária, verificada após 7 dias do início da embebição. Nesses experimentos foram utilizadas 4 repetições com 20 plântulas cada.

4.1 Análise estatística

Os dados de sobrevivência da raiz primária foram submetidos à análise de variância (ANAVA), seguido de teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5% (Sokal & Rohlf, 1981). Os dados da tolerância à dessecação das diferentes populações também foram correlacionados com a pluviosidade anual, da época de desenvolvimento e de dispersão das sementes, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson (Bussab & Morettin, 1986).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo da reindução da TD revelou que plântulas *T. impetiginosa* procedentes de diferentes regiões brasileiras apresentam diferentes níveis de TD (Figura 1). As plântulas da população de Rondonópolis-MT e Assú-RN apresentaram capacidade para reindução da TD, após secagem direta em sílica gel, até o comprimento de 3,5 mm; enquanto que as plântulas procedentes das sementes de Lavras-MG e Penápolis-SP, até 2,5 e 2,0 mm, respectivamente (Figura 1). Foi possível verificar também que a porcentagem de sobrevivência da raiz primária das plântulas de Assú-RN foi superior às das demais populações, para todos os comprimentos radiculares analisados. As plântulas da população de Penápolis-SP foram as menos tolerantes à dessecação.

Essas variações da capacidade de reindução se relacionam com a plasticidade adaptativa do vegetal e está, de acordo com Futuyma (2004), geralmente correlacionada às pressões seletivas diferenciais presentes nos habitats. Dentre os fatores ambientais mais destoantes entre as regiões que podem influenciar profundamente a tolerância à dessecação, destaca-se a disponibilidade hídrica (Tabela 1).

A análise dos coeficientes de correlação de Pearson permitiu avaliar a força de associação linear e o sentido da relação entre a pluviosidade e a TD das diferentes populações. A correlação entre a pluviosidade anual e a TD foi alta e negativa (-0,91797); a correlação entre a pluviosidade durante a época de formação das sementes e a TD foi moderada e também negativa (-0,66147); e a correlação entre pluviosidade da época de dispersão das sementes e a TD, foi baixa e positiva (0,1741).

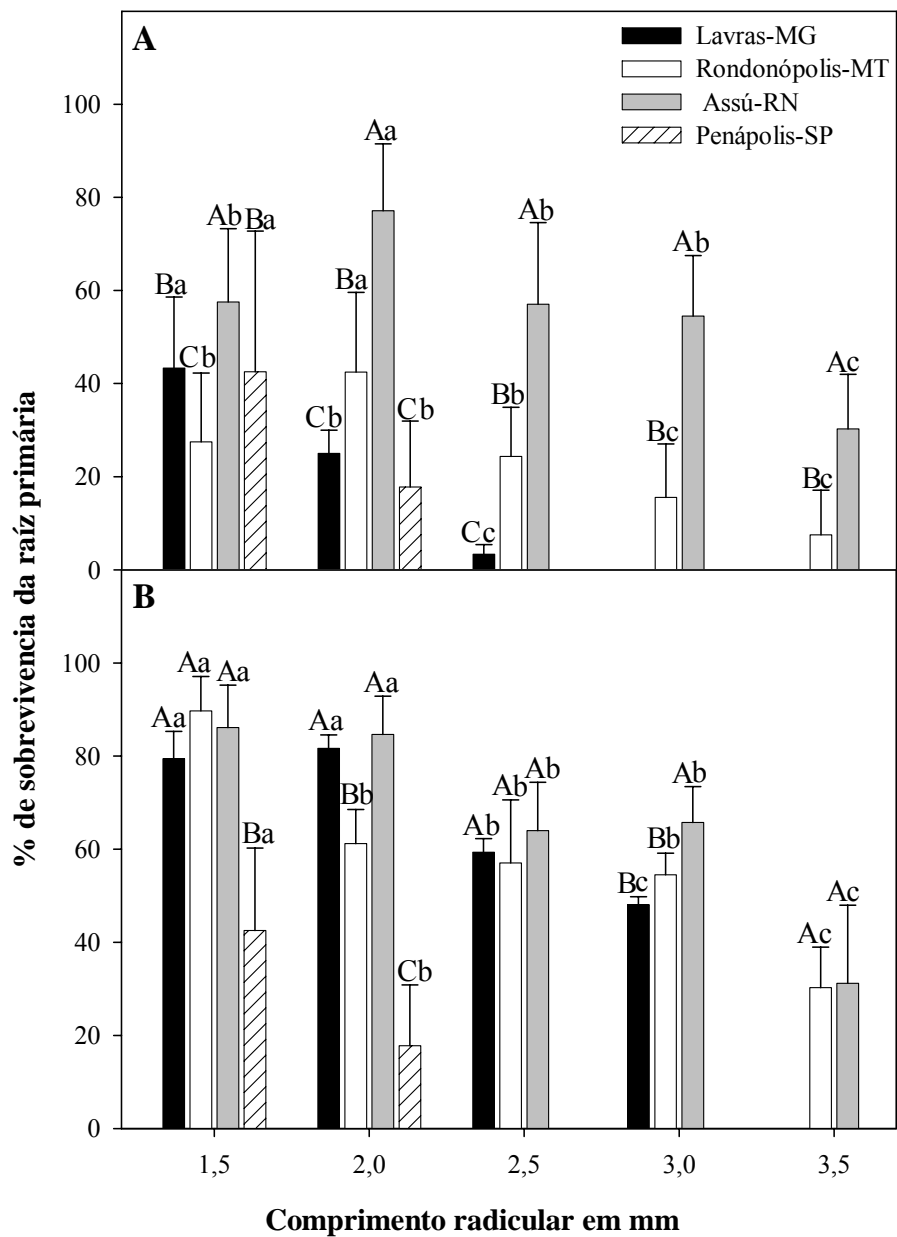


FIGURA 1 Reindução da TD em plântulas de *Tabebuia impetiginosa* com diferentes comprimentos radiculares, procedentes de diferentes populações. A: plântulas não incubadas em solução de PEG; B: plântulas incubadas em solução de PEG. As letras maiúsculas comparam as médias dos tratamentos dentro de cada comprimento radicular. As letras minúsculas comparam as médias de cada tratamento nos diferentes comprimentos radiculares.

TABELA 1 Dados pluviométricos (mm) dos locais de coleta de sementes referentes ao ano de 2007.

Precipitação	Lavras	Rondonópolis	Assú	Penápolis
Anual	1248,0	1249,8	750,8	1219,4
Na época de desenvolvimento das sementes	17,6	43,5	6,8	107,0
Na época de dispersão das sementes	130,1	158,0	0,0	49,4

*Fontes: Estação Climatológica da UFLA, INMET, SLAB-DAEP, Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte S/A (EMPARN).

A associação mais significativa e negativa entre a pluviosidade anual e a TD indica que, em *T. impetiginosa*, a TD está mais fortemente relacionada a uma adaptação às características inerentes do habitat do que às flutuações hídricas pontuais que ocorrem ao longo do ano, de forma que, quanto maior for a disponibilidade hídrica de uma região onde *T. impetiginosa* estiver inserida, menor será a capacidade de tolerância à dessecação de suas plântulas.

Dussert et al. (2000), ao constatar significantes variações intraespecíficas quanto à sensibilidade à dessecação em espécimes nativas de *Coffea* e correlacioná-las aos fatores ambientais, verificaram uma correlação positiva entre tempo de seca após a época de dispersão das sementes e a sensibilidade à dessecação. Estes resultados mostram que as espécies podem apresentar amplas variações comportamentais quanto à relação entre TD e disponibilidade hídrica ambiental.

A incubação das plântulas em PEG antes da secagem minimizou as diferenças na reindução à TD entre as populações, principalmente nos comprimentos radiculares de 1,5 e 2,5mm. As diferenças mais marcantes do efeito do estresse osmótico foram observadas nas plântulas procedentes da população de Lavras-MG, em que a capacidade de tolerar a dessecação foi estendida de 2,5mm para 3,0mm. O tratamento com PEG proporcionou um

significativo acréscimo na porcentagem de plântulas reinduzidas em todas as populações, exceto nas plântulas de Assú-RN.

Plântulas de *T. impetiginosa*, procedentes de Lavras-MG, também apresentaram significativa melhoria na porcentagem de reindução quando as plântulas foram incubadas em PEG, em trabalho de Vieira (2008), o qual detectou alterações na expressão do gene responsável pela tradução da expansina, indicando que as mudanças nas respostas fisiológicas resultantes do estresse osmótico são também decorrências de alterações na expressão gênica.

