

**PERDA DA TOLERÂNCIA À
DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE
Peltophorum dubium DURANTE E APÓS A
GERMINAÇÃO**

CRISTIANE CARVALHO GUIMARÃES

2009

CRISTIANE CARVALHO GUIMARÃES

**PERDA DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM
SEMENTES DE *Peltophorum dubium* DURANTE E APÓS
A GERMINAÇÃO**

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

Orientador
Prof. José Marcio Rocha Faria

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

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

Guimarães, Cristiane Carvalho.

Perda da tolerância à dessecação em sementes de *Peltophorum dubium* durante e após a germinação / Cristiane Carvalho Guimarães. – Lavras : UFLA, 2009.

76 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: José Marcio Rocha Faria.

Bibliografia.

1. Sensibilidade à dessecação. 2. Conteúdo de DNA. 3. Integridade de DNA. 4. Análise ultraestrutural. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.9562

CRISTIANE CARVALHO GUIMARÃES

**PERDA DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM
SEMENTES DE *Peltophorum dubium* DURANTE E APÓS
A GERMINAÇÃO**

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

APROVADA em 02 de abril de 2009

Prof. Claudio José Barbedo

IBT

Prof. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

UFLA

Prof. José Marcio Rocha Faria
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

“(...) E se, um dia ou uma noite, um demônio se introduzisse na tua suprema solidão e te dissesse: 'Esta existência, tal como a levaste e a levaste até aqui, vai-te ser necessário recomeçá-la sem cessar: sem nada de novo: muito pelo contrário! A menor dor, o menor prazer, o menor pensamento, o menor suspiro, tudo o que pertence à vida voltará ainda a repetir-se, tudo o que nela há de indizivelmente grande e de indizivelmente pequeno, tudo voltará a acontecer, e voltará a verificar-se na mesma ordem, segundo a mesma impiedosa sucessão... esta aranha também voltará a aparecer, este lugar entre as árvores, e este instante, e eu também! A eterna ampulheta da vida será invertida sem descanso, e tu com ela, ínfima poeira das poeiras!...' Não te lançarias por terra, rangendo os dentes e amaldiçoando esse demônio? A menos que já tenhas vivido um instante prodigioso em que lhe responderias: 'Tu és um deus: nunca ouvi palavras tão divinas!' Se este pensamento te dominasse, talvez te transformasse e talvez te aniquilasse; perguntarias a propósito de tudo: 'Queres isto outra vez e por repetidas vezes, até o infinito?' E esta questão pesaria sobre ti como um peso decisivo e terrível! Ou então, ah!, como será necessário que te ames a ti próprio e que ames a vida para nunca mais desejar outra coisa além dessa suprema confirmação! (...)”

Friedrich Nietzsche

Agradecimentos

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

À CAPES pela concessão da Bolsa.

Ao meu orientador, Dr. José Marcio Rocha Faria, pela oportunidade, paciência nestes dois anos e por tornar o convívio no laboratório mais agradável devido o seu grande senso de humor.

Ao membro da Banca examinadora, Cláudio José Barbedo, pelas pertinentes sugestões e palavras de incentivo durante a conclusão deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Sementes Florestais, Laboratório de Melhoramento Vegetal e Recursos Genéticos, Laboratório de Citogenética, Laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão e Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, pessoas estas que são muito importantes a nossa formação profissional e pessoal. Em especial ao professor Dr. Edvaldo Aparecido Amaral, Dr. Antônio Cláudio Davide e Olívia Tonetti, pela paciência em nos ensinar e pela constante ajuda aos “pós-graduandos desesperados”. E aos amigos de trabalho, dentre eles Julio Maia (meu querido parceiro de sucessos e frustrações, sempre disponível, paciente, otimista e bem humorado), Simone Anese, Sue Ellen Queiroz, Giuliana Mourão, Marcela Nery, Ana Carla Fraiz, Thatiana Masetto, Joeferson Reis e Cinara Libéria pelas idéias trocadas, auxílio nas horas precisas e claro, pelas boas risadas que tornavam nosso ambiente de trabalho mais sereno.

A todas as meninas da República Pira Saia, incluindo as ex-moradoras, pelo harmônico convívio e constantes demonstrações de verdadeiro afeto.

Aos meus inesquecíveis companheiros de trabalho do Instituto de Botânica de São Paulo (os estagiários, com quem iniciei esta jornada, e os pesquisadores, que sempre contribuíram com o nosso crescimento profissional).

A minha família pelo interesse em meu trabalho e por estarem ao meu lado incondicionalmente. Em especial minha mãe Maria José (força indescritível), meu pai Sergio, minha irmã Vanessa e meu irmão Leonardo (um dos mais belos entre os seres humanos que conheci).

Ao Renato Santos por tanto ter me apoiado nesta caminhada e por todas às vezes que segurou minha mão e disse que acreditava.

Aos amigos pela alegria.

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

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	1
1 Introdução Geral.....	1
2 Referências Bibliográficas.....	6
CAPÍTULO 2: Avaliação da perda da tolerância à dessecação e determinação da quantidade de DNA nuclear em sementes de <i>Peltophorum dubium</i> durante e após a germinação	
1 Resumo.....	9
2 Abstract.....	10
3 Introdução.....	11
4 Material e Métodos.....	14
4.1 Material vegetal.....	14
4.2 Determinação do grau de umidade.....	14
4.3 Quebra de dormência.....	14
4.4 Germinação.....	14
4.5 Índice de velocidade de germinação.....	15
4.6 Curva de embebição.....	16
4.7 Caracterização da perda da tolerância à dessecação durante e após a germinação.....	17
4.8 Quantificação do conteúdo de DNA nuclear.....	18
5 Resultados e Discussão.....	19
6 Conclusões.....	34
7 Referências Bibliográficas.....	35

CAPÍTULO 3: Mudanças ultra-estruturais e integridade do DNA genômico em sementes germinadas de *Peltophorum dubium* submetidas à secagem.

1 Resumo.....	41
2 Abstract.....	42
3 Introdução.....	43
4 Material e Métodos.....	46
4.1 Material vegetal.....	46
4.2 Determinação do grau de umidade.....	46
4.3 Quebra de dormência.....	46
4.4 Germinação.....	46
4.5 Avaliação da perda da tolerância à dessecação após a germinação.....	47
4.6 Avaliação da integridade do DNA.....	48
4.7 Análise da morfologia celular por meio de microscopia eletrônica de transmissão.....	49
5 Resultados e Discussão.....	51
6 Conclusões.....	68
7 Referências Bibliográficas.....	69
CONCLUSÕES GERAIS.....	75

RESUMO GERAL

GUIMARÃES, Cristiane Carvalho. **Perda da tolerância à dessecação em sementes de *Peltophorum dubium* durante e após a germinação.** 2009. 76p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

Há carência de informações para subsidiar planos e ações de conservação da diversidade biológica. Sementes tolerantes à dessecação (ortodoxas) podem ser armazenadas a longo prazo sem apresentarem queda significativa da viabilidade. Por outro lado, sementes recalcitrantes, sensíveis à dessecação, devem ser armazenadas úmidas, conseqüentemente por períodos curtos, representando um grande desafio na conservação de sementes. O presente estudo foi realizado com o objetivo de ampliar o conhecimento dos eventos celulares que ocorrem durante a perda da tolerância à dessecação (TD) em sementes de *Peltophorum dubium*. Para caracterização do processo, sementes desta espécie foram amostradas após a germinação, quando atingiram 1, 3 e 5 mm de comprimento radicular, e posteriormente submetidas à desidratação em sílica gel. Foram efetuadas avaliações citométricas ao longo da embebição (12, 48, 60 e 72 horas) no intuito de correlacionar a retomada do ciclo celular ao aumento da sensibilidade à desidratação. A fim de relatar possíveis danos promovidos pela secagem, observações ultraestruturais e de integridade do DNA genômico foram realizadas após redução gradual do grau de umidade em sementes com radículas de 1 mm de comprimento (68, 20 e 8% de teor de água). Para os três comprimentos de raiz primária houve nulidade na sobrevivência, indicando que a perda da TD em sementes de *Peltophorum dubium* acontece nos estágios iniciais de germinação, anteriormente a protrusão radicular. Não foi constatada, através das análises citométricas, evidências da replicação de DNA nuclear, em eixos embrionários das sementes em estudo, durante e após a germinação não sendo possível, portanto, correlacionar a retomada do ciclo celular com aumento da sensibilidade à dessecação. As avaliações ultraestruturais sugerem que a TD está relacionada a mecanismos envolvidos na manutenção da estrutura celular e integridade do DNA durante a perda de água. Quando secas aos níveis iniciais de hidratação (8%), foi observada desintegração da membrana plasmática, colapso intracelular e danos ao DNA genômico.

Palavras chave: Sensibilidade à dessecação, conteúdo de DNA, integridade de DNA, análise ultraestrutural.

GENERAL ABSTRACT

GUIMARÃES, Cristiane Carvalho. **Loss of desiccation tolerance during and after germination in *Peltophorum dubium* seeds.** 2009. 76p. Dissertation (Master Program in Forest Engineering) - Federal University of Lavras, MG*.

There is a lack of information to subsidize plans for conservation of biological diversity. Seeds that present desiccation tolerance (orthodox) can be stored for many years without significant loss of viability. Recalcitrant seeds, however, can be stored for short periods once they are wet, leading to a big challenge for conservation purposes, due to their desiccation sensitivity. This research aimed to study cellular events that occur during the loss of desiccation tolerance (DT) in seeds of *Peltophorum dubium*. Germination tests were set and samples of seeds with radicle length of 1, 3 and 5 mm were taken and then dehydrated in silica gel. Cytometric evaluations were realized along the imbibition process (12, 48, 60 and 72 hours) in order to relate the resumption of cell cycle with the increase of dehydration sensitivity. To report possible damages caused by drying, ultrastructural and genomic DNA integrity analyses were done after a gradual reduction of moisture content in seeds with radicle length of 1 mm (68, 20 and 8% of water content). For all lengths of primary root there was nullity on survival, suggesting that the loss of DT in *Peltophorum dubium* seeds happens at the early stages of germination, before radicle protrusion. By the cytometric assays, there was no evidence of nuclear DNA replication in embryonic axes, during and after germination. So, it was not possible to relate the resumption of cell cycle with the increase of desiccation sensitivity. The ultrastructural analyses suggest that DT is related with mechanisms involved in the maintenance of cellular structure and DNA integrity during the loss of water. When the seeds were dried until their initial moisture content (8%), there were disintegration of plasma membrane, intracellular breakdown and damages to genomic DNA.

Keywords: Sensitivity to desiccation, DNA content, DNA integrity, ultrastructural analysis.

1 Introdução Geral

A influência do homem sobre o meio ambiente vem crescendo ao longo do tempo, causando assim, perda de espécies vegetais dos diversos biomas existentes. A acelerada necessidade de exploração dos recursos naturais resultou na devastação de florestas, gerando uma grande preocupação com a conservação de germoplasma na forma de banco de sementes. No entanto, a dificuldade de manutenção da qualidade fisiológica das sementes sensíveis à dessecação, concorre com a estabilidade dos recursos genéticos de algumas espécies.

O processo de desenvolvimento ou formação de sementes é controlado geneticamente e envolve uma seqüência ordenada de alterações morfológicas, físicas, fisiológicas e bioquímicas que ocorrem a partir da fecundação do óvulo e prosseguem até o momento em que as sementes se desligam fisiologicamente da planta. Após a fertilização, há um período de formação das estruturas da semente, mediante a divisão, expansão e diferenciação celular. Durante essa fase, ocorre o aumento do tamanho das sementes, mas o grau de umidade permanece constante e elevado, passando a decrescer à medida que as sementes perdem água sem que ocorram acréscimos significativos da massa seca (Beltrati & Paoli, 2003).

Quando a semente atinge máximo acúmulo de matéria seca e não mais recebe produtos da planta mãe, “desligando-se” desta, os níveis de água ainda estão elevados, podendo ocorrer rápida deterioração ou, em alguns casos, germinação na própria planta mãe. Para evitar estas ocorrências, a planta pode acionar vários mecanismos, que visam à redução na quantidade de água na semente (Marcos Filho, 2005). Quando tolerantes às reduções nos níveis de água, sem prejuízos latentes, as sementes são intituladas ortodoxas (Roberts, 1973).

Entretanto, nem todas as espécies vegetais apresentam este comportamento. Sementes denominadas recalcitrantes não apresentam a fase de hsecagem ao final do desenvolvimento, sendo dispersas com alto conteúdo de água e sensíveis à dessecação (Berjak & Pammenter, 2000).

O alto grau de umidade das sementes é uma das principais causas da perda do poder germinativo durante o armazenamento (Desai et al., 1997). Esta condição causa aumento da taxa respiratória e favorece a ação de microorganismos. Como a conservação da qualidade é favorecida pela redução do grau de umidade e da temperatura do ambiente de armazenamento, graus de umidade altos, geralmente acima de 20%, podem promover o aquecimento da massa de sementes a uma temperatura letal (Harrington, 1972).

Tolerância à dessecação em sementes pode ser definida como a capacidade de sobrevivência e manutenção do vigor depois de quase completa remoção de água. Para tal, é necessário que as sementes possuam habilidade de manter a integridade estrutural da membrana celular e das organelas para reparar danos quando a água estiver novamente disponível (Vertucci & Ferrant, 1995). Vários compostos e processos são considerados importantes ou, até fundamentais para que uma semente seja tolerante à perda de água, como as características físicas dos constituintes celulares e intracelulares, o acúmulo de reservas insolúveis, a desdiferenciação intracelular, o desligamento metabólico, a presença de um eficiente sistema antioxidante, o acúmulo de proteínas e outros protetores, e presença e operação de um sistema de reparo durante a reidratação (Pammenter & Berjak, 1999).

Segundo Berjak et al. (1984), é provável que um mecanismo genético atue no sentido de controlar o processo de desidratação durante a maturação de sementes ortodoxas, as quais parecem ter suas origens em locais sujeitos a seca, que nem sempre são propícios a germinação. Porém, em sementes recalcitrantes, que tendem a ser originadas de locais úmidos, e, portanto adequados ao processo

germinativo continuamente, este mecanismo genético pode não estar presente, e caso esteja, não é funcional.

Talvez a fronteira mais instigante do estudo da tolerância à dessecação seja como induzir tal tolerância em sementes sensíveis (Crowe et al., 2005), no entanto, as pesquisas com sementes recalcitrantes enfrentam uma série de obstáculos, sendo o principal deles o limitado período de disponibilidade de sementes viáveis. Assim, tem-se observado um lento progresso no estudo da recalcitrância. Diante disso, o uso de sementes ortodoxas em germinação, ou germinadas, surgiu como uma importante ferramenta no estudo da sensibilidade à dessecação, já que, com a germinação, essas sementes perdem progressivamente a tolerância à dessecação, passando a se comportar como as recalcitrantes (Sun, 1999).

De acordo com Sun (1999), algumas semelhanças entre sementes recalcitrantes e ortodoxas germinadas podem facilitar a realização de estudos comparativos e conferir maior flexibilidade na concepção de experimentos que visam elucidar atributos estruturais e bioquímicos associados à sensibilidade à dessecação e comportamento durante o armazenamento.

Assim como as sementes recalcitrantes, as ortodoxas germinadas são sensíveis à dessecação (Sun, 1999); após a desidratação, sementes ortodoxas germinadas mostram mudanças ultra-estruturais semelhantes às observadas em recalcitrantes (Peng & Fu, 1993) e a capacidade de armazenamento de sementes germinadas é significativamente reduzida quando comparadas ao controle (Hong & Ellis, 1992; Sun et al., 1997). Mudanças estruturais e bioquímicas durante a germinação e re-indução da tolerância à dessecação podem fornecer uma visão detalhada dos mecanismos de sensibilidade à dessecação (Sun, 1999).

Um melhor entendimento dos mecanismos que regem a tolerância/sensibilidade à dessecação em sementes é pré-requisito para o desenvolvimento de técnicas que permitam a manipulação dessa característica

em sementes recalcitrantes, visando prolongar sua viabilidade durante o armazenamento, contribuindo para a conservação *exsitu* da diversidade vegetal.

A observação de mudanças nas estruturas celulares, conteúdo e integridade de DNA nuclear, dentre outros aspectos em sementes germinadas submetidas à desidratação, constituem ferramentas promissoras para elucidação dos mecanismos que regem a sensibilidade à dessecação em sementes recalcitrantes.

