



FABIELI PELISSARI

**REDUÇÃO DA SENSIBILIDADE À
DESSECAÇÃO E AO ARMAZENAMENTO DE
SEMENTES DE ESPÉCIES FLORESTAIS**

**LAVRAS – MG
2018**

FABIELI PELISSARI

**REDUÇÃO DA SENSIBILIDADE À DESSECAÇÃO E AO
ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE ESPÉCIES FLORESTAIS**

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

Dr. ANDERSON CLEITON JOSÉ
ORIENTADOR

Dr. JOSÉ MARCIO ROCHA FARIA
Dr. WILSON VICENTE SOUZA PEREIRA
CO-ORIENTADORES

**LAVRAS – MG
2018**

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

Pelissari, Fabieli.

Redução da sensibilidade à dessecação e ao armazenamento de
sementes de espécies florestais / Fabieli Pelissari. - 2018.

110 p. : il.

Orientador(a): Anderson Cleiton José.

Coorientador(a): Wilson Vicente Souza Pereira, José Marcio
Rocha Faria.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Tolerância à dessecação 2. Armazenamento 3. Enzimas I.
José, Anderson Cleiton. II. Pereira, Wilson Vicente Souza. III.
Faria, José Marcio Rocha. IV. Título.

FABIELI PELISSARI

**REDUÇÃO DA SENSIBILIDADE À DESSECAÇÃO E AO
ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE ESPÉCIES FLORESTAIS
REDUCTION OF DESICCATION SENSITIVITY AND
STORAGE OF FOREST TREE SPECIES SEEDS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração Ciências Florestais, para a obtenção do título de Doutor

APROVADA em 28 de fevereiro de 2018.
Dr. Carlos Vinicio Vieira – UFMT
Dra. Heloisa Oliveira dos Santos – UFLA
Dr. José Marcio Rocha Faria – UFLA
Dra. Marcela Carlota Nery – UFVJM

Prof. Dr. Anderson Cleiton José - UFLA
Orientador

Dr. Wilson Vicente Souza Pereira - UFLA
Dr. José Marcio Rocha Faria - UFLA
Co-Orientadores

**LAVRAS – MG
2018**

Aos meus pais, Silvino e Oneide, por todo incentivo e apoio.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as bênçãos e sonhos realizados.

Aos meus pais e irmãos, por todo incentivo e apoio. Vocês são fundamentais.

À todos os meus amigos que estiveram presentes durante toda essa caminhada. Que me ouviram quando precisava falar, e que me incentivavam quando tudo parecia não dar certo.

Ao meu grande amigo e co-orientador Wilson, pela paciência, dedicação, orientação, e por me ouvir nas horas de desespero.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Sementes Florestais, por todos os dias de convivência e as várias experiências e conhecimentos trocados.

Ao Zé Pedro, pela ajuda em todas as idas a campo para as coletas de sementes.

À Universidade Federal do Mato Grosso, pela liberação e afastamento para realização do doutorado.

Ao Laboratório de Sementes, e aos funcionários dos mesmos, em especial a Dr. Heloisa Oliveira dos Santos, pelo auxílio nas análises e contribuição ao trabalho.

Ao Prof. Anderson e Prof. José Márcio, pela ajuda e orientações durante a execução deste trabalho.

À Universidade Federal de Lavras, em especial, o Programa de Pós Graduação em Engenharia Florestal pela oportunidade de realização do curso, assim como as agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo financiamento da pesquisa.

*“I have great faith in a seed. Convince me that you have a seed
there, and I am prepared to expect wonders.”*

Henry D. Thoreau

RESUMO

A impossibilidade de armazenamento de sementes não ortodoxas impede a conservação *ex-situ* dessas espécies e dificulta a utilização das mesmas em programas de restauração ambiental. Compreender os mecanismos que possibilitam a dessecação e o armazenamento é fundamental para novas estratégias que permitam aumentar a capacidade de perda de água e a longevidade de sementes recalcitrantes e intermediárias durante o armazenamento. Vários estudos têm obtido sucesso com o uso de agentes osmóticos como o PEG e aplicação de ABA na reindução da tolerância à dessecação, em sementes germinadas de espécies ortodoxas, permitindo maior entendimento sobre os mecanismos associados a tolerância à dessecação. Diante disso, buscou-se com o uso de PEG e ABA a redução da sensibilidade à dessecação e ao armazenamento de sementes *Genipa americana* e *Magnolia ovata*. As sementes foram submetidas a diferentes soluções de PEG e/ou ABA, em seguida passaram por secagem e foram armazenadas. Foram realizadas análises de porcentagem de germinação, plântulas normais, IVG, e perfil eletroforético de proteínas totais, resistentes ao calor e das enzimas catalase, peroxidase e superóxido dismutase. Nas sementes de *M. ovata*, o PEG influenciou negativamente a germinação e formação de plântulas normais, enquanto o ABA parece ter um papel importante na tolerância à dessecação dessa espécie, uma vez que possibilitou maior germinação das sementes após secagem. Em sementes de *G. americana*, alguns tratamentos com PEG e/ou ABA foram eficientes para manutenção da germinação após a secagem e o armazenamento. Não foram observadas mudanças significativas nos padrões eletroforéticos das enzimas e proteínas. Porém, o uso de PEG e ABA pode ter induzido a síntese de proteínas e ativado outros mecanismos relacionados a tolerância à dessecação e armazenamento nas sementes de *Genipa americana* e *Magnolia ovata*.

Palavras-chave: PEG. ABA. Intermediárias. Proteínas. Enzimas.

ABSTRACT

The impossibility of storing unorthodox seeds prevents ex situ conservation of these species and makes it difficult to use them in environmental restoration programs. Understanding the mechanisms that allow the desiccation and the storage is fundamental for new strategies to increase water loss capacity and the longevity of recalcitrant and intermediate seeds during storage. Several studies have obtained success with the use of osmotic agents such as PEG and ABA application in the reinduction of desiccation tolerance in germinated seeds of orthodox species, allowing for a better understanding of the mechanisms associated with desiccation tolerance. Therefore, it was sought with the use of PEG and ABA the reduction of the sensitivity to the desiccation and storage of *Genipa americana* and *Magnolia ovata* seeds. The seeds were submitted to different PEG and/or ABA solutions, after that dried, and stored. Analysis of germination percentages, normal seedlings, IVG, and electrophoretic profile of total proteins, resistant to heat and enzymes catalase, peroxidase and superoxide dismutase were performed. In the *M. ovata* seeds, PEG negatively influenced the germination and formation of normal seedlings, whereas ABA seems to play an important role in the desiccation tolerance of this species, since it allowed for greater seed germination after drying. In *G. americana* seeds, some treatments with PEG and/or ABA were efficient for germination maintenance after the drying and storage. No significant changes in the electrophoretic patterns of enzymes and proteins were observed. However, the use of PEG and ABA may have induced protein synthesis and activated other mechanisms related to the desiccation tolerance and storage in *Genipa americana* and *Magnolia ovata* seeds.

Keywords: PEG. ABA. Intermediates. Proteins. Enzymes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 Caracterização da espécie	12
2.1.1 <i>Genipa americana</i>	12
2.1.2 <i>Magnolia ovata</i>	13
2.2 Tolerância à dessecação.....	14
2.3 Mecanismos da tolerância à dessecação.....	16
2.4 Condicionamento fisiológico	21
REFERÊNCIAS.....	23
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	32
ARTIGO 1 – REDUÇÃO DA SENSIBILIDADE À DESSECAÇÃO E AO ARMAZENAMENTO DE <i>Magnolia ovata</i>	32
ARTIGO 2 – REDUÇÃO DA SENSIBILIDADE À DESSECAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Genipa americana</i>.....	57
ARTIGO 3 – ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE <i>Genipa americana</i> APÓS TRATAMENTO EM PEG E ABA	81

1- INTRODUÇÃO GERAL

Conhecer as respostas das sementes à dessecação, bem como o seu comportamento ao longo do armazenamento, é de suma importância para projetos de conservação *ex situ*, uma vez que as espécies comportam-se diferentemente em resposta a tais condições

Três classes de sementes quanto à capacidade de tolerância à dessecação e ao armazenamento são conhecidas: ortodoxas, as quais as sementes suportam a dessecação e o armazenamento em baixas temperaturas; as recalcitrantes, que não suportam estas condições (ROBERTS, 1973); e as intermediárias, que suportam a secagem, mas não suportam o armazenamento em baixas temperaturas (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990).

A dificuldade de conservação da qualidade fisiológica de sementes não ortodoxas tem dificultado a conservação de tais espécies (MASETTO et al., 2008). Sementes recalcitrantes são dispersas com alto conteúdo de água e alta atividade metabólica, e sua viabilidade é perdida com a diminuição do conteúdo de água (FARIA et al., 2006), não podendo ser armazenadas em baixas temperaturas e com baixo teor de água (PAMMENTER; BERJAK, 1999).

A capacidade para suportar a secagem e sobreviver no estado seco é resultado de adaptações que impedem danos à estrutura celular durante a retirada de água (NEDEVA; NIKOLOVA, 1997) e durante o processo de reidratação. A proteção contra esses danos é caracterizada pelo ajuste de processos metabólicos e estruturais, possibilitando às sementes resistirem à desidratação e retomar as atividades metabólicas, assim como reparar eventuais danos causados pela reidratação (JOSÉ et al., 2011). Para que isso ocorra, é necessário que as sementes possuam capacidade de manter a integridade estrutural da membrana celular, a fim de reparar danos quando a água estiver novamente disponível (VERTUCCI; FARRANT, 1995).

A tolerância à dessecação é um processo complexo, que envolve a interação de vários fatores que atuam simultaneamente, possibilitando a semente suportar a secagem. (LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993). Vários são os mecanismos que são reportados como fatores que possibilitam a tolerância à dessecação, tais como o acúmulo de proteínas LEA, oligossacarídeos (sacarose, rafinose e estaquiose), redução dos vacúolos (vacuolização), sistema antioxidante eficiente, desdiferenciação celular, além de mecanismos de reparo durante a reidratação (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998; PAMMENTER; BERJAK, 2000).

Dentre as técnicas utilizadas na tentativa de compreender os mecanismos da tolerância à dessecação, o condicionamento fisiológico tem sido bastante utilizado. Tal técnica consiste em uma hidratação parcial, o que permite que os processos preparatórios para germinação sejam iniciados, contudo, sem que ocorra a protrusão radicular (VARIER; VARI; DADLANI, 2010). Essa é uma técnica utilizada como modelo para estímulo de mecanismos que conferem tolerância a estresse, mostrando-se eficiente no restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas (BRUGGINK; OOMS; VAN DER TOORN, 2007; MASETTO et al., 2014; VIEIRA et al., 2010).

Dessa forma, o uso dessa técnica pode ser um grande aliado na redução da sensibilidade à dessecação e ao armazenamento de sementes recalcitrantes e intermediárias, uma vez que, qualquer característica que confere tolerância à dessecação pode ter origem em um estímulo externo que aciona o código genético, dando início a uma cascata gênica responsável por essa característica (KRANNER et al., 2010).

O maior desafio enfrentado por todos os envolvidos na conservação de sementes das espécies sensíveis a dessecação é a elaboração de estratégias que possibilitem aumentar o tempo de armazenamento, sem que ocorra a perda

significativa de viabilidade das sementes (WESLEY-SMITH et al., 2001), como a diminuição no teor de água das sementes e a temperatura de armazenamento.

Este trabalho mostra que a secagem até 10% de conteúdo de água não afeta a viabilidade das sementes de *Genipa americana* e *Magnolia ovata*. Em sementes de *M. ovata* o uso do PEG e, ou, ABA afetou negativamente a germinação das sementes. Por outro lado, em sementes de *G. americana*, o condicionamento em PEG e ABA reduziu a sensibilidade à dessecação das sementes.

Em relação ao armazenamento, foi verificado que o uso do PEG e ABA aumenta a longevidade das sementes de *M. ovata* no armazenamento a -21°C . O mesmo comportamento é observado em sementes de *G. americana* com os tratamentos em ABA $5\mu\text{M}$, PEG $-2,1\text{ MPa}$ e PEG $-2,1\text{ MPa} + \text{ABA } 5\mu\text{M}$, quando as sementes são armazenadas a 25°C com 5% de conteúdo de água e PEG $-2,1\text{ Mpa} + \text{ABA } 100\mu\text{M}$ e a 5°C com 10% de conteúdo de água.

Não foram observadas mudanças no perfil proteico na análise de proteínas totais e proteínas resistentes ao calor nas duas espécies estudadas, nas diferentes condições testadas. Pequenas alterações foram observadas na atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase em sementes de *G. americana* após o armazenamento.

Apesar das análises moleculares usadas nesse estudo não apresentarem relação com as respostas fisiológicas encontradas, acredita-se que algum dos mecanismos de tolerância à dessecação tenha sido ativado durante os tratamentos utilizados e, dessa forma, o uso de técnicas mais sensíveis para captar essas modificações devem ser utilizadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização da espécie

2.1.1 *Genipa americana*

Genipa americana, conhecida popularmente como jenipapo, pertencente à família Rubiaceae, é uma planta de porte arbóreo, heliófila, semidecídua, podendo ocorrer em áreas com florestas abertas e de vegetação secundária de várzeas, em locais permanente ou temporariamente inundados (ANDRADE et al., 2000). A espécie ocorre naturalmente nas florestas neotropicais desde o norte da Argentina até o México (CARVALHO, 1994; LAVINSKY et al., 2007).

O jenipapo apresenta grande potencial para sua utilização em atividades agroflorestais, econômicas e ecológicas, pois, devido a sua rusticidade, adapta-se a vários tipos de clima e solo, tendo ampla distribuição geográfica e crescimento rápido (SILVA et al., 2006).

G. americana é importante para restauração de florestas ripárias no Cerrado brasileiro, podendo também ser usada na arborização urbana (COSTA et al., 2005) e na recuperação de áreas de preservação (VALERI; PUERTA; DA CRUZ, 2003). A árvore é muito utilizada em plantios em áreas brejosas e degradadas, sendo uma ótima fonte de alimentação para a fauna (LORENZI, 2000). Também tem sido utilizado para recuperação de áreas degradadas em ambientes de mata ciliar, por suportar grandes períodos sob condições de alagamento (SILVA et al., 2006). Os frutos são comestíveis, sendo utilizados para sucos, doces, vinho e licor, doces cristalizados, sorvetes e refrescos (COSTA et al., 2005).

As sementes de jenipapo são classificadas como intermediárias quanto à capacidade de dessecação e armazenamento (CARVALHO; NASCIMENTO,

2000; MAGISTRALI et al., 2013), o que dificulta a manutenção da viabilidade das mesmas por longos períodos, constituindo um obstáculo para sua conservação em banco de sementes e execução de pesquisas a longo prazo. Outra restrição é quanto a semeadura, que deve ser realizada logo após o beneficiamento das sementes, uma vez que a viabilidade das mesmas não é mantida por períodos longos, concentrando a oferta de mudas em determinadas épocas do ano, ou tornando-as disponíveis em épocas impróprias para o plantio (FONSECA; FREIRE, 2003).

2.1.2 *Magnolia ovata*

Conhecida popularmente como pinha-do-brejo, a *Magnolia ovata* é nativa brasileira, de ocorrência na Mata atlântica e Cerrado, ocorrendo do sul de Minas Gerais até o norte do Rio Grande do Sul (CAZETTA et al, 2002), estando relacionada a solos úmidos das florestas ripícolas (JOSÉ et al., 2011), ocorrendo exclusivamente em matas de galeria inundáveis (SILVA JUNIOR; PEREIRA, 2009)

Plantas de pinha-do-brejo suportam a inundação e o encharcamento, o que facilita sua adaptação a locais brejosos. A espécie é muito recomendada em projetos de restauração de matas ciliares, sendo uma das espécies mais importantes em áreas permanentemente alagadas, e apresentando alta capacidade de recrutamento (LOBO; JOLY, 1998). Também é muito utilizada em arborização urbana, possuindo flores brancas, grandes e com perfume agradável. A árvore pode atingir 30m de altura com frutos deiscentes e quando abertos expõem as sementes que se encontram envoltas por um arilo vermelho (LORENZI, 1992).

Sua madeira é leve, indicada para construção civil, indústrias de embalagens e caixotaria (SILVA JUNIOR; PEREIRA, 2009). Os frutos devem ser colhidos quando iniciarem a abertura espontânea, sendo observada pela

exposição do arilo vermelho das sementes (LORENZI, 2002). Seus frutos representam uma importante fonte alimentar para aves (CAZETTA et al., 2002).

Quanto a capacidade de tolerância à dessecação e ao armazenamento, as sementes de *M. ovata* são classificadas como intermediárias (JOSÉ et al., 2011). Tal característica limita o seu armazenamento em ambientes com baixas temperaturas, uma vez que tais condições podem causar danos irreversíveis a semente, levando a perda de viabilidade. Por isso, estudos que busquem prolongar a viabilidade durante o armazenamento são de suma importância para a espécie, uma vez que há uma grande demanda na produção de mudas da mesma.