Assim, o acréscimo da porcentagem de plântulas reinduzidas e a redução das diferenças de TD entre as populações refletem que a dessecação lenta proporcionada pela incubação em PEG estimula a reativação de genes e mecanismos que, devido às pressões seletivas ambientais, se tornaram pouco responsivos à dessecação.

A correlação entre a pluviosidade anual das regiões onde as populações estão inseridas e a capacidade de reindução da TD das plântulas, mesmo após incubação em PEG, foi moderada, -0,42708. Esta alteração de -0,91797 para -0,42708 reforça a argumentação de que a incubação em PEG minimizou as diferenças entre as populações, provavelmente por reativar genes que se encontravam poucos responsivos à dessecação. No entanto, a existência de correlação moderada ainda aponta para a marcante relevância da pluviosidade ambiental anual no estabelecimento das diferenças nas características que conferem a TD entre as populações.

6 CONCLUSÕES

A pluviosidade anual correlaciona negativamente com a TD das plântulas de *T. impetiginosa*. As plântulas oriundas da população de Rondonópolis-MT e Assú-RN são mais TD que as plântulas das populações de Lavras-MG e Penápolis-SP. A incubação das plântulas em solução de PEG melhorou a capacidade de reindução à dessecação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, London, v. 101, n. 2, p. 213-228, Feb. 2008.

BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Ed.). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. New York: CAB International, 2002. 382 p.

BRUGGINK, T.; TOORN, P. van der. Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 5, n. 1, p. 1-4, Jan. 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**, Wallingford, v. 13, n. 4, p. 273-286, Apr. 2003.

BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. **Estatística básica**. São Paulo: Atual, 1986. 136 p.

DUSSERT, S.; CHABRILLANGE, N.; ENGELMANN, F.; ANTHONY, F.; LOUARN, J.; HAMON, S. Relationship between seed desiccation sensitivity, seed water content at maturity and climatic characteristics of native environments of nine *Coffea* L. species. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 10, n. 3, p. 293-300, Mar. 2000.

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.

FUTUYMA, D. J. **Evolutionary biology**. 3. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. 763 p.

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

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Contrasting seed storage behavior among different species of Meliaceae. **Seed Science Technology**, Zurich, v. 26, n. 1, p. 77-95, Jan. 1998.

KERMODE, A. R. Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: interactions between the embryo and the seed environment. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: M.Dekker, 1995. p. 273-332.

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**, Washington, v. 122, n. 2, p. 597-608, Feb. 2000.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v. 2, 384 p.

MURDOCH, A. J.; ELLIS, R. H. Dormancy, viability and longevity. In: FENNER, M. (Ed.). **Seeds: the ecology of regeneration in plant communities**. 2. ed. Wallingford: CABI, 2000. p. 183-214.

OLIVER, M. J.; VELTEN, J.; MISHLER, B. D. Desiccation tolerance in Bryophytes: a reflection of the primitive strategy for plant survival in dehydrating habitats? **Integrative and Comparative Biology**, New York, v. 45, n. 5, p. 788-799, May 2005.

PRITCHARD, H. W.; DAWS, M. I.; FLETCHER, B. J.; GAMÉNÉ, C. S.; MSANGA, H. P.; OMONDI, W. Ecological correlates of seed desiccation tolerance in tropical african dryland trees. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 91, n. 6, p. 863-870, June 2004.

PRITCHARD, H. W.; TOMPSETT, P. B.; MANGER, K.; SMIDT, W. J. The effect of moisture content on the low temperature responses of *Araucaria huntsteinii* seed and embryos. **Annals of Botany**, London, v. 76, n. 1, p. 79-88, July 1995.

SCHULZE, M.; GROGAN, J.; UHL, C.; LENTINIA, M.; VIDAL, E. Evaluating ipê (*Tabebuia*, Bignoniaceae) logging in Amazonia: sustainable management or catalyst for forest degradation? **Biological Conservation**, Essex, v. 141, n. 8, p. 2071-2085, Aug. 2008.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**. 2. ed. San Francisco: W.H. Freeman, 1981. 219 p.

TWEDDLE, J. C.; DICKIE, J. B.; BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 91, n. 2, p. 294-304, Apr. 2003.

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

VIEIRA, C. V. **Germinação e re-indução de tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Tabebuia impetiginosa* e *Alliaria petiolata***. 2008. 98 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

WALTERS, C.; WHEELER, L.; GROTEHUIS, J. M. Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 15, n. 1, p. 1-20, Mar. 2005.

CAPÍTULO 4

Estudo do controle da reindução da tolerância à dessecação em plântulas de *T. impetiginosa*, utilizando tratamento osmótico combinado com ácido abscísico e fluridona

1 RESUMO

Este estudo avaliou a capacidade de reindução da TD em plântulas de *T. impetiginosa* pela sobrevivência da raiz primária após secagem a $0,07 \text{ g H}_2\text{O} \cdot \text{g}^{-1} \text{MS}$. O efeito da incubação prévia em PEG e a influência de ABA na reindução da TD também foram avaliados. A atividade do ciclo celular foi mensurada por citometria de fluxo e análises citogenéticas. As modificações ultraestruturais foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Com o crescimento radicular houve aumento do conteúdo de água na região meristemática, aumento do número de células em divisão e decréscimo da capacidade das radículas em reinduzir a TD. A incubação em PEG estimulou a síntese *de novo* de ABA, paralisou o ciclo celular em G1 e proporcionou aumento da porcentagem de sobrevivência radicular e detectou-se reindução de plântulas com radícula de 3,0 mm. A incubação em PEG aumentou o IM nas células do cilindro central, e o interrompeu em prófase. Nas raízes com 3,0 mm, foram verificadas anomalias no alinhamento dos cromossomos em metáfase. A secagem direta em sílica causou acentuada retração do volume celular, aparecimento de espaços aéreos intracelulares e o colapso das células ao centro da radícula. A incubação em PEG proporcionou a manutenção da integridade da parede e do volume celular, embora tenha ocorrido considerável retração citoplasmática e manutenção da integridade nuclear.

2 ABSTRACT

This study evaluated the capacity of re-inducing TD in seedlings of *T. impetiginosa* by the survival of the primary root after drying up to 0.07g H₂O.g⁻¹DM. The effect of the previous incubation in PEG and the influence of ABA on the re-induction of TD were also evaluated. The activity of the cell cycle was measured by flow cytometry and cytogenetic analyses. The ultrastructural modifications were analyzed by scanning and transmission electron microscopy. In relation to root growth, increased water content in the meristematic region, increase of the number of dividing cells and decrease of the capacity of the radicles to re-induce TD were evaluated. The incubation in PEG stimulated the *de novo* ABA synthesis, paralyzed the cell cycle at G1 and provided increase of the percentage of root survival and the re-induction of seedlings with radicle of 3.0mm was detected. The incubation in PEG increased IM in the cells of the central cylinder and interrupted it at prophase. In the radicles of 3.0 mm, anomalies in the chromosome aligning at metaphase were found. The direct drying on silica caused a marked shrinkage in the cell volume, appearance of intracellular air spaces and the collapse of the cells at the center of the radicle. The incubation in PEG provided the maintenance of the integrity of the cell wall and volume, although considerable cytoplasmatic shrinkage and the maintenance of the integrity of nucleus has occurred.

3 INTRODUÇÃO

As plantas exibem várias estratégias para sobreviver às condições adversas do meio ambiente, especialmente sob escassez severa de recurso hídrico. Em ambientes secos, os vegetais sobrevivem resistindo, evitando ou tolerando a dessecação (Levit, 1980). A maioria das plantas terrestres é capaz de produzir estruturas tolerantes à dessecação como esporos, pólenes e sementes.

Nas sementes ortodoxas, a tolerância à dessecação (TD) é adquirida durante a maturação como parte normal do desenvolvimento e tem sido entendida como a habilidade da semente germinar após secagem, em que o conteúdo de água do protoplasma seja igual ou inferior a 0,1g por g de massa seca (g.g^{-1}) (Vertucci & Farrant, 1995; Walters et al., 2005; Berjak, 2006).