A espécie em estudo, *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert (Figura 1) pertence à família Leguminosae subfamília Caesalpinioideae. É uma espécie arbórea nativa do Brasil conhecida popularmente como canafistula, tamboril bravo, guarucaia, angico amarelo, dentre outros. Ocorre naturalmente em regiões da Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul até o Paraná (Lorenzi, 1992). Suas sementes (Figura 6) são ortodoxas, podendo assim, serem utilizadas como ferramenta para o estudo da sensibilidade à dessecação.

Assim, objetivou-se com esse trabalho:

- ✓ Avaliar o comportamento de sementes germinadas de *Peltophorum dubium* quanto à tolerância à dessecação;
- ✓ Determinar a quantidade de DNA nuclear em células radiculares após diferentes períodos de embebição, a fim de correlacionar o início do ciclo celular com a perda da tolerância à dessecação;
- ✓ Avaliar a integridade do DNA e identificar mudanças ultra-estruturais em raízes primárias de sementes germinadas, submetidas a diferentes níveis de secagem.



FIGURA 1 *Peltophorum dubium*. **A.** Árvore. **B.** Flor. **C.** Frutos imaturos. **D.** Frutos maduros. **E.** Detalhe das folhas. **F.** Sementes.

2 Referências Bibliográficas

BELTRATI, C. M.; PAOLI, A. A. S. Semente. In: APPEZZATO DA GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2003. p. 399-424.

BERJAK, P.; DINI, M.; PAMMENTER, N. W. Possible mechanisms underlying the differing dehydration responses in recalcitrant and orthodox seeds: desiccation-associated subcellular changes in propagules of *Avicennia marina*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 12, n. 3, p. 365-384, 1984.

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

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

DESAI, B. B.; KOTTECHA, P. M.; SALUNKHE, D. K. **Seeds handbook biology, production, processing and storage**. New York: Bassel, 1997. 627 p.

HARRINGTON, J. H. Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI, T. T. **Seed biology**. New York: Academic, 1972. v. 3, p. 145-245.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. The survival of germinating orthodox seeds after desiccation and hermetic storage. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 239-247, 1992.

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

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

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

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

SUN, W. Q. Desiccation sensitivity of recalcitrant seeds and germinated orthodox seeds: can germinated orthodox seeds serve as a model system for studies of recalcitrance? In: MARZALINA, M.; KHOO, K. C.; JAYANTHI, N.; TSAN, F. Y.; KRISHNAPILLAY, B. (Ed.). **IUFRO seed symposium "recalcitrant seeds"**. Kuala Lumpur: Forest Research Institute of Malasya, 1999. p. 29-42.

SUN, W. Q.; KOH, D. C. K.; ONG, C. M. Correlation of modified water sorption properties with the decline of storage stability of osmotically-primed seeds of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 7, n.4, p. 391-397, 1997.

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.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA PERDA DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE DNA NUCLEAR EM SEMENTES DE *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT DURANTE E APÓS A GERMINAÇÃO

1 Resumo

Cerca de 50% das espécies florestais oferecem dificuldade no que se refere à habilidade de manter suas sementes viáveis quando armazenadas. Diante da necessidade de conservação dos recursos genéticos, são importantes os estudos que permitam maior conhecimento dos mecanismos relacionados à tolerância/sensibilidade à dessecação e ao armazenamento de sementes. Assim, com o presente trabalho objetivou-se a avaliação da perda da tolerância à dessecação (TD) em sementes de *Peltophorum dubium* durante e após a germinação. Sementes de *Peltophorum dubium* foram colocadas para germinar e, ao atingirem 1, 3 e 5 mm de raiz primária (68% de umidade), foram desidratadas em sílica gel, até atingirem o grau de umidade inicial (8%), sendo em seguida reidratadas e avaliadas quanto à sobrevivência (retomada do crescimento e formação de plântulas normais). Procedimento semelhante foi adotado para os ensaios realizados durante a embebição, onde foram amostradas 100 sementes divididas em quatro repetições de 25 para cada um dos seguintes tempos de embebição: 12, 24, 48, 60 e 72 horas. Em seguida, foram selecionados diferentes pontos de interesse (12, 48 e 60 horas de embebição e raízes primárias com 1 mm de comprimento) para determinação da quantidade de DNA nuclear, afim de analisar possível correlação entre início do ciclo celular e perda da TD. Com relação ao comportamento de sementes germinadas submetidas à secagem e reidratação, para os três comprimentos de raízes primárias amostradas, não houve sobrevivência. Foi observada queda progressiva na sobrevivência de sementes de *Peltophorum dubium* relacionada ao tempo de embebição, e posterior secagem e reidratação, sugerindo que a perda da TD desta espécie acontece nos estágios iniciais da germinação, antes da protrusão da radícula. Sementes embebidas por 12h, 48h, 60h, 72h e aquelas germinadas, com 1 mm de comprimento radicular obtiveram índices iguais a 98%, 93%, 83%, 35%, 17% e 0% de sobrevivência respectivamente. Os estudos relacionados ao conteúdo de DNA nuclear não demonstraram correlação entre retomada do ciclo celular e perda da TD.

Palavras chave: Sensibilidade à dessecação, ciclo celular, protrusão radicular.

2 Abstract

Approximately 50% of forest species produce seeds whose storage may lead to a loss of their viability. Due to the need of conservation of genetic resources, there is urgency for studies related with mechanisms involved in the desiccation tolerance/sensitivity and storage of seeds. The present study aimed to investigate the loss of desiccation tolerance (DT) in seeds of *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, during and after germination. *Peltophorum dubium* seeds were put to germinate and taken when the primary root reached the lengths of 1, 3 and 5 mm (68% of water content). Seeds were then dehydrated in silica gel until their initial moisture content (8%), rehydrated and assessed by the survival (resumption of growth and development of normal seedlings). These proceedings were also realized in the assays during imbibition, where 4 replications of 25 seeds were sampled for different periods of imbibition: 12, 24, 48, 60 and 72 hours. Subsequently, different points of interest were selected (12, 48 and 60 hours of imbibition and radicles with 1 mm length) to assess the nuclear DNA content, in order to relate the beginning of cell cycle with the loss of DT. For the three radicle lengths sampled, it was not observed survival in the seeds submitted to drying and rehydration. There was a progressive decrease in survival of *Peltophorum dubium* seeds related with the period of imbibition, and subsequent drying and rehydration, suggesting that the loss of DT occurs in at the early stages of germination, before the radicle protrusion. Imbibed seeds for 12, 24, 48 and 60 hours and germinated ones with 1 mm of radicle length presented 98%, 93%, 83%, 35%, 17% and 0% of survival, respectively. The assays with the nuclear DNA content did not show relation between the resumption of the cell cycle and the loss of DT.

Keywords: Desiccation sensitivity, cell cycle, radicle protrusion.

3 Introdução

Nos últimos anos, a degradação ambiental tem elevado a preocupação mundial com a perda da biodiversidade e, no tocante à diversidade vegetal, a conservação de germoplasma na forma de banco de sementes tem um papel importante na redução da perda dessa diversidade. Contudo, ainda há carência de informações científicas para subsidiar planos e ações de conservação da diversidade biológica, principalmente em áreas com maior abundância e diversidade de grupos ecológicos (Barbedo et al., 2002).

De modo geral, para se manter a longevidade de uma semente, a conservação é feita com baixo teor de água e sob baixa temperatura. Teores elevados de água em sementes podem reduzir a longevidade das mesmas, acelerando o metabolismo e favorecendo o crescimento de patógenos prejudiciais à manutenção da capacidade germinativa. Assim, a secagem e o armazenamento de sementes em ambiente frio podem contribuir para prolongar a manutenção de sua viabilidade (Vertucci & Roos, 1990).

No entanto, existem aquelas espécies em que as sementes são altamente sensíveis à perda de água, ou seja, não suportam a desidratação. Hong & Ellis (1996) afirmam que as sementes de espécies de regiões tropicais e temperadas seguem três padrões quanto ao comportamento no armazenamento: ortodoxo, intermediário e recalcitrante (Roberts, 1973; Ellis et al., 1990). As sementes ortodoxas são tolerantes à dessecação (TD) a teores de água em torno de 5% e temperaturas baixas. Sementes de comportamento intermediário não toleram desidratação abaixo de 10 a 12,5% de teor de água, e sementes recalcitrantes são sensíveis à redução do teor de água abaixo de 20%.

Black & Pritchard (2002) sugerem que a dessecação de sementes recalcitrantes é prejudicial por vários motivos, dentre eles os danos causados ao

citoesqueleto como resultado das mudanças decorrentes da alteração do volume celular. Além disso, a remoção de água pode ocasionar danos às membranas, mudança de pH, desnaturação de proteínas, dentre outros. Em sementes ortodoxas, vários processos ou mecanismos são responsáveis pela tolerância à desidratação, podendo conferir proteção contra os efeitos mencionados anteriormente. A ausência ou falhas na expressão de um ou mais mecanismos determinam o grau de sensibilidade à dessecação nas espécies (Pammenter & Berjak, 1999). Acredita-se que a TD provavelmente não possa ser atribuída a um único mecanismo de proteção; ao contrário, ela parece ser um fenômeno multifatorial em que cada componente é igualmente crítico, agindo em sinergismo e controlado pelo genoma (Leprince et al., 1993).

Muitas espécies florestais dispersam suas sementes com alto conteúdo de água (Carvalho et al., 1983), indicando que estas podem ter comportamento recalcitrante durante o armazenamento e ao mesmo tempo apresentar níveis variáveis de sensibilidade à dessecação.

Diante da dificuldade de manipulação de sementes recalcitrantes, devido sua rápida perda de viabilidade durante o armazenamento, sementes ortodoxas germinadas vem sendo usadas em estudos relacionados à tolerância/sensibilidade à dessecação. A razão é que sementes ortodoxas em processo de germinação perdem a tolerância à desidratação, passando a se comportar como recalcitrantes. Muitos dos eventos metabólicos e moleculares envolvidos com a perda da TD em sementes ortodoxas em processo de germinação, podem se assemelhar aqueles que ocorrem em sementes recalcitrantes, justificando o uso dessa técnica (Sun, 1999). Estas semelhanças podem facilitar a realização de estudos comparativos e conferir maior flexibilidade na concepção de experimentos que visam elucidar atributos estruturais e bioquímicos associados à sensibilidade à dessecação e comportamento durante o armazenamento.

Foi reportada que a intolerância à dessecação durante a germinação é verificada quando as células se aproximam do início das divisões celulares (Osbourne et al., 2002). A fim de verificar possível correlação entre início do ciclo celular, nesta espécie, e sensibilidade à dessecação, foi utilizada a citometria de fluxo como ferramenta para análise do ciclo celular. Esta ferramenta constitui-se em alternativa para o estudo dos eventos celulares envolvidos na resposta a diferentes níveis de estresse (Yanpaisan, 1999).

A espécie em estudo, *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert pertence à família Leguminosae subfamília Caesalpinioideae. É uma espécie arbórea nativa do Brasil conhecida popularmente como canafistula, tamboril bravo, guarucaia, angico amarelo, dentre outros. Ocorre naturalmente em regiões da Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul até o Paraná (Lorenzi, 1992). Suas sementes são ortodoxas, podendo assim, serem utilizadas como ferramenta para o estudo da sensibilidade à dessecação.

Sabendo-se da necessidade de novos estudos para um maior entendimento dos processos fisiológicos envolvidos na sensibilidade à dessecação de sementes, para que técnicas eficazes de conservação de sementes com comportamento recalcitrante possam ser adotadas (José et al., 2007), objetivou-se com esse trabalho avaliar a perda da tolerância à dessecação em sementes de *Peltophorum dubium*, durante e após a germinação, e o conteúdo de DNA nas células da radícula durante a embebição.

4 Material e Métodos

4.1 Material vegetal

A coleta dos frutos maduros foi realizada em árvores no *Campus* da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, sendo as sementes beneficiadas no Viveiro Florestal. O beneficiamento foi realizado manualmente, com a quebra dos frutos e uso de peneiras para separação das sementes. Após este procedimento, para retirada de impurezas presentes na amostra foram utilizados sopradores da marca South Dakota e General.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Sementes Florestais, do Departamento de Ciências Florestais, da UFLA.

4.2 Determinação do grau de umidade

O grau de umidade das sementes foi determinado pelo método de estufa a $103 \pm 3^\circ\text{C}$, por 17 horas (Brasil, 1992), com 4 repetições de 10 sementes cada. O cálculo foi feito na base úmida, sendo o grau de umidade expresso em porcentagem.

4.3 Quebra de dormência

O tratamento pré-germinativo utilizado para quebra de dormência tegumentar foi realizado por meio de imersão das sementes em água quente (96°C) e deixadas em repouso na mesma água, fora do aquecimento, por 24 horas, à temperatura ambiente (Oliveira et al., 2003).

4.4 Germinação

Antes de serem colocadas para germinar as sementes foram lavadas em solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por 10 minutos, fazendo-se

posteriormente a lavagem em água corrente por um minuto, no intuito de reduzir a proliferação de fungos.

Após a utilização do tratamento para quebra da dormência e posterior desinfecção, a capacidade germinativa das sementes foi avaliada através de teste de germinação conduzido em gerbox, sobre papel (Perez et al., 1999), umedecido com água destilada até sua saturação. Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes. Em seguida, os gerbox foram transferidos para germinadores (Marconi tipo MA 400) a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas.

A germinação foi avaliada, considerando-se germinadas as sementes nas quais houve protrusão radicular e desenvolvimento de plântulas normais (sistema radicular desenvolvido e primeiro par de folhas visível); dormentes as que não germinaram nem se deterioraram até o final do teste, permanecendo intactas; e mortas as sementes que não germinaram, não permaneceram duras e mostraram-se amolecidas e/ou atacadas por microorganismos. A avaliação da germinação e desenvolvimento de plântulas foi realizada diariamente durante 20 dias, após a instalação do teste.

4.5 Índice de velocidade de germinação

Paralelamente ao estudo da germinação foi determinado o índice de velocidade de germinação, utilizando-se a fórmula proposta por Maguire (1962), para sementes com e sem tratamento pré-germinativo.

$IVG = \Sigma (G_n/N_n)$, onde:

IVG = índice de velocidade de germinação;

G_n = número de sementes germinadas computadas na enésima contagem;

N_n = número de dias da enésima contagem a partir da semeadura.

Foram realizadas contagens diárias, registrando-se o número de sementes que apresentaram raiz primária com comprimento maior ou igual a 1 mm, até estabilização destes valores.

4.6 Curva de embebição

Para determinar o padrão de embebição de água pelas sementes, a umidade inicial foi determinada como descrito anteriormente, e as curvas elaboradas utilizando-se 2 repetições com 10 sementes cada, sendo cada semente pesada individualmente para determinação da evolução da hidratação.

A curva foi elaborada considerando-se sementes com e sem quebra de dormência, para comparação do padrão de embebição em ambos os casos (A quebra de dormência foi realizada em água fervente para amolecimento do tegumento, porém as sementes não foram deixadas em repouso em água por 24 horas. Este procedimento foi realizado tomando-se o cuidado para que as sementes não iniciassem a embebição durante o pré-tratamento).

Posteriormente as sementes foram colocadas para embeber em bandejas plásticas tendo como substrato duas folhas de papel mata borrão saturado com água destilada e acondicionado em germinadores regulados a 25°C e fotoperíodo 12 horas.

A cada 3 horas as sementes foram removidas dos recipientes e pesadas em balança, precisão de 0,01g, durante 3 dias, período este em que se verifica a protrusão radicular da maior parte das sementes em estudo. Para as amostras onde não foi realizada quebra de dormência tegumentar as pesagens foram realizadas a cada 24 horas, durante 3 dias. As duas repetições foram pesadas simultaneamente ao longo do dia inferindo-se os dados coletados de uma das repetições, aos pesos que seriam coletados durante a madrugada.

4.7 Caracterização da perda da tolerância à dessecação durante e após a germinação

Para caracterização da perda da tolerância à dessecação durante a germinação (embebição) foram amostradas 100 sementes divididas em quatro repetições de 25 sementes para cada um dos seguintes tratamentos: 12h, 24h, 48h, 60h e 72h de embebição. A hidratação foi realizada em placas de petri contendo papel de filtro, até que fosse atingido o período de hidratação. Para estes ensaios foi realizada a quebra de dormência tegumentar, porém as sementes foram deixadas por um período de apenas 30 minutos em água a fim de evitar o início da embebição.