2.2 Tolerância à dessecação

Tolerância à dessecação é definida como sendo a capacidade de um organismo (ou órgão) suportar acentuada perda de água para o meio extracelular, podendo sobreviver por períodos prolongados quando no estado seco e, após a reidratação, retornar as atividades metabólicas normalmente, sem prejuízo às suas funções (BUITINK; LEPRINCE, 2004, 2008). Essa característica está presente em todos os grupos de organismos vivos, observada em espécies de bactérias, fungos, animais e vegetais, sendo que em vegetais é mais comum em pólen, esporos e sementes (ALPERT, 2006).

Quanto à capacidade de tolerar à dessecação, as sementes são divididas em três grupos: ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990; ROBERTS, 1973).

As sementes com comportamento ortodoxo suportam a secagem a níveis próximos de 5% de umidade, podendo ser armazenadas em baixas temperaturas por períodos prolongados sem perder a viabilidade. Essas, em sua maioria, são dispersas da planta mãe com baixo conteúdo de água, próximo ao conteúdo crítico e, geralmente, apresentam algum tipo de dormência. Sementes tolerantes à

dessecação são capazes de sobreviver à condições adversas, germinando quando estas forem apropriadas para a retomada de seu desenvolvimento iniciado pela germinação (BARBEDO; BILIA, 1998).

Ao contrário das sementes ortodoxas, as recalcitrantes são muito sensíveis à perda de água e não suportam o armazenando a baixas temperaturas, sendo dispersas da planta mãe com alto teor de água (MEDEIROS; EIRA, 2006; ROBERTS, 1973). Devido à alta umidade das sementes no momento da dispersão, sementes desse grupo germinam rapidamente após serem dispersas, sendo muito comum a viviparidade. Mesmo em condições favoráveis de armazenamento, as sementes sensíveis possuem longevidade curta, isto também ocorre devido ao metabolismo acelerado, uma vez que as mesmas não entram em estado de quiescência (FONSECA; FREIRE, 2003).

A categoria das espécies com comportamento intermediário é formada por sementes que suportam perda considerável de água, porém, não suportam armazenamento em baixas temperaturas.

Apesar de Roberts (1973) e, posteriormente, Ellis; Hong e Roberts (1990) estabeleceram três categorias com limites fixos de teor de água até o qual as sementes podem ser secas, o que se observa é a existência de um gradiente, e não de um valor único de conteúdo crítico de água, que pode ser atribuído às diferenças na sensibilidade à tolerância à dessecação entre as espécies (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990), ou dentro da mesma espécie, variando entre o habitat de origem e à diversidade genética (BOVI; MARTINS; SPIERING, 2004; DAWS et al., 2004; MARTINS; MARILENE; NAKAGAWA, 2007; PEREIRA et al., 2012). O conteúdo crítico de água considerado como o limite que as sementes podem ser secas, sem danos aparentes, (WALTERS, 2000) é muito variável entre as espécies, especialmente para espécies recalcitrantes, evidenciando então a existência de um contínuo de tolerância à dessecação quando se compara várias espécies. Sementes sensíveis à dessecação, em sua maioria, são mais comuns em

ambientes mais úmidos e sua dispersão ocorre no período de maior índice pluviométrico. Em áreas tropicais e subtropicais, a proporção de sementes sensíveis à dessecação diminui à medida que o habitat se torna mais seco (DAWS et al., 2006; TWEDDLE et al., 2003).

Sementes armazenadas com alto conteúdo de água perdem sua viabilidade mais rapidamente, devido à alta taxa respiratória e a ação de microrganismos. Portanto, estudos nessa área são importantes para determinar estratégias de armazenamento de sementes, em especial, para espécies com comportamento intermediário e recalcitrante, uma vez que esta característica influencia diretamente no método de conservação das mesmas (TWEDDLE et al. 2003).

2.3 Mecanismos da tolerância à dessecação

As sementes ortodoxas passam por três fases durante o desenvolvimento: histodiferenciação, maturação e dessecação (BERJAK; PAMMENTER, 2013; CASTRO; BRADFORD; HILHORST, 2004). A histodiferenciação é caracterizada por intensa atividade metabólica e sensibilidade à dessecação, ocorrendo de forma similar em sementes tolerantes e sensíveis à dessecação, havendo aumento da matéria verde e do peso fresco. Na maturação ocorre a deposição de reservas, principalmente proteínas, carboidratos e lipídeos, ocorrendo diminuição do conteúdo de água e aumento de matéria seca (BERJAK; PAMMENTER, 2013).

Mudanças estruturais nas células, composição química e conformação da parede celular desempenham um papel importante na manutenção das propriedades mecânicas e químicas necessárias para suportar a dessecação (CACCERE et al. 2013). A falta ou ineficiência de um ou mais desses mecanismos impede a aquisição e manutenção da tolerância à dessecação (BERJAK; PAMMENTER, 2013).

A última fase de desenvolvimento das sementes é caracterizada por grande perda de água e redução do metabolismo, passando para o estado de quiescência, para então ocorrer a dispersão. A diminuição do conteúdo de água no final da fase de maturação é precedida pela indução da tolerância à dessecação nas sementes ortodoxas. As sementes recalcitrantes não passam por estas duas fases, sendo dispersas com alto conteúdo de água (SONG et al., 2003).

Após a perda de água, a diminuição do volume celular provoca aglomeração de componentes citoplasmáticos e os conteúdos celulares tornam-se cada vez mais viscosos, reduzindo a chance de interações moleculares que possam causar a desnaturação de proteínas e a fusão da membrana (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001). Becwar, Stanwood e Roos (1982), comprovaram que a perda de viabilidade de sementes sensíveis à dessecação está diretamente relacionada aos danos nas membranas celulares, que ocorre durante o processo de secagem, uma vez que as mesmas não possuem mecanismos eficientes para reparar e/ou evitar tais danos.

Quando uma célula perde água, seus solutos se tornam mais concentrados, fazendo com que ocorra aumento nas reações químicas destrutivas, ocorrendo a modificação do pH da solução intracelular, devido a cristalização de alguns solutos, as proteínas começam a desnaturar e pode ocorrer a ruptura das membranas (BARBEDO; BILIA, 1998; SILVA et al., 2012). Essas consequências da secagem ocorrem tanto em sementes sensíveis quanto tolerantes à dessecação, porém, as tolerantes, possuem mecanismos para minimizar e/ou reparar esses danos, enquanto em sementes sensíveis estes são falhos ou inexistentes.

Durante a secagem das sementes, danos à molécula de DNA podem ocorrer, principalmente pela ação de espécies reativas de oxigênio, além de poder causar injúrias às membranas, ruptura da parede celular, condensação da cromatina, modificações em ultraestrutura e danos nas mitocôndrias (BERJAK, 2006; KIOKO; BERJAK; PAMMENTER, 2006; MIAO; KANEKO;

SUGAWARA, 2005; WANG; MØLLER; SONG, 2012; WEN et al., 2012). A estabilidade do DNA durante a dessecação e a capacidade para a sua reparação é característica de sementes tolerantes à dessecação (BOUBRIAK et al., 2000; OSBORNE; BOUBRIAK, 1994). A perda de água em sementes sensíveis à dessecação pode ocasionar a degradação do DNA, através da ação de endonucleases, sendo considerado um importante marcador para a morte em células vegetais (MCCABE; LEAVER, 2000).

A tolerância à dessecação, adquirida durante a formação da semente (WANG; MØLLER; SONG, 2012), é um fenômeno complexo que envolve ajustes metabólicos e estruturais (BONJOVANI; BARBEDO, 2008), que juntos, possibilitam a ação de mecanismos a fim de evitar danos às células, tais como: proteção do DNA e citoesqueleto; desdiferenciação celular; presença de sistemas antioxidantes eficientes; acúmulo de moléculas protetoras, tais como proteínas LEA (*Late Embryonic Abundant Proteins*) e *heat shock proteins* (HSP) e oligossacarídeos (rafinose, estaquiose, verbascose); moléculas anfipáticas; redução da atividade metabólica, bem como a presença de mecanismos de reparo dos danos causados pela secagem e posteriormente aqueles causados pela reidratação (BUITINK et al, 2003; HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001; PAMMENTER; BERJAK, 1999).

Após a histodiferenciação, as células de sementes ortodoxas preenchem os vacúolos com proteínas, acumulam açúcares, produzem proteínas LEA (“late-embryogenesis-abundant”) e ocorre a formação do estado vítreo (WALTERS, 2000). As proteínas LEA atuam na manutenção da estrutura do citoplasma durante a perda de água (NEDEVA; NIKOLOVA, 1997), atuando na atividade antioxidante, na estabilização de proteínas e membranas, e na integridade da molécula de DNA (AMARA et al., 2012; DELAHAIE et al., 2013). As desidrinas, proteínas pertencentes ao grupo das LEAs, acumulam durante o desenvolvimento das sementes, e estão relacionadas a tolerância à dessecação, protegendo a célula

durante a secagem, e agindo como antioxidante (CLOSE, 1996; BOMAL; LE; TREMBLAY, 2002).

As HSP, proteínas resistentes ao calor, desempenham a função de preservação das estruturas macromoleculares durante a secagem, desnaturação proteica e reparo durante a reidratação (JOSÉ et al., 2005; HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001; WATERS; LEE; VIERLING, 1996). Kalembe e Pukacka (2012), estudando a associação de proteínas protetoras em sementes recalcitrantes e ortodoxas através de extratos proteicos, demonstraram que desidrinas e HSPs estão relacionadas a tolerância à dessecação, uma vez que sementes ortodoxas apresentaram níveis mais elevados dessas proteínas quando comparadas com sementes recalcitrantes.

A desidratação também induz a formação de radicais livres que podem atuar como sinalizadores no processo de morte celular programada (KRANNER et al., 2011). Em sementes recalcitrantes, a presença de radicais livres durante a secagem, devido ao metabolismo desregulado, pode ser o principal dano ao meio celular (FARRANT; SHERWIN 1998; PAMMENTER; BERJAK, 1999; WALTERS, 2000), uma vez que não há um sistema antioxidante eficiente.

A perda de viabilidade durante a secagem pode estar relacionada pela presença de um sistema antioxidante ineficiente para remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são formadas. A enzima superóxido dismutase (SOD) é a primeira linha de defesa contra EROs, dismutando os radicais superóxido (O_2^-), transformando-os em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é menos reativo e em O_2 (BOWLER; MANTAGU; INZE, 1992; CHENG; SONG, 2008; GILL; TUTEJA, 2010). O H_2O_2 é então eliminado pela ação da enzima catalase (CAT) (WILLEKENS et al., 1995). A enzima peroxidase (PO) também tem a função de destruir H_2O_2 , tendo maior afinidade do que a CAT (CHENG; SONG, 2008). Essas enzimas convertem o H_2O_2 em O_2 e H_2O (GILL; TUTEJA, 2010).

Ao contrário das sementes sensíveis à dessecação, as tolerantes possuem um sistema antioxidante eficiente devido à atuação de antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (PO), e antioxidantes não enzimáticos, como ácido ascórbico e glutatona redutase (PAMMENTER; BERJAK, 1999).

No processo final de maturação, as sementes tolerantes a dessecação passam a acumular açúcares e proteínas que atuam na proteção celular (BARBEDO; CENTENO; RIBEIRO, 2013) e a perda de água durante a secagem estimula um maior acúmulo de oligossacarídeos, como rafinose e sacarose (BOMAL; LE; TRAMBLAY, 2002). Esses açúcares substituem a água, prevenindo danos durante a secagem, fornecendo as interações hidrofílicas necessárias para manter a estabilização de proteínas e das membranas, prevenindo a movimentação dos constituintes celulares, sendo este caracterizado como estado vítreo (LEPRINCE; HOEKSTRA, 1998; HOEKSTRA, GOLOVINA; BUITINK, 2001).

O estado vítreo é formado por um líquido muito viscoso capaz de reduzir as reações químicas que necessitam de difusão molecular, atuando assim, na preservação das estruturas celulares durante a desidratação, evitando o colapso celular (OOMS et al., 1993), além de impedir a formação de cristais de gelo durante o armazenamento em baixas temperaturas (PAMMENTER; KERJAK, 1999).

Além da tolerância à dessecação ser um processo físico, também está associado a diversas mudanças na expressão de genes, indicando que esta também é uma etapa muito ativa em respeito a transcrição (ANGELOVICI et al., 2010). Porém, a expressão de um único gene durante a secagem não garante que a semente irá sobreviver à dessecação (JOSÉ et al., 2011), uma vez que é necessário a expressão de vários genes para que os mecanismos relacionados a tolerância à dessecação confirmem tal capacidade.

O ABA atua na regulação de expressão de genes, induzindo a síntese de vários tipos diferentes de proteínas (NEDEVA; NIKOLOVA, 1997), que podem desempenhar papel fisiológico importante durante o desenvolvimento da semente. É comprovado, por exemplo, que o ABI3 regula a abundância de proteínas LEA durante o processo de secagem (DELAHAIE et al., 2013).

É evidente que a capacidade da tolerância à dessecação não depende somente de mecanismos inerentes às sementes, mas também do nível de desenvolvimento, as condições em que ocorreu a secagem das mesmas, e qual fase do processo germinativo as mesmas se encontram (PAMMENTER; BERJAK, 1999; SONG et al. 2003).

2.4 Condicionamento fisiológico

O condicionamento fisiológico consiste no controle da hidratação das sementes, de maneira suficiente para ativar os processos metabólicos essenciais para a germinação, mas evitando a protrusão da raiz primária (HEYDECKER; HIGGINS; GULLIVER, 1973). Tem como principal objetivo reduzir o período de germinação, bem como sincronizar e melhorar a emergência das plântulas (SANTOS et al., 2008).

No entanto, muitos fatores podem influenciar esses efeitos, como o método de condicionamento, o período e a temperatura utilizada durante o procedimento (LIMA; MARCOS FILHO, 2010), podendo o efeito de um mesmo protocolo ser variável entre as espécies e entre lotes diferentes da mesma espécie (CHEN; FESSEHAIE; ARORA, 2012).

O osmocondicionamento é uma das técnicas mais comuns, melhorando o desempenho da germinação de sementes, bem como a tolerância a estresse (CHEN; FESSEHAIE; ARORA, 2012), sendo o polietilenoglicol (PEG) o mais

utilizado, por ser inerte, não tóxico, e não absorvível pelas sementes (SANTOS; SILVA-MANN; FERREIRA, 2011).

O uso de condicionamento fisiológico pode possibilitar o restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes que passaram a ser sensíveis à dessecação ao longo do processo germinativo (BUTINK et al., 2006; COSTA et al., 2015; FARIA et al., 2005; MAIA et al., 2011).

O uso de PEG, em combinação com o ABA e baixas temperaturas tem apresentado resultados satisfatórios no restabelecimento da tolerância à dessecação de sementes ortodoxas após a germinação (BUTINK et al., 2003; ANGOSHTARI et al., 2009). O potencial osmótico do PEG e o tempo de exposição podem influenciar na resposta de reindução da tolerância à dessecação (MAIA et al., 2011), assim como a concentração do ABA, sendo variável entre as espécies.

Estudando a reindução da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Arabidopsis thaliana* com o osmocondicionamento realizado utilizando PEG, Maia et al. (2014), observaram que após o restabelecimento da tolerância à dessecação mecanismos como estabilização de membranas e DNA, acúmulo de açúcares e proteínas LEA e sistemas antioxidantes estavam presentes.

Estudos realizados com sementes de *Arabidopsis thaliana* (MAIA et al., 2014) e *Brassica napus* (ANGOSHTARI et al., 2009) demonstraram que sementes em processo germinativo readquirem a tolerância à dessecação após condicionamento em ABA, o que ocorre devido a expressão de genes envolvidos na proteção celular (COSTA et al., 2015), desenvolvimento, e uma redução na expressão de genes relacionados ao crescimento celular e fotossíntese.

Dessa forma, o uso do PEG, associado ou não ao ABA, pode ser utilizado para redução da sensibilidade à tolerância à dessecação, tendo seus resultados analisados e esclarecidos através do uso de técnicas moleculares.