Muitos estudos que buscam identificar e elucidar os mecanismos que proporcionam a TD têm-se utilizado da possibilidade de reinduzir a TD em plântulas procedentes de sementes ortodoxas (Bruggink & Toorn, 1995; Buitink et al., 2003; Faria et al., 2005). Tendo em vista que as plântulas são sensíveis à dessecação, sugere-se que, durante todo o curso da re-aquisição da TD, sobretudo durante a incubação em PEG, pode-se obter informações sobre quais são os mecanismos responsáveis pela TD e como eles interagem no controle desse processo (Sun, 1999).

Sabe-se que os mecanismos envolvidos na aquisição e manutenção da TD estão sob um complexo controle genético, o qual ainda não é pouco conhecido. Buitink et al. (2006) constataram que em *Medicago truncatula* mais de 1300 genes foram diferentemente expressos durante a incubação das sementes germinadas, plântulas, em PEG, sendo muitos relacionados ao metabolismo do carbono e ao ciclo celular. Para Berjak & Pammenter (2008), o primeiro conjunto de mecanismos que proporcionam a aquisição de TD está relacionado à preservação da integridade do DNA e, o segundo, à coordenada regulação dos eventos do ciclo celular durante a desidratação.

Várias pesquisas têm mostrado que o estresse causado pelo déficit hídrico e diminuição do volume celular durante a dessecação induzem o acúmulo de ácido abscísico (ABA), devido à síntese *de novo* (Taylor et al., 2000; Jia et al., 2001). Este fitormônio é um bloqueador da replicação do DNA e, por isso, age paralisando o ciclo celular, com consequente acúmulo de células na fase G₁, as quais são mais resistentes a estresses e, portanto, se mantêm viáveis por mais tempo que as células em fase S ou M/G₂. (Deltour, 1985; Bino et al., 1993; Dewitte & Murray, 2003; Silva et al., 2008)

A biossíntese de ABA durante a desidratação tem sido correlacionada também com o relaxamento da membrana celular. A maior flexibilidade da membrana durante a dessecação aumenta a possibilidade da redução do volume citoplasmático sem danos ultra-estruturais (Creelman & Mullet, 1991).

A manutenção da integridade das membranas e paredes celulares durante a dessecação é essencial para garantir a subsequente e ordenada reestruturação celular durante a embebição e retomada do crescimento e desenvolvimento vegetal (Vertucci & Farrant, 1995; Sun, 2002; Corbineau et al., 2004).

Diante disso, os objetivos deste estudo foram avaliar a capacidade de reindução da tolerância à dessecação em plântulas de *T. impetiginosa* correlacionando-a com o teor de água e a progressão do ciclo celular na região meristemática, avaliar a importância do ABA no processo de reindução da dessecação através da adição exógena de ABA e fluridona, bem como analisar as alterações ultraestruturais durante o processo de reindução.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Avaliação da influência de ABA e de fluridona no restabelecimento da tolerância à dessecação nas radículas de *T. impetiginosa*

Para estudar a influência do ABA no controle da reindução da TD, as sementes coletadas em Lavras-MG foram germinadas e as plântulas com radículas de 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mm de comprimento foram incubadas nos seguintes tratamentos: solução de PEG 6000 a 1,7 MPa, PEG + ABA (0,1 mM), PEG + fluridona (0,1 mM) e PEG + ABA + fluridona, ambos a 0,1 mM, a 5°C por 72 horas. Após a incubação, as plântulas foram lavadas em água corrente por 20 segundos e o excesso de água superficial foi retirado com toalha de papel. Em seguida, as plântulas foram dispostas em placas de Petri abertas, colocadas sobre sílica gel em caixas plásticas, com controle de umidade relativa de 20%, em sala com temperatura constante de 20 °C, por aproximadamente 48h até atingirem 0,07 gH₂O/gMS, aproximadamente 6,5% umidade. Após a secagem, as sementes germinadas foram submetidas à pré-germinação em ambiente com umidade saturada (100%) por 24 horas e submetidas à germinação em placas de Petri de 8,5 cm com dupla camada de papel germitest, umedecidas com 4 mL de água destilada, e incubadas a 30 °C sob luz constante. Nesse experimento, foram usadas 4 repetições com 20 plântulas cada.

A reindução da TD foi avaliada a partir da retomada do crescimento da raiz primária verificada após 7 dias do início da germinação.

Os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando o programa SISVAR 4.3 (Ferreira, 1999).

4.2 Análise de eventos do ciclo celular no ápice das radículas de *T. impetiginosa* através de citometria de fluxo durante o processo de reindução da tolerância à dessecação

Para determinação da quantidade de DNA e análise de ciclo celular nos meristemas, uma secção a 1 mm do ápice da radícula foi macerada com auxílio de uma lâmina cortante em uma placa de Petri, contendo 1 mL do tampão LB01 gelado, para liberação dos núcleos em suspensão (Dolezel et al., 1989). A solução tampão foi aspirada através de duas camadas de gaze com auxílio de uma pipeta plástica e posteriormente filtrada em uma malha de 50 μm , sendo coletada em tubo de poliestireno. Os núcleos foram corados com a adição de 25 μL de solução de iodeto de propídeo a 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ à suspensão. A cada amostra foram adicionados 5 μL de RNase.

As amostras foram armazenadas no escuro e analisadas até 1 hora após o preparo. Para cada amostra, pelo menos 10 mil núcleos foram analisados usando uma escala logarítmica para os histogramas obtidos. A análise foi realizada com o citômetro FacsCalibur (Becton Dickinson) e os histogramas obtidos pelo software Cell Quest.

A análise estatística foi realizada por meio do software WinMDI 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>). O ciclo celular foi avaliado por meio das frequências de núcleos nas fases do ciclo celular G1, S e G2/M dos histogramas obtidos por citometria de fluxo.

4.3 Análise de eventos da mitose nas células meristemáticas do cilindro central das radículas durante o processo de reindução da tolerância à dessecação

Para determinação do índice mitótico, foi empregada a metodologia descrita por Oliveira et al. (1996). Foram coletados de cada plântula 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mm de raiz primária e realizados cortes a 1 mm a partir da extremidade distal. As amostras foram imersas em fixador de Farmer (Jensen, 1962), por 2 horas a 25 °C e, em seguida, transferidas para uma solução de álcool 70% e armazenados a 8 °C. As amostras foram

hidrolisadas em HCl 5 N durante dez minutos a 30 °C e lavadas em água destilada a 5 °C. As pontas das radículas foram dissecadas para o isolamento de 0,5 mm de cilindro central, a partir da extremidade distal e, em seguida, foram corados com orceína acética a 5%. As amostras foram observadas em microscópio ótico comum, com aumento de 1000X, contando-se o número de células em cada fase da mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase). Para cada tratamento, foram preparadas 10 lâminas, avaliando-se 10 campos/lâmina, perfazendo-se um total de 8000 células avaliadas. O índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células visualizadas em mitose pelo número total de células (intérfase + mitose) multiplicando-se por 100.

4.4 Análises ultraestruturais no ápice radicular durante a reindução da tolerância à dessecação

A avaliação ultraestrutural das células meristemáticas foi realizada através de microscópio eletrônico de varredura (LEO, modelo EVO 40). Para tanto, realizou-se criofratura das secções transversais de fragmentos retirados a 0,5 mm do ápice radicular. Os fragmentos foram fixados em solução Karnovsky, lavados em tampão cacodilato, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%, desidratados em gradiente progressivo de acetona e pelo ponto crítico e metalizados em evaporador de ouro.

Para a avaliação em microscópio eletrônico de transmissão, logo após a desidratação em gradiente progressivo de acetona, o material foi embocado em resina Spurr a 70 °C para a polimerização. Os blocos foram fracionados em secções semifinas (1µm) e ultrafinas (<100 nm), utilizando-se um ultramicrótomo Reichert-Jung. Os cortes semifinos foram corados com azul de toluidina e avaliados ao microscópio ótico. Os cortes ultrafinos foram secos em raques de alumínio cobertos com formvar (Rowley & Moran, 1975) e pós-contrastadas em acetato de uranila, seguido por acetato de chumbo e, em seguida, examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss, modelo EM 109, e obtidas as imagens.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após serem dessecadas a 0,07 gH₂O/gMS, as plântulas de *T. impetiginosa*, com até 2,5 mm, puderam ser reinduzidas à TD. As porcentagens de sobrevivência das radículas com 1,5; 2,0 e 2,5 mm foram 43,3; 25 e 3,3%, respectivamente (Figura 1). Estes resultados evidenciam que a capacidade de reindução da TD decresceu acentuadamente durante o crescimento radicular.