Para os ensaios relacionados à avaliação da tolerância à dessecação após a germinação foi realizada a quebra de dormência tegumentar e posterior desinfecção das sementes, sendo as mesmas colocadas para germinar sobre papel (Perez et al., 1999), umedecido com água destilada até a saturação em bandejas plásticas, em germinadores (Marconi tipo MA 400) a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. Sementes de *Peltophorum dubium* foram amostradas para serem desseccadas quando suas raízes primárias atingiram 1, 3 e 5 mm de comprimento. Para cada comprimento foram amostradas 80 sementes divididas em quatro repetições de 20 sementes cada.

A desidratação foi feita em caixas acrílicas tipo gerbox, vedadas com filme plástico, colocando-se as sementes sobre um telado, tendo uma camada de sílica gel ao fundo, a 20°C até que fosse atingido o grau de umidade inicial. Durante a desidratação foram realizadas pesagens sucessivas até que o peso encontrado coincidissem com o peso desejado, correspondente ao grau de umidade, por meio da expressão proposta por Cromarty et al. (1985). Após a desidratação, as sementes foram pré-umedecidas em ar úmido (100 % UR) por 24 horas a 25°C para prevenir danos causados pela embebição (Crowe et al., 1989).

Posteriormente as sementes pré-umedecidas foram reidratadas em gerbox, contendo papel de filtro saturado com água como substrato e transferidas para germinadores (Marconi tipo MA 400) a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. As sementes germinadas que continuaram seu desenvolvimento e formaram plântulas normais foram consideradas tolerantes à dessecação (TD).

Conjuntamente a este experimento, foi realizada a curva de secagem para os comprimentos de raízes primárias descritos anteriormente. Após a quebra de dormência as sementes foram colocadas para germinar até que atingissem os tamanhos de raízes primárias pré-estabelecidas e colocadas para secar utilizando-se metodologia semelhante à descrita para os ensaios de dessecação. As sementes foram pesadas ao longo de 3 dias nos períodos descritos a seguir: 1, 2, 3, 6, 9, 18, 24, 48 e 72 horas.

4.8 Quantificação do conteúdo de DNA nuclear

A partir dos dados de sobrevivência, obtidos com a avaliação da tolerância à dessecação durante e após a germinação, foram selecionados diferentes pontos de interesse para quantificação do conteúdo de DNA nuclear por citometria de fluxo, sendo eles: 12, 48, 60 horas de embebição e raízes com 1 mm de comprimento.

As análises citométricas foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal, do Departamento de Biologia Geral (DBG) da Universidade Federal de Viçosa (MG).

Nas análises citométricas foram usadas suspensões de núcleos intactos obtidos de raízes primárias e radículas de *Peltophorum dubium*. As amostras foram preparadas de acordo com o proposto por Carvalho et al. (2008) e analisadas em um citômetro de fluxo Partec PAS (Partec®_ GmbH, Munster, Germany) equipado com uma fonte de laser e uma série de filtros (TK 420, TK 560). Pelo menos 5000 núcleos foram analisados em cada tratamento.

5 Resultados e Discussão

O tratamento utilizado para quebra da dormência das sementes foi eficaz em favorecer o amolecimento do tegumento. Com a imersão das sementes em água quente (96°C) por 24 horas, obteve-se valor em torno de 0% de sementes duras, enquanto que para testemunha foi de 94% de sementes duras, o que demonstra a necessidade de utilização de tratamentos para quebra da dormência em sementes de canafístula. A porcentagem de sementes germinadas (93%), quando as mesmas foram submetidas ao tratamento, evidencia a eficiência da técnica. (Tabela 1).

TABELA 1 Valores médios de parâmetros avaliados em sementes de *Pelthoporum dubium* submetidas ou não a tratamento pré-germinativo.

Tratamentos	Parâmetros avaliados			
	Sementes germinadas(%)	Sementes mortas(%)	Sementes dormentes(%)	IVG
Com quebra de dormência	93 a	7 a	0 b	8,61 a
Sem quebra de dormência	6 b	0 a	94 a	0,38 b

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Oliveira et al. (2003) em trabalho com sementes de canafístula, que obteve valores próximos a 80% de plântulas normais em um dos lotes testados. Os diversos autores que trabalharam com sementes desta espécie recomendaram tratamentos diferentes para quebra de dormência. Bianchetti & Ramos (1981) e Capelanes (1991) obtiveram resultados positivos quanto à eficiência da quebra de dormência em sementes de canafístula com imersão das mesmas em ácido sulfúrico por

diferentes períodos. Porém, o uso de ácido sulfúrico apresenta riscos como queimaduras para o operador, necessidade de um local apropriado para o seu descarte, além da dificuldade de empregá-lo em larga escala, sendo preferível o tratamento que utiliza água. A escarificação mecânica também se mostrou eficiente na superação da dormência, segundo Bianchetti & Ramos (1982) e Figliolia & Silva (1982), entretanto este tratamento apresenta o inconveniente de sua aplicação prática pela dificuldade de execução em larga escala e possibilidade de causar injúria ao embrião.

A porcentagem de sementes mortas (7%) e de plântulas anormais (0%) quando realizada a imersão de sementes em água fervente enfatiza a eficiência da técnica, a qual além da praticidade de uso leva à reduzida mortalidade e danos as sementes (Tabela 1).

O índice de velocidade de germinação (IVG), também representado na Tabela 1, mostra novamente diferença significativa quando realizada a imersão de sementes de *Pelthoporum dubium* em água fervente. Sabendo-se que a dormência imposta pelo tegumento tem trazido problemas aos viveiristas, na formação de mudas, o conhecimento de técnicas que permitam uma germinação mais rápida e uniforme é considerado de grande valia.

O aumento do grau de umidade das sementes (Figura 1) submetidas ao tratamento de quebra de dormência indica a evolução na absorção de água pelas mesmas seguindo o padrão trifásico proposto por Bewley & Black (1994).

A umidade inicial das sementes foi de 6% e a umidade final destas chegou a níveis próximos a 70%, transcorridas 72 horas. Sabe-se que a velocidade da germinação é determinada principalmente pela absorção de água (Marcos Filho, 2005), fato este que pode ser certificado correlacionando a curva de embebição desta espécie com a germinação da mesma. Ambas possuem curta duração podendo ser observada protrusão radicular, em sementes de *Pelthoporum dubium*, com aproximadamente 70 horas de embebição.

A curva obtida apresentou velocidade de absorção lenta nas primeiras horas da Fase I de embebição, com duração média de 36 horas, fato este que pode ser explicado pela dormência imposta pelo tegumento, comum em sementes da família Leguminosae (Bianchetti & Ramos, 1982). Embora tenha sido realizada a quebra de dormência tegumentar as sementes não foram deixadas imersas em água por 24 horas e sim por 30 minutos, o que pode ter contribuído para o atraso na absorção hídrica, devido ao lento amolecimento do tegumento. Este atua como retardador da absorção de água e, posteriormente, facilita a movimentação da água no interior da semente, permitindo que os cotilédones se hidratem de maneira uniforme (Marcos Filho, 2005). Ao final desta fase as sementes atingiram aproximadamente 60% de teor de água. Em seguida iniciou-se a Fase II, com duração de aproximadamente 35 horas, caracterizada pela redução da velocidade de hidratação indicado pelo platô observado na curva.

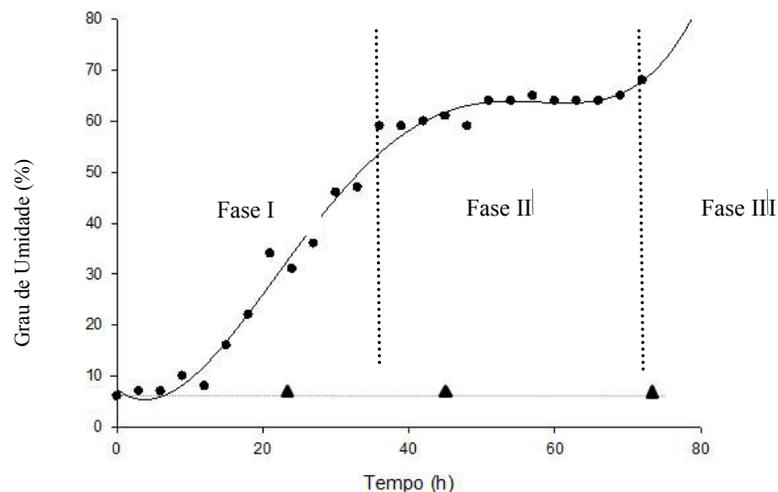


FIGURA 1 Curva de embebição de sementes de *Pelthoporum dubium*, com (●, linha inteira) e sem tratamento pré-germinativo (▲), sob temperatura de 25° C e fotoperíodo de 12 horas. A seta indica o momento da protrusão radicular.

A proporção de tempo decorrido entre as duas primeiras fases deixa claro a presença de dormência nas sementes. De acordo com citado por Bewley (1997), normalmente a Fase II dura até dez vezes mais que a Fase I. Para sementes de *Pelthoporum dubium* ambas as fases tiveram duração semelhante e, como citado anteriormente, esse fato pode estar relacionado à dormência imposta pelo tegumento que impede, ou dificulta, a absorção de água pelas sementes.

A protrusão radicular pôde ser observada, para a maioria das sementes, no início da Fase III, que começou a partir de aproximadamente 70 horas. Segundo Bewley (1997), o início desta fase é marcado pelo retomada do crescimento da radícula e caracterizada pelos processos de alongação e divisão celular.

Para sementes nas quais não foi realizado o tratamento de quebra de dormência tegumentar não foi observado aumento da massa fresca, indicando que não houve absorção de água pelas mesmas. Assim, conclui-se que o amolecimento do tegumento, promovido pelo tratamento pré-germinativo, propicia uma maior absorção de água pelas sementes, resultando em melhorias como aceleração e uniformização do processo germinativo.

Os resultados referentes à sobrevivência de sementes de *Peltophorum dubium*, com diferentes comprimentos de raízes primárias, quando submetidas à secagem em sílica gel estão dispostos na Figura 2. Foi observada alta mortalidade de sementes para os três comprimentos da raiz primária amostrados, sendo eles 1 mm, 3 mm e 5 mm, indicando que mecanismos ligados à tolerância à dessecação, presentes em sementes ortodoxas maduras, são desativados à medida que os processos pós-germinativos avançam, contribuindo para o aumento da sensibilidade à dessecação.

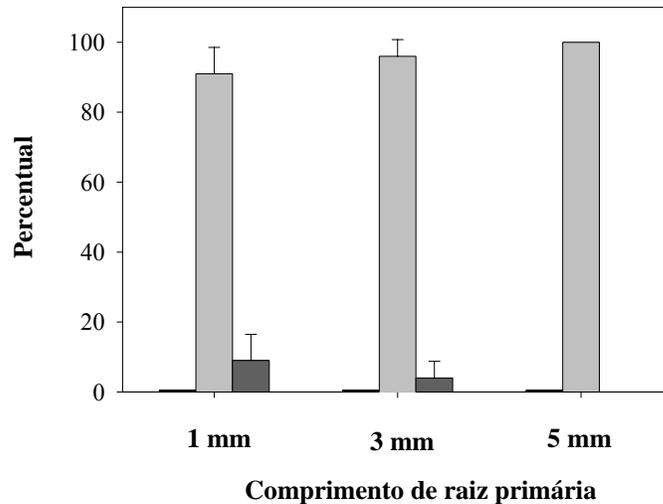


FIGURA 2 Porcentagem de sobrevivência de sementes germinadas de *Peltophorum dubium*, com diferentes comprimentos da raiz primária, submetidas à desidratação em sílica gel por 72 horas seguida por reidratação. Plântulas normais (coluna preta), Sementes germinadas mortas (coluna cinza claro) e Plântulas anormais (coluna cinza escuro).

Quando secas ao teor de água inicial, sementes com 1, 3 e 5 mm de comprimento de raiz primária mantiveram altas taxas de mortalidade (91%, 96% e 100%), demonstrando que a perda da tolerância à desidratação acontece nos estágios iniciais de germinação de sementes desta espécie. Foi observada retomada do crescimento para uma baixa porcentagem de sementes com comprimento radicular de 1 e 3 mm (9% e 4% respectivamente), entretanto estas resultaram em plântulas anormais, fato este que ratifica os danos causados pela rápida retirada de água das sementes, propiciada pela sílica gel. Para nenhum dos comprimentos da raiz primária houve a retomada do crescimento e posterior formação de plântulas normais.

Como pode ser constatado pela Figura 3, o comportamento das sementes com 1, 3 e 5 mm de comprimento de raiz primária, quando submetidas à desidratação, foi semelhante em relação ao padrão de desidratação.

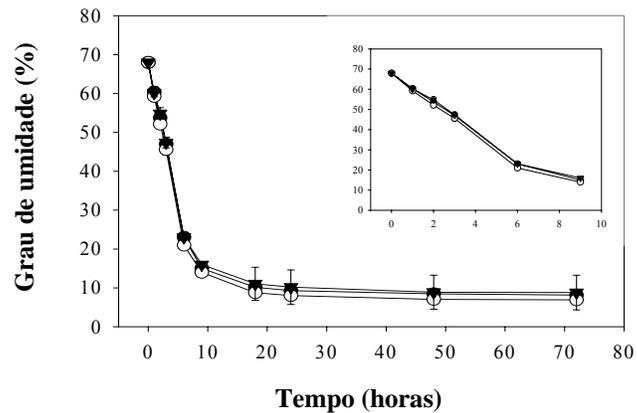


FIGURA 3 Velocidade de secagem de sementes germinadas de *Peltophorum dubium*, com diferentes comprimentos da raiz primária, em sílica gel por 72 horas. Raiz primária com 1 mm de comprimento (○), raiz primária com 3 mm de comprimento (◐) e raiz primária com 5 mm de comprimento (◑).

Como tentativa de restabelecer a tolerância à dessecação perdida em função da germinação, foram utilizados diferentes tratamentos em pré-testes (Tabela 2) constituídos pela incubação das sementes germinadas em diversas soluções, antes da secagem com sílica gel. Foram testadas soluções de Polietilenoglicol (PEG) em diferentes potenciais hídricos e de sais como cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl) e cloreto de magnésio (MgCl). Diversos autores têm mostrado a exequibilidade desta técnica (Buitink et al., 2003; Faria et al., 2005; Vieira, 2008; Masetto, 2008). As sementes foram deixadas por um período de 72 horas em cada tratamento e em cada etapa.

Entretanto, no presente trabalho, os tratamentos aplicados não foram capazes de restabelecer a TD nas sementes germinadas, uma vez que em todos os casos não houve sobrevivência após incubação nestas soluções, seguida por secagem em sílica gel e reidratação.

TABELA 2 Valores médios de parâmetros avaliados para sementes de *Pelthoporum dubium* submetidas a diferentes tratamentos para reindução da Tolerância à dessecação.

Tratamentos	Parâmetros Avaliados		
	Sobrevivência (%)	Sementes mortas (%)	Plântulas anormais (%)
PEG (-1,8 Mpa) + Sílica	0	98	2
PEG (-1,8 Mpa + fungicida) + Sílica	0	100	0
PEG (-2,12 Mpa) + Sílica	0	100	0
PEG (-2,12 Mpa + fungicida) + Sílica	0	100	0
PEG (-2,12 Mpa + fungicida) + MgCl	0	100	0
NaCl + Sílica	0	100	0
KCl + Sílica	0	100	0
PEG (-4 Mpa + fungicida) + Sílica	0	100	0

A tolerância à dessecação é um fenômeno complexo, envolvendo a interação de ajustes metabólicos e estruturais, permitindo que as células resistam a perdas consideráveis de água sem a ocorrência de prejuízos acentuados (Marcos Filho, 2005). Quando células não tolerantes à dessecação são desidratadas, algumas conseqüências são observadas: seus solutos podem ficar mais concentrados aumentando as reações químicas destrutivas; alguns solutos podem cristalizar, inicia-se a desnaturação das proteínas e a ruptura das membranas celulares (Barbedo & Bilia, 1998); conseqüências estas que podem explicar a ausência de plântulas normais nos três comprimentos de radícula, em sementes germinadas de *Peltophorum dubium* quando submetidas à secagem rápida (Figura 2).