REFERÊNCIAS

- ALPERT, P. Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 209, n.9, p. 1575-1584, 2006.
- AMARA, I. et al. Insights into maize LEA proteins: from proteomics to functional approaches. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 53, n. 2, p. 321–329, 2012.
- ANDRADE, A. C. S. et al. Germinação de sementes de jenipapo: temperatura, substrato e morfologia do desenvolvimento pós-seminal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 3, p. 609-615, 2000.
- ANGELOVICI, R. et al. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 211-218, 2010.
- ANGOSHTARI, R. et al. Effects of abscisic acid on somatic embryogenesis and induction of desiccation tolerance in *Brassica napus*. **Asian Journal of Plant Science**, Dubai, v. 8, n. 4, p. 276-284, 2009.
- BARBEDO, C. J.; BILIA, D. A. C. Evolution of research on recalcitrant seeds. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, Número Especial, p.121-125, 1998.
- BARBEDO, C. J.; CENTENO, D. C.; RIBEIRO, R. C. L. F. Do recalcitrant seeds really exist? **Hoehnea**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 583-593, 2013.
- BARBEDO, C. J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 12, n. 2, p. 145-164, 1998.
- BECWAR, M. R.; STANWOOD, P. C.; ROOS, E..E. Dehydration effects imbibitional leakage from desiccation sensitive seeds. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 69, n. 5, p.1132-1135, 1982.
- BERJAK, P. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 1-15, 2006.
- BERJAK, P; PAMMENTER, N. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrance seeds. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, p. 1-9, 2013.

BOMAL, C.; LE, V. Q.; TREMBLAY, F. M. Induction of tolerance to fast desiccation in black spruce (*Picea mariana*) somatic embryos: relationship between partial water loss, sugars, and dehydrins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 115, n. 4, p. 523–530. 2002.

BONJOVANI, M. R.; BARBEDO, C. J. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. Subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. toleram temperaturas sub-zero. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 345-356, 2008.

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

BOVI, M. L. A.; MARTINS, C. C.; SPIERING, S. H. Desidratação de sementes de quatro lotes de pupunheira: efeitos sobre a germinação e o vigor. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 22, n. 1, p. 109-1112, 2004.

BOWLER, C; MANTAGU, M. V.; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 83–116, 1992.

BRUGGINK, G.T.; OOMS, J. J. J.; VAN DER TOORN, P. Induction of longevity in primed seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 9, n. 1, p. 49-53, 2007.

BUITINK, J., et al. Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, Cambridge, v. 47, n. 5, p. 735-50, 2006.

BUITINK, J., et al. Starvation, osmotic stress and desiccation tolerance lead to expression of different genes of the regulatory b and g subunits of the SnRK1 complex in germinating seeds of *Medicago truncatula*. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 55-67, 2003.

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

BUITINK, J.; LEPRINCE, O. Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. **Cryobiology**, Rockville, v. 48, n. 3, p. 215-228, 2004.

CACCERE, R. et al. Metabolic and structural changes during early maturation of *Inga vera* seeds are consistent with the lack of a desiccation phase. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 170, n. 9, p. 791-800, 2013.

CARVALHO, J. E. R.; NASCIMENTO, W. M. O. Sensibilidade de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) ao dessecamento e ao congelamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 11, p. 53-56, 2000.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994.

CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F., **Germinação: Do básico ao aplicado**, Porto Alegre: Artmed, Cap. 9, p. 149-162, 2004.

CAZETTA, E. et al. Frugivoria e dispersão de sementes de *Talauma ovata* (Magnoliaceae) no sudeste brasileiro. **Ararajuba**, v.10, n.2, p.199-206, 2002.

CHEN, K.; FESSEHAIE, A.; ARORA, R. Dehydrin metabolism is altered during seed osmopriming and subsequent germination under chilling and desiccation in *Spinacia oleracea* L. cv. Bloomsdale: possible role in stress tolerance. **Plant Science**, Oxford, v. 183, V. 27, p. 27-36, 2012.

CHENG, H.; SONG, S. Possible involvement of reactive oxygen species scavenging enzymes in desiccation sensitivity of *Antiaris toxicaria* seeds and axes. **Journal of Integrative Plant Biology**, Pequim, v. 50, n. 12, p. 1549-1556, 2008.

CLOSE, T.J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 97, n. 4, p.795-803, 1996.

COSTA, M. C. et al. Substratos para produção de mudas de jenipapo (*Genipa americana* L.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 1, p. 19-24, 2005.

COSTA, M.C.D. et al. A gene co-expression network predicts functional genes controlling the re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds. **Planta**, Berlin, v. 242, n. 2, p. 435-449, 2015.

DAWS, M. I. et al. Variable desiccation tolerance in *Acer pseudoplatanus* seeds in relation to developmental conditions: a case of phenotypic recalcitrance?

Functional Plant Biology, Victoria, v. 33, n. 1, p. 59-69, 2006.

DAWS, M. I. et al. Seed mass variation potentially masks a single critical water content in recalcitrant seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 14, n. 2, p. 185-195, 2004.

DELAHAIE, J. et al. LEA polypeptide profiling of recalcitrant and orthodox legume seeds reveals ABI3-regulated LEA protein abundance linked to desiccation tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 14, p. 4559-4573, 2013.

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

FARIA, J. M. R. et al. Physiological and cytological aspects of *Inga vera* subsp. *Affinis* embryos during storage. **Brazilian Journal Plant Physiol**, Campos dos Goytacazes, v. 18, n. 4, p. 503-513, 2006.

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

FARRANT, J. M.; SHERWIN, H. W. Mechanisms of desiccation tolerance in seeds and resurrection plants. In: International conference on seed science and technology, 2., 1998, Geneva. **Proceedings...** Geneva: Agricultural Experimental Station, 1998. p. 109-120.

FONSECA, S.C.L.; FREIRE, H.B. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 2, p. 297-303, 2003.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n.12, p. 909-930, 2010.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; GULLIVER, R. L. Accelerated germination by osmotic seed treatment. **Nature**, London, v. 246, n 5427, p. 42-44, 1973.

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

JOSÉ, A. C. et al. Protein expression. Upon desiccation and imbibition of *Magnolia ovata* A.St. Hil seeds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54, n. 3, p. 465-476, 2011.

JOSÉ, S. C. B. R. et al. Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 2, p.115-121, 2005.

KALEMBA, E. M.; PUKACKA, S. Association of protective proteins with dehydration and desiccation of orthodox and recalcitrant category seeds of three *Acer* genus species. **Journal Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 31, n. 3, p.351-362. 2012.

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

KRANNER, I. et al. Inter-nucleosomal DNA fragmentation and loss of RNA integrity during seed ageing. **Journal Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 63, n. 1, p. 63-72, 2011.

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **The New Phytologist**, Cambridge, v. 188, n. 3, p. 655-673, 2010.

LAVINSKY, A. O. et al. Effects of light availability and soil flooding on growth and photosynthetic characteristics of *Genipa americana* L. seedlings. **New Forests**, Nova York, v. 34, p. 34-41, 2007.

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

LEPRINCE, O.; HOEKSTRA, F. A. The responses of cytochrome redox state and energy metabolism to dehydration support a role for cytoplasmic viscosity in desiccation tolerance. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 118, n. 4, p. 1253-1264, 1998.

LIMA, L. B.; MARCOS FILHO, J. Condicionamento fisiológico de sementes de pepino e germinação sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 32 n. 1, p. 138-147, 2010.

LOBO, P. C.; JOLY, C. A. Tolerance to hypoxia and anoxia in neotropical tree species. In: SCARANO, F. R.; FRANCO, A. C. **Ecophysiological strategies of xerophytic and amphibious plants in the neotropics**. Rio de Janeiro: Programa de Pós-Graduação em Ecologia, 1998. (Oecologia Brasiliensis, 4).

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4 ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3 ed., Nova Odessa: Plantarum, 2000.

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

MAIA, J. et al. Abscisic acid (ABA) sensitivity regulates desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis* seeds. **New Phytologist**, Cambridge, v. 203, n. 1, 81-93, 2014.

MAIA, J. et al. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds and its associated transcriptome. **Plos One**, Cambridge, v. 6, n. 12, 2011.

MARTINS, C. C.; MARILENE, LA; NAKAGAWA, J. Qualidade fisiológica de sementes de palmitero-vermelho em função da desidratação e do armazenamento. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 25, n. 2, 2007.

MASETTO, T. E. et al. Re-induction of desiccation tolerance after germination of *Cedrela fissilis* Vell. Seeds. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 3, p. 1273-1825, 2014.

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

MCCABE, P. F.; LEAVER, C. J. Programmed cell death in cell cultures. **Plant Mol Bio**, Dordrecht, v. 44, n. 3, p. 359-368, 2000.

MIAO, N. H.; KANEKO, Y.; SUGAWARA, Y. Ultrastructural implications of pretreatment for successful cryopreservation of *Oncidium* protocorm like body. **CryoLetters**, Lewes, v. 26, n. 5, p. 333-340, 2005.

NEDEVA, D.; NIKOLOVA, A. Desiccation tolerance in developing seeds. **Journal of Plant Physiology**, Bethesda, v. 23, n.3/4, p. 100-113, 1997.

OOMS, J. J. et al. Acquisition of Desiccation Tolerance and longevity in Seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 102, n. 4, p. 1185-1191, 1993.

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

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Aspects of recalcitrant seed physiology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, Número especial, p. 56-69, 2000.

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

PEREIRA, W. V. S. et al. Desiccation tolerance of *Tapirira obtusa* seeds collected from different environments. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 4, p. 388-396, 2012.

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

SANTOS, A. R. F.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R. A. Restrição hídrica em sementes de jenipapo (*Genipa americana* L). **Revista Árvore**, Viçosa v. 35, n. 2, p. 213-220, 2011.

SANTOS, M. C. A. et al. Condicionamento osmótico de sementes. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 2, p. 1-6, 2008.

SILVA JÚNIOR, M. C. da; PEREIRA, B. A. da S. + **100 Árvores do Cerrado - Matas de Galeria**: guia de campo. Brasília: Ed. Rede de Sementes do Cerrado, 2009.

SILVA, D. B. et al. Jenipapo. In: VIEIRA, R. F. et al. **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. Edi: Roberto Fontes Vieira et al. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006.

SILVA, K. B. et al. Tolerância à dessecação de sementes de *Cinnamomum zeylanicum* Ness. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 587-594. 2012.

SONG, S. et al. Seed recalcitrance: a current assessment. **Acta Botanica Sinica**, China, v. 45, n. 6, p. 638-643, 2003.

TWEDDLE, J. C. et al. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 91, n. 2, p. 294–304, 2003.

VALERI, S. V.; PUERTA, R.; DA CRUZ, M. C. P. Efeitos do fósforo do solo no desenvolvimento inicial de *Genipa americana* L. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, n. 64, p. 69-77, dez. 2003.

VARIER, A.; VARI, A. K.; DADLANI, M. The subcellular basis of seed priming. **Current Science**, Columbus, v. 99, n. 4, p. 450-456, 2010.

VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995, cap. 10, p. 237-271.

VIEIRA, C. V. et al. Stress-associated factors increase after desiccation of germinated seeds of *Tabebuia impetiginosa* Mart. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht v. 62, n. 3, p. 257-263, 2010.

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

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

WANG, W. Q.; MØLLER, I. M.; SONG, S. Proteomic analysis of embryonic axis of *Pisum sativum* seeds during germination and identification of proteins associated with loss of desiccation tolerance. **Journal of Proteomics**, Austria, v. 77, p. 68–86, 2012.

WEN, B. et al. Cytological and physiological changes in recalcitrante chinese fan palm (*Livistona chinensis*) embryos during cryopreservation. **Protoplasma**, Germany, v. 249, n.2, p. 323-335, 2012.

WESLEY-SMITH, J. et al. The effects of two drying rates in the desiccation tolerance of embryonic axes of recalcitrant jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) seeds. **Annals of Botany**, London, v. 88, n. 4, p. 653-664, 2001.

WILLEKENS, H. et al. Catalases in plants. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 1, n. 3, p. 207–228, 1995.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 – REDUÇÃO DA SENSIBILIDADE À DESSECAÇÃO E AO ARMAZENAMENTO DE *Magnolia ovata*

RESUMO

Vários estudos têm obtido sucesso com o uso de PEG e/ou ABA na reindução da tolerância à dessecação em sementes germinadas de espécies ortodoxas, possibilitando avanços nos conhecimentos dos mecanismos que possibilitam tal característica. Com isso, utilizou-se tratamentos com PEG e ABA para verificar a sua eficiência na redução da sensibilidade à dessecação e ao armazenamento em sementes intermediárias de *Magnolia ovata*. A secagem das sementes até 10% de conteúdo de água não afetou significativamente a germinação. Sementes condicionadas com PEG tiveram redução na viabilidade, enquanto as sementes tratadas com ABA não sofreram efeito da secagem. No armazenamento, sementes com 5% de conteúdo de água tiveram maior germinação, sendo que as sementes tratadas com ABA (100 µM) apresentaram os melhores resultados. Não foram observadas mudanças na atividade das enzimas catalase, peroxidase e superóxido dismutase, assim como na abundância das proteínas totais e resistentes ao calor.

Palavras-chave: Atividade enzimática. Intermediária. Proteínas. Sementes florestais.

ABSTRACT

Many studies have obtained success with the use of PEG and/or ABA in the reinduction of desiccation tolerance in germinated seeds of orthodox species, enabling advances in knowledge of the mechanisms that allow such characteristic. Thus, treatments with PEG and ABA were used to verify their efficiency in reducing the sensitivity to desiccation and storage in intermediate seeds of *Magnolia ovata*. The drying of seeds until 10% of water content did not affect the germination significantly. PEG conditioned seeds had a reduction viability loss, whereas seed treated with ABA were not affected by drying. In the storage, seeds with 5% water content had higher germination, and the seeds treated with the ABA at 100µM presented the best result. No changes were observed in the activity of the catalase, peroxidase and superoxide dismutase enzymes, as well as in the abundance of total and heat resistant proteins.

Keywords: Enzymatic activity. Intermediates. Proteins. Forestry seeds.

INTRODUÇÃO

A tolerância à dessecação é a capacidade de suportar a perda de água e sobreviver, após a reidratação, sem danos permanentes (DEKKERS et al., 2015). Sementes com essas características são chamadas de ortodoxas. A conservação dessas sementes, seja por períodos curtos ou longos, é diretamente influenciada por esta característica (GONÇALVES et al., 2017).

A dificuldade de conservação da qualidade fisiológica de sementes não ortodoxas tem impedido a conservação de tais espécies (MASETTO et al., 2008). Sementes recalcitrantes são dispersas com alto conteúdo de água e alta atividade metabólica, e sua viabilidade é perdida com a diminuição do conteúdo de água (FARIA et al., 2006), não podendo ser armazenadas em baixas temperaturas e com baixo conteúdo de água (PAMMENTER; BERJAK, 1999).

A viabilidade das sementes ao longo da secagem e do armazenamento está diretamente relacionada a capacidade das mesmas de eliminar as espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas durante estes processos. Se não forem eliminadas, as EROs podem danificar macromoléculas, ou atuar como sinais que induzem a morte celular programada (KRANNER; BIRTIC, 2005).

Durante a secagem de sementes tolerantes à dessecação, a viscosidade citoplasmática aumenta, formando o estado vítreo (BUITINK; LEPRINCE, 2004), diminuindo todas as reações químicas, auxiliando na manutenção da viabilidade durante o processo de secagem e armazenamento, entretanto, as espécies sensíveis à dessecação não são capazes de manter a integridade das membranas e organelas durante a redução do conteúdo de água das sementes (BERJAK; PAMMENTER, 2000).

Trabalhos com reindução da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas germinadas têm sido utilizados na tentativa de compreender os mecanismos que impedem a secagem e o armazenamento de sementes sensíveis à dessecação. Para isso, o uso de condicionamentos com PEG e ABA tem proporcionado bons resultados (ANGOSHTARI et al., 2009; BUITINK et al., 2003; DEKKERS et al., 2015; MAIA et al., 2011; VIEIRA et al., 2010). O potencial osmótico do PEG e o tempo de exposição podem influenciar na resposta de reindução da tolerância à dessecação (MAIA et al., 2011), assim como a concentração do ABA, sendo variável entre as espécies. Estes podem regular genes que estão relacionados a atividades antioxidantes, respostas ao estresse e ao armazenamento, além de induzir a síntese de moléculas protetoras, como açúcares e proteínas LEA (*Late Embryonic Abundant Proteins*) e HSPs (*heat shock proteins*) (BUITINK et al., 2003; MAIA et al., 2011).

Acredita-se que o uso do PEG, associado ou não ao ABA, pode reduzir a sensibilidade à dessecação de sementes sensíveis à dessecação e ao armazenamento.

Magnolia ovata, pertencente à família Magnoliaceae, tem grande importância na recomposição das áreas ciliares (DURIGAN; NOGUEIRA, 1990), e na restauração de florestas ripícolas devido à sua adaptação a solos pantanosos. Suas sementes são classificadas como intermediária quanto à capacidade de tolerância à dessecação e ao armazenamento (JOSÉ et al., 2011).