Com o crescimento radicular foi também possível verificar que o conteúdo de água nas células meristemáticas aumentou significativamente (Figura 1), concomitantemente a um acentuado acréscimo da porcentagem de núcleos em processo de transição da fase G₁ para S (Figura 2).

Segundo Faria et al. (2005), em *Medicago truncatula*, a razão para o decréscimo da capacidade de reindução da TD com o aumento radicular deve-se à reativação do ciclo celular. Gendreau et al. (2008) concluíram que a reativação do ciclo celular em embriões de cevada está relacionada com a expressão do gene CDKD1, associado à proporção de núcleos em fase de mudança de G₁ para S, e esse é fortemente regulado pela taxa de hidratação da semente.

Assim, o decréscimo da capacidade de reindução da TD verificado com aumento do comprimento radicular em plântulas de *T. impetiginosa* pode ser correlacionado também com o aumento da taxa de hidratação e a conseqüente reativação do ciclo celular, que ocorre devido ao crescimento e desenvolvimento radicular.

Quando as plântulas foram expostas ao estresse osmótico, foi observado um considerável aumento da capacidade de reindução da TD das radículas, sendo o comprimento radicular limite para a reindução da TD ampliado de 2,5 mm para 3,0 mm. As porcentagens de sobrevivência das radículas de 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mm após o estresse osmótico aumentaram para 79,4; 81,6; 59,3; e 40%, respectivamente (Figura 1).

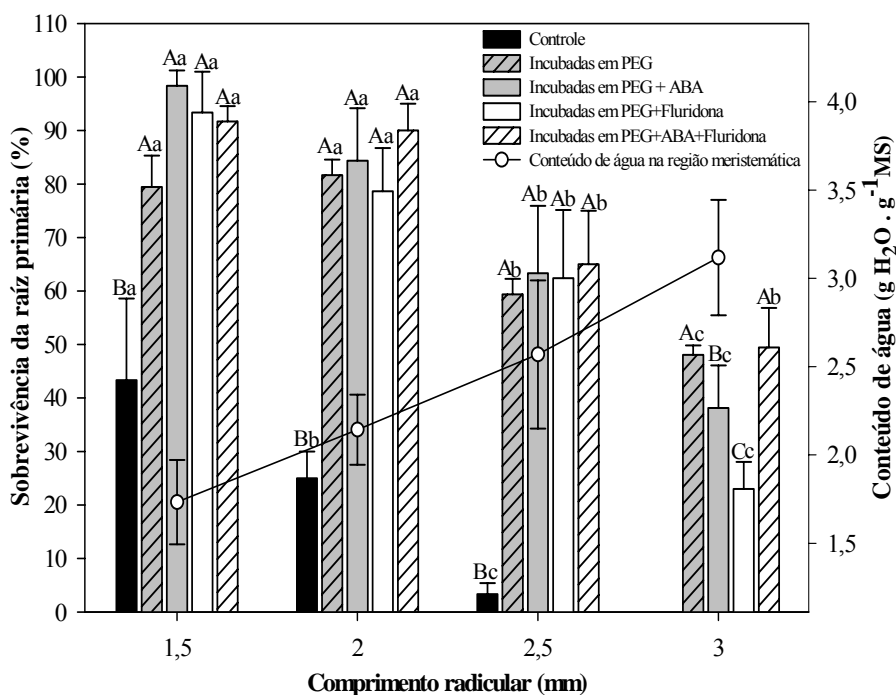


FIGURA 1 Sobrevivência da raiz primária de *T. impetiginosa* após secagem direta em sílica gel e após secagem precedida de incubação em PEG; PEG+ABA; PEG+Fluridona; PEG+ABA+Fluridona. A curva mostra o conteúdo de água na região meristemática da raiz primária. As letras maiúsculas comparam as médias dos tratamentos em cada comprimento radicular. As letras minúsculas comparam cada tratamento nos diferentes comprimentos radiculares. As mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Vieira (2008) também verificou que as radículas de plântulas de *T. impetiginosa*, quando incubadas em PEG, a 5 °C, tiveram maior capacidade de sobreviver após a secagem e atribuiu este fato à ativação de genes e mecanismos responsáveis pela TD, proporcionados pelo estresse osmótico.

Em *Medicago truncatula*, Buitink et al. (2006) constataram que a incubação em PEG (-1,7 MPa) a 10 °C por 72 h proporcionou a expressão diferencial em 1300 genes. Dentre os genes que tiveram sua expressão aumentada, estão os codificadores de LEAs proteínas e os responsáveis pela mobilização de amido, lipídeos e oligossacarídeos. Esta observação

coincidiu com a constatação do acúmulo de sacarose, agente importante no ajuste osmótico e formação do estado vítreo durante a dessecação (Berjak, 2006; Berjak et al., 2007). Dentre os genes que tiveram decréscimos na expressão estão os responsáveis pela progressão do ciclo celular. Faria et al. (2005) constataram que o estresse osmótico provocou em *Medicago truncatula* um retardo na progressão do ciclo celular, acumulando células em G1.

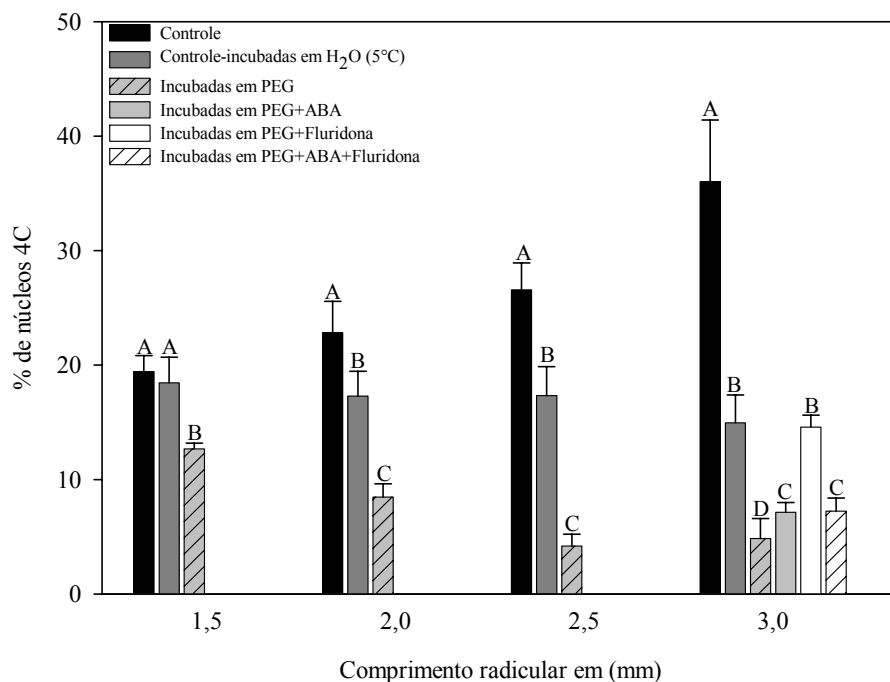


FIGURA 2 Efeito da incubação de plântulas de *T. impetiginosa* em diferentes condições de estresse sobre a porcentagem de núcleos 4C da região apical das radículas. As letras comparam os tratamentos em cada comprimento radicular. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scoot-Knott a 5% de probabilidade.

A partir da Figura 2, verifica-se que o protocolo para a reindução da TD proporciona efeitos aditivos da temperatura e estresse osmótico sobre as respostas fisiológicas. Na medida em que ocorre o crescimento radicular, o

efeito da temperatura baixa sobre a interrupção do ciclo celular torna-se mais expressivo e o estresse osmótico acentua esta interrupção na fase G1.

O acúmulo de células em G1 pode ser entendido como um mecanismo de aquisição de TD, pois, segundo Deltour (1985) e Sliwiska (2003), há evidências de que as células na fase S e na fase G2 são mais sensíveis aos fatores estressantes e podem apresentar alterações na morfologia dos cromossomos e no padrão de divisão celular.

Assim, pode-se inferir que em *T. impetiginosa* a interrupção do ciclo celular proporcionada pelo estresse osmótico e térmico é um mecanismo necessário à aquisição de TD e pode estar fortemente relacionado com a alteração da expressão de genes responsivos pela regulação desse processo.