Sabe-se que a tolerância de sementes à dessecação decresce à medida que a germinação avança, sendo inibida ou perdida geralmente a partir da protrusão radicular (Bewley & Black, 1994), podendo variar entre espécies. Como demonstrado anteriormente, sementes de *Peltophorum dubium* perderam a aptidão em reparar os danos causados pela secagem concomitantemente a protrusão radicular, indicando que a perda da tolerância à dessecação ocorreu durante a embebição. A tolerância a desidratação nesta espécie foi gradativamente perdida com a evolução do umedecimento das sementes como pode ser observado na Figura 4.

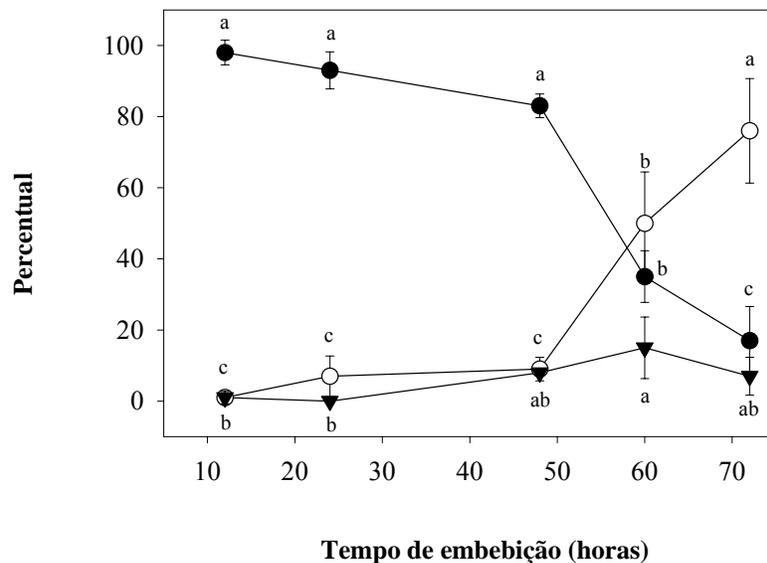


FIGURA 4 Porcentagem de sobrevivência de sementes de *Peltophorum dubium*, submetidas a diferentes períodos de embebição em água e posterior secagem em sílica gel por 72 horas. Sementes germinadas (●), Sementes mortas (○) e Formação de plântulas anormais (▼). As médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey.

Nos estágios iniciais da germinação (12 e 24 horas de embebição), a secagem aos níveis iniciais de teor de água (aproximadamente 10%) não ocasionou danos às sementes, que mantiveram os índices de sobrevivência acima de 90%. Com 48 horas, fase II de embebição, foi observada mortalidade de sementes e desenvolvimento de plântulas anormais (9% e 8% respectivamente), porém estas ainda permaneceram com valores altos de sobrevivência (83%). Segundo Bewley & Black (1994), a tolerância das sementes a reduções nos níveis de água decresce com o decorrer das Fases I e II de embebição, sendo perdida no início ou após a Fase III.

Esta afirmação corrobora com os resultados obtidos neste experimento, onde foi observado aumento significativo da mortalidade de sementes (76%) quando estas se encontravam na fronteira das Fases II e III (72 horas) de embebição. A fase intolerante se acentuou, portanto, com a aproximação da protrusão radicular e quando esta ocorreu, as sementes perderam integralmente a tolerância à desidratação, exibindo 100% de mortalidade. Diversos autores obtiveram resultados semelhantes no que se refere ao aumento da sensibilidade à dessecação durante a hidratação. Em experimentos com *Pisum sativum* (Reisdorph & Koster, 1999) e *Triticum aestivum* (Miazek et al., 2001) constatou-se redução na sobrevivência de sementes destas espécies quando submetidas à hidratação e posterior secagem.

As razões da conversão do estado de tolerância para o de sensibilidade à dessecação ainda não são integralmente esclarecidas, mas geralmente coincidem com o nível de atividade das células embrionárias, especialmente as da extremidade radicular. Em sementes em processo germinativo, em geral, a radícula é a primeira estrutura a perder a tolerância à dessecação (Buitink et al., 2003). Reisdorph & Koster (1999), estudando a perda progressiva da TD em sementes germinadas de *Pisum sativum*, encontraram maior sensibilidade na região da raiz primária, demonstrando ser esta a primeira a sofrer danos por

secagem. Assim, diversos autores obtiveram sucesso em trabalhos utilizando radículas como modelo experimental, para avaliação de alterações ocorridas durante a perda da tolerância à dessecação, dentre eles Buitink et al. (2003), Faria et al. (2005), Vieira (2008) e Masetto (2008). O alongamento da radícula dentro da semente durante a germinação é resultado tanto da expansão quanto da divisão celular (Castro & Hilhorst, 2004; Marcos Filho, 2005). Deltour & Barsy (1985) sugeriram que células são mais sensíveis ao estresse quando se encontram com seu ciclo celular ativo, ou seja, quando em processo de síntese de DNA ou de divisão celular.

Em suma, a síntese e replicação de DNA ocorrem durante a interfase e nesta fase existe um período de quiescência (G0) seguido de uma fase de crescimento e pré-síntese (G1), durante a qual os núcleos de células diplóides contêm um valor arbitrário de DNA (2C; referente à quantidade de DNA por núcleo). Posteriormente, a síntese de DNA ocorre durante a Fase S (síntese) e por último a Fase G2, que abrange núcleos com valores 4C de DNA, indicando a ocorrência de replicação de DNA em preparação para mitose (Castro & Hilhorst, 2000).

Em estudos com diferentes espécies, autores verificaram baixo índice inicial e posterior incremento significativo no número de células com conteúdo 4C no decorrer da embebição (Castro et al., 2000; Barrôco et al., 2005; Silva et al., 2008) e encontraram relação entre este evento e sensibilidade ao estresse, entretanto esta correlação ainda não está completamente esclarecida (Deltour & Barsy, 1985; Saracco et al., 1995). Deltour & Barsy (1985) supôs que as células com conteúdo 2C de DNA nuclear oferecem menor alvo para fatores indutores de mutações em relação às com conteúdo 4C.

Através das análises citométricas, realizadas em radículas de *Peltophorm dubium*, obtidas a partir de sementes embebidas por diferentes períodos, pôde ser observado alto conteúdo de núcleos 4C (aproximadamente

40%) durante o processo germinativo (Figura 5). Este resultado sugere que, ao final do desenvolvimento dois bloqueios ocorrem: um na fronteira entre a Fase G2 e Mitose e outro na Fase G1, mantendo as células com conteúdo 2C na Fase pré-sintética, como observado por Faria et al., (2005) em trabalho com sementes de *Medicago truncatula*.

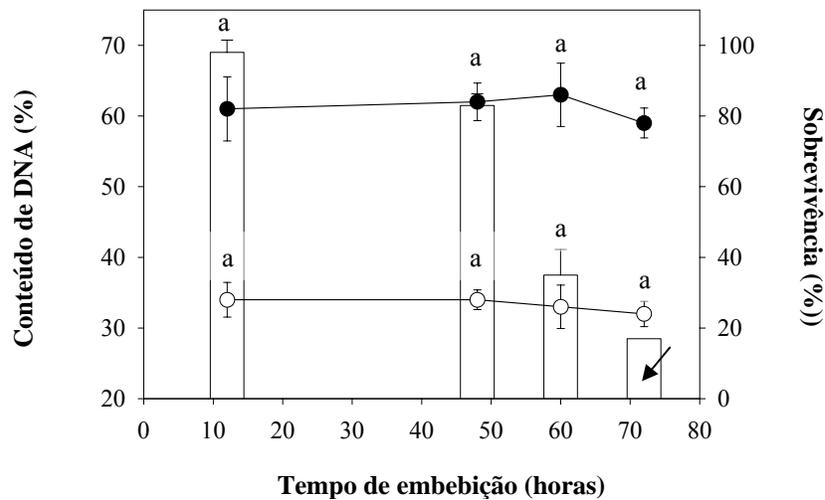


FIGURA 5 Conteúdo de DNA nuclear em radículas de sementes de *Peltophorum dubium*. Fração de células com conteúdo 2C de DNA nuclear (●), 4C (○) e sobrevivência de sementes embebidas e posteriormente secas (colunas). A seta indica o momento da protrusão radicular. As médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey.

Em relação às sementes ortodoxas, sabe-se que a maioria das células meristemáticas está “presa” na fase G1, caracterizada pela ausência de sinais que favorecem a síntese de DNA (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003). Entretanto, foi

reportada para algumas espécies, dentre elas *Medicago truncatula* (Faria et al., 2005) e *Phaseolus vulgaris* (Bino et al., 1993) elevado conteúdo 4C de DNA nuclear ao final da maturação e início da embebição. Embora tenha sido hipotetizado que células com conteúdo 4C oferecem maior alvo às possíveis mutações, e assim tornam-se mais sensíveis a estresses, dentre eles a dessecação, para algumas espécies intermediárias e recalcitrantes, como *Castanea sativa* (Bino et al., 1993), *Inga vera* (Faria et al., 2004) e *Coffea arabica* (Silva et al., 2008) foi amostrado elevado índice de núcleos com conteúdo 2C de DNA. A amplitude de resultados demonstra que o conhecimento dos eventos do ciclo celular, e sua importância para a germinação e tolerância a estresse, ainda são escassos e fragmentários, e que diferentes espécies podem ter desenvolvido mecanismos únicos de controle, adaptadas às características específicas de germinação e habitat (Bino et al., 1993; Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003; Faria et al., 2005).

Conforme citado anteriormente, em grande parte das espécies estudadas, dentre elas *Capsicum annuum* (Portis et al., 1999), *Lycopersicon esculentum* (Castro et al., 2000) e *Coffea arabica* (Silva et al., 2008) foi observado aumento significativo no número de células com conteúdo 4C durante o umedecimento das sementes, indicando que estas entraram na fase de síntese de DNA concomitantemente com a hidratação. No entanto, a embebição não provoca imediata entrada no ciclo. Em vez disso, há um atraso de até algumas horas antes da fase S tornar-se evidente (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003). A longa transição se dá provavelmente entre a fase G₀/G₁ devido à necessidade de recuperar danos celulares acumulados durante a maturação (Osborne, 1983). Contudo, para sementes de *Peltophorum dubium* não houve evidência da ocorrência da replicação de DNA durante a embebição (Figura 5), já que os níveis de 2C e 4C mantiveram-se inalterados. O histograma de citometria de

fluxo representando o conteúdo de DNA nuclear do ciclo celular pode ser visualizado na Figura 6.

Estes resultados demonstram que, sementes desta espécie, permanecem “presas” em determinadas fases do ciclo celular durante toda a embebição e que a perda da tolerância à dessecação e protrusão radicular não pode ser correlacionada ao início do ciclo celular. Faria et al. (2005), em trabalho utilizando sementes de *Medicago truncatula*, igualmente observaram protrusão radicular e perda da TD anteriormente a retomada do ciclo celular. Para sementes desta espécie também foi relatada constância nos índices de conteúdo 2C e 4C de DNA nuclear, durante e após a germinação, sendo observado incremento significativo no conteúdo 4C apenas quando as raízes primárias atingiram 3 mm de comprimento.

Embora seja usualmente afirmado que a protrusão radicular acontece concomitantemente à síntese de DNA, Górník et al. (1997) demonstraram que sementes de repolho exibem protrusão radicular mesmo após a incubação destas em hidroxauréia, um inibidor da Fase S do ciclo celular. A quantificação de DNA nuclear em células da ponta de radícula destas sementes exibiu um padrão semelhante ao das sementes secas, indicando um bloqueio total da atividade de divisão celular. Esse resultado levou à conclusão de que a replicação do DNA não é necessariamente uma condição prévia para a protrusão radicular, assim como observado no presente estudo com sementes de *Peltophorum dubium*.

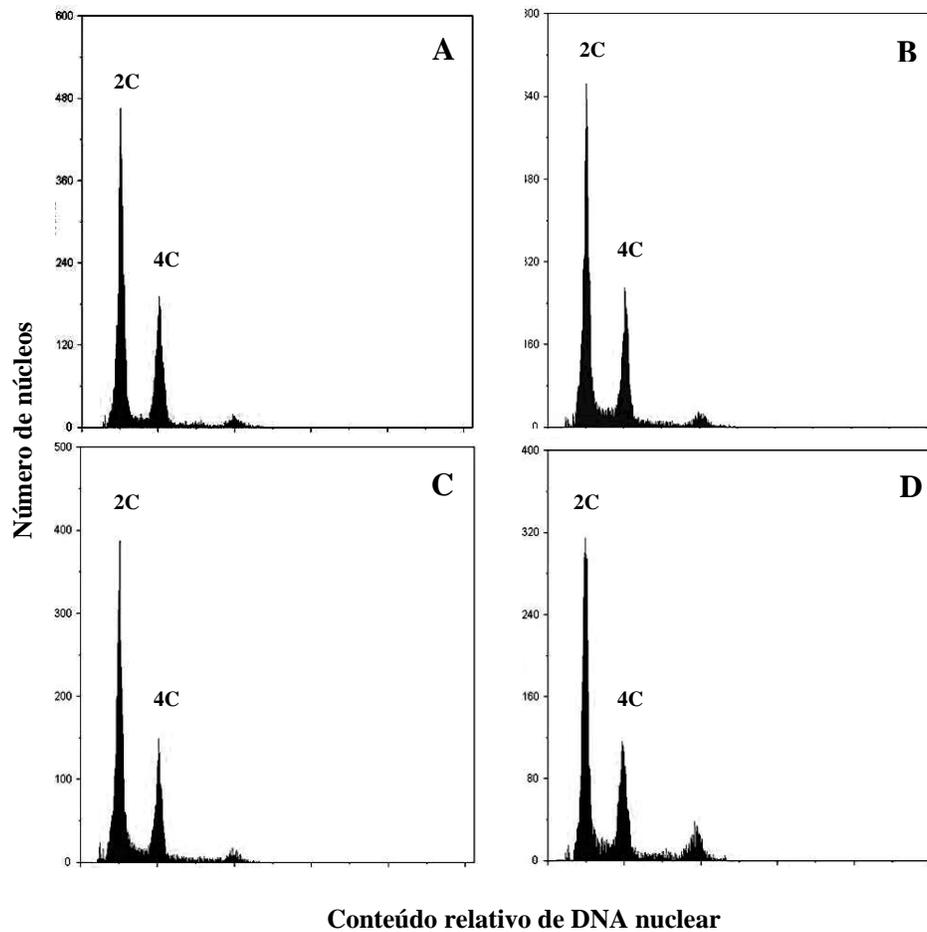


FIGURA 6 Histograma de citometria de fluxo demonstrando o conteúdo de DNA nuclear em sementes de *Peltophorum dubium* após diferentes períodos de embebição. **A.** 12 horas de embebição; **B.** 48 horas; **C.** 60 horas; **D.** Raízes primárias com 1 mm de comprimento.

6 CONCLUSÕES

Sementes de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert perdem a tolerância à dessecação (TD) nos estágios iniciais de germinação, assim como descrito para as demais espécies com comportamento ortodoxo. Em sementes de *Peltophorum dubium* foi evidenciada redução gradual da tolerância ao longo da embebição e completa perda da capacidade de sobreviver à desidratação quando observada protrusão radicular. Não foi constatada, através das análises citométricas, aumento da síntese de DNA nuclear em radículas de sementes de *Peltophorum dubium* durante e após a germinação não sendo possível, portanto, correlacionar a retomada do ciclo celular com a perda da tolerância à dessecação. Sementes desta espécie são dispersas com alto conteúdo de DNA nuclear 4C (aproximadamente 40%) e este índice permanece constante ao longo da embebição e com a protrusão radicular com 1 mm de comprimento.

7 Referências Bibliográficas

- BARBEDO, C. J.; BILIA, D. A. C. Evolution of research on recalcitrant seeds. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 55, p. 121-125, 1998. Edição especial.
- BARBEDO, C. J.; BILIA, D. A. C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 431-439, dez. 2002.
- BARRÔCO, R. M.; POUCKE, K. van; BERGERVOET, J. H. W.; LIEVEN, V. de; STEVEN, P. C.; GROOT, S. P. C.; INZE, D.; ENGLER, G. The role of the cell cycle machinery in resumption of postembryonic development. **Plant Physiology**, Washington, v. 137, n. 1, p. 127-140, 2005.
- BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **The 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.
- BIANCHETTI, A.; RAMOS, A. Quebra de dormência de sementes de canafístula *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert resultados preliminares. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 3, p. 87-95, 1981.
- BIANCHETTI, A.; RAMOS, A. Comparação de tratamentos para superar a dormência de sementes de canafístula *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 4, p. 91-99, 1982.
- BINO, R. J.; LANTERI, S.; VERHOEVEN, H. A.; KRAAK, H. L. Flow cytometric determination of nuclear replication stage in seed tissues. **Annals of Botany**, London, v. 72, n. 2, p. 181-187, 1993.
- BLACK, J. D.; PRITCHARD, H. W. **Dessiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford: CABI, 2002. 412 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNAD/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.