Diante disso, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito do condicionamento em PEG e ABA na redução da sensibilidade à dessecação e prolongar a longevidade de sementes de *Magnolia ovata* armazenadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos frutos e beneficiamento das sementes

A coleta foi realizada no município de Lavras, MG, em um total de 7 matrizes. Os frutos de *M. ovata* foram coletados diretamente da árvore, e em seguida levados para o Viveiro Florestal da Universidade Federal de Lavras. Após a abertura natural dos frutos, as sementes foram beneficiadas com auxílio de uma peneira em água corrente, para retirada do arilo vermelho que recobre a semente. Em seguida, as sementes foram levadas para o Laboratório de Sementes Florestais, no Departamento de Ciências Florestais e mantidas em camada única sobre bancada para secagem da água superficial. As sementes foram armazenadas em câmara fria (5 °C) por no máximo cinco dias.

Determinação do conteúdo de água

O conteúdo de água foi determinado pelo método de estufa a 105 °C por 24 horas (BRASIL, 2009), com quatro repetições de 10 sementes cada. O cálculo foi feito na base úmida e os resultados expressos em porcentagem.

Condicionamento osmótico e tratamento com ABA

O condicionamento osmótico e o tratamento com ABA das sementes foi realizado em soluções de polietilenoglicol (PEG 6000) e ABA, nas seguintes condições: ABA 5 µM; ABA 50 µM; ABA 100 µM; PEG -2,1 MPa; ABA 5 µM + PEG -2,1 MPa; ABA 50 µM + PEG -2,1 MPa; ABA 100 µM + PEG -2,1 MPa. As soluções de PEG foram preparadas de acordo com recomendações de Sun (2002).

O ABA foi preparado em solução estoque de 1 mM em KOH 1 N, para posterior diluição de acordo com a concentração desejada.

Para o condicionamento, as sementes foram mantidas em bandejas plásticas contendo as soluções de PEG e ABA (200 mL de solução para cada um

quilo de sementes). A quantidade de solução utilizada não cobriu totalmente a camada de sementes, para permitir a oxigenação das mesmas. As bandejas foram vedadas com papel alumínio, seguindo recomendação de Costa et al. (2015), para evitar danos oxidativos pela presença de luz, e permaneceram em câmara de germinação na temperatura de 10 °C por 72 horas. As soluções foram trocadas diariamente, a fim de manter o potencial hídrico constante durante o período de condicionamento. Antes da troca, as soluções foram mantidas por duas horas a 10 °C para não haver variação de temperatura no momento da troca.

Após o condicionamento, as sementes foram lavadas em água corrente e permaneceram durante uma hora em sala climatizada a 20 °C para remoção da água superficial. Em seguida foi realizada a determinação do conteúdo de água e a secagem das sementes.

Secagem das sementes

Após o condicionamento fisiológico, as sementes passaram por secagem, seguindo recomendação de Magistralli et al. (2013). As sementes foram colocadas em sacos de tule, e em seguidas armazenadas em caixas tipo higrostat (caixa com tampa e circulação de ar interna mantida por um pequeno ventilador, possibilitando a homogeneização da umidade relativa dentro da caixa e aumentando a velocidade de secagem) contendo soluções salinas, seguindo a metodologia proposta por Magistralli et al. (2013) (Tabela 1). As sementes foram dispostas em camada úmida possibilitando uma secagem uniforme.

Durante a secagem, as sementes foram pesadas diariamente até atingirem os conteúdos de água de 15%, 10% e 5%. Para estimar o conteúdo de água das sementes durante a secagem foi utilizada a fórmula proposta por Hong e Ellis (1996). Ao atingir o peso alvo para cada conteúdo de água, foi realizada a

determinação do conteúdo de água pelo método de estufa. As sementes alcançaram 5% de conteúdo de água com 12 dias de secagem.

Tabela1 - Soluções salinas utilizadas para secagem das sementes de *Magnolia ovata*

Solução Salina	Concentração em água	Umidade relativa de equilíbrio	Tempo de exposição
LiCl	5g/100ml	95%	120h
MgSO₄·7H₂O	Solução saturada	89%	120h
NaCl	Solução saturada	75%	48h
Sílica gel	---	10%	48h

Fonte: Adaptado Magistralli (2013)

Armazenamento das sementes

Após atingirem 10% e 5% de conteúdo de água de cada condicionamento, as sementes foram armazenadas a -21 °C em recipiente hermeticamente fechado. Após 45 e 90 dias foram realizados testes de germinação para determinar a viabilidade das sementes.

Avaliação da qualidade das sementes

Antes da montagem dos testes de germinação, foi realizada a pré-umidificação das sementes em caixas gerbox durante 24 horas a 25°C. Para isso as sementes foram colocadas sobre tela, em camada única em caixa gerbox contendo 50 mL de água no fundo. Logo após, as sementes foram desinfetadas com hipoclorito de sódio (2% durante três minutos) e os testes de germinação montados em placas de Petri contendo duas folhas de papel filtro umedecidos com água, e então mantidas em germinadores tipo BOD a 25°C, com fotoperíodo (12 horas de luz/escuro). Foram utilizadas 5 repetições com 20 sementes cada.

As avaliações foram realizadas em intervalos regulares de três dias, tendo como critério de germinação a protrusão radicular (radícula com comprimento \geq

2 mm). O teste foi finalizado com 42 dias, e então foram analisadas a formação de plântulas normais (sistema radicular desenvolvido com raízes primárias e secundárias, e desenvolvimento do primeiro par de folhas).

Índice de velocidade de germinação (IVG)

A avaliação foi realizada diariamente, computando o número de sementes germinadas até a estabilização e calculado pela fórmula proposta por Maguire (1962).

Padrão eletroforético de proteínas totais e resistentes ao calor

Para a determinação do padrão eletroforético de proteínas totais e resistentes ao calor foram avaliadas as sementes no conteúdo de água inicial (20%), 15%, 10% e 5% de conteúdo de água, com e sem o condicionamento em PEG ou PEG+ABA (ABA 100 μ M, PEG -2,1 MPa, PEG -2,1 MPa+ ABA 100 μ M) em sementes antes e após o armazenamento por 45 dias com 10% e 5% de conteúdo de água.

Foram macerados em nitrogênio líquido sementes de *M. ovata* e então 100 mg do macerado foram colocados em microtubos de 300 μ l para a extração. Em seguida foi adicionado 1 mL do tampão de extração (50 nM de Tris HCL pH 7,5, 5 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂, 0,001 M de inibidor de protease e 1 μ L de β -mercaptoetanol). As amostras foram misturadas em vortex e centrifugadas a 12000 rpm por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi separado em duas alíquotas, uma para análise de proteínas totais e outra para proteínas resistentes ao calor. Neste caso, as amostras foram aquecidas por 15 min a 90 °C. Em seguida, todas as amostras foram colocadas no gelo por 15 minutos, e então centrifugadas a 12000 rpm por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos. A

quantificação das proteínas nos extratos foi realizada pelo método de Bradford (1976).

A eletroforese foi realizada em gel descontínuo de acrilamida (gel concentrador com acrilamida a 6% e separador a 12,5%). Para a aplicação das amostras no gel, foram utilizadas 40 µg de cada amostra de proteína, juntamente com 20 µL do tampão da amostra (2,5 mL de glicerol, 0,46 g SDS, 20 mg de bromofenol e completado para 20 mL com tampão de extração Tris HCL pH 7,5). A corrida foi realizada em cuba vertical, com tampão SDS, a 200 V por, aproximadamente, 6 horas

Ao término da corrida, o gel foi transferido para um recipiente onde foi realizada a fixação em solução contendo 40% de metanol e 7% de ácido acético por 30 minutos. Após esse período a solução de fixação foi descartada, os géis foram lavados em água destilada e então corados em solução contendo 0,08% (p/v) de Comassie Blue G250, 1,6% (v/v) de ácido ortofosfórico e 12% (p/v) de sulfato de amônio e mantidos em agitador por 72 horas. Em seguida foi realizada a descoloração dos géis em solução de Tris base 0,1M com pH 6,5, ajustado com ácido fosfórico. Os géis descoloridos foram mantidos imersos em água destilada até o momento da digitalização.

Atividade enzimática

Para análise eletroforética de enzimas, as sementes foram maceradas em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido, e armazenadas a -86 °C até o momento da extração. Para a extração das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), foi utilizado o tampão Tris HCL 0,2M pH 8,0 + 0,1% de mercaptoetanol, na proporção de 200 µL por 50 mg de sementes maceradas. Em seguida, foi homogeneizado em vortex e mantido em geladeira por 12 horas. Após esse período os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 14000 rpm, a 4 °C.

Para a extração da enzima peroxidase (PO) foi utilizado o tampão de extração fosfato (0,034 M de fosfato de sódio bi-básico; 0,2 M de sacarose; 2,56 g de PVP; 0,003M de DTT; 5,7 mL ácido ascórbico; 2,5 mM de borato de sódio; 1 g de PEG 6000; 0,2% de β -mercaptoetanol). Após, as amostras foram homogeneizadas em vortex e mantidas em geladeiras por 12 horas. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas por 30 minutos a 14000 rpm a 4 °C.

Para todas as enzimas, foram aplicados 40 μ L de cada amostra em canaletas de gel descontínuo de poliacrilamida a 7,5% no gel separador e 4,5% no gel concentrador. O tampão para o sistema gel/eletrodo utilizado foi o tris-glicina pH 8,9, e a corrida foi realizada a 120V durante cinco horas. Em seguida, seguindo a metodologia específica para cada enzima descrita por Alfenas (2006), os géis foram revelados.

Após a revelação os géis foram fotografados e analisados por comparação visual e utilizando o *software* ImageJ® para quantificação da intensidade das bandas observadas.

Análises Estatísticas

O experimento foi montado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC). A primeira parte do experimento que consistiu na análise do efeito do condicionamento e secagem na viabilidade das sementes foi realizado em um fatorial 3x8 (três conteúdos de água e oito condicionamentos), enquanto que o experimento de armazenamento foi analisado em um fatorial 2x8 (dois conteúdos de água e oito condicionamentos). Todos os dados foram analisados pelo *software* R for Windows e submetidos a análise de GLM (modelos lineares generalizados), sendo as médias comparadas pelo teste de LSD a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

As sementes apresentavam 20% de conteúdo de água, e de maneira geral, a secagem até 10% de conteúdo de água não afetou a germinação, exceto para os tratamentos em que as sementes foram condicionadas em PEG, nos quais foi observada uma redução da viabilidade quando as sementes foram secas de 15% para 10% de conteúdo de água. Verificou-se efeito positivo da embebição das sementes de *Magnolia ovata* em solução de ABA 5 μM , tendo-se em vista que após esse tratamento não houve efeito da secagem sobre a viabilidade das sementes. Como observado, o condicionamento em PEG teve efeito negativo nas sementes após secagem (Figura 1A e 1B) e o IVG (Figura 1E e 1F). Em todos os tratamentos onde foi realizado o condicionamento osmótico com PEG foi verificada redução na viabilidade, na formação de plântulas normais e no índice de velocidade de germinação. Em sementes com 10% de conteúdo de água, o uso do ABA 5 μM , 50 μM e 100 μM influenciou positivamente no IVG das sementes quando comparadas a testemunha (Figura 1E e 1F).

O uso do PEG, associado ao ABA ou não, influenciou negativamente a formação de plântulas normais, apresentando os menores resultados quando as sementes foram secas a 10% e 5% de conteúdo de água (Figura 1C e 1D). No conteúdo de água de 15%, o uso de ABA 50 μM proporcionou a maior porcentagem de plântulas normais, enquanto que no conteúdo de água de 5% o melhor resultado foi obtido com ABA 5 μM . Todos os condicionamentos que utilizaram PEG na conteúdo de água de 10% e 5% não apresentaram formação de plântulas normais.

Após o armazenamento por 45 dias a $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$, as sementes que foram tratadas com ABA 50 μM e 5 μM , respectivamente, promoveram maior germinação no conteúdo de água de 5% quando comparada a de 10%. Dentro de cada conteúdo de água, os tratamentos não apresentaram diferenças significativas,

quando avaliado no conteúdo de água de 10%, enquanto que no conteúdo de água de 5%, o tratamento das sementes com ABA 100 μ M apresentou resultado superior aos demais (Figura 2A E 2C). Em nenhum dos tratamentos houve formação de plântulas normais.

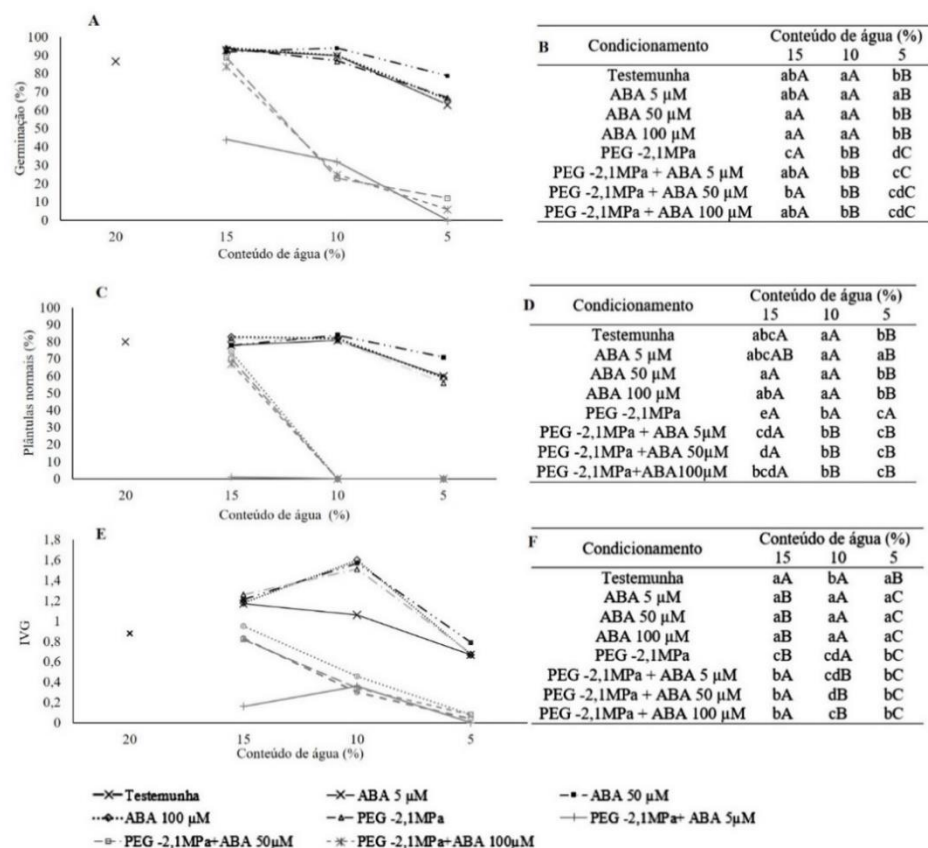
Para o IVG, observa-se um aumento nesse índice para alguns tratamentos, sendo os melhores resultados obtidos quando as sementes foram tratadas com ABA 50 μ M e 100 μ M e secas a 5% de conteúdo de água (Figura 2B e 2D).

Não há mudanças na expressão da SOD, tanto na secagem quanto no armazenamento (Figura 3C e 4C, respectivamente). A atividade da enzima CAT (Figura 3A) diminuiu ao longo da secagem das sementes. Porém, há um aumento de atividade quando realiza-se o condicionamento com PEG e ABA, quando comparado a testemunha. Há uma diminuição na atividade da PO (Figura 3B) com a secagem das sementes, mas não existe um padrão consistente.

Após o armazenamento, observou-se uma redução na atividade da PO (Figura 4B), enquanto que a CAT (Figura 4A) parece ter sido menos afetada pelo armazenamento. Em ambas as enzimas, as sementes com 5% de conteúdo de água tiveram uma atividade um pouco menor do que as sementes com 10%. Isto está relacionado ao fato que as sementes com 5% de conteúdo de água apresentaram maior viabilidade (Figura 2).

No perfil eletroforético das proteínas totais (Figura 5A) e resistentes ao calor (Figura 5B) não são observadas diferenças entre os tratamentos. O mesmo padrão eletroforético é apresentado para proteínas totais (Figura 6A) e resistentes ao calor (Figura 6B) em sementes que foram armazenadas por 45 dias a -21 °C. Nas sementes armazenadas, o tratamento com ABA 100 μ M, em ambas os conteúdos de água, apresentou maior intensidade nas bandas, nas proteínas resistentes ao calor (Figura 6B). Essa maior abundância proteica observada nesses tratamentos aparentemente está associada a uma resposta positiva das sementes, analisando-se a germinação (Figura 2A).