A adição exógena de ABA e de fluridona durante a incubação em PEG não alterou a capacidade de reindução da TD nos comprimentos de 1,5; 2,0 e 2,5 mm. No entanto, nas plântulas com radículas de 3,0mm, a adição exógena de ABA e de fluridona alterou a capacidade de reindução da TD e do conteúdo de células em divisão (Figura 1 e 2).

Nas plântulas com radículas de 3,0 mm, a porcentagem de sobrevivência quando incubadas em PEG e em PEG+ABA foram 48,08% e 38,13%, respectivamente, ou seja, pode-se considerar que houve prejuízos quanto à capacidade de reindução da TD.

Vieira (2008) constatou que a incubação de plântulas de *T. impetiginosa*, com radículas de 3,0 mm, somente em PEG não proporcionou a reaqusição da TD, entretanto, a incubação em PEG+ABA (0,1 mM) foi benéfica à sobrevivência das radículas, proporcionando a sobrevivência de aproximadamente 40% das mesmas, semelhante aos resultados descritos nesse experimento.

A adição do inibidor de síntese de ABA, fluridona, proporcionou uma redução drástica da porcentagem de reindução da TD nas plântulas de 3,0 mm, indicando que, além de ABA ser sintetizado durante a incubação em PEG, ele é importante para a aquisição da TD.

A participação de ABA no processo de reindução da TD está relacionada com a promoção da interrupção do ciclo celular, pois, na presença de fluridona, o conteúdo de células com DNA duplicado foi maior que aquele das plântulas incubadas somente em PEG (Figura 2). Portanto, em *T. impetiginosa*, o ABA é sintetizado como resultado do estresse osmótico e induz à interrupção do ciclo celular em G1, e a maior proporção de células nesta fase confere maior TD, como já verificado por Deltour (1985) e Bino et al. (1993).

A observação de que há reindução mesmo com a inibição da síntese *de novo* de ABA, durante o estresse osmótico e início da dessecação, permite deduzir que este fitormônio pode não ser imprescindível à re aquisição de TD nessa espécie. Em *Arabidopsis*, a partir de estudos com mutantes insensíveis e incapazes de sintetizar ABA, foi possível constatar a existência de duas rotas de regulação do programa de aquisição da TD, uma dependente e outra independente de ABA (Ooms et al., 1994). Provavelmente, essas duas rotas possam atuar em *T. impetiginosa*.

Outra possibilidade para explicação da capacidade em reinduzir a TD mesmo na ausência da biossíntese de ABA em *T. impetiginosa* é que, durante a germinação, ocorre a síntese de ABA como mecanismo de prevenção a estresses, e essa síntese é suficiente para proporcionar a TD na plântula.

A adição de PEG + ABA + fluridona proporcionou às plântulas com radículas de 3,0 mm a capacidade de reindução da TD semelhante às incubadas somente em PEG (Figura 1), ou seja, o efeito danoso da inibição da biossíntese de ABA na reindução da TD foi revertido pela adição exógena de ABA. Esse tratamento também promoveu a inibição da progressão do ciclo celular (Figura 2). Estes resultados também assinalam que o ABA, sintetizado durante o estresse osmótico, tem um importante papel para a re aquisição da TD, sobretudo por inibir o ciclo celular, retendo as células em G1.

A partir das análises citogenéticas em células do cilindro central presente na região meristemática das radículas de 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mm, incubadas e não incubadas em PEG, foi possível detectar que até nas radículas de 2,5 mm o índice mitótico (IM) se manteve estável, porém, nas radículas de 3,0 mm houve um aumento considerável das células em mitose (Figura 3).

A aceleração da multiplicação celular na região meristemática mostra que a retomada do crescimento ocorre nas plântulas de *T. impetiginosa* quando as radículas estão com 3,0 mm. A retomada do progresso do ciclo celular tem sido caracterizada como um marco para a impossibilidade de reindução da TD (Faria et al., 2005). Por isso, mesmo após a incubação em PEG, o comprimento de 3,0 mm é o limite para a reindução da TD nas plântulas de *T. impetiginosa*.

No cilindro central foi observado que o maior índice mitótico ocorreu nas plântulas com radículas de 3,0 mm que foram incubadas sob estresse osmótico. Este resultado destoou das análises citométricas, provavelmente porque, para a avaliação em citometria de fluxo, levou-se em conta todos os tecidos do ápice radicular. Portanto, pode-se inferir que o padrão de resposta ao estresse osmótico é variado nos diferentes tecidos que compõem a raiz.

Nas radículas de todos os comprimentos avaliados, a maioria das células meristemáticas se encontrava em interfase, e, dentre aquelas em mitose, a maioria se encontravam em prófase, especialmente as radículas de 3,0 mm. Isto evidencia a recente retomada do crescimento. Nas plântulas com radículas de 3,0mm incubadas em PEG, o conteúdo de células em prófase foi maior ainda, caracterizando que esse estresse osmótico pode ter proporcionado uma inibição da progressão mitótica nesta fase.

Em muitas células radiculares com 3,0 mm, cujas plântulas foram incubadas em PEG, foi observado que durante a metáfase não ocorreu uma disposição equatorial de todos os cromossomos (Figura 4A, B e C).

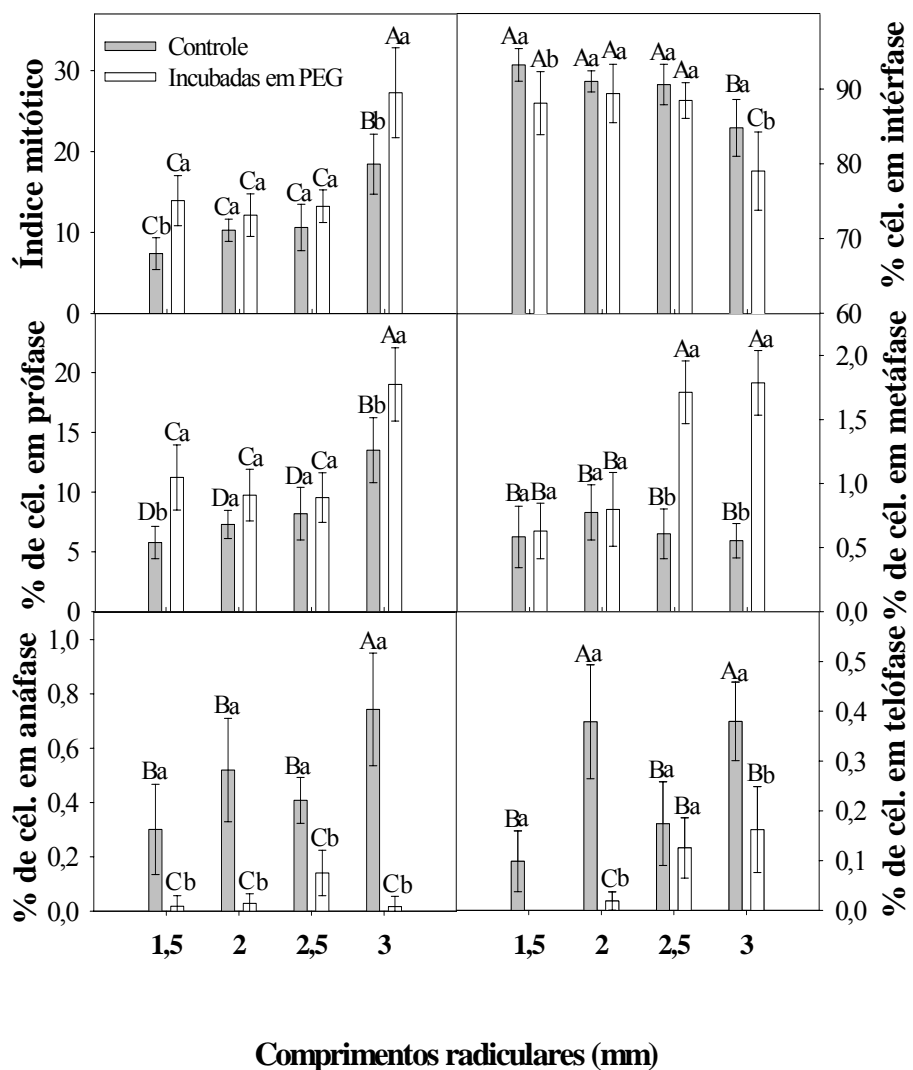


FIGURA 3 Porcentagem de núcleos meristemáticos da região apical de raiz de *T. impetiginosa* nas diferentes fases da mitose, antes e após a inubação em PEG (6000) a -1,7 MPa, por 72 h a 5 °C. As letras maiúsculas comparam os tratamentos nos diferentes comprimentos radiculares. As letras minúsculas comparam os tratamentos em cada comprimento radicular. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scoot-Knott a 5% de probabilidade.