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

CAPELANES, T. M. C. Quebra-de-dormência em sementes florestais, em laboratório. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE TECNOLOGIA DE SEMENTES FLORESTAIS, 2., 1991, Atibaia, SP. **Anais...** São Paulo: Instituto Florestal, 1991. p. 41.

CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R.; PRAÇA, M. M.; ARAÚJO, F. S.; CARELS, N. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. **Plant Science**, Clare, v. 174, n. 6, p. 613-617, 2008.

CARVALHO, J. E. U. de; KATO, A. K.; FIGUEIRÊDO, F. J. C. **Efeito do estágio de maturação do fruto sobre a qualidade da semente do guaranazeiro**. Belém: Embrapa-CPATU, 1983. 11 p. (Circular técnica, 43).

CASTRO, R. D. de; HILHORST, H. W. M. Dormancy, germination and the cell cycle in developing and imbibing tomato seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, p. 105-136, 2000. Edição especial.

CASTRO, R. D. de; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 149-162.

CASTRO, R. D. de; LAMMEREN, A. A. M. van; GROOT, S. P. C.; BINO, R. J.; HILHORST, H. W. M. Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. **Plant Physiology**, Washington, v. 122, n. 2, p. 327-335, 2000.

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

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; HOEKSTRA, F. A. Phase transitions and permeability changes in dry membranes during rehydration. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 21, n. 1, p. 77-91, 1989.

DELTOUR, R.; BARSY, T. Nuclear activation during early germination of the higher plant embryo. **Journal of Cell Science**, London, v. 75, n. 1, p. 43-83, 1985.

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

FARIA, J. M. R.; BUITINK, J.; LAMMEREN, A. A. M. V.; 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, 2005.

FARIA, J. M. R.; LAMMEREN, A. A. M. V.; HILHORST, H. W. M. Desiccation sensitivity and cell cycle aspects in seeds of *Inga vera* subsp. affinis. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, n. 2, p. 165-178, 2004.

FIGLIOLIA, M. B.; SILVA, A. Germinação de sementes beneficiadas e não beneficiadas de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert. em laboratório e viveiro sob tratamentos pré-germinativos. **Silvicultura em São Paulo**, São Paulo, v. 16A, pt. 2, p. 908-916, 1982. Trabalho apresentado no II Congresso nacional sobre essências nativas realizado em Campos do Jordão, em 1982.

GÓRNIK, K.; CASTRO, R. D. de; LIU, Y.; BINO, R. J.; GROOT, S. P. C. Inhibition of cell division during cabbage (*Brassica oleracea* L.) seed germination. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 7, n. 4, p. 333-340, 1997.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 55 p.

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

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

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

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Maidson, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

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

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

MIAZEK, A.; BOGDAN, J.; ZAGDANSKA, B. Effects of water deficit during germination of wheat seeds. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 44, n. 3, p. 397-403, 2001.

OLIVEIRA, L. M.; DAVIDE, A. C.; CARVALHO, M. L. M. Avaliação de métodos para quebra de dormência e para desinfecção de sementes de canafístula *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 27, n. 5, p. 1-8, 2003.

OSBORNE, D. J. Biochemical control systems operating in the early hours of germination. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 61, n. 12, p. 3568-3577, 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. 344-364.

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, 1999.

PEREZ, S. C. J. G. A.; FANTI, S. C.; CASALI, C. A. Influência do armazenamento, substrato, envelhecimento precoce e profundidade de semeadura na germinação de canafístula. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 1, p. 57-68, 1999.

PORTIS, E.; MARZACHÌ, C.; QUAGLIOTTI, L.; LANTERI, S. Molecular and physiological markers during seed development of peppers (*Capsicum annuum* L.): DNA replication and b-tubulin synthesis. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 1, p. 85-90, 1999.

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

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 2, p. 499-514, 1973.

SARACCO, F.; BINO, R. J.; BERGERVOET, J. H. W.; LANTERI, S. Influence of priming-induced nuclear replication activity on storability of pepper (*Capsicum annuum L.*) seed. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 5, n. 1, p. 25-29, 1995.

SILVA, E. A. A.; TOOROP, P. E.; LAMMEREN, A. A. M. van; HILHORST, H. W. M. ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* 'Rubi') seed germination. **Annals of Botany**, v. 102, n. 3, London, p. 1-9, 2008.

SUN, W. Q. Desiccation sensitivity of recalcitrant seeds and germinated orthodox seeds: can germinated orthodox seeds serve as a model system for studies of recalcitrance? In: MARZALINA, M.; KHOO, K. C.; JAYANTHI, N.; TSAN, F. Y.; KRISHNAPILLAY, B. (Ed.). **IUFRO seed symposium "recalcitrant seeds"**. Kuala Lumpur: Forest Research Institute of Malasya, 1999. p. 29-42.

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

VERTUCCI, C. W.; ROOS, E. E. Theoretical basis of protocols for seed storage. **Plant Physiology**, Washington, v. 94, n. 3, p. 1019-1023, 1990.

VIEIRA, C. V. **Germinação e re-indução de tolerância a dessecação em sementes germinadas de *Tabebuia impetiginosa***. 2008. 98 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

YANPAISAN, W.; NICHOLAS, J.; KING, G.; DORAN, P. M. Flow cytometry of plant cells with applications in large scale bioprocessing. **Biotechnology Advances**, New York, v. 17, n. 1, p. 3-27, 1999.

CAPÍTULO 3

MUDANÇAS ULTRAESTRUTURAIS E INTEGRIDADE DO DNA GENÔMICO EM SEMENTES GERMINADAS DE *Peltophorum dubium* SUBMETIDAS À SECAGEM

1 Resumo

Os danos fisiológicos provocados pela secagem podem advir de alterações nos sistemas subcelulares e da degradação do DNA genômico. A tolerância à dessecação (TD) no embrião de sementes depende da capacidade de reparação dos danos ao DNA e das estruturas celulares, quando o embrião é desidratado e posteriormente reidratado. Sabendo-se que os estudos destes aspectos são de fundamental importância para a compreensão dos mecanismos de tolerância e sensibilidade à dessecação, objetivou-se com esse trabalho avaliar a integridade do DNA e identificar mudanças ultra-estruturais em raiz primária de sementes de *Peltophorum dubium* submetidas a secagens a diferentes níveis. Para tanto, sementes foram posta a germinar e ao atingirem 1 mm de comprimento da raiz primária (68% de umidade), foram desidratadas em sílica gel, até atingirem diferentes graus de umidade (59%, 50%, 38%, 32%, 20% e 8%), sendo em seguida reidratadas e avaliadas quanto à sobrevivência (retomada do crescimento e formação de plântulas normais). Após esse procedimento foram selecionados diferentes pontos de interesse (controle, 20% e 10% de umidade) para avaliação da integridade do DNA e da ultraestrutura celular no intuito de detectar possíveis mudanças celulares nas raízes primárias após estas serem desidratadas. A secagem a 32% de umidade não influenciou a retomada do crescimento das sementes germinadas que mantiveram 100% de sobrevivência. Ao serem desidratadas a 20% de umidade, a sobrevivência foi reduzida a 67% e, quando secas a 8% de umidade, concorreu para nulidade na sobrevivência. Pela avaliação de mudanças ultraestruturais em células da raiz primária observou-se que a secagem a aproximadamente 20% de umidade marcou o início dos danos por dessecação, tanto fisiológica quanto ultraestruturalmente. Secagem a níveis próximos a 10% de umidade concorreu não somente para total desconfiguração e ruptura das membranas como também promoveu colapso intracelular. Foi observada perda da integridade do DNA genômico no decorrer da secagem.

Palavras chaves: Tolerância á dessecação, alterações celulares, danos ao DNA.

2 Abstract

Physiological damages caused by drying may be caused by changes in subcellular systems and the degradation of genomic DNA. Desiccation tolerance (DT) in embryos of seeds depends on cellular structures and the ability to repair damages to DNA, when embryos are dehydrated and subsequently rehydrated. In order to better understand some of the mechanisms involved in desiccation tolerance and sensitivity, the aim of this study was to assess the DNA integrity and to identify ultrastructural changes in radicles of germinating seeds of *Peltophorum dubium* submitted to different levels of drying. Seeds were put to germinate and when the radicle length reached 1 mm (68% of water content), they were dehydrated in silica gel up to different rates of moisture content (approximately 59%, 50%, 38%, 32%, 20% and 8%), and then rehydrated and assessed by the survival (resumption of growth and development of normal seedlings). After that, different points of interest were selected (control, 20% and 10% of water content) to assess the DNA integrity and the cellular ultrastructure, in order to detect possible cellular changes in radicles after dehydration. The drying up to 32% of moisture content did not affect the resumption of growth of germinating seeds, whose survival maintained 100%. The dehydration of seeds up to 20% of moisture content caused a decrease in survival, 67%, and when they were dried up to 8% of moisture content, there was nullity on survival. By the assessment of ultrastructural changes in radicle cells it was observed that the drying up to approximately 20% of water content pointed the beginning of desiccation damages. The dehydration up to 10% of water content caused not only the disintegration and collapse of membranes, but also the intracellular breakdown. It was observed loss of DNA integrity during the drying.

Keywords: Desiccation tolerance, cellular changes, damages to DNA.

3 Introdução

Estudos básicos relacionados ao comportamento de sementes florestais são imprescindíveis para o desenvolvimento de metodologias adequadas de utilização e conservação desse material. A escassez de informações sobre a manutenção da qualidade fisiológica durante a conservação dessas sementes é um fator limitante quando se visa à obtenção de um estoque regular de sementes (Garcia & Nogueira, 2008).

Porém, a falta de habilidade para sobreviver após a desidratação (processo essencial no armazenamento), observado em sementes de algumas espécies, é um entrave aos programas de conservação. O baixo teor de água das sementes, além de limitar a germinação é fundamental para reduzir a deterioração das mesmas.

Quanto ao comportamento das sementes, no que se refere à secagem e ao armazenamento, pode-se classificá-las em duas categorias distintas. Sementes ortodoxas são tolerantes à dessecação e ao armazenamento sob baixas temperaturas. As sementes recalcitrantes, de comportamento diferenciado, tendem a perder a viabilidade com a redução do grau de umidade (Roberts, 1973); além disso, sendo suscetíveis à injúria por resfriamento quando submetidas a armazenamento a 10-15°C (Chin, 1988). Uma terceira categoria de sementes, denominada “intermediária” foi proposta por Ellis et al. (1990). Tais sementes se caracterizam pelo comportamento intermediário pós-dispersão, isto é, são relativamente tolerantes à dessecação, mas não suportam a remoção de água a níveis tão baixos quanto às sementes ortodoxas.

O fenômeno de tolerância à dessecação em qualquer sistema pode ser avaliado pela extensão da sobrevivência das células durante a reidratação. Quanto mais mecanismos de proteção dispostos para a célula durante o processo de desidratação, maior será a manutenção da integridade da informação genética.

Mundree & Farrant (2000), com base em estudos de tolerância à dessecação em sementes, sugerem algumas conseqüências fisiológicas, bioquímicas e anatômicas normalmente esperadas em tecidos vivos submetidos a estresse, que devem ser resolvidos para que a tolerância à dessecação seja assegurada: 1) estresse mecânico associado com a redução do volume celular; 2) estresse oxidativo provocado pela produção de radicais livres como conseqüência de um metabolismo desregulado; 3) ruptura de membranas e integridade macromolecular devido à perda de água associada às estruturas celulares.

A sensibilidade à dessecação limita a conservação *ex situ* de mais de 47% das espécies vegetais (Daws et al., 2006), informação esta que enfatiza a importância de estudos desta natureza.

Entretanto, as pesquisas com sementes recalcitrantes enfrentam uma série de obstáculos, sendo o principal deles o limitado período de disponibilidade de sementes viáveis. Assim, tem-se observado um lento progresso no estudo da recalcitrância. Diante disso, o uso de sementes ortodoxas em germinação, ou germinadas, surgiu como uma importante ferramenta no estudo da sensibilidade à dessecação, já que, com a germinação, essas sementes perdem progressivamente a tolerância à dessecação, passando a se comportar como as recalcitrantes (Sun, 1999).

O entendimento dos eventos celulares que ocorrem durante a perda da tolerância à dessecação em sementes germinadas, por meio de técnicas largamente utilizadas em estudos em biologia celular, tais como, avaliação da integridade do DNA, por eletroforese, e da ultraestrutura, através da microscopia eletrônica de transmissão, pode ampliar o conhecimento sobre o assunto (Masseto, 2008). Foi reportado que a tolerância à dessecação no embrião de sementes depende da capacidade de reparação dos danos ao DNA genômico, quando o embrião é desidratado e posteriormente reidratado (Osborne & Boubriak, 1994). Assim, a manutenção da integridade do material genético, à

medida que a semente é hidratada, é um requisito prioritário para a tolerância à dessecação, sendo portanto, a degradação do DNA considerado um importante marcador para morte em células vegetais (McCabe & Leaver, 2000; Marcos Filho, 2005). Estudos de ultra-estrutura conduzidos durante os últimos anos contribuíram para a compreensão das diferentes respostas à secagem apresentadas por sementes recalcitrantes e ortodoxas. Membranas das organelas celulares, o citoesqueleto e o núcleo esquelético são essenciais para o perfeito funcionamento da célula, danos a essas estruturas durante a secagem podem levar à perda de viabilidade (Berjak & Pammenter, 2000).

A espécie em estudo, *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert pertence à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae. É uma espécie arbórea nativa do Brasil conhecida popularmente como canafístula, tamboril-bravo, guarucaia, angico-amarelo, dentre outros. Ocorre naturalmente na Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais e do Mato Grosso do Sul até o Paraná (Lorenzi, 1992). Suas sementes são ortodoxas e, portanto, quando germinadas podem ser utilizadas como ferramenta para o estudo da sensibilidade à dessecação.

Desta forma, objetivou-se, com a realização deste trabalho, a avaliação da integridade do DNA e a identificação de mudanças ultra-estruturais em raízes primárias com 1 mm de comprimento, estágio em que foi verificada a perda da tolerância à dessecação, em sementes germinadas de *Peltophorum dubium* submetidas a secagens progressivas. Estudos desta natureza visam subsidiar pesquisas destinadas a ampliar a longevidade de sementes recalcitrantes durante o armazenamento.

4 Material e Métodos

4.1 Material vegetal

A coleta dos frutos maduros foi realizada em árvores no Campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, sendo as sementes beneficiadas no Viveiro Florestal da mesma Universidade. O beneficiamento foi realizado manualmente, com a quebra dos frutos e uso de peneiras para separação das sementes. Após este processo, a retirada de impurezas presentes na amostra foi realizada com sopradores tipo South Dakota e General.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Sementes Florestais do Departamento de Ciências Florestais da UFLA.

4.2 Determinação do grau de umidade

O grau de umidade das sementes foi determinado pelo método da estufa a $103 \pm 3^\circ\text{C}$, por 17 horas (Brasil, 1992), com 4 repetições de 10 sementes por tratamento. O cálculo foi feito na base úmida, sendo o grau de umidade expresso em porcentagem.

4.3 Quebra de dormência

O tratamento pré-germinativo utilizado para quebra de dormência tegumentar foi realizado por meio de imersão das sementes em água quente (96°C) e deixadas em repouso na mesma água, fora do aquecimento, por 24 horas, à temperatura ambiente (Oliveira et al., 2003).

4.4 Germinação

Previamente aos ensaios de germinação as sementes foram lavadas em solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por 10 minutos, fazendo-se

posteriormente a lavagem em água corrente por um minuto, no intuito de reduzir a proliferação de fungos.

Após a quebra de dormência tegumentar, e posterior desinfecção das sementes, as mesmas foram postas a germinar sobre papel (Perez et al., 1999), umedecido com água destilada até a saturação (Brasil, 1992), em bandejas plásticas e germinadores (Marconi tipo MA 400) a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas.