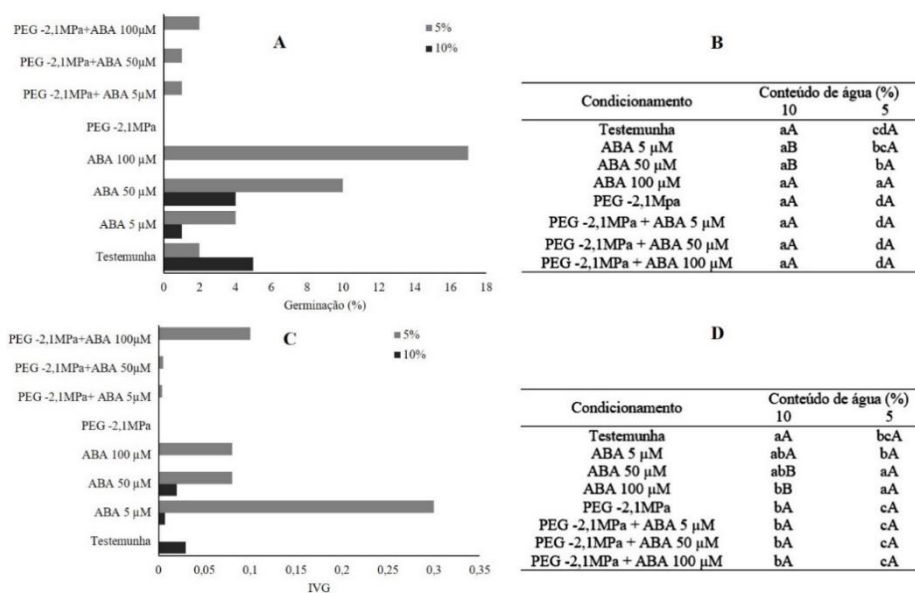
Figura 1 - Porcentagem de germinação, plântulas normais e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Magnolia ovata* submetidas ao condicionamento em PEG e tratamento com ABA.



Legenda: Painéis A e B: Porcentagem de germinação; C e D: plântulas normais; E e F: índice de velocidade de germinação. Nos painéis B, D e F, as mesmas letras, minúscula na coluna e maiúscula na linha, indicam ausência de diferenças estatísticas significativas pelo Teste de LSD ao nível de 5% de probabilidade entre os tratamentos utilizados e as porcentagens de conteúdo de água.

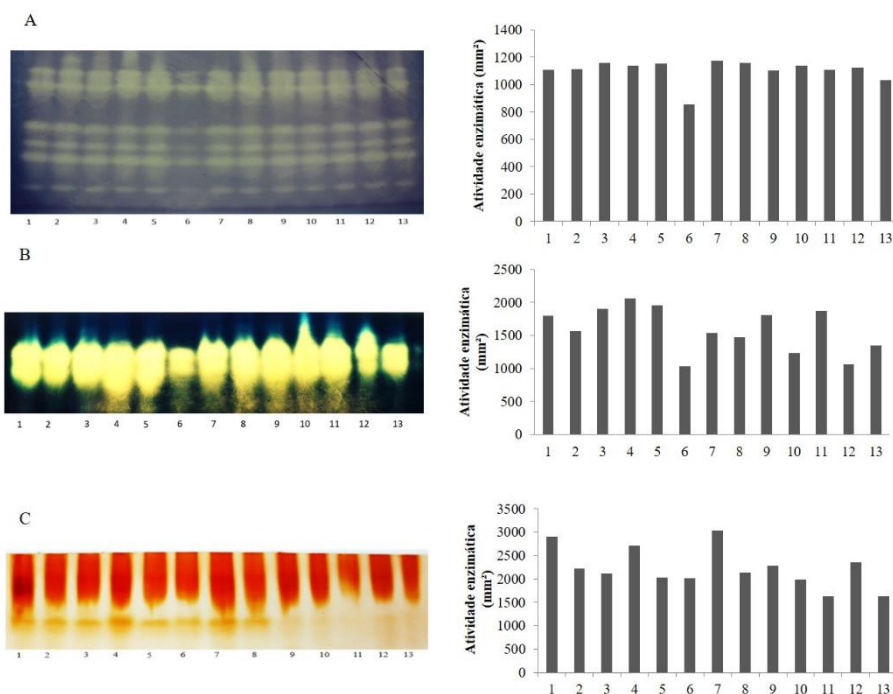
Fonte: Do autor (2018).

Figura 2 - Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Magnolia ovata* submetidas a diferentes tratamentos e armazenadas por 45 dias a -21°C .



Legenda: Painel **A**: Porcentagem de germinação; **C**: índice de velocidade de germinação. Nos painéis **B** e **D**, as mesmas letras, minúscula na coluna e maiúscula na linha, indicam ausência de diferenças estatísticas significativas pelo Teste de LSD ao nível de 5% de probabilidade entre os tratamentos utilizados e as porcentagens de conteúdo de água. Fonte: Do autor (2018).

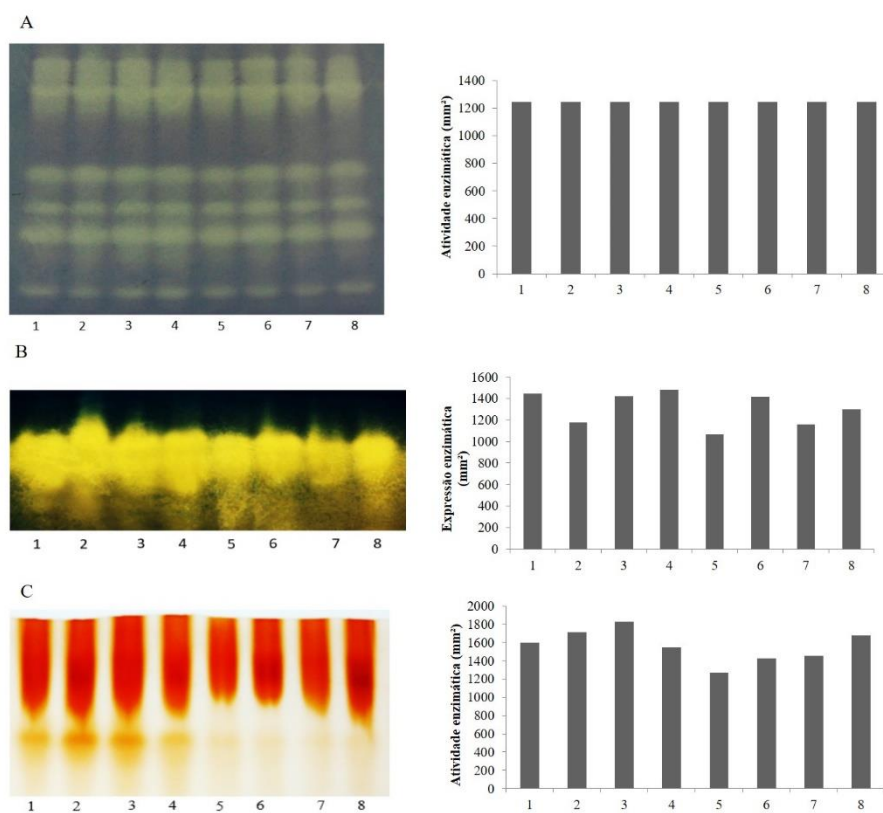
Figura 3- Atividade enzimática em sementes de *Magnolia ovata* após condicionamento em PEG e tratamento com ABA.



Legenda. Géis de eletroforese após coloração para revelação das enzimas A- Superóxido Dismutase; B- catalase; C- peroxidase (lado esquerdo) e representação numérica da intensidade das bandas (lado direito). Tratamentos: **1** – 20% de conteúdo de água; **2**- 15% de conteúdo de água; **3**- Sementes tratadas com ABA 100 μ M e secas a 15% de conteúdo de água ; **4**- Sementes tratadas com PEG -2,1MPa e secas a 15% de conteúdo de água ; **5**- Sementes tratadas com PEG -2,1MPa+ ABA 100 μ M e secas a 15% de conteúdo de água **6**- 10% de conteúdo de água ; **7**- Sementes tratadas com ABA 100 μ M e secas a 10% de conteúdo de água ; **8**- Sementes tratadas com -2,1MPa e secas a 10% conteúdo de água; **9**- Sementes tratadas com PEG -2,1MPa+ ABA 100 μ M e secas a 10% conteúdo de água ; **10**- 5% de conteúdo de água; **11**- Sementes tratadas com ABA 100 μ M e secas a 5% de conteúdo de água ; **12**- Sementes tratadas com PEG -2,1MPa e secas a 5% de conteúdo de água ; **13**- Sementes tratadas com PEG -2,1MPa+ ABA 100 μ M e secas a 5% de conteúdo de água

Fonte: Do autor (2018).

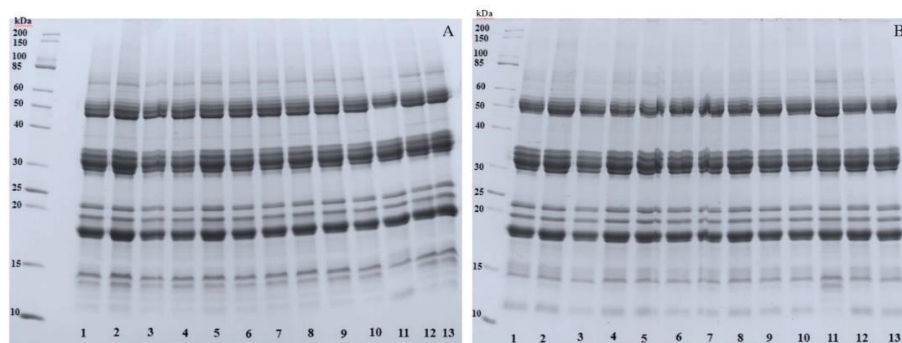
Figura 4- Atividade de enzimas em sementes de *Magnolia ovata* após com condicionamento em PEG, tratamento com ABA e secagem, seguido de armazenamento por 45 dias a -21°C .



Legenda. Géis de eletroforese após coloração para revelação das enzimas A-superóxido dismutase; B- catalase; C- peroxidase (lado esquerdo) e representação numérica da intensidade das bandas (lado direito). Tratamentos: **1-** 10% de conteúdo de água; **2-** Sementes condicionadas com ABA 100 μM e secas a 10% de conteúdo de água; **3-** Sementes condicionadas com PEG -2,1MPa e secas a 10% de conteúdo de água; **4-** Sementes condicionadas em PEG -2,1MPa+ABA 100 μM e secas até 10% de conteúdo de água; **5-** Sementes secas até 5% de conteúdo de água; **6-** Sementes tratadas com ABA 100 μM e secas até 5% de conteúdo de água; **7-** Sementes condicionadas em PEG -2,1MPa, secas até 5% de conteúdo de água; **8-** Sementes condicionadas em PEG -2,1MPa+ABA 100 μM , secas até 5% de conteúdo de água.

Fonte: Do autor (2018).

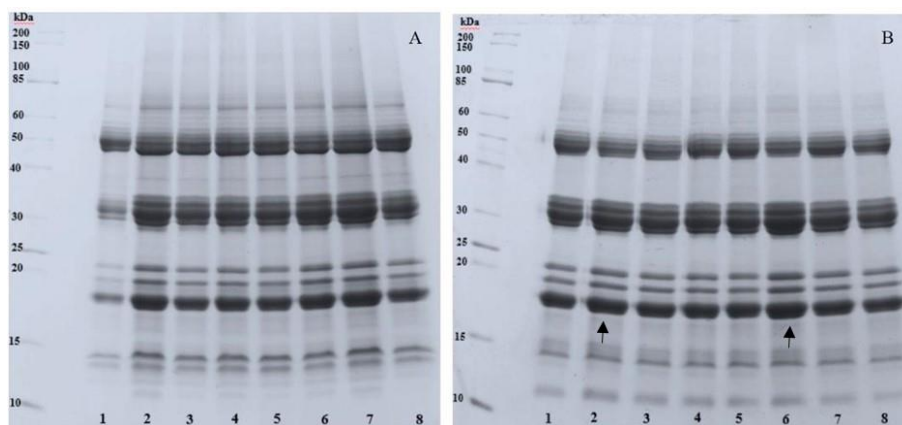
Figura 5- Padrão eletroforético das proteínas totais e resistentes ao calor de *Magnolia ovata* após diferentes tratamentos e com diferentes conteúdos de água.



Legenda. A – Proteínas totais; B- Proteínas resistentes ao calor. Tratamentos: **1** – 20% de conteúdo de água; **2**- 15% de conteúdo de água; **3**- Sementes tratadas com ABA 100 μ M e secas a 15% de conteúdo de água ; **4**- Sementes tratadas com PEG -2,1MPa e secas a 15% de conteúdo de água ; **5**- Sementes tratadas com PEG -2,1MPa+ ABA 100 μ M e secas a 15% de conteúdo de água **6**- 10% de conteúdo de água ; **7**- Sementes tratadas com ABA 100 μ M e secas a 10% de conteúdo de água ; **8**- Sementes tratadas com -2,1MPa e secas a 10% conteúdo de água; **9**- Sementes tratadas com PEG -2,1MPa+ ABA 100 μ M e secas a 10% conteúdo de água ; **10**- 5% de conteúdo de água; **11**- Sementes tratadas com ABA 100 μ M e secas a 5% de conteúdo de água ; **12**- Sementes tratadas com PEG -2,1MPa e secas a 5% de conteúdo de água ; **13**- Sementes tratadas com PEG -2,1MPa+ ABA 100 μ M e secas a 5% de conteúdo de água.

Fonte: Do autor (2018).

Figura 6- Padrão eletroforético das proteínas totais (A) e resistentes ao calor (B) de *Magnolia ovata* após diferentes tratamentos, em diferentes conteúdos de água, armazenadas por 45 dias a -21°C .



Legenda. A – Proteínas totais; B- Proteínas resistentes ao calor. Tratamentos: **1-** 10% de conteúdo de água; **2-** Sementes condicionadas com ABA $100\ \mu\text{M}$ e secas a 10% de conteúdo de água; **3-** Sementes condicionadas com PEG $-2,1\text{MPa}$ e secas a 10% de conteúdo de água; **4-** Sementes condicionadas em PEG $-2,1\text{MPa}+\text{ABA}\ 100\ \mu\text{M}$ e secas até 10% de conteúdo de água; **5-** Sementes secas até 5% de conteúdo de água; **6-** Sementes tratadas com ABA $100\ \mu\text{M}$ e secas até 5% de conteúdo de água; **7-** Sementes condicionadas em PEG $-2,1\text{MPa}$, secas até 5% de conteúdo de água; **8-** Sementes condicionadas em PEG $-2,1\text{MPa}+\text{ABA}\ 100\ \mu\text{M}$, secas até 5% de conteúdo de água. As setas indicam os tratamentos com maior intensidade de bandas.

Fonte: Do autor (2018).

DISCUSSÃO

O PEG tem sido utilizado com sucesso no restabelecimento da tolerância à dessecação, em sementes com comportamento ortodoxo após a germinação, quando essas perdem a tolerância à dessecação (COSTA et al., 2015; MAIA et al., 2011; BUITINK et al., 2006; FARIA et al., 2005). Porém, para as sementes de *M. ovata*, o uso do PEG, associado ou não ao ABA, prejudicou a germinação das sementes. O PEG é considerado um produto inerte, não tóxico, devido ao fato de não ser absorvido pelas sementes durante o condicionamento (SANTOS; SILVA-

MANN; FERREIRA, 2011). Contudo, a solução de PEG é viscosa, o que atrapalha a areação uniforme da solução, diminuindo a permeabilidade do oxigênio (NASCIMENTO, 2004). Portanto, acredita-se que a redução na viabilidade das sementes tenha sido causada pela falta de oxigenação que pode ter ocorrido durante o tratamento em PEG, pois a falta do oxigênio causa a redução da atividade metabólica nos tecidos das sementes, respiração anaeróbica, que também pode ser diminuída pelo aumento do gás carbônico (GEIGENBERGER, 2003).

Com a secagem, as sementes de *M. ovata* perderam progressivamente a viabilidade. Em sementes sensíveis à dessecação, os danos que ocorrem no metabolismo estão diretamente relacionados a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BERJAK; PAMMENTER, 2008). A medida que se perde água, o metabolismo se torna desequilibrado, ocasionando o acúmulo de EROs, (VARGHESE et al., 2011), e o sistema antioxidante é ineficiente para removê-los (BERJAK; PAMMENTER, 2008), ocasionando danos irreversíveis em lipídios, proteínas e ácidos graxos (KRANNER et al., 2002).

Diferentes partes da semente apresentam níveis variáveis de tolerância à dessecação (MAIA et al, 2011). A não formação de plântulas normais pode estar relacionada a este fator, uma vez que durante a germinação foi verificada a protrusão radicular, entretanto, não ocorreu o desenvolvimento da parte aérea.

Dentre os mecanismos de tolerância à dessecação estão a atuação das proteínas resistentes ao calor, e dentro deste grupo estão incluídas as proteínas LEA. É possível que algumas proteínas LEA tenham um duplo papel durante o ciclo de vida da planta, funcionando como uma proteína de armazenamento durante a germinação e também na tolerância à dessecação durante o desenvolvimento da semente (MANFRE et al., 2009).