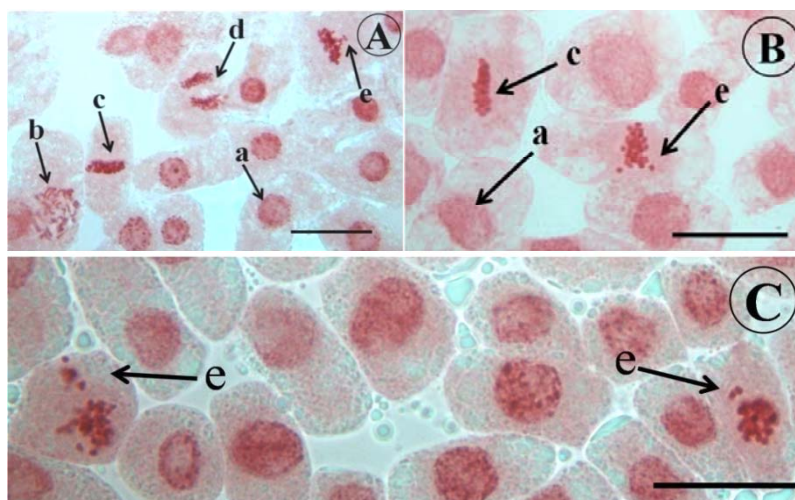


FIGURA 4 Fotomicrografia de anomalias cromossômicas durante a metáfase em células meristemáticas do ápice radicular de plântulas de *T. impetiginosa* com 3,0 mm. Legenda: a- núcleo em interfase; b- prófase; c- metáfase normal; d- anáfase; e- metáfase anômala, com cromossomos dispersos na célula. Barras= 40 μ m.

De acordo com Faria et al. (2005), em *Medicago truncatula* a causa da maior capacidade das plântulas incubadas em PEG em tolerar a dessecação deve-se à melhor reorganização dos microtúbulos durante a embebição subsequente à dessecação.

Isto sugere que, embora a causa do aumento da proporção de plântulas incubadas em PEG tolerantes à dessecação e o alargamento da faixa de tolerância à dessecação de 2,5 mm para 3,0 mm possa estar relacionada à ativação de mecanismos que promovem uma maior preservação da integridade dos microtúbulos durante a desidratação, a menor capacidade em reinduzir a TD, nas plântulas com 3,0 mm, pode estar relacionada à degradação dos microtúbulos que possivelmente seja a causa das anomalias observadas durante a fase de metáfase, sob leve estresse osmótico.

A análise ultraestrutural do ápice radicular realizada nas plântulas com radículas de 3,0 mm de comprimento revelou que a estrutura celular é

mais preservada quando ocorre a incubação em PEG previamente à dessecação (Figura 5,6 e 7).

Os cortes transversais, em secções semifinas (1 μm), mostram a disposição celular no meristema radicular antes da germinação (Figura 5A), as células completamente túrgidas após a germinação (Figura 5B) e a desorganização arquitetônica celular em função da dessecação rápida, com acentuada retração do volume celular, aparecimento de espaços aéreos intracelulares, maior separação das células presentes na parte periférica e o colapso das células ao centro da radícula (Figura 5C).

No ápice radicular das plântulas previamente incubadas em PEG, não foi verificado o colapso celular, após a secagem. O formato e a adesão das células foram mantidos, tanto na região central quanto na periférica do meristema, no entanto, foi detectada a presença de vários micro vacúolos (Figura 5E). Estes resultados mostram que a incubação em PEG proporcionou uma estabilidade estrutural nas células para suportar o estresse mecânico durante a dessecação.

Segundo Walters et al. (2002), o estresse mecânico é definido como a tensão que se desenvolve entre a parede e a membrana celular devido à perda da pressão de turgor, podendo ocasionar plasmólise. Os danos resultantes do estresse mecânico são dependentes da elasticidade da parede celular e do grau de rompimento da membrana celular.

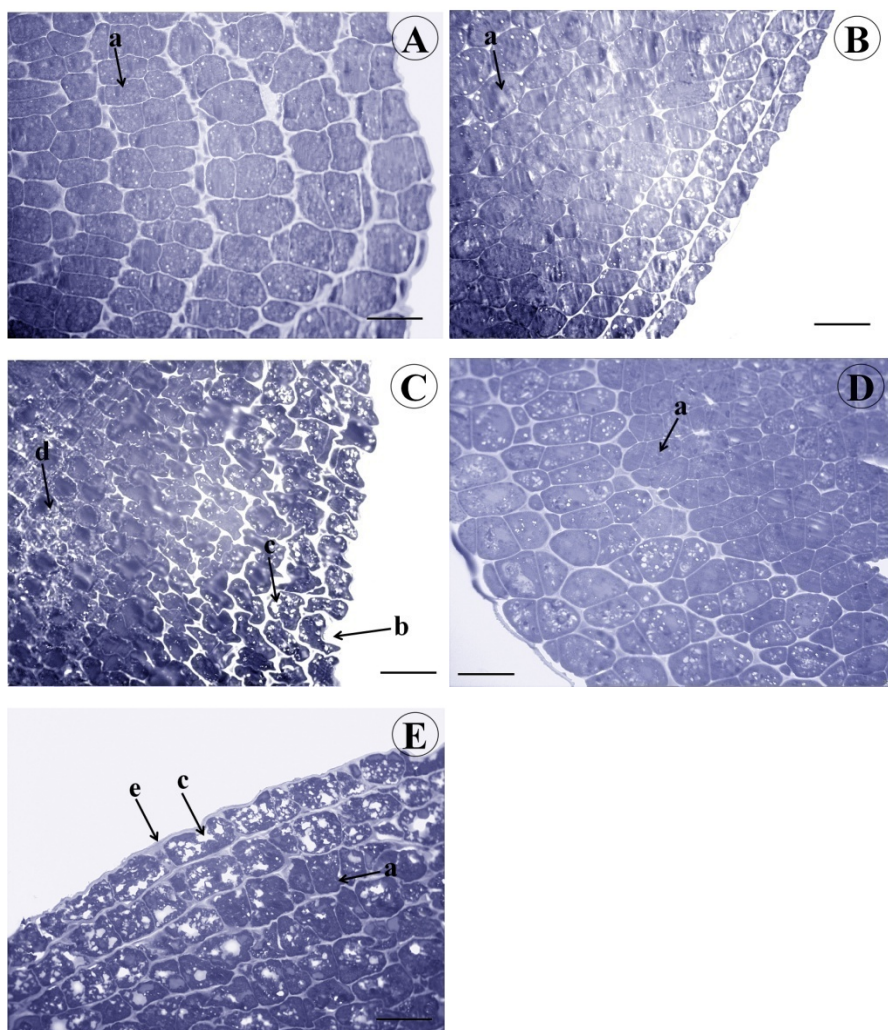


FIGURA 5 Fotomicrografias do ápice radicular de plântulas de *T. impetiginosa* de 3,0 mm. A- antes da germinação; B- após a germinação C-após secagem direta em sílica até $0,07 \text{ gH}_2\text{O} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$; D-após incubação em PEG; E- após secagem até $0,07 \text{ gH}_2\text{O} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$, precedida de incubação em PEG. Legenda: a- célula íntegra; b- retração celular; c- micro vacúolo; d- colapso celular; e- parede celular espessa. Barras= 40 μm .

As eletromicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, em superfície criofraturada da região central do meristema de radículas de 3,0 mm, permitiram verificar a adequada disposição das células antes da germinação e a superfície das paredes celulares (Figura 6A), o

conteúdo citoplasmático e em evidência os grânulos de amido, logo após a germinação (Figura 6B). Na figura 6C, há evidência do completo colapso celular após a secagem direta em sílica gel, sem prévia incubação em PEG.

Na figura 6D, observa-se que a incubação em PEG promove diminuta retração do volume celular e aumenta a sinuosidade da parede celular. No entanto, na figura 6E, verifica-se que o conteúdo citoplasmático desconecta quase completamente da parede celular, surgindo então amplo espaço entre a parede e o citosol.