4.5 Avaliação da perda da tolerância à dessecação após a germinação

Sementes germinadas, com raiz primária de 1 mm de comprimento foram amostradas para este ensaio, em quatro repetições de 20 sementes para cada um dos seguintes tratamentos: secagem a 59%, 50%, 38%, 32%, 20% e 8% de umidade.

Para alcançar esses graus de umidade, a desidratação foi feita em caixas plásticas tipo gerbox, vedadas com filme plástico, com as sementes sobre um telado e uma camada de sílica gel ao fundo, a 20°C no escuro. Durante a desidratação foram realizadas pesagens sucessivas até que o peso encontrado coincidissem com o peso desejado, correspondente ao grau de umidade desejado, por meio da expressão proposta por Cromarty et al.(1985).

$M_f = M_i (100 - U_i) \times (100 - U_f)^{-1}$, onde:

M_f = massa da amostra (g) após a secagem;

M_i = massa da amostra (g) antes da secagem;

U_i = grau de umidade (%) antes da secagem;

U_f = grau de umidade (%) desejado após a secagem.

Após a desidratação, as sementes foram pré-umedecidas em ar úmido (100% UR) por 24 horas a 25°C, no intuito de prevenir possíveis danos causados

pela rápida embebição (Crowe et al., 1989), e posteriormente colocadas nas mesmas condições usadas para germinação. As sementes germinadas que continuaram seu desenvolvimento e formaram plântulas normais foram consideradas tolerantes à dessecação.

4.6 Avaliação da integridade do DNA

A partir dos dados de sobrevivência, obtidos após a avaliação da perda da tolerância à dessecação, foram selecionados diferentes pontos de interesse para avaliação da integridade do DNA sendo eles: 68% (controle), 20% e 8% de grau de umidade.

A extração de DNA foi realizada a partir de raízes primárias com 1 mm de comprimento após serem submetidas à secagem, sendo utilizadas aproximadamente 150 raízes divididas em 3 repetições por tratamento.

A extração do DNA foi realizada a partir do protocolo CTAB, modificado, de microextração de DNA genômico (Ferreira & Grattapaglia, 1995). As raízes primárias de *Peltophorum dubium* foram maceradas em nitrogênio líquido até se reduzirem a pó e aproximadamente 1g de material foi transferido para um microtubo de 1,5ml. Para cada amostra foram adicionados 800µl de tampão de extração CTAB com 1,5µl de β-mercaptoetanol e estes permaneceram aquecidos em banho-maria a 65°C durante 1 hora.

Os tubos foram retirados do banho-maria e permaneceram resfriando por cinco minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a primeira extração adicionando 600µl de solvente orgânico (clorofórmio-álcool isoamílico) e agitando levemente por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 12000rpm em temperatura ambiente, sendo o sobrenadante em seguida transferido para novo tubo, onde foram adicionados 600µl de clorofórmio e novamente os tubos foram agitados por 10 minutos e centrifugados por 5 minutos à temperatura ambiente. A fase aquosa foi

transferida para um novo tubo, adicionando-se 90µl de acetato de sódio (pH 4,6) e 900µl de isopropanol gelado. As amostras foram incubadas durante 30 minutos à -20°C sendo em seguida centrifugadas por 3 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 300µl de etanol 70% gelado, agitando levemente, os tubos foram centrifugados durante 3 minutos e o sobrenadante descartado. O pelete foi seco em câmara de fluxo laminar por 2 horas, ressuspendido em 50µl de tampão TE (pH 8,0) e armazenado a 5°C.

A integridade do DNA foi analisada em gel de agarose 1% (2g de agarose, 200 ml de tampão TAE 1% e 4µl de brometo de etídio). O total de amostra aplicada em cada canaleta foi de 15µl, sendo utilizado 3µl de Bromofenol, quantidade de DNA em µl variável (devido à necessidade de padronização da intensidade das bandas) e água pura quando necessário para completar o total da amostra. Estas foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese por 40 minutos a 100W, sendo as imagens registradas. O DNA genômico foi quantificado em Nanodrop (Spectrophotometer ND 1000).

4.7 Análise da morfologia celular por meio de microscopia eletrônica de transmissão

A partir dos dados de sobrevivência, obtidos após a avaliação da perda da tolerância à dessecação, foram selecionados diferentes pontos de interesse para avaliação de possíveis mudanças ultra-estruturais em raízes primárias de *Peltophorum dubium* com 1 mm de comprimento, sendo eles: 68% (controle), 20% e 8% de grau de umidade.

Foram analisadas cinco raízes primárias por tratamento, sendo as mesmas fixadas em solução Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5%; formaldeído 2% em um tampão sódio cacodilato 0,05M; CaCl₂ 0,001M, pH 7,2). As amostras foram lavadas três vezes (10 minutos cada) com o tampão cacodilato 0,05M e após serem fixadas em uma solução aquosa de tetróxido de

ósio 1% por 2 horas a temperatura ambiente, foram lavadas em água ultra pura durante 15 minutos.

Posteriormente, as amostras foram coloridas em acetato de uranila (0,5%) por 12 horas a 4°C e desidratadas em uma gradativa de acetona (25, 50, 75, 90 e 100% três vezes). Em seguida o material foi incluído em gradiente crescente de Spurr/acetona 30%/8h; 70%/12h e 100% duas vezes por 24 h cada, sendo que os espécimes foram montados em moldes e colocados para polimerizar em estufa a 70°C por 48h. Os cortes foram realizados com o ultramicrotomo Reichart-Jung, cuja lâmina de diamante permitiu seccionar os tecidos com espessura inferior a 100nm, que foram coloridos com acetato de uranila seguido por citrato de chumbo (3 minutos cada). As imagens das células do meristema radicular foram capturadas com microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) a 80 kV. As atividades citadas neste item foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

5 Resultados e Discussão

Sementes de *Peltophorum dubium* germinam com grande facilidade e rapidez, apresentando cerca de 90% de plântulas normais quando submetidas a tratamento pré-germinativo adequado (Tabela 1). Quando realizada a quebra de dormência tegumentar, por meio de imersão das sementes em água quente (96°C) e posterior repouso em mesma água, fora do aquecimento, por 24 horas, foi observada protrusão radicular em grande parte das sementes em 72 horas. Diante do exposto e, considerando-se que a espécie possui comportamento ortodoxo no que se refere ao armazenamento, esta pode ser considerada uma interessante ferramenta para estudos relacionados à tolerância à dessecação (TD).

TABELA 1 Valores médios de parâmetros avaliados em sementes de *Peltophorum dubium* submetidas ou não a tratamento pré-germinativo.

Tratamentos	Parâmetros avaliados			
	Germinação (%)	Sementes mortas (%)	Sementes dormentes (%)	IVG
Com quebra de dormência	93 a	7 a	0 b	8,61 a
Sem quebra de dormência	6 b	0 a	94 a	0,38 b

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey em nível de de 5% de probabilidade.

Com o intuito de avaliar o processo gradativo de perda da TD em sementes germinadas de *Peltophorum dubium*, afim de posteriormente utilizá-las como modelo para estudos referentes aos aspectos moleculares envolvidos neste processo, estas foram analisadas quanto à sobrevivência após a remoção gradual de água. Os resultados estão dispostos na Figura 1.

Um decréscimo na sobrevivência foi observado à medida que o grau de umidade das sementes foi reduzido (Figura 1). É possível observar que a porcentagem de sobrevivência (formação de plântulas normais após a reidratação) não foi afetada quando as mesmas foram dessecadas a aproximadamente 30% de umidade. No entanto, a secagem a graus de umidade abaixo deste valor (20%) provocou redução na sobrevivência e, quando desidratadas aos níveis iniciais de hidratação (8%), houve nulidade nestes valores. Resultados semelhantes foram encontrados por Nascimento et al. (2005) e Kohoma et al. (2006) ao verificar os efeitos da redução nos níveis de água em sementes de *Eutерpe oleracea* e *Eugenia brasiliensis*, respectivamente.

Existem evidências de vários mecanismos, como a presença de açúcares solúveis, enzimas, antioxidantes e proteínas específicas na aquisição e manutenção da tolerância à dessecação em sementes, conferindo proteção contra as consequências da perda de água, em diferentes níveis de hidratação. Apesar de ser determinada geneticamente, a presença destes mecanismos pode ser intensificada ou reduzida de acordo com a taxa de secagem ou com o ambiente no qual a semente se desenvolveu (Guimarães, 1999).

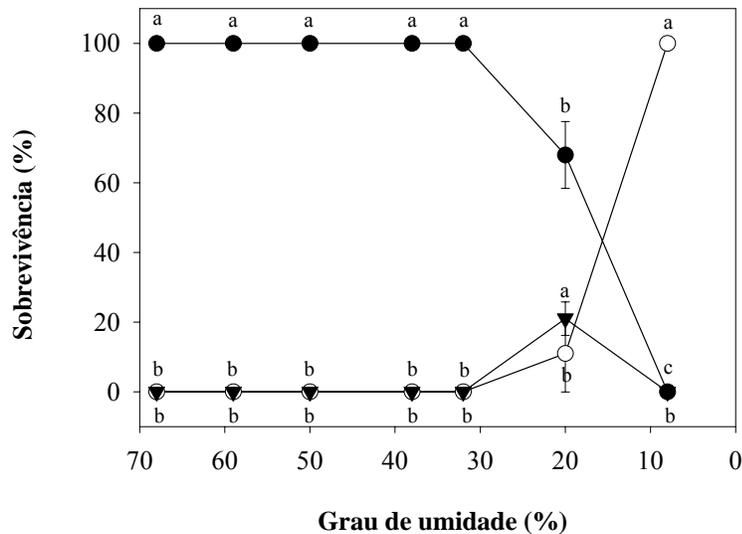


FIGURA 1 Comportamento de sementes germinadas de *Peltophorum dubium* quando submetidas a diferentes níveis de secagem e posterior reidratação. Sementes que retomaram o crescimento e originaram plântulas normais (●); sementes que não retomaram o crescimento (○) e sementes que retomaram o crescimento mas não originaram plântulas anormais (▼). Médias seguidas pela mesma letra em cada curva não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey.

Walters (2000) considerou que, para tolerar a desidratação, a semente necessita de diferentes sistemas de proteção a cada nível de remoção de água e, dessa forma, teria seu grau de tolerância condicionado ao tipo de água removida em cada etapa e a presença desses sistemas. Segundo Vertucci & Farrant (1995), os teores entre 10% e 20%, que representam teores letais de água para grande parte das espécies com sementes recalcitrantes, caracterizam a água ligada a sítios hidrofílicos, e não ocorre mais síntese de proteínas e de ácidos nucleicos. Esta afirmação corrobora com dados obtidos neste estudo, onde a secagem de

sementes germinadas de *Peltophorum dubium* a 20% de umidade e posterior reidratação provocou queda significativa na porcentagem de sobrevivência (68%) (Figura 1), aumento no número de plântulas anormais (21%) e na mortalidade (11%) de sementes de *Peltophorum dubium* (Figura 1).

Inúmeros fatores abióticos e bióticos exercem efeitos diretos e indiretos sobre a germinação e sobrevivência de sementes. Dentre estes fatores podem-se destacar os procedimentos adotados durante a secagem (Marcos Filho, 2005). Conforme sugerido por Baudet et al. (1999), a secagem é considerada como um processo fundamental da tecnologia para produção de sementes de alta qualidade pois permite a redução do teor de água a níveis adequados para o armazenamento, preserva as sementes de alterações físicas e químicas induzidas pelo excesso de umidade e torna possível a manutenção da qualidade inicial durante o armazenamento. Entretanto, quando conduzida de forma errônea, pode concorrer para redução da qualidade das sementes, o que torna necessário que esta seja realizada com os devidos cuidados, sem promover distúrbios às mesmas (Junior & Corrêa, 2000; Marcos Filho, 2005).

Sabe-se que a água tem participação decisiva nas reações enzimáticas, na solubilização e transporte de metabólitos, como reagente na digestão hidrolítica de tecidos de reserva da semente (Bradford, 1995) e que há ampla variação no limite de tolerância a redução dos níveis de água entre famílias, gêneros e espécies. Walters (2000) denominou como “grau de umidade crítico” o limite até o qual as macromoléculas e os tecidos das sementes podem ser desidratados sem a ocorrência de danos irreparáveis; e como “grau de umidade letal” a causa da perda integral da viabilidade da semente.

Conforme demonstrado em inúmeros experimentos, sabe-se que a extensão dos danos provocados pela remoção de água depende de diversos fatores como a temperatura e a taxa de secagem (Junior & Corrêa, 2000; Andrade et al., 2005), o estágio de desenvolvimento (Guimarães et al., 2002),

expressão dos mecanismos de proteção (Boubriak et al., 1997), dentre outros. Assim, torna-se de extrema importância ampliar os estudos relacionados à sensibilidade/tolerância a dessecação para que técnicas apropriadas sejam empregadas no intuito de minimizar os danos causados pela dessecação em sementes. Impactos estes de considerável relevância, já que a secagem pode causar danos irreversíveis responsáveis pela alta mortalidade das sementes, como foi observado neste trabalho, onde a desidratação ao teor de água inicial (próximo a 8%) ocasionou nulidade na sobrevivência de sementes germinadas de *Peltophorum dubium*.

A partir dos resultados demonstrados na Figura 1, foram selecionados diferentes e representativos níveis de TD para posterior observação de possíveis danos ultra-estruturais e da integridade do DNA genômico após a secagem. Os referidos estágios de TD foram amostrados considerando-se o percentual de sobrevivência das sementes sendo eles: sementes germinadas (grau de umidade correspondente a 68% e sobrevivência de 100%), sementes secas a 20% de umidade (67% de sobrevivência) e sementes secas aos níveis iniciais de umidade (8% de umidade e nulidade na sobrevivência).

É notório que diferentes estruturas da semente não perdem a tolerância à dessecação simultaneamente, sendo observada maior sensibilidade na região da raiz primária (Reisdorph & Koster, 1999; Faria et al., 2005). Portanto, radículas são seguramente utilizadas como modelo experimental, para avaliação de alterações ocorridas durante a perda da TD (Deltour & Barsy, 1985; Faria et al., 2005; Vieira, 2008; Masseto, 2008). Os danos fisiológicos provocados pela secagem podem refletir-se em alterações nos sistemas subcelulares e estas podem ser observadas através de análises ultraestruturais, que durante os últimos anos contribuíram para a compreensão das diferentes respostas à secagem apresentadas por sementes recalcitrantes e ortodoxas (Berjak & Pammenter, 2000).

Análises microscópicas efetuadas em raízes primárias de *Peltophorum dubium* com 1 mm de comprimento e graus de umidade de 68, 20 e 8%, elucidam que a transição do estágio de tolerância para sensibilidade à dessecação foi acompanhada por mudanças físicas e estruturais nas células.

Evidenciado na Figura 2A, as estruturas visualizadas em sementes não submetidas à secagem indicam metabolismo ativo. A integridade destas estruturas é de extrema importância para o funcionamento celular e naturalmente essencial para a sobrevivência e crescimento das plântulas. Danos ultraestruturais podem concorrer para redução da capacidade germinativa e consequente aumento, parcial ou total, na mortalidade das sementes.

Raízes primárias não desidratadas de *Peltophorum dubium* aparentaram mitocôndrias diferenciadas, comprovado pela presença de pequenas cristas (Figura 2B e 2C). O número e grau de desenvolvimento destas estruturas estão correlacionado à elevada taxa metabólica (Berjak & Pammenter, 2000). Núcleos proeminentes (Figura 2A), retículo endoplasmático (Figura 3D), integridade da parede celular (Figura 2A, 2B e 2C) e pequeno grau de vacuolização (Figura 2B) foram observados no meristema radicular. Abundâncias de polissomos, detectados através das análises ultraestruturais, são indicativos de alta taxa de síntese protéica (Berjak & Pammenter, 2000). Nas proximidades do plasmalema (Figura 2C), igualmente íntegro e unido à parede celular, foi detectada a presença de grãos de lipídios alinhados (Figura 2C). Padrão similar foi descrito por Cordova-Tellez & Burris (2002), em estudos com sementes de *Zea mays*. Estes autores relataram que o alinhamento dos corpos lipídicos ao longo da membrana plasmática pode reduzir a superfície celular exposta à perda de água, resultando em alterações nas relações hídricas entre as células e, consequentemente, em desidratação mais organizada durante o processo de secagem das sementes.