Não foram observadas alterações no padrão eletroforético das proteínas totais e resistentes ao calor. Provavelmente os tratamentos utilizados não foram

eficientes para ativar a proteção através dessas proteínas ou o método de análise não foi sensível o suficiente para detectar essas alterações. De forma semelhante, utilizando a mesma metodologia para análise, não foi verificada alteração no perfil proteico durante a secagem de sementes de *Handroanthus serratifolius* (GONÇALVES et al., 2015).

A dessecação aumenta de maneira acentuada a formação de EROs e radicais livres nas sementes. Dessa forma, um sistema antioxidante eficiente é fundamental para a tolerância à dessecação (KRANNER; BIRTIC, 2005; MOORE et al., 2009). A dessecação e o armazenamento afetam os mecanismos de controle que mantêm baixas as concentrações de EROs, e o aumento destes causará processos de deterioração, como perda de viabilidade, envelhecimento e morte (BECKMANN; AMES, 1998; KRANNER et al., 2002).

Houve uma tendência na diminuição da atividade da enzima PO durante a secagem e armazenamento, porém sem um padrão consistente, o mesmo observado por Illing et al. (2005) trabalhando com sementes de *Eragrostis nindensis* e *Eragrostis curvula* durante a secagem. Bailly (2004) sugere que esta enzima pode não estar relacionada ao mecanismo de tolerância à dessecação e ao armazenamento. Em sementes de *Citrus reshni*, a atividade das enzimas CAT e SOD aumentou no início da secagem, mas com a redução do conteúdo de água das sementes foi observada uma redução drástica da atividade dessas enzimas (GONÇALVES et al., 2017).

Estudando o armazenamento de sementes de *Oryza sativa*, Gao et al. (2016) não encontraram uma correlação entre as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e PO. Em sementes de *Ginkgo biloba* (TOMASSI et al., 2016), as respostas das enzimas PO e CAT foram semelhantes aos das sementes de *M. ovata*: a atividade da CAT foi menos afetada do que a PO, tendo pouca alteração durante o armazenamento. Acredita-se que a incapacidade das sementes de aumentar as atividades dessas enzimas durante a dessecação e armazenamento

pode ser uma das causas dos danos que ocorrem no armazenamento (TOMMASI et al., 2006).

Os dados referentes a produção de EROs e atividades antioxidantes em tecidos de sementes recalcitrantes em resposta à dessecação, são inconsistentes entre as espécies (BERJAK; PAMMENTER, 2013). O mesmo pode ocorrer com sementes intermediárias, uma vez que não foi observado um padrão consistente de atividade das enzimas estudadas. Isso pode ocorrer devido à grande variabilidade entre as espécies desses dois grupos, tais como o conteúdo de água no momento da dispersão, a taxa de perda de água e a resposta a secagem (BERJAK; PAMMENTER, 2008).

Mesmo não havendo a formação de plântulas normais após o armazenamento, o tratamento das sementes com ABA 100 μM e PEG+ABA 100 μM possibilitou uma porcentagem maior de germinação em relação aos outros tratamentos. Acredita-se que a aplicação de ABA possa ter ativado outros mecanismos que permitiram uma maior tolerância das sementes de *M. ovata*, tais como a presença de desidrinas, as quais são conhecidamente associadas a alterações nos níveis de ABA endógenos (CHANDLER; ROBERTSON, 1994). Em estudos com sementes de *Arabidopsis thaliana*, altas concentrações de ABA estimularam a formação ou liberação de açúcares protetores (MEURS et al., 1992). Sabe-se que alguns açúcares tem a função de preservar estrutural e funcionalmente proteínas e membranas durante o processo de secagem e armazenamento (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001), contribuindo com a manutenção da viabilidade das sementes.

CONCLUSÕES

A secagem das sementes até 10% de conteúdo de água não afeta a viabilidade das sementes de *M. ovata*.

O uso do PEG, associado ao ABA ou não, afetou negativamente a viabilidade das sementes.

O tratamento das sementes com ABA em doses variando de 5 a 100 μM pode aumentar a capacidade de armazenamento das sementes em baixas temperaturas ($-21\text{ }^{\circ}\text{C}$).

A atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase, e o perfil eletroforético de proteínas totais e resistentes ao calor não são afetados com a secagem e armazenamento das sementes de *M. ovata*.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2 ed., Viçosa: Editora UFV, 2006.

ANGOSHTARI, R. et al. Effects of abscisic acid on somatic embryogenesis and induction of desiccation tolerance in *Brassica napus*. **Asian Journal of Plant Science**, Dubai, v. 8, n. 4, p. 276-284, 2009.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, n. 2, p. 93-107, 2004.

BECKMANN, K. B.; AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. **Physiological**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 547-581, 1998.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrance seeds. **Frontiers in Plant Science**, New Haven, v.4, p. 1-9, 2013.

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

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. What ultrastructure has told us about recalcitrance seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, n. edição especial, p. 22-55, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254. 1976.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009, 399p.

BUITINK, J., et al. Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, Cambridge, v. 47, n. 5, p. 735-50, 2006.

BUITINK, J., et al. Starvation, osmotic stress and desiccation tolerance lead to expression of different genes of the regulatory b and g subunits of the SnRK1 complex in germinating seeds of *Medicago truncatula*. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 55-67, 2003.

BUITINK, J.; LEPRINCE, O. Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. **Cryobiology**, Rockville, v. 48, n. 3, p. 215-228, 2004.

CHANDLER, P.M., ROBERTSON, M. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 45, p. 113-141, 1994.

COSTA, M.C.D. et al. A gene co-expression network predicts functional genes controlling the re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds. **Planta**, Berlin, v. 242, n. 2, p. 435-449, 2015.

DEKKERS, B. J. W. et al. Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. **Planta**, Berlin, v. 241, n. 3, p. 563-577, 2015.

DURIGAN, G.; NOGUEIRA, J. C. B. **Recomposição de matas ciliares**. São Paulo: Instituto Florestal, 1990 (Série Registros, 4)

FARIA, J. M. R. et al. Physiological and cytological aspects of *Inga vera* subsp. *Affinis* embryos during storage. **Brazilian Journal Plant Physiol**, Campos dos Goytacazes, v. 18, n. 4, p. 503-513, 2006.

FARIA, J. M. R. et al. Changes in DNA and microtubules during loss and reestablishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula*

seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 418, p. 2119-2130, 2005.

GAO, J. et al. Comparative proteomic analysis of seed embryo proteins associated with seed storability in rice (*Oryza sativa L*) during natural aging. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 103, p. 31-44, 2016.

GEIGENBERGER, P. Response of plant metabolism to too little oxygen. **Current Opinion in Plant Biology**, [s.l.], v. 6, n. 3, p. 247–256, 2003.

GONÇALVES, L. H. N. et al. Physiological quality and expression of genes in seeds of *Handroanthus serratifolius* subjected to drying. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 37, n. 2, p. 102-110, 2015.

GONÇALVES, M. I. F. et al. Desiccation tolerance and antioxidant enzymatic activity in *Citrus reschni* seeds exposed to various drying rates. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 45, n. 2, p. 411-427, 2017.

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

HONG, T.D.; ELLIS, R.H. **A protocol to determine seed storage behavior: a protocol to determine seed storage behaviour**. Rome: IPGRI, 1996.

ILLING, N. et al. The signature of seeds in resurrection plants: a molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. **Integrative and Comparative Biology**, Mclean, v. 45, n. 5, p. 771-787, 2005.

JOSÉ, A. C. et al. Effects of drying rate and storage time on *Magnolia ovata* Spreng. Seed viability. **Seed Science and Technology, Zurich**, v. 39, n. 2, p. 425-434, 2011.

KRANNER, I.; BIRTIC, S. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. **Integrative and Comparative Biology**, Mclean, v. 45, n. 5, p.734-740, 2005.

KRANNER, I. et al. Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. **The Plant Journal**, [s. l], v. 31, n. 1, p. 13-24, 2002.

MAGISTRALLI, P. R. et al. Physiological behavior of *Genipa americana* L. seeds regarding the capacity for desiccation and storage tolerance. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 495-500, 2013.

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

MAIA, J. et al. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds and its associated transcriptome. **Plos One**, Cambridge, v. 6, n. 12, 2011.

MANFRE, A. J. et al. Seed dehydration and the establishment of desiccation tolerance during seed maturation is altered in the *Arabidopsis thaliana* mutante *atem6-1*. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 243-253, 2009.

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

MEURS, C. et al. Role of abscisic acid in the induction of desiccation tolerance in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 98, n. 4, p. 1484-1493, 1992.

MOORE, J. P. et al. Towards a systems-based understanding of plant desiccation tolerance. **Plant Science**, Limerick, v. 14, n. 2, p. 110-117, 2009.

NASCIMENTO, W. M. **Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2004. Circular Técnica

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

SANTOS, A. R. F.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R. A. Restrição hídrica em sementes de jenipapo (*Genipa americana* L). **Revista Árvore**, Viçosa v. 35, n. 2, p. 213-220, 2011.

SUN, W. Q. Methods for the study of water relations under desiccation stress. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. New York: Wiley, 2002, cap. 2, p. 47-83.

TOMMASI, F. et al Effects of storage temperature on viability, germination and antioxidant metabolism in *Ginkgo biloba* L. seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, n. 5-6, p. 359-368, 2006.

VARGHESE, B. et al. Diferencial drying rates of recalcitrant *Trichilia dregeana* embryonic axes: a study of survival and oxidative stress metabolismo. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 142, n.4, p. 326-338, 2011.

VIEIRA, C. V. et al. Stress-associated factors increase after desiccation of germinated seeds of *Tabebuia impetiginosa* Mart. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht v. 62, n. 3, p. 257-263, 2010.

ARTIGO 2 – REDUÇÃO DA SENSIBILIDADE À DESSECAÇÃO SEMENTES DE *Genipa americana*

RESUMO

A capacidade de suportar a perda de água e sobreviver ao estado seco é resultado de vários mecanismos e adaptações que impedem danos à estrutura celular. Diante disso, utilizou-se condicionamento em PEG e ABA em sementes de *Genipa americana* para reduzir a sensibilidade à dessecação dessas sementes, uma vez que as mesmas são classificadas como intermediárias. As diferentes concentrações de PEG e ABA utilizados favoreceram significativamente a viabilidade das sementes com diferentes conteúdos de água. Mesmo não sendo observado mudanças nos padrões eletroforéticos e enzimáticos, os tratamentos com PEG e ABA podem ter induzido mecanismos necessários para a tolerância à dessecação das sementes

Palavras-chave: Secagem. PEG. ABA. Atividade enzimática. Proteínas.

ABSTRACT

The ability to withstand water loss and survive the dry state is the results of several mechanisms and adaptations that prevent damage to the cellular structure. Thus, PEG and ABA conditioning were used on *Genipa americana* seeds to reduce the desiccation sensitivity of these seeds, since they are classified as intermediates. The different concentrations of PEG and ABA used significantly favored the viability of the seeds in different water contents. Even though no changes were observed in the electrophoretic and enzymatic patterns, PEG and ABA treatments may have induced mechanisms necessary for the tolerance of desiccation of the seeds.

Keywords: Drying. PEG. ABA. Enzymatic activity. Proteins.

INTRODUÇÃO

A tolerância à dessecação é a capacidade de suportar a perda extrema de água e sobreviver após a reidratação sem danos permanentes (ANGELOVICI et al., 2010), sendo considerado um processo complexo, que envolve a interação de vários fatores que atuam simultaneamente, possibilitando a semente suportar a secagem. (LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993). Vários são os mecanismos que são relatados como fatores que possibilitam a tolerância à dessecação, tais como o acúmulo de proteínas LEA (*Late Embryonic Abundant Proteins*), oligossacarídeos (sacarose, rafinose e estaquiose), redução dos vacúolos (vacuolização), sistema antioxidante eficiente, desdiferenciação celular, além de mecanismos de reparo durante a reidratação (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998; PAMMENTER; BERJAK, 2000).

A capacidade de suportar a secagem e sobreviver no estado seco é resultado de adaptações que impedem danos à estrutura celular durante a retirada de água (NEDEVA; NIKOLOVA, 1997) e durante o processo de reidratação. A proteção contra esses danos é caracterizada pelo ajuste de processos metabólicos e estruturais, possibilitando às sementes resistirem à desidratação e retomar as atividades metabólicas, assim como reparar eventuais danos causados pela reidratação (JOSÉ et al., 2011). Para que isso ocorra, é necessário que as sementes possuam capacidade de manter a integridade estrutural da membrana celular, a fim de reparar danos quando a água estiver novamente disponível (VERTUCCI; FARRANT, 1995).

A morte das sementes não tolerantes à dessecação durante o processo de desidratação está ligado à falha de diversos mecanismos, além da falha em reparar as lesões causadas pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), acumuladas devido à presença de um sistema antioxidante eficiente (BERJAK; PAMMENTER, 2013).

A peroxidação lipídica e o estresse oxidativo são considerados as duas principais causas da deterioração das sementes (BAILLY, 2004). Quando

sementes sensíveis à dessecação são desidratadas a níveis não suportáveis, o metabolismo torna-se desequilibrado e ocorre grande geração de EROs e/ou falhas nos sistemas antioxidantes (HALLIWELL, 2006). Essa incapacidade de produzir proteção adequada contra os danos oxidativos, decorrentes do metabolismo desordenado, é considerado por alguns pesquisadores como a principal causa da sensibilidade à dessecação (BAILLY, 2004; LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993; PAMMENTER; BERJAK, 1999).

A compreensão de como os mecanismos que atuam no processo de tolerância à dessecação ainda não foi bem esclarecida, mesmo com o avanço nas pesquisas utilizando-se sementes ortodoxas, as quais perdem a tolerância à dessecação após a germinação, sendo possível fazer o restabelecimento dessa característica utilizando tratamento osmótico PEG e através do uso do ABA (BUIKINK et al., 2003; FARIA et al., 2005; LEPRINCE et al., 2000; VIEIRA et al., 2010).

A incubação em PEG, por induzir a síntese de proteínas que realizam a proteção de DNA (FARIA et al., 2005), síntese de enzimas que atuam como antioxidantes (LANG et al., 2017), tais como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e a peroxidase (PO), também pode induzir a síntese de moléculas protetoras, como as proteínas LEA (MAIA et al., 2011). As proteínas LEA são de baixa complexidade, altamente hidrofílicas e termoestáveis (WISE, 2003), e acredita-se estarem diretamente relacionadas ao processo de proteção celular na tolerância à dessecação (DELAHAIE et al., 2013).

Genipa americana, conhecida popularmente como jenipapo, é encontrada em regiões de clima quente e úmido no Brasil (CAVALCANTE, 1996). Possui crescimento rápido, e é muito utilizada em projetos de arborização urbana e paisagísticos, além de ter uma grande utilização na culinária, para confecção de licores e doces (COSTA et al., 2005). Quanto a capacidade de tolerância à

dessecação e ao armazenamento, suas sementes são classificadas como intermediárias (SALOMÃO, 2004).

Dessa forma, por ser uma espécie importante e devido ao fato de possuir sementes que apresentam sensibilidade à dessecação e ao armazenamento, esse trabalho teve como objetivo analisar a influência do condicionamento em PEG e da aplicação de ABA na redução da sensibilidade à dessecação e ao armazenamento de sementes de *Genipa americana*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e beneficiamento

A coleta foi realizada nos municípios de Lavras e Itumirim, MG. Os frutos foram coletados após a queda natural, o que é considerado uma indicação da maturação das sementes para essa espécie. Após a coleta, os frutos foram levados para o beneficiamento. Foi realizada a mistura de areia lavada com as sementes e maceração manual sob água corrente utilizando-se uma peneira para retirada do mesocarpo. Em seguida as sementes foram levadas para o Laboratório de Sementes Florestais, no Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Lavras, e então dispostas em camada única sobre bancada para secagem da água superficial. As sementes foram armazenadas em sacos plásticos a 5 °C por sete dias, até o início dos testes.

Determinação do conteúdo de água

Logo após o beneficiamento e ao término de cada etapa de secagem, o conteúdo de água foi determinado pelo método de estufa a 105 °C por 24 horas (BRASIL, 2009), com quatro repetições de 10 sementes cada. O cálculo foi realizado na base úmida e os resultados expressos em porcentagem.

Condicionamento osmótico, tratamento com ABA e secagem

Após o beneficiamento, as sementes foram condicionadas em polietilenoglicol (PEG 6000) e ABA nas seguintes concentrações: ABA 5 μM ; ABA 50 μM ; ABA 100 μM ; PEG -2,1 MPa; ABA 5 μM + PEG -2,1 MPa; ABA 50 μM + PEG -2,1 MPa; ABA 100 μM + PEG -2,1 MPa. As soluções de PEG foram preparadas de acordo com recomendações de Sun (2002).