De acordo com Vicre et al. (1999), a maior capacidade da parede celular em dobrar-se reduz a tensão sobre as estruturas envolvidas pela mesma e favorece a maior tolerância à dessecação. Porém, há células que mantêm o volume original durante a dessecação, tornando-se enredadas com vacúolos cheios de substâncias insolúveis (Farrant, 2000). Nas radículas de *T. impetiginosa*, as células que sobreviveram à dessecação mantêm o volume celular e ocorre uma considerável retração do conteúdo citoplasmático (Figura 5E).

Durante a incubação em PEG foi verificada que possivelmente ocorre a biossíntese de ABA e este fitormônio está relacionado com a ativação de vários mecanismos protetores contra a dessecação, dentre eles, o relaxamento membrana celular, que aumenta a possibilidade da redução do volume citoplasmático sem a ocorrência de danos ultra-estruturais (Creelman & Mullet, 1991). Sreedhar et al. (2002) constatou que os embriões somáticos de *Medicago sativa* somente se mostraram tolerantes à dessecação e mantiveram a membrana celular íntegra quando tratados com ABA.

Diante disso, pode-se inferir que a biossíntese de ABA durante a incubação em PEG é importante para o adequado ajuste estrutural da membrana celular, pois auxilia a preservação da integridade da parede bem como a manutenção da viabilidade celular após severa retração do volume citoplasmático.

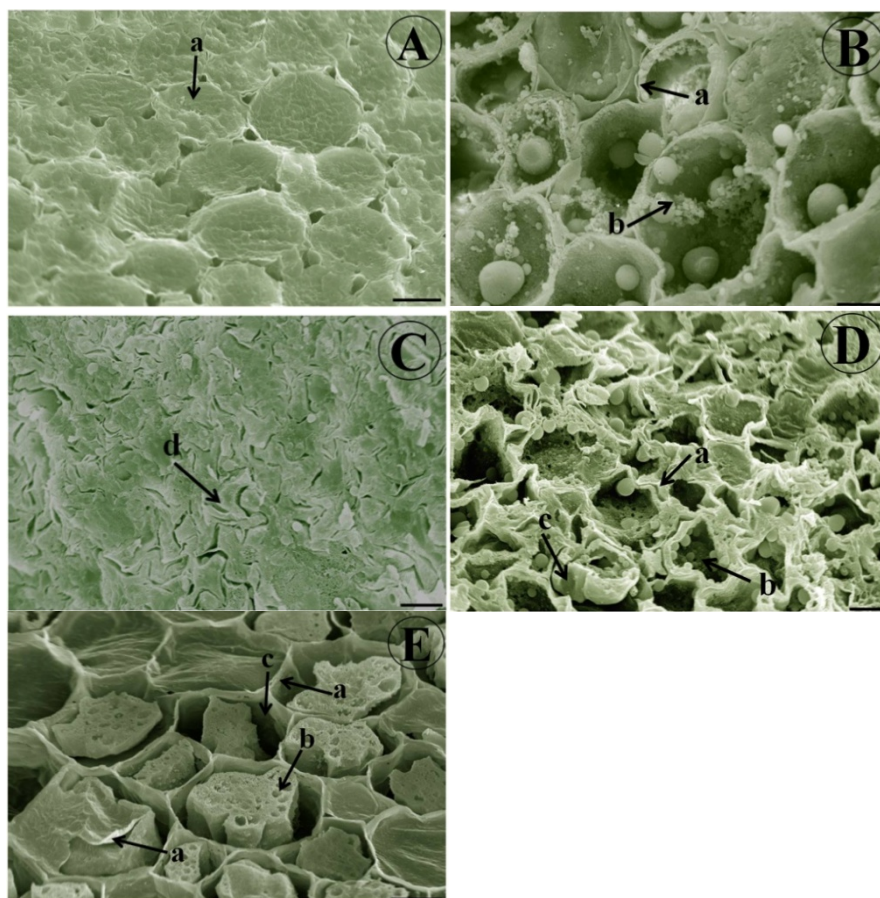


FIGURA 6 Eletromicrografias de varredura (MEV), do ápice radicular de plântulas de *T. impetiginosa* de 3,0 mm. A- antes da germinação; B- após a germinação C- após secagem direta em sílica até $0,07 \text{ gH}_2\text{O.g}^{-1}\text{MS}$; D- após incubação em PEG; E- após secagem até $0,07 \text{ gH}_2\text{O.g}^{-1}\text{MS}$, precedida de incubação em PEG. Legenda: a- parede celular; b- conteúdo citoplasmático com grãos de amido; c- micro vacúolos; d- colapso celular. Barras=10 μm .

As eletromicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão em cortes de secções ultrafinas (<100 nm), da região central do meristema de radículas de 3,0 mm permitiu observar que a semente é dispersa com as células radiculares apresentando as paredes celulares justapostas e com poucas sinuosidades (Figura 7A). Após a germinação, a

parede celular apresenta diversas sinuosidades, reentrâncias e saliências, indicando maior fluidez e contato entre as células (Figura 7B). Na dessecação foi observado que a parede celular torna-se descontínua e surge vários espaços aéreos intracelulares, denotando o início de colapso celular (Figura 7C).

Nas plântulas incubadas previamente em PEG foi observado um evidente espessamento da parede celular (Figura 7D). E, após a secagem, as paredes celulares apresentavam-se mais grossas e com sinuosidades, verificando-se também uma menor quantidade de microvacúolos.

Diversas pesquisas têm demonstrado a ocorrência da biossíntese e acúmulo de muitas substâncias que conferem proteção durante a desidratação (Bartels & Salamini, 2001; Hoekstra et al., 2001; Ingram & Bartels, 1996). Avelange-macherel et al. (2006) verificou que o conteúdo de sacarose aumentou mais de 5 vezes após as radículas de 4 mm terem sido incubadas em PEG. Portanto, pode-se inferir que, durante a incubação em PEG, há acúmulo de substâncias, sobretudo na parede celular alterando sua espessura, mas permitindo maior flexibilidade e resistência ao estresse mecânico da desidratação.

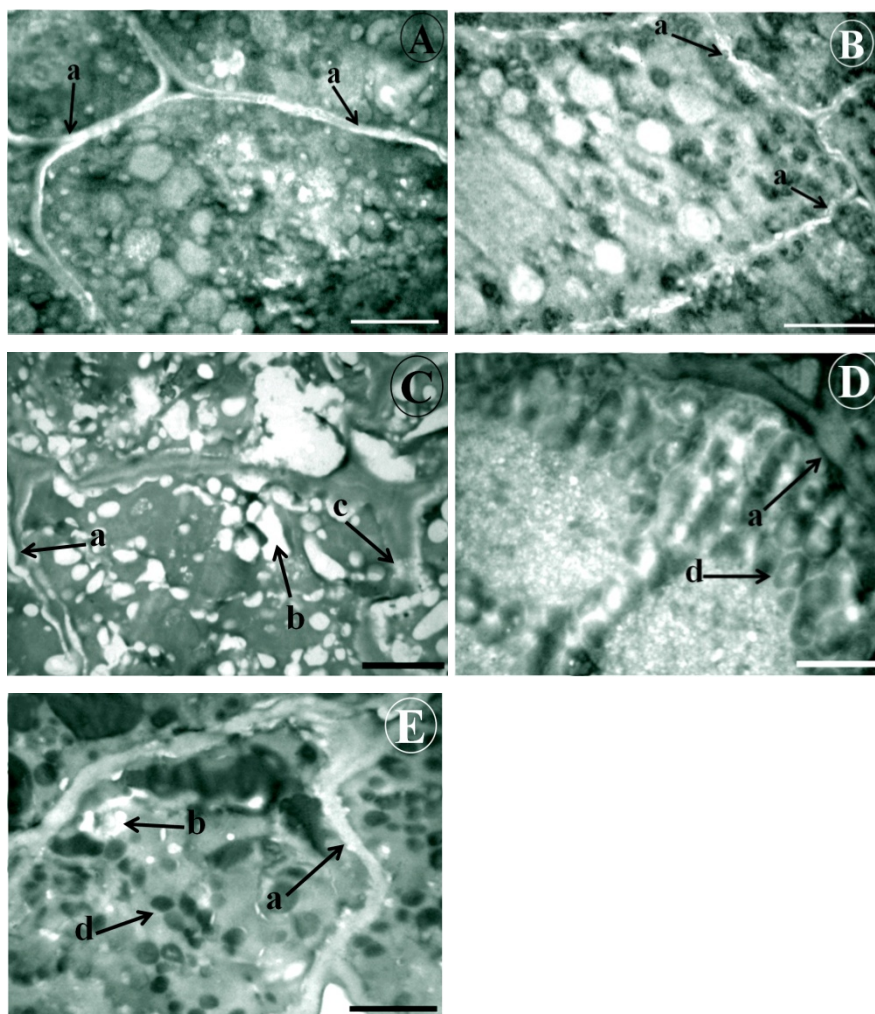


FIGURA 7 Eletromicrografias de transmissão (MET), do ápice radicular de plântulas de *T. impetiginosa* de 3,0 mm. A- antes da germinação; B- após a germinação C- após secagem direta em sílica até $0,07 \text{ gH}_2\text{O} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$; D- após incubação em PEG; E- após secagem até $0,07 \text{ gH}_2\text{O} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$, precedida de incubação em PEG. Legenda: a- parede celular; b- microvacúolos; c- descontinuidade da parede celular; d- grânulos de amido. Barras= $2 \mu\text{m}$.