A integridade da membrana plasmática é considerada essencial para manutenção da viabilidade de sementes. A mesma mantém a integridade celular e delimita a fronteira entre os meios intracelular e extracelular, constituindo uma barreira seletiva, através da qual se processam trocas de substâncias e energia entre a célula e o meio exterior. A membrana celular funciona também como um sensor, permitindo à célula modificar-se em resposta a diversos estímulos ambientais. Entretanto, com a secagem estas sofrem um processo de desorganização estrutural, estando tanto mais desorganizadas, quanto menor for o grau de umidade das sementes e, conseqüentemente, verifica-se um grau maior de lixiviação de eletrólitos do interior das células para o meio externo, descontrolo de trocas hídricas e completa descompartimentalização celular (Bewley & Black, 1985; Corrêa & Júnior, 1994; Santos et al., 2004). Numerosos fatores contribuem para a TD em sementes, incluindo o acúmulo de açúcares que estabilizam membranas. Estas são consideradas particularmente vulneráveis às transformações físicas que acompanham a desidratação e reidratação e são, portanto, sítios primários das lesões ocorridas em células sensíveis à dessecação (Bryant et al., 2001).

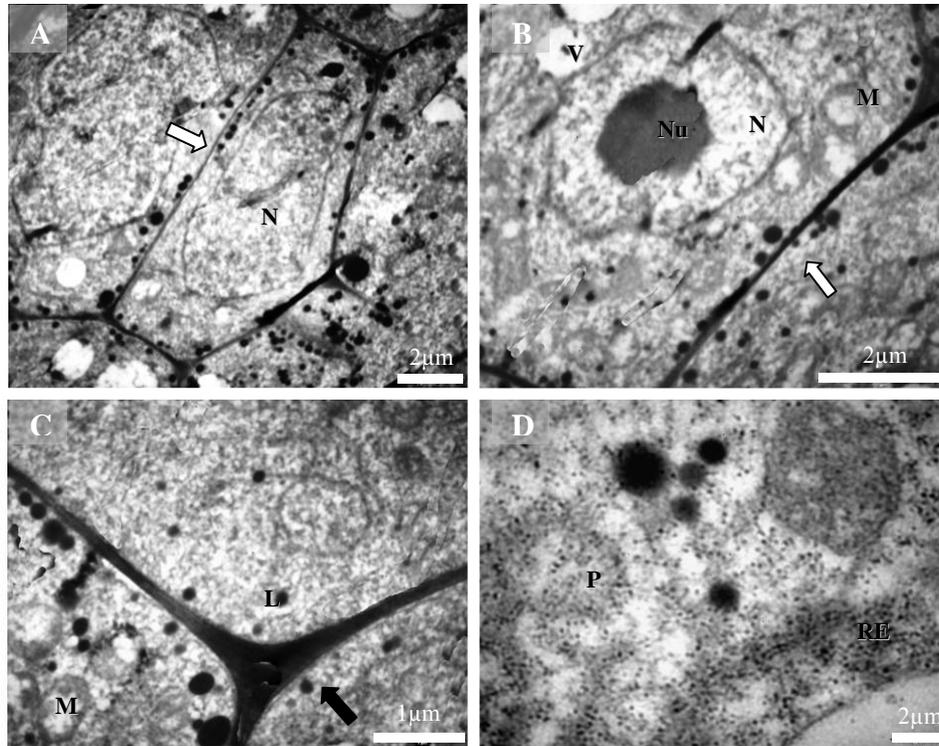


FIGURA 2 Aspecto celular do meristema radicular de sementes de *Peltophorum dubium* íntegras e metabolicamente ativas, avaliadas através de microscopia eletrônica de transmissão. As células apresentam estruturas compatíveis com a normalidade funcional celular. **A.** Célula intacta, perfeitamente delimitada por parede celular (seta clara) e núcleo proeminente (N); **B.** Presença de pequenos vacúolos (V), nucléolo arredondado (Nu), núcleo distinto (N), mitocôndrias diferenciadas (M), parede celular intacta (seta) e organização celular; **C.** Mitocôndrias diferenciadas (M), corpos lipídicos (L), integridade da membrana plasmática (seta escura) e ausência de espaço intracelular; **D.** Retículo endoplasmático (RE) e abundância de polissomos (P).

Os dados sugerem que secagem a teores de água de aproximadamente 20% marcou o início dos danos por dessecação tanto fisiológica quanto

ultraestruturalmente. Estes ficaram evidentes em algumas estruturas, em particular as paredes celulares que apresentaram atípica aparência ondulada, considerada indicativo de estresse hídrico prolongado das sementes (Figura 3A; 3B). Contudo, uma pequena mudança na permeabilidade da membrana não necessariamente resulta em perda da viabilidade. A morte do tecido resulta quando uma porção crítica de células perde a integridade da membrana (Leprince et al, 1999). Esta afirmação ratifica a sobrevivência de 67% das sementes de *Peltophorum dubium*, quando secas a 20% de umidade, mesmo quando observadas determinadas anormalidades ultraestruturais.

Houve dilatação e confluência dos vacúolos (Figura 3C), provavelmente devido à autofagia, onde componentes citoplasmáticos seriamente danificados são removidos e quebrados dentro dos mesmos (Berjak & Pammenter, 2000; Corbineau et al., 2004), entretanto estes permaneceram intactos sem extravasamento do conteúdo interno. Outras indicações de estresse foram a regressão das cristas mitocondriais (Figura 3B), princípio da separação do plasmalema da parede celular (Figura 3B) e surgimento de núcleos amorfos.

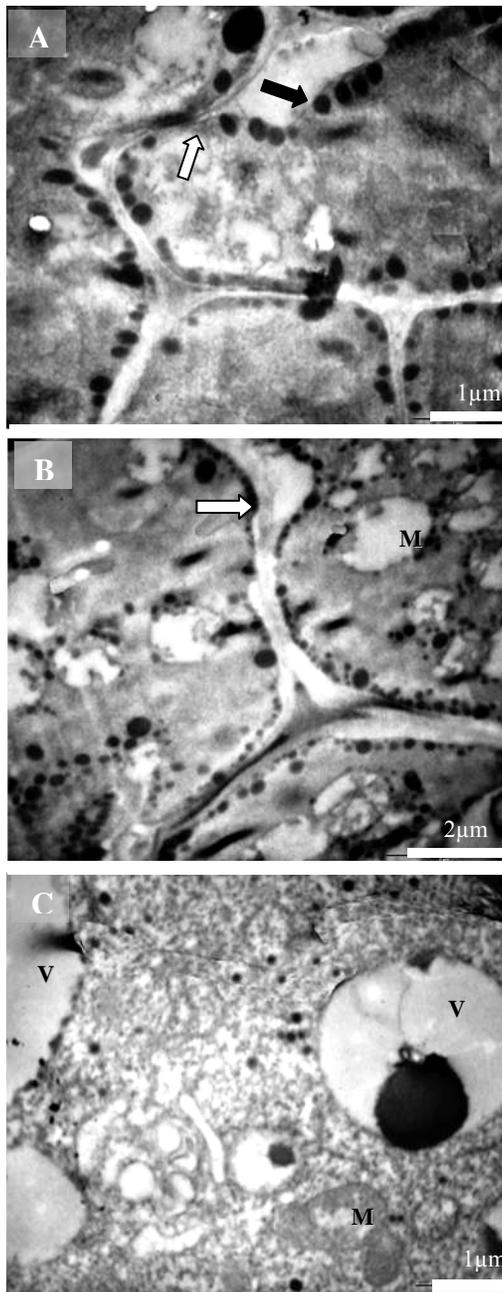


FIGURA 3 Ultraestrutura de células embrionárias de sementes de *Peltophorum dubium* submetidas à secagem analisadas através da microscopia eletrônica de transmissão. Desidratação a 20% de umidade marcou o início dos danos por dessecação, entretanto sementes da espécie em estudo apresentaram aptidão em reparar estes danos mantendo índices de sobrevivência próximos a 70%. **A.** Parede celular com atípica aparência ondulada (seta clara) e alteração na integridade da membrana plasmática demonstrado pelo início da separação desta da parede celular (seta escura); **B.** Evidências de redução das cristas mitocondriais (M) e dobras irregulares na parede celular (seta clara); **C.** Incremento ao tamanho dos vacúolos (V), possivelmente devido à autofagia.

Secagem em níveis próximos a 10% de umidade concorreu não somente para total desconfiguração e ruptura das membranas (Figura 4A), como também promoveu colapso intracelular.

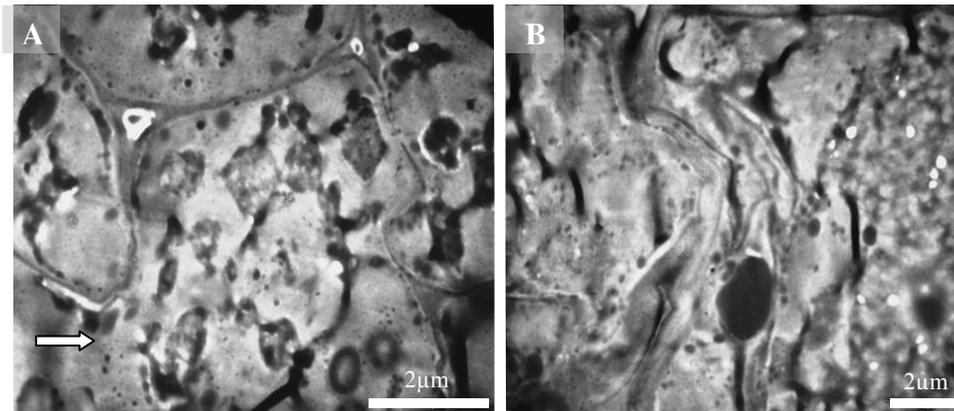


FIGURA 4 Aspecto subcelular do meristema radicular de sementes de *Peltophorum dubium* submetidas à desidratação a 8% de umidade; teor de água este em que foi observado nulidade na sobrevivência. **A.** Desorganização celular, impossibilidade de discernimento de organelas e ruptura da membrana e parede celular; **B.** Colapso intracelular e desconfiguração da membrana e parede celular.

O plasmalema foi completamente descolado da parede celular e toda célula aparentou tamanha desorganização que se tornou praticamente impossível discernir organelas individuais. Vacúolos, anteriormente observados e perfeitamente delimitados por membrana, desapareceram. Vale ressaltar que este é um importante fator que concorre para a perda da viabilidade das sementes devido ao dano celular promovido pelo conteúdo vacuolar liberado após a ruptura. Estas estruturas estão envolvidas na manutenção do potencial osmótico

da célula vegetal e isolamento de enzimas e metabolitos tóxicos, o que ressalva a importância da integridade dos mesmos. Rosseto (1992; 1997), em estudos com *Xerophyta plicata* e *Nanuzia plicata*, observou que vacúolos fragmentam-se em vacúolos menores, porém, sem ruptura de membranas nestas duas espécies tolerantes a dessecação. Este mecanismo impede o extravasamento de enzimas e substâncias incompatíveis que existam nestes compartimentos.

Em adição às respostas ao estresse, devido à rápida retirada de água, lipídios desapareceram em resposta ao excessivo consumo de energia ou consequência dos processos de oxidação, em conformidade com Elias et al. (2009), que mencionaram esta possível consequência. De acordo com estes autores, a redução no teor de lipídios está diretamente relacionada à velocidade e intensidade do processo de deterioração, pois os mesmos são considerados os constituintes mais suscetíveis à degradação química e processo de deterioração. A redução do teor de lipídios e o aumento no teor de ácidos graxos livres, resultantes da hidrólise destas substâncias de reserva, constituem-se um eficiente parâmetro para o controle da viabilidade de sementes (Rupollo et al., 2004; Marini et al., 2005). Altas taxas de secagem do embrião podem também concorrer para impedir, ou desorganizar, o alinhamento dos corpos lipídicos ao longo da membrana plasmática que, conforme descrito anteriormente, corroboram com uma desidratação mais organizada (Cordova-Tellez & Burris, 2002).

Segundo Xu & Hanson (2000), morte celular pode ser detectada através da condensação e encolhimento do núcleo, o que foi observado no meristema radicular de *Peltophorum dubium* no presente estudo. Faria et al. (2006), em análise ultraestrutural realizada em eixos embrionários de *Inga vera*, espécie cujas sementes são consideradas altamente recalcitrantes, observou semelhantes anormalidades quando estas foram armazenadas, tais como dobras na parede celular, degradação do citoplasma e núcleos amorfos.

Estes resultados ratificam a afirmação de que há consideráveis danos que ocorrem como consequência da desidratação e validam os resultados relacionados à sobrevivência de sementes da espécie em estudo, que exibiram 100% de mortalidade ao serem secas a 8% de umidade.

Alterações ultraestruturais semelhantes foram descritas em diversos estudos de danos por secagem, dentre eles Deltour & Barys, 1985; Corbineau et al., 2004; Kioko et al., 2006; Silva et al., 2007; Masseto, 2008.

É sabido que o DNA está sujeito a danos por secagem e que células possuem estratégias para responder a estas lesões. A manutenção da informação genética contida no DNA é essencial para a sobrevivência das células e propõe-se que a tolerância à dessecação em sementes depende da capacidade de reparo dos danos ao DNA genômico quando o embrião é desidratado e posteriormente reidratado. A tolerância pode ser alcançada através de mecanismos que incorporem uma das duas alternativas, ou seja, proteção ou recuperação celular (Oliver, 1996; Osborne et al., 2002).

Conforme descrito anteriormente, no intuito de correlacionar secagem severa a danos ao DNA genômico, foi avaliada a integridade do mesmo quando sementes germinadas de *Peltophorum dubium* foram submetidas a secagens a 20 e 8% de umidade; graus estes em que foi observado o início dos danos fisiológicos por secagem com redução na porcentagem de sobrevivência e aumento da porcentagem de plântulas anormais. O perfil eletroforético de DNA extraído de raízes primárias com 1 mm de comprimento é mostrado na Figura 6.

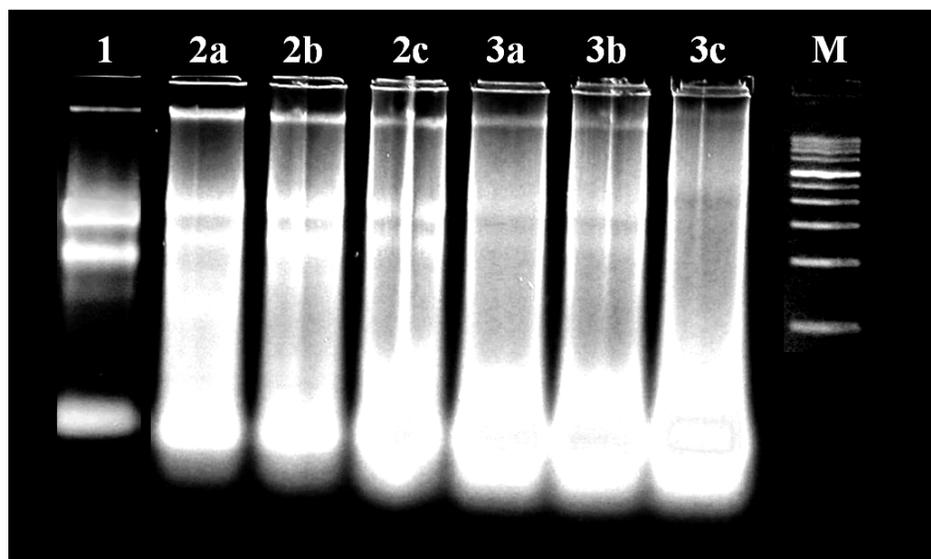


FIGURA 5 Perfil eletroforético de DNA extraído de raízes primárias com 1 mm de comprimento, para avaliação da integridade do DNA genômico em sementes germinadas de *Peltophorum dubium* submetidas à secagem em sílica gel. **1.** Sementes não submetidas à secagem (68% de umidade); **2a, 2b e 2c.** Sementes secas a 20% de umidade (67% de sobrevivência); **3a, 3b e 3c.** Sementes secas a 8% de umidade (0% de sobrevivência). **M.** Marcador de peso molecular 1Kb.