As sementes foram dispostas em camada única em bandejas de plástico com as respectivas soluções, sem que estas cobrissem totalmente as sementes, permitindo a oxigenação, e então acondicionadas em câmara de germinação a 10 °C por 72 horas. As soluções foram trocadas diariamente, para manter constante o potencial hídrico das soluções. Antes da troca, as soluções ficaram a 10 °C por duas horas para manter a mesma temperatura em que as sementes estavam armazenadas.

Após o condicionamento, as sementes foram lavadas em água corrente, e colocadas em sala climatizada a 20 °C por uma hora para secagem da água superficial. Em seguida foi realizada a determinação do conteúdo de água e iniciados os tratamentos de secagem das sementes.

Sementes secas foram expostas por diferentes períodos a uma sequência decrescente de umidade relativa do ar obtida por soluções salinas e sílica gel até atingirem o conteúdo de água desejado, seguindo a metodologia descrita por Magistralli et al. (2013). Para tal, as sementes de cada tratamento foram pesadas, colocadas em sacos de tule e acondicionadas em caixas tipo higrostat (caixa com tampa e circulação de ar interna, com um pequeno ventilador, possibilitando a homogeneização da umidade relativa do ar dentro da caixa) com solução salina, de acordo com a tabela 1. As sementes foram dispostas em camada única para manter a secagem o mais uniforme possível.

Tabela1 - Soluções salinas utilizadas para secagem das sementes de *Magnolia ovata*

Solução Salina	Concentração em água	Umidade relativa de equilíbrio	Tempo de exposição
LiCl	5g/100ml	95%	120h
MgSO₄·7H₂O	Solução saturada	89%	120h
NaCl	Solução saturada	75%	48h
Sílica gel	---	10%	48h

Fonte: Adaptado Magistralli (2013)

A umidade inicial da semente foi de 45%. Então, diariamente as sementes foram pesadas até atingirem os seguintes conteúdos de água: 40%, 30%, 20%, 15%, 10% e 5%. Para estimar o conteúdo de água durante a secagem foi utilizada a fórmula proposta por Hong e Ellis (1996) (Fórmula 1). Após 30 dias de secagem, as sementes estavam com 5% de conteúdo de água. Ao atingir o peso alvo, foi realizada a determinação do conteúdo de água pelo método de estufa, e então realizado o teste de germinação.

$$M = \frac{(100 - CA_i)}{(100 - CA_d)} \times M_i \quad (\text{Fórmula 1})$$

Onde:

M: massa (g) no conteúdo de água desejado

M_i: massa (g) no conteúdo de água inicial

CA_i: conteúdo de água inicial (base úmida)

CA_d: conteúdo de água desejado (base úmida)

Teste de germinação

Antes da montagem dos testes de germinação, as sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2% por três minutos, e lavadas com água corrente. Os testes de germinação foram montadas em placas de Petri com 9 cm de diâmetro, utilizando-se como substrato papel mata borrão umedecidos com

água na proporção de 2,5 vezes o peso do papel. A germinação foi realizada em câmara tipo Mangelsdorf a 25 °C, com luz constante. As sementes com 15%, 10% e 5% de conteúdo de água foram pré-umidificadas antes da germinação. Para isso as sementes foram colocadas em gerbox com 50 mL de água, sobre tela, em camada única de forma que as sementes não entrassem em contato direto com a água. A pré-umidificação foi realizada por 24 horas a 25 °C. Para cada teste, foram utilizadas cinco repetições de 20 sementes cada. As leituras foram realizadas a cada três dias, tendo como critério de germinação a protrusão radicular (2 mm). O teste teve a duração de 48 dias, e então foram avaliadas a porcentagem de germinação, porcentagem de plântulas normais e o índice de velocidade de germinação (IVG). Para o IVG utilizou-se a fórmula proposta por Maguire (1962).

Padrão eletroforético de proteínas totais e resistentes ao calor

Para a determinação do padrão eletroforético das proteínas totais e resistentes ao calor foram selecionados os seguintes tratamentos: sementes tratadas em ABA 5 µM, sementes condicionadas em PEG -2,1 MPa, sementes condicionadas em PEG -2,1 MPa + ABA 5 µM e a testemunha, nos conteúdos de água de 45%, 20% e 5%.

Para a extração proteica, sementes de *G. americana* de cada tratamento foram maceradas em nitrogênio líquido, e então utilizados 100 mg do macerado. Ao macerado foi adicionado 1 mL do tampão de extração (50 mM de Tris HCL pH 7,5, 5 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂, 0,001 M de inibidor de protease e 1 µL de β-mercaptoetanol). As amostras foram homogeneizadas em vortex e centrifugadas a 12000 rpm a 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante foi dividido em duas alíquotas: uma para análise de proteínas totais e outra para proteínas resistentes ao calor. Para a obtenção do extrato contendo as proteínas resistentes ao calor, o extrato foi aquecido a 90 °C por 15 minutos, em seguida incubado em

gelo por 15 minutos, e então centrifugadas novamente a 12000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi coletado e armazenado a -20 °C. A determinação da concentração proteica nos extratos obtidos foi realizado pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão.

Foram utilizadas 40 µg de proteína de cada amostra, diluída em 20 µL do tampão da amostra (2,5 mL de glicerol, 0,46g SDS, 20 mg de bromofenol e completado para 20 mL com tampão de extração Tris HCL pH 7,5).

Para eletroforese utilizou-se gel de poliacrilamida descontínuo (gel concentrador 6% e separador 12,5%) e a corrida foi realizada em cuba vertical, modelo SE600 (Hoefer) com tampão contendo 0,1% (p/v) de SDS, glicina 192 mM e trizma-base 25 mM, a 200V por, aproximadamente, seis horas. O gel foi então fixado solução contendo 40% de metanol e 7% de ácido acético por 30 minutos. Após a fixação os géis foram corados em solução de azul de coomassie G250 (0,08% (p/v) de Coomassie Blue G250, 1,6% (v/v) de ácido ortofosfórico e 12% (p/v) de sulfato de amônio) em agitação por 72 horas. Em seguida, o gel foi lavado com solução de descoloração (Tris base 0,1 M com pH 6,5, ajustado com ácido fosfórico), e então armazenado com água até a digitalização.

Atividade enzimática

Para a análise eletroforética das enzimas foram utilizados os mesmos tratamentos do perfil proteico. As sementes foram maceradas com nitrogênio líquido e para a extração das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), foi utilizado o tampão Tris HCL 0,2M pH 8,0 + 0,1% de mercaptoetanol, na proporção de 350 µL de tampão para cada 100 mg de sementes maceradas. Para a extração da enzima peroxidase (PO) foi utilizado o tampão fosfato (0,034 M de fosfato 0,034 M de fosfato de sódio bi-básico; 0,2 M de sacarose; 2,56% de PVP;

0,003 M de DTT; 5,7 mM ácido ascórbico; 2,5 mM de borato de sódio; 1% 40 de PEG 6000, 0,002% de β -mercaptoetanol).

Após a adição do tampão de extração, as amostras foram misturadas em vortex e mantidas em repouso overnight, em geladeira (10 °C). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 60 minutos, a 4 °C. Do extrato obtido foram aplicados 40 μ L de cada amostra em gel de poliacrilamida descontínuo (gel separador 7,5% e concentrador 4,5%), e a corrida foi realizada em uma cuba modelo SE600 (Hoefer) com tampão gel/eletrodo de tris-glicina pH 8,9 a 120V durante cinco horas.

Após a corrida, os géis foram revelados de acordo com a metodologia específica para cada enzima contida em Alfenas (2006)

Os géis foram fotografados e as imagens obtidas foram analisadas visualmente. Também foi feita a quantificação da intensidade das bandas utilizando o *software* ImageJ®.

Análises Estatísticas

O experimento foi montado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com fatorial 7 x 8 (sete conteúdos de água e oito combinações de tratamentos em PEG e/ou ABA). Todos os dados foram analisados pelo *software* R for Windows e submetidos a análise de GLM (modelos lineares generalizados) e as médias comparadas pelo teste de LSD a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Os fatores estudados (conteúdo de água e tratamento em PEG/ABA) apresentaram interação nas variáveis porcentagem de germinação e plântulas normais (Tabela 1 e 2, respectivamente).

Durante a secagem, sementes que não foram condicionadas apresentaram redução dos valores em todas as variáveis estudadas, porcentagem de germinação, plântulas normais e índice de velocidade de germinação (Tabela 1, 2 e 3, respectivamente). Entretanto, alguns tratamentos apresentaram efeito positivo sobre a porcentagem de germinação quando comparados a testemunha nos conteúdos de água de 20%, 10% e 5% (Tabela 1). No conteúdo de água de 20%, os tratamentos PEG -2,1 MPa, PEG -2,1 MPa + ABA 5 μ M e PEG -2,1 MPa + ABA 100 μ M foram superiores a testemunha, enquanto que no conteúdo de água de 10%, o condicionamento em PEG -2,1 MPa + ABA 50 μ M também apresentou resposta positiva. No conteúdo de água de 5%, todos os tratamentos, com exceção do PEG -2,1 MPa, foram superiores a testemunha.

O tratamento das sementes com ABA 5 μ M e ABA 100 μ M, reduziram a sensibilidade à dessecação, tendo aumentado a germinação quando as sementes apresentavam 15% e 10% de conteúdo de água, sendo estatisticamente iguais as sementes com 45% de conteúdo de água, que corresponde ao conteúdo de água de dispersão das sementes dessa espécie (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de germinação de sementes de *Genipa americana* submetidas ao condicionamento em PEG e aplicação de ABA antes da secagem. (continua)

	Conteúdo de água (%)						
	45	40	30	20	15	10	5
Testemunha	97 aA	94 abA	89 bA	62 eBC	80 cA	72 dBC	31 fC
ABA 5 μ L	87 aB	83 aBC	67 aD	57 cC	70 aBC	63 abD	42 dA
ABA 50 μ L	88 aB	74 bD	38 dE	58 dBC	65 cdCD	67 bcCD	41 dA
ABA 100 μ L	64 abcC	60 cE	40 dE	62 bcBC	70 aBC	69 abCD	39 dAB
Peg -2,1MPa	93 aAB	92 aA	90 aA	65 cAB	73 bAB	74 bABC	28 dC

Peg -2,1MPa	92	90	82 aB	72 cA	63	78	40 eA
+ ABA 5 μ L	aAB	aAB			dCD	bcAB	
Peg -2,1MPa	88 aB	82	74 cC	63	61 dD	79	32
+ ABA 50 μ L		abC		dBC		bcAB	eBC
Peg -2,1MPa	89 aB	65 cE	65 cD	72 cA	69	81 bA	32
+ ABA 100 μ L					cBC		dBC

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de LSD a 5% de probabilidade (conclusão).

O tratamento das sementes em PEG -2,1 MPa, PEG -2,1 MPa + ABA 5 μ M e PEG -2,1 MPa + ABA 100 μ M também reduziram a sensibilidade à dessecação, aumentando a formação de plântulas normais após secagem a 20% e 10% de conteúdo de água. Da mesma forma, o condicionamento em PEG a -2,1 MPa melhorou a resposta das sementes após a secagem até 40% de conteúdo de água em comparação à testemunha. Em todos os condicionamentos, a porcentagem de plântulas normais nas sementes com 15% e 10% de conteúdo de água foram superiores em comparação com aquelas secas a 30% e 20% de conteúdo de água, com exceção da testemunha, indicando que os tratamentos usados favoreceram a formação de plântulas normais nesses conteúdos de água (Tabela 2).

Os diferentes tratamentos utilizados nas sementes em diferentes conteúdos de água, em sua maioria, não afetaram significativamente o IVG (Tabela 3). Apenas quando as sementes foram secadas até 20%, 15% e 10% de conteúdo de água, os tratamentos em ABA 100 μ M e PEG -2,1 MPa + ABA 100 μ M, foram superiores a testemunha, além do ABA 50 μ M quando as sementes foram secadas a 15% e 10% de conteúdo de água (Tabela 3).

A análise da atividade enzimática mostrou pequenas alterações na atividade das enzimas SOD e CAT (Figura 1A e B, respectivamente), observando-se um pequeno aumento da atividade com a secagem das sementes. Não foi observada atividade da enzima PO em nenhum dos tratamentos analisados.

Analisando-se o perfil eletroforético de proteínas totais e proteínas resistentes ao calor, verificou-se que não há grandes variações de abundância de proteínas ao longo da secagem e nos tratamentos utilizados (Figura 2). Observa-se somente uma pequena redução na intensidade de algumas bandas de proteínas totais extraídas em todos os tratamentos com sementes com 5% de conteúdo de água.

Tabela 2. Porcentagem de plântulas normais de *Genipa americana* submetidas ao condicionamento em PEG e aplicação de ABA antes da secagem.

	Conteúdo de água						
	45%	40%	30%	20%	15%	10%	5%
Testemunha	91 aA	68 aB	58 cA	44 dAB	65 bcA	48 dBC	19 eA
ABA 5 µL	63 bE	72 aB	45 deB	39 eBC	53 cCD	48 cdBC	13 fAB
ABA 50 µL	76 aCD	33 bE	14 dE	24 cD	40 bEF	21 cdE	19 cdA
ABA 100 µL	39 aF	25 bF	17 cdE	20 bcD	36 aF	37 aD	11 dB
Peg -2,1MPa	82 aBC	80 aA	40 cBC	47 bcA	53 bCD	53 bAB	11 dB
Peg -2,1MPa +ABA 5 µL	88 aAB	49 cC	35 dCD	51 cA	55 bcBC	60 bA	18 eAB
Peg -2,1MPa + ABA 50 µL	80 aC	41 cdD	17 eE	34 dC	62 bAB	43 cCD	18 eAB
Peg -2,1MPa + ABA 100 µL	72 aD	28 cF	50 bE	50 bA	46 bDE	52 bB	12 eAB

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de LSD a 5% de probabilidade.

Os tratamentos com ABA 5 µM, PEG -2,1 MPa e PEG -2,1 MPa+ABA 5 µM em sementes com 5% de conteúdo de água apresentaram uma intensidade maior nas bandas, quando comparadas as sementes no mesmo conteúdo de água, porém, sem nenhum tratamento. Isto pode ter ocorrido porque os condicionamentos utilizados podem ter induzido a síntese de algum grupo

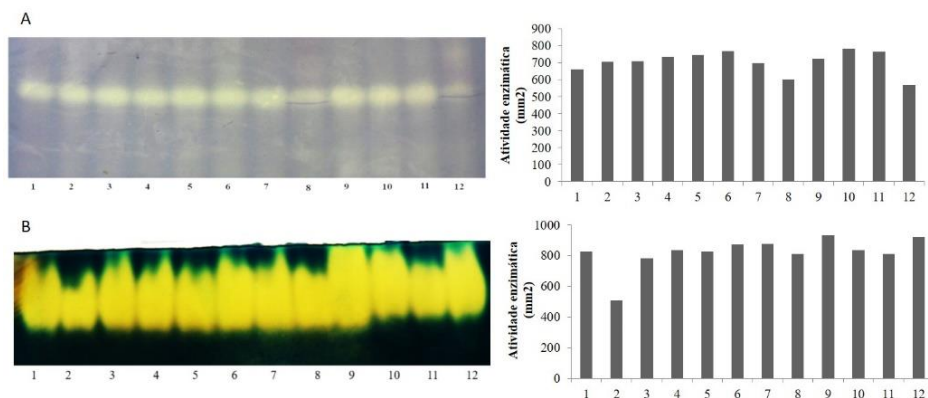
proteico associado a mecanismos de tolerância à dessecação, o que é confirmado com a porcentagem de germinação superior desses tratamentos em relação a testemunha (Tabela 1).

Tabela 3. Índice de velocidade de germinação de sementes de *Genipa americana* durante a secagem, após serem submetidas a diferentes tratamentos visando a redução da sensibilidade à dessecação.

	Conteúdo de água (%)						
	45	40	30	20	15	10	5
Testemunha	2,22	1,5	1,36	0,57	0,87	0,77	0,2
a	aA	abAB	aABC	aCD	aBCD	aBCD	2 aD
ABA 5 μ M	1,94	1,44	0,81	0,62	0,76	0,77	0,28
	abA	abAB	abBC	aBC	aBC	aBC	aD
ABA 50 μ M	1,32	0,77	0,32	0,4 aB	0,57	0,57	0,25
	bcA	abAB	bB		aAB	aAB	aB
ABA 100 μ L	0,71	0,73	0,31	0,35 aA	0,61 aA	0,58 aA	0,21
	cA	abA	bA				aA
PEG-2,1 MPa	2,17	1,54	1,25	0,57	0,82	0,93	0,18
	abA	aAB	aBC	aCD	aBCD	aBCD	aD
PEG -2,1 MPa + ABA 5 μ M	2,15	1,35	1,19	0,80	0,71	0,89	0,30
	abA	abAB	abB	aBC	aBC	aBC	aC
PEG -2,1 MPa + ABA 50 μ M	1,52	1,17	0,89	0,51	0,63	0,80	0,25
	abcA	abAB	abABC	aBC	aBC	aBC	aC
PEG -2,1 MPa + ABA 100 μ M	1,31	0,66	0,59	0,64	0,62	0,86	0,21
	bcA	bAB	abAB	aAB	aAB	aAB	aB

Médias seguidas de letras minúsculas na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de LSD a 5% de probabilidade.