6 CONCLUSÕES

Em plântulas de *T. impetiginosa*, o decréscimo da capacidade em reinduzir a TD em radícula de maior comprimento está correlacionado com o aumento acentuado do conteúdo de água na região meristemática e a conseqüente maior taxa de secagem durante a dessecação e pela reativação do ciclo celular, com acréscimo de núcleos 4C. O efeito benéfico do PEG está correlacionado com estímulo à síntese *de novo* de ABA e a interrupção do ciclo celular na fase G1. A incubação em PEG proporcionou a manutenção da integridade da parede celular e do núcleo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVELANGE-MACHEREL, M. H.; LY-VU, B.; DELAUNAY, J.; RICHOMME, P.; LEPRINCE, O. NMR metabolite profiling analysis reveals changes in phospholipid metabolism associated with the re-establishment of desiccation tolerance upon osmotic stress in germinated radicles of cucumber. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 471-482, Apr. 2006.

BARTELS, D.; SALAMINI, F. Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*: a contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. **Plant Physiology**, Washington, v. 127, n. 6, p. 1346-1353, Dec. 2001.

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

BERJAK, P.; FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W. Seed desiccation tolerance mechanisms. In: JENKS, M. (Ed.). **Plant desiccation tolerance**. Wallingford: CAB International, 2007. chap. 6, p. 121-139, 311 p.

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.

- BINO, R. J.; LANTERI, S.; VERHOEVEN, H. A.; KRAAK, H. L. Flow cytometric determination of nuclear replication stages in seed tissues. **Annals of Botany**, London, v. 72, n. 2, p. 181-187, Aug. 1993.
- BRUGGINK, T.; TOORN, P. Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 5, n. 1, p. 1-4, Jan. 1995.
- BUITINK, J.; LEGER, J. J.; GUISE, I.; VU, B. L.; WUILLÈME, S.; LAMIRAULT, G.; BARS, A. L.; MEUR, N. L.; BECKER, A.; KÜSTER, H.; LEPRINCE, O. Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. **The Plant Journal**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 735-750, Sept. 2006.
- BUITINK, J.; VU, B. L.; SATOUR, P.; LEPRINCE, O. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 13, n. 4, p. 273-286, Apr. 2003.
- CORBINEAU, F.; RUDNICKI, R. M.; CÔME, D. Induction of secondary dormancy in sunflower seeds by high temperature: possible involvement of ethylene biosynthesis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 73, n. 3, p. 489-496, Mar. 1988.
- CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Abscisic acid accumulates at positive turgor potential in excised soybean seedling growing zones. **Plant Physiology**, Washington, v. 95, n. 4, p. 1209-1213, Aug. 1991.
- DELTOUR, R. Nuclear activation during early germination of the higher plant embryo. **Journal of Cell Science**, London, v. 75, n. 1, p. 43-83, Apr. 1985.
- DEWITTE, W.; MURRAY, J. A. H. The plant cell cycle. **Annual Review of Plant Biology**, London, v. 54, p. 235-264, 2003.
- DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; LUCRETTI, S.; MEISTER, A.; LYSÁK, M. A.; NARDI, L.; OBERMAYER, R. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. **Annals of Botany**, London, v. 82, p. 17-26, 1998. Supplement.
- 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.

FARRANT, J. M. A comparison of patterns of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 151, n. 1, p. 29-39, Nov. 2000.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3 - Sistema de Análises Estatísticas**. Lavras: UFLA, 1999. Software.

GENDREAU, E.; ROMANIELLO, S.; BARAD, S.; LEYMARIE, J.; BENECH-ARNOLD, R.; CORBINEAU, F. Regulation of cell cycle activity in the embryo of barley seeds during germination as related to grain hydration. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 203-212, Feb. 2008.

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

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review Physiology**, Dordrecht, v. 47, p. 377-403, 1996.

JENSEN, W. A. Histochemical techniques. In: _____. **Botanical histochemistry**. San Francisco: Freeman, 1962. p. 206-256.

JIA, W.; LIANG, J.; ZHANG, J. Initiation and regulation of water deficit-induced abscisic acid accumulation in maize leaves and roots: cellular volume and water relations. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 355, p. 295-300, Feb. 2001.

LEVITT, J. **Responses of plants to environmental stresses**. 2. ed. New York: Academic, 1980. 256 p.

OLIVEIRA, V. R.; SCAPIM, C. A.; OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; PIRES, N. M. Efeito do herbicida trifluralin sobre a germinação de sementes e índice mitótico em raízes de milho (*Zea mays* L.). **Revista Unimar**, Marília, v. 18, n. 1, p. 537-544, 1996.

OOMS, J. J. J.; WILMER, J. A.; KARSSSEN, C. M. Carbohydrates are not the sole factor determining desiccation tolerance in seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 90, n. 3, p. 431-436, June 1994.

ROWLEY, C. R.; MORAN, D. T. A simple procedure for mounting wrinkle free section on formvar-coated slot grids. **Ultramicrotomy**, Amsterdam, v. 1, n. 2, p. 151-155, 1975.

- SILVA, E. A. A.; TOOROP, P. E.; LAMMEREN, A. A. M. V.; HILHORST, H. W. M. ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. **Annals of Botany**, London, v. 102, n. 3, p. 425-433, Sept. 2008.
- SLIWINSKA, E. Cell cycle and germination of fresh, dried and deteriorated sugarbeet seeds as indicators of optimal harvest time. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 13, n. 2, p. 131-138, June 2003.
- SREEDHAR, L.; WOLKERS, W. F.; HOEKSTRA, F. A.; BEWLEY, J. D. In vivo characterization of the effects of abscisic acid and drying protocols associated with the acquisition of desiccation tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. **Annals of Botany**, London, v. 89, n. 4, p. 391-400, 2002.
- 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, 1., 1998, Kuala Lumpur. **Proceedings...** Kuala Lumpur: FRIM, 1999. p. 29-42.
- SUN, W. Q. Methods for the study of water relations under desiccation stress. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Ed.). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford: CABI, 2002. p. 47-91.
- TAYLOR, I. B.; BURBIDAGE, A.; THOMPSON, A. J. Control of abscisic acid synthesis. **Journal Experimental of Botany**, Oxford, v. 51, n. 350, p. 1563-1574, Sept. 2000.
- VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILLI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: M.Dekker, 1995. p. 237-271.
- VICRÉ, M.; SHERWIN, H. W.; DRIOUICH, A.; JAFFER, M. A.; FARRANT, J. M. Cell wall characteristics and structure of hydrated and dry leaves of the resurrection plant *Craterostigma wilmsii*, a microscopical study. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v. 155, n. 6, p. 719-726, Dec. 1999.
- VIEIRA, C. V. **Germinação e re-indução de tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Tabebuia impetiginosa* e *Alliaria petiolata***. 2008. 98 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

WALTERS, C.; FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.
Desiccation stress and damage. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Ed.).
Desiccation and survival in plants: drying without dying. Wallington:
CABI, 2002. p. 263-282.

WALTERS, C.; HILL, L. M. A.; WHEELER, L. M. Dying while dry:
kinetics and mechanisms of deterioration in desiccated organisms.
Integrative and Comparative Biology, New York, v. 45, n. 5, p. 751-758,
Nov. 2005.