Em raízes primárias de sementes germinadas (68% de grau de umidade), não submetidas à secagem, a integridade do DNA é evidente (Figura 5 - 1). Deve ser ressaltada a importância do reparo do DNA na determinação do genoma da planta, enfatizando que a habilidade em retomar a síntese de proteínas, lipídeos e RNA só é efetuada se a integridade da informação genética também for conservada (Osborne & Boubriak, 1997).

Para sementes secas a 20% de umidade foi detectado início da degradação do material genético, evidenciado pelo arraste deixado no gel quando comparado ao controle (Figura 5). A literatura descreve dois processos de morte celular e estes podem ser detectados através da observação do padrão

de degradação do DNA em gel. Apoptose descreve um processo ativo de colapso celular que difere morfológicamente da morte por necrose. É um tipo de morte celular programada que ocorre durante várias situações fisiológicas e patológicas, constituindo um mecanismo de remoção de células lesadas e, de renovação celular e tecidual, sem desintegração de organelas. Devido à ativação de endonucleases, responsáveis pela clivagem do DNA em fragmentos, o padrão observado no gel, nestes casos, é semelhante a uma escada (Stein & Hansen, 1999; Anazetti & Melo, 2007). Por outro lado, a necrose ocorre, geralmente, em resposta à injúria severa às células e é caracterizada pela perda de integridade da membrana plasmática, floculação da cromatina, inchaço seguido de lise celular com extravasamento do conteúdo intracelular e desintegração de organelas (Curtin et al., 2002). O arraste deixado no gel, no presente trabalho (Figura 5) caracteriza este processo.

Segundo Marcos Filho (2005), a redução da integridade do material genético das sementes demonstra que o DNA e as proteínas envolvidas em seu metabolismo são propensos a deterioração e as lesões provocadas podem se traduzir em distúrbios à germinação. Esta afirmação valida os resultados obtidos neste estudo, já que o declínio na porcentagem de sobrevivência de sementes desta espécie (67%) coincide com a observação da degradação do DNA genômico. A degradação verificada no gel, essencialmente nas repetições 2b e 2c da Figura 5, é procedente de 11% de raízes primárias que não sobreviveram à secagem e advém, provavelmente, também das sementes que, danificadas pela secagem, resultaram em plântulas anormais (21%).

De acordo com estudo realizado por Boubriak et al. (1997), um dos eventos iniciais durante a embebição é a ação de mecanismos de reparo de prováveis danos ao DNA. Bloqueios à atuação destes mecanismos concorrem para o aumento da degradação do DNA genômico e comprometem o desempenho das sementes. Possivelmente, a ineficiência destes mecanismos

concorreu para o aumento da mortalidade (11%) e de formação de plântulas anormais (21%) quando as sementes foram desidratadas a 20% de teor de água. Pesquisas relacionadas à deterioração vêm direcionando maior atenção aos processos de reparo durante a germinação, principalmente a recuperação do DNA. Foi constatada a presença de DNA danificado em sementes não germinadas, entretanto existem dúvidas se estas injúrias são a causa ou consequência da deterioração (Marcos Filho, 2005).

Em sementes germinadas de *Peltophorum dubium*, secagem a níveis de hidratação próximos a 10% ocasionou degradação completa do DNA genômico (Figura 5 – 3a, b e c), coincidindo com a nulidade na sobrevivência das mesmas. O padrão de degradação observado corresponde à morte por necrose, geralmente relatado quando o grau de estresse está acima de determinado nível particular. Masseto et al. (2008) e Masseto (2008) observaram semelhante padrão de degradação e perda da integridade do DNA genômico em estudos com sementes de *Eugenia pleurantha* e sementes germinadas de *Sesbania virgata* e *Cedrela fissilis* submetidas a secagem. Diferindo apenas quanto ao padrão de degradação, em sementes germinadas de *Megicaco truncatula* (Faria et al., 2005) foi igualmente observada degradação do DNA quando estas foram desidratadas, ratificando os prejuízos promovidos pela secagem.

Durante a deterioração, o DNA nuclear é fragmentado progressivamente e paralelamente proteínas são desnaturadas e enzimas de reparo do DNA perdem sua função. Durante a embebição a recuperação da integridade do genoma e a retomada da síntese de DNA são retardadas e podem ser integralmente inibidas. Assim, as células do embrião perdem o potencial de sobrevivência (Marcos Filho, 2005) sancionando, conforme mencionado anteriormente, a nulidade na sobrevivência de sementes de *Peltophorum dubium* secas aos níveis iniciais de hidratação e a completa degradação do DNA genômico evidenciado através do perfil eletroforético. Sabe-se que, evolutivamente, foram selecionadas diversas

estratégias para tolerar ou reparar danos causados no material genético celular, entretanto estresses severos concorrem com a estabilidade dos mesmos e a inabilidade em reparar danos ocasionados ao DNA das células foi, possivelmente, crucial para a sobrevivência das sementes germinadas de *Peltophorum dubium*.

Vale ressaltar que o protocolo CTAB modificado (Ferreira & Grattapaglia, 1995) utilizado para extração de DNA genômico foi do mesmo modo eficiente na extração de RNA, que pôde ser observado no gel (Figura 5). As bandas de RNA, visualizadas aos pares logo abaixo da banda de DNA, igualmente evidenciaram os danos por secagem, já que a cada nível de remoção de água foi notada degradação do Ácido Ribonucleico.

Embora haja considerável progresso no entendimento das respostas moleculares aos estresses celulares, muito ainda precisa ser estudado para um melhor entendimento da relação entre estresse celular, controle da transição do ciclo celular, reparo de DNA e decisão entre sobrevivência ou morte (Berra & Menck, 2006).

6 CONCLUSÕES

Houve correlação entre redução do teor de água e diminuição da capacidade de sobrevivência de sementes germinadas de *Peltophorum dubium*. Secagens a níveis próximos a 30% de umidade não comprometeram a sobrevivência de sementes germinadas desta espécie, entretanto níveis de hidratação abaixo destes valores concorreram para redução na capacidade de sobrevivência das mesmas. Observou-se que, níveis de hidratação abaixo de 10% de umidade mostraram-se letais para as sementes germinadas e avaliações microscópicas foram eficientes em evidenciar danos ultraestruturais em células submetidas à secagem. Danos como extravasamento do conteúdo vacuolar, desestruturação da membrana plasmática, colapso celular, dentre outros, podem ser observados após a desidratação e correlacionados com alta mortalidade de sementes de *Peltophorum dubium* (100%), ao serem secas aos níveis iniciais de hidratação (8%). Houve relação direta entre a degradação do DNA após a secagem de sementes germinadas e a perda da tolerância a dessecação das mesmas.

7 Referências Bibliográficas

AFONSO JÚNIOR, P. C.; CORRÊA, P. C. Efeitos imediato e latente da secagem de sementes de feijão colhidas com diferentes níveis de umidade. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 33-40, dez. 2000. Edição especial.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, Campinas, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.

ANDRADE, R. R.; SCHORN, L. A.; NOGUEIRA, A. C. Tolerância à dessecação em sementes de *Archantophoenix alexandrae* wendl. and drude (palmeira real australiana). **Ambiência**, Guarapuava, v. 1, n. 2, p. 279-288, 2005.

BAUDET, L. M. L.; VILLELA, F. A.; CAVARIANI, C. Princípios de secagem. **Seed News**, Pelotas, v. 3, n. 10, p. 20-27, 1999.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

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

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1985. 367 p.

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

BRADFORD, K. J. Water relations in seed germination. In: KIGEL, J.; GALILI, J. **Seed development and germination**. New York: M. Dekker, 1995. 853 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNAD/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.

BRYANT, G.; KOSTER, K. L.; WOLFE, J. Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 11, n. 1, p. 17-25, 2001.

CHIN, H. F. **Recalcitrant seeds**: a status report. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1988. 18 p.

CORBINEAU, F.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.; VINEL, D.; PICARD, M.; CÔME, D. Reversible cellular and metabolic changes induced by dehydration in desiccation-tolerant wheat seedling shoots. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 122, n. 1, p. 28-38, 2004.

CORDOVA-TELLEZ, L.; BURRIS, J. S. Alignment of lipid bodies along the plasma membrane during the acquisition of desiccation tolerance in maize seed. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 6, p. 1982-1988, 2002.

CORRÊA, P. C.; AFONSO JÚNIOR, P. C. Uso do teste de condutividade elétrica na avaliação dos danos provocados por diferentes taxas de secagem em sementes de feijão. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 1, n. 1, p. 21-26, 1999.

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

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; HOEKSTRA, F. A. Phase transitions and permeability changes in dry membranes during rehydration. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 21, n. 1, p. 77-91, 1989.

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

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

DELTOUR, R.; BARSY, T. Nuclear activation during early germination of the higher plant embryo. **Journal of Cell Science**, London, v. 75, n. 1, p. 43-83, 1985.

ELIAS, M. C.; LOPES, V.; GUTKOSKI, L. C.; OLIVEIRA, M.; MAZZUTTI, S.; DIAS, A. R. G. Umidade de colheita, métodos de secagem e tempo de armazenamento na qualidade tecnológica de grãos de trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 25-30, fev. 2009.

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

FARIA, J. M. R.; BUITINK, J.; LAMMEREN, A. A. M. V.; 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, 2005.

FARIA, J. M. R.; LAMMEREN, A. A. M. V.; HILHORST, H. W. M. Desiccation sensitivity and cell cycle aspects in seeds of *Inga vera* subsp. *affinis*. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, n. 2, p. 165-178, 2004.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa/CENARGEN, 1995. 220 p.

GARCIA, L. C.; NOGUEIRA, A. C. Resposta de sementes de *Podocarpus lambertii* e *podocarpus sellowii* (Podocarpaceae) à dessecação. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 3, p. 353-358, jul./set. 2008.

GUIMARÃES, R. M.; VIEIRA, M. G. G. C.; FRAGA, A. C.; PINHO, E. V. R. von; FERRAZ, V. P. Tolerância à dessecação em sementes de caféiro (*coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 1, p. 128-139, jan./fev. 2002.

JOSÉ, S. C. B. R.; PINHO, E. V. R. V.; DIAS, M. A. G. S. Açúcares e tolerância a alta temperatura de secagem em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 2, p. 60-68, 2006.

KIOKO, J. I.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Viability and ultrastructural responses of seeds and embryonic axes of *Trichilia emetica* to different dehydration and storage conditions. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 71, n. 2, p. 167-176, 2006.

KOHOMA, S.; MALUF, A. M.; BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Grumixameira). **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 1, p. 72-78, 2006.

LEPRINCE, O.; BUITINK, J.; HOEKSTRA, F. A. Axes and cotyledons of recalcitrant seeds of *Castanea sativa* Mill. exhibit contrasting responses of respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 338, p. 1515-1524, 1999.

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

MACCABE, P. F.; LEAVER, C. J. Programmed cell death in cell cultures. **Plant Molecular Biology**, Dodrecht, v. 44, n. 3, p. 359-368, Oct. 2000.

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

MARINI, L. J.; GUTKOSKI, L. C.; ELIAS, M. C.; SANTIN, J. A. Efeito da secagem intermitente na estabilidade de grãos de aveia. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 8, n. 3, p. 260-267, 2005.

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

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

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

NASCIMENTO, W. M. O. do; SILVA, W. R. da. Comportamento fisiológico de sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) submetidas à desidratação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 349-351, 2005.

OLIVEIRA, L. M.; DAVIDE, A. C.; CARVALHO, M. L. M. Avaliação de métodos para quebra de dormência e para desinfecção de sementes de canafistula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 27, n. 5, p. 1-8, 2003.

OLIVER, M. J. Desiccation tolerance in vegetative plant cells. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 97, n. 4, p. 779-787, 1996.

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

OSBORNE, D. J.; BOUBRIAK, I. I. DNA status, replication and repair in desiccation tolerance and germination: basic and applied aspects of seed biology. In: ELLIS, R. H.; BLACK, M.; MURDOCH, A. J.; HONG, T. D. (Ed.). **Basic and applied aspects of seed biology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1997. p. 23-32. (Current plant sciences and biotechnology in agriculture, 30).

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.

PEREZ, S. C. J. G. A.; FANTI, S. C.; CASALI, C. A. Influência do armazenamento, substrato, envelhecimento precoce e profundidade de semeadura na germinação de canafístula. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 1, p. 57-68, 1999.

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

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

ROSSETO, E. S. **Aspectos celulares de folhas de *Xerophyta plicata* Spreng. (Velloziaceae), durante os processos de dessecação e revivescência**. 1992. 152 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ROSSETO, E. S. **Comparação ultraestrutural entre folhas hidratadas e desseçadas de três espécies de Velloziaceae: duas revivescentes e uma sensível a dessecação**. 1997. 110 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RUPOLLO, G.; GUTKOSKI, L. C.; MARINI, L. J.; ELIAS, M. C. Sistemas de armazenamento hermético e convencional na conservabilidade de grãos de aveia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1715-1722, 2004.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, n. 1, p. 110-119, 2004.

SILVA, P. A. S.; DINIZ, K. A.; OLIVEIRA, J. A.; PINHO, E. V. R. von. Análise fisiológica e ultra-estrutural durante o desenvolvimento e a Secagem de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 29, n. 2, p. 15-22, 2007.

STEIN, J. C.; HANSEN, G. Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells. **Plant Physiology**, Washington, v. 121, n. 1, p. 71-79, 1999.

SUN, W. Q. Desiccation sensitivity of recalcitrant seeds and germinated orthodox seeds: can germinated orthodox seeds serve as a model system for studies of recalcitrance? In: MARZALINA, M.; KHOO, K. C.; JAYANTHI, N.; TSAN, F. Y.; KRISHNAPILLAY, B. (Ed.). **IUFRO seed symposium “recalcitrant seeds”**. Kuala Lumpur: Forest Research Institute of Malasya, 1999. p. 29-42.

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 a dessecação em sementes germinadas de *Tabebuia impetiginosa***. 2008. 98 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

WALTERS, C. Levels of recalcitrance in seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, p. 7-21, 2000. Edição especial.

CONCLUSÕES GERAIS

A espécie em estudo, *Peltophorum dubium* (Spreng.)Taubert, produz sementes em grande quantidade e de fácil manipulação. Possuem comportamento ortodoxo no que se refere ao armazenamento, constituindo-se eficiente ferramenta para estudos de longa duração. A dormência tegumentar observada em sementes desta espécie é facilmente superável não trazendo, portanto problemas durante a germinação, a qual é completada com aproximadamente 70 horas após o início da embebição.

Sabe-se que sementes com comportamento ortodoxo perdem a tolerância à dessecação (TD) durante ou após a germinação, assim como observado para a espécie em estudo. Entretanto, o momento exato da perda da TD é variável entre famílias, gêneros e espécies. Em *Peltophorum dubium*, houve aumento gradual da sensibilidade à dessecação durante a germinação, sendo a TD completamente perdida concomitantemente a protrusão radicular, indicando que sementes de *Peltophorum dubium* tornam-se sensíveis as reduções hídricas nos estágios iniciais de germinação. Diante dos entraves as pesquisas com sementes de comportamento recalcitrante em relação ao armazenamento, o uso de sementes germinadas e a identificação de diferentes níveis de TD para avaliação de possíveis danos promovidos pela secagem podem ser considerados hábeis instrumentos.

Com relação aos estudos relacionados ao ciclo celular, não foi constatado aumento no número de células da radícula com conteúdo de DNA 4C durante e após a germinação não havendo, portanto, relação entre a retomada do ciclo celular e a perda da TD. Sementes desta espécie são dispersas com alto conteúdo de células com conteúdo 4C de DNA genômico, em contraposto a afirmações que relatam que geralmente espécies com comportamento ortodoxo possuem baixo índice de DNA 4C após a dispersão.

Danos ultraestruturais em células submetidas à secagem, como extravasamento do conteúdo vacuolar, desestruturação da membrana plasmática, colapso celular, dentre outros, podem ser relacionados com a mortalidade das sementes, já que quando estes eram observados havia simultânea redução na porcentagem de sobrevivência de sementes de *Peltophorum dubium*. Igualmente, houve relação direta entre a degradação do DNA e RNA após a secagem de sementes germinadas e a perda da tolerância à dessecação das mesmas.

Embora haja considerável progresso no entendimento das respostas moleculares aos estresses celulares, muito ainda precisa ser estudado para um melhor entendimento da relação entre estresse celular, controle da transição do ciclo celular, reparo de DNA e decisão entre sobrevivência ou morte.