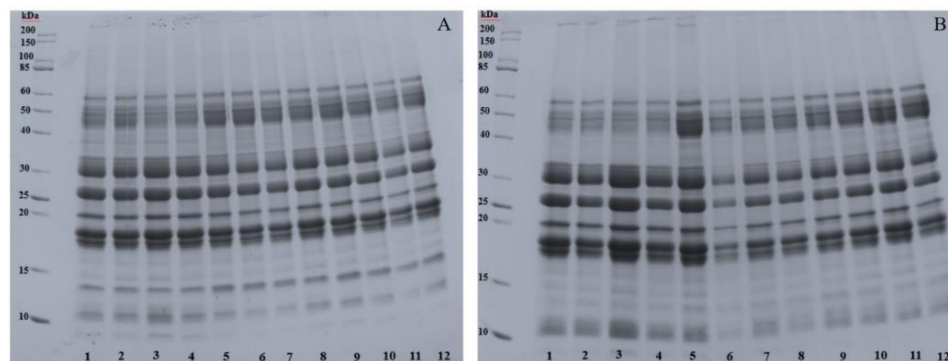
Figura 1. Atividade enzimática em sementes de *Genipa americana* submetidas a secagem, após tratamentos para redução da sensibilidade à dessecação



Legenda: Géis de eletroforese após coloração para revelação das enzimas superóxido dismutase (A) e catalase (B) (lado esquerdo) e representação numérica da intensidade das bandas (lado direito). Tratamentos: **1** – Sementes frescas com 45% de conteúdo de água; **2** – sementes frescas com 45% de água tratadas com ABA 5 μ M; **3** – sementes frescas com 45% de conteúdo de água condicionadas em PEG -2,1MPa; **4** – sementes frescas a 45% de conteúdo de água condicionadas em PEG -2,1MPa e tratadas com ABA 5 μ M; **5** – sementes secas a 20% de conteúdo de água; **6** – sementes secas a 20% de conteúdo de água e tratadas com ABA 5 μ M; **7** – sementes secas a 20% de conteúdo de água e condicionadas em PEG -2,1MPa; **8** – sementes secas a 20% de conteúdo de água, condicionadas em PEG -2,1MPa e tratadas com ABA 5 μ M; **9** – sementes secas a 5% de conteúdo de água; **10** – sementes secas a 5% de conteúdo de água e tratadas com ABA 5 μ M; **11** – sementes secas a 5% de conteúdo de água e condicionadas em PEG -2,1MPa; **12** – sementes secas a 5% de conteúdo de água, condicionadas em PEG -2,1MPa e tratadas com ABA 5 μ M.

Fonte: do autor (2018).

Figura 2. Padrão eletroforético das proteínas totais e resistentes ao calor em sementes de *Genipa americana* com diferentes condicionamentos e conteúdo de água



Legenda: Proteínas totais (A); proteínas resistentes ao calor (B). Tratamentos: **1** – sementes frescas a 45% de conteúdo de água; **2** – sementes frescas a 45% de conteúdo de água tratadas com ABA 5 μM ; **3** – sementes frescas a 45% de conteúdo de água condicionadas em PEG -2,1MPa; **4** – sementes frescas a 45% de conteúdo de água condicionadas em PEG -2,1MPa+ABA 5 μM ; **5** – sementes secas a 20% de conteúdo de água; **6** – sementes secas a 20% de conteúdo de água tratadas ABA 5 μM ; **7** – sementes secas a 20% de conteúdo de água condicionadas em PEG -2,1MPa; **8** – sementes secas a 20% de conteúdo de água condicionadas em PEG -2,1MPa+ABA 5 μM ; **9** – sementes secas a 5% de conteúdo de água; **10** – sementes secas a 5% de conteúdo de água tratadas com ABA 5 μM ; **11** – sementes secas a 5% de conteúdo de água condicionadas em PEG -2,1MPa; **12** – sementes secas a 5% de conteúdo de água condicionadas em PEG -2,1MPa+ABA 5 μM .

Fonte: do autor (2018).

DISCUSSÃO

A secagem das sementes abaixo de 10% de conteúdo de água resultou em uma grande redução da viabilidade. As moléculas de água são componentes críticos das reações químicas, contribuindo para a estabilidade das proteínas, DNA, lipídeos e membranas (DEKKERS et al., 2015), por isso, a sua falta ou limitação pode causar colapso celular em organismos não tolerantes. Situação semelhante foi observada em embriões de *Araucaria bidwillii*, tendo uma queda significativa de viabilidade após 28% de umidade (FRANCINI et al., 2006).

Níveis intermediários de umidade são prejudiciais as células pois as EROs são produzidas como subprodutos da respiração (LEPRINCE et al., 2000).

O progresso de desidratação é acompanhado de aumento de liberação de solutos e danos de membranas (ESPINDOLA et al., 1994; GASPARIN et al., 2017). A diminuição do conteúdo de água possibilita redução na respiração e liberação de solutos e, aumenta a longevidade das sementes mais secas, quando essas são tolerantes à dessecação (WALTERS et al., 2001). Porém, sementes sensíveis a dessecação não possuem mecanismos eficientes para suportar essa redução no conteúdo de água, como observado nas sementes de *G. americana*.

A secagem das sementes de *G. americana* ocasionou a perda da viabilidade com a diminuição do conteúdo de água. Berjak e Pammenter (2013) citam que a secagem de sementes sensíveis à dessecação podem ocasionar danos devido a geração descontrolada de EROS e um sistema antioxidante ineficiente, além de danos mecânicos devido à redução do volume celular.

O tratamento das sementes em PEG e ABA melhorou a porcentagem de germinação das sementes de *G. americana* após secagem a 20%, 10% e 5% de conteúdo de água. Buitink et al. (2003), estudando a reindução da tolerância à dessecação em sementes de *Medicago truncatula* relataram que o ABA e o PEG atuam como estímulos independentes: o PEG inibe o crescimento da radícula até que o ABA seja acumulado e as suas funções sejam realizadas. A aplicação do ABA exógeno pode induzir a expressão de genes que respondem a desidratação (NARUSAKA et al., 2004), enquanto o PEG pode induzir a síntese de proteínas que realizam a proteção do DNA (FARIA et al., 2005).

O uso isolado do ABA possibilitou a redução da sensibilidade à dessecação em sementes com 15% e 10% de conteúdo de água, sendo estatisticamente igual a testemunha, porém, reduziu a velocidade de germinação. Lopez-Molina; Mongrand e Chua, (2001), trabalhando com sementes de *Arabidopsis thaliana*, observaram que aplicação de ABA retardou a germinação,

podendo ter ativado genes que promovem a dormência, além de participar na regulação da transcrição do gene *LEA* (KERMODE; FINCH-SAVAGE, 2002).

Também foi observada uma redução na porcentagem de plântulas normais ao longo da secagem. Essa redução também foi observada em sementes de *Araucaria bidwillii* (FRANCINI et al., 2006), *Araucaria angustifolia* (GASPARIN et al., 2017). Vários podem ser os fatores que causam a redução da formação de plântulas normais, mas, certamente, um sistema antioxidante ineficiente e o aumento de radicais livres e EROs são uma das causas mais prováveis nesses casos (FRANCINI et al., 2006).

Neste contexto, a manutenção do equilíbrio celular pela ativação de enzimas antioxidantes tais como a SOD, CAT e PO para redução do estresse oxidativo é de grande importância (GAO et al., 2016). A falha no funcionamento deste sistema causará a deterioração das sementes, redução da viabilidade e conseqüentemente, a morte, como observado nas sementes de *G. americana*. A ineficiência do sistema antioxidante também promoveu a perda de viabilidade durante o armazenamento em sementes de *Shorea robusta* (CHAITANYA; NAITHANI; NAITHANI, 2000; PARKHEY; NAITHANI; KSHAVKANT, 2012), *Quercus robur* (HENDRY et al., 1992) e *Ginkgo biloba* (TOMMASI et al., 2006).

Durante a secagem das sementes ocorre um aumento de produção de EROs e radicais livres. Dessa forma, sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos são importantes para extinção da atividade desses agentes (BERJAK; PAMMENTER, 2008). Essas moléculas são consideradas como a fonte mais provável de danos aos ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (KRANNER; BIRTIC, 2005). Porém, Illing et al. (2005), sugere que algumas enzimas que atuam na remoção de radicais livres podem não ser exclusivas desse sistema. Somente em tecidos verdadeiramente tolerantes à dessecação a atividade dessas enzimas permanecerá elevada. Talvez isto tenha uma relação com o fato de não

ter sido observada atividade da enzima peroxidase nas sementes de *G. americana* durante o processo de secagem.

A atividade de proteínas resistentes ao calor tem sido um dos mecanismos mais estudados na adaptação dos organismos a estresse (GONÇALVES et al., 2015), em especial, na tolerância à dessecação. Dentro desse grupo de proteínas estão presentes as proteínas de choque térmico, deidrinas e proteínas LEA (MACHEREL et al., 2007).

A incubação em PEG e ABA podem ativar genes que regulam a atividade de determinadas enzimas relacionadas a tolerância à dessecação. Em sementes de *Brassica napus*, proteínas de choque térmico e LEA foram altamente expressas após o uso do PEG (LANG et al., 2017), regulando uma série de chaperonas durante a dessecação (XUE; DRENTH; MCINTYRE, 2015). Entretanto, a presença de deidrinas (proteínas pertencentes ao grupo das LEA) não foi suficiente para conferir a tolerância à dessecação em sementes recalcitrantes (FINCH-SAVAGE; PRAMANIK; BEWLEY, 1994). Acredita-se que o mesmo possa ocorrer nas sementes de *G. americana*, uma vez que não houve alteração no perfil das proteínas resistentes ao calor, e que esta característica não possibilitou a manutenção da viabilidade das sementes durante o processo de secagem.

José et al. (2005) trabalhando com secagem de sementes de milho, também não observaram mudanças no padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor. Dessa forma, a presença de tais proteínas não pode ser tomada como indicativo de que as sementes de determinada espécie pode ou não resistir a perda de água (BLACKMAN et al., 1991; JOSÉ et al., 2005), uma vez que são vários os mecanismos que conferem tal característica.

CONCLUSÕES

O condicionamento em PEG e ABA reduziu a sensibilidade a dessecação de sementes de *G. americana*.

Não foram identificadas alterações moleculares pelas técnicas utilizadas para estudo dos mecanismos associados a redução da sensibilidade a dessecação em sementes *G. americana*.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2 ed., Viçosa: Editora UFV, 2006.

ANGELOVICI, R. et al. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 211-218, 2010.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, n. 2, p. 93-107, 2004.

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

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrance seeds. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, p. 1-9, 2013.

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

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254. 1976.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009, 399 p.

BUITINK, J., et al. Starvation, osmotic stress and desiccation tolerance lead to expression of different genes of the regulatory b and g subunits of the SnRK1 complex in germinating seeds of *Medicago truncatula*. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 55-67, 2003.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 6 ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1996.

CHAITANYA, K. S. K.; NAITHANI, R.; NAITHANI, S. C. Ascorbic acid metabolism in ageing recalcitrant sal (*Shorea robusta* Gaertn. f.) seeds. **Indian Journal Experimental Biology**, [s. l.], v. 38, n. 10, p. 1031-1035, 2000.

COSTA, M. C. et al. Substratos para produção de mudas de jenipapo (*Genipa americana* L.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 1, p. 19-24, 2005.

DEKKERS, B. J. W. et al. Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. **Planta**, Berlin, v. 241, n. 3, p. 563-577, 2015.

DELAHAIE, J. et al. LEA polypeptide profiling of recalcitrant and orthodox legume seeds reveals ABI3-regulated LEA protein abundance linked to desiccation tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 14, p. 4559-4573, 2013.

ESPINDOLA, L. S. et al. Cellular and metabolic damage induced by desiccation in recalcitrant *Araucaria angustifolia* embryos. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 4, p. 193-201, 1994.

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

FINCH-SAVAGE, W. E.; PRAMANIK, S. K.; BEWLEY, J. D. The expression of dehydrin proteins in desiccation-sensitive (recalcitrance) seeds of temperate trees. **Planta**, Berlin, v. 193, n. 4, p. 478-485, 1994.

FRANCINI, A. et al. Enzymatic and non-enzymatic protective mechanisms in recalcitrant seeds of *Araucaria bidwillii* subjected to desiccation. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, n. 10, p. 556-5563, 2006.

GAO, J. et al. Comparative proteomic analysis of seed embryo proteins associated with seed storability in rice (*Oryza sativa* L) during natural aging. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 103, p. 31-44, 2016.

GASPARIN, E. et al. Physiological and ultrastructural responses during drying of recalcitrant seeds of *Araucaria angustifolia*, **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 45, n. 1, p. 112-129, 2017.

GONÇALVES, L. H. N. et al. Physiological quality and expression of genes in seeds of *Handroanthus serratifolius* subjected to drying. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 37, n. 2, p. 102-110, 2015.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration; where are we now? **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 97, n. 6, p. 1634-1658, 2006.

HENDRY, G.A.F. et al. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New Phytologist**, Cambridge, v.122, n. 2, p. 273-279, 1992.

HONG, T.D.; ELLIS, R.H. **A protocol to determine seed storage behavior: a protocol to determine seed storage behaviour**. Rome: IPGRI, 1996.

ILLING, N. et al. The signature of seeds in resurrection plants: a molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. **Integrative and Comparative Biology**, Mclean, v. 45, n. 5, p. 771-787, 2005.

JOSÉ, A. C. et al. Protein expression. Upon desiccation and imbibition of *Magnolia ovata* A.St. Hil seeds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54, n. 3, p. 465-476, 2011.

JOSÉ, S. C. B. R. et al. Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 2, p.115-121, 2005.

KERMODE, A.R.; FINCH-SAVAGE, W. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: Black, M.; Pritchard, H. **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Oxford: CABI, 2002, cap. 5, p. 149-184

- KRANNER, I.; BIRTIC, S. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. **Integrative and Comparative Biology**, Mclean, v. 45, n. 5, p.734-740, 2005.
- LANG, S. et al. Functional characterization of BnHSFA4a as a heat shock transcription factor in controlling the re-establishment of desiccation tolerance in seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 68, n. 9, p. 2361-2375, 2017.
- LEPRINCE, O. et al. Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 122, n. 2, p. 597–608, 2000.
- LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 3, n. 4, p. 231-246, 1993.
- LOPEZ-MOLINA, L; MONGRAND, S.; CHUA, N. H. A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 8, p. 4782-4787, 2001.
- MACHEREL, D. et al. Function and stress tolerance of seed mitochondria. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 129, n. 1, p. 233-241, 2007.
- MAGISTRALLI, P. R. et al. Physiological behavior of *Genipa americana* L. seeds regarding the capacity for desiccation and storage tolerance. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 495-500, 2013.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.
- MAIA, J. et al. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds and its associated transcriptome. **Plos One**, Cambridge, v. 6, n. 12, 2011.
- NARUSAKA, Y. et al. Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis*: Analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 55, n. 3, p. 327-342, 2004.

- NEDEVA, D.; NIKOLOVA, A. Desiccation tolerance in developing seeds. **Journal of Plant Physiology**, Bethesda, v. 23, n.3/4, p. 100-113, 1997.
- PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 9, n. 1, p. 13-37. 1999.
- PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Aspects of recalcitrant seed physiology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, Número especial, p. 56-69, 2000.
- PARKHEY, S.; NAITHANI, S. C.; KSHAVKANT, S. ROS production and lipid catabolism in desiccating *Shorea robusta* seeds during aging. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 57, p. 261-267, 2012.
- SALOMÃO, A. N. Desiccation, storage and germination of *Genipa Americana* seeds. In: SACANDÉ, M. et al. **Comparative storage: biology of tropical tree seeds**. Rome: IPGRI, 2004. p. 263-26,
- SUN, W. Q. Methods for the study of water relations under desiccation stress. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. New York: Wiley, 2002, cap. 2, p. 47-83.
- TOMMASI, F. et al Effects of storage temperature on viability, germination and antioxidant metabolism in *Ginkgo biloba* L. seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, n. 5-6, p. 359-368, 2006.
- VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995, cap. 10, p. 237-271.
- VIEIRA, C. V. et al. Stress-associated factors increase after desiccation of germinated seeds of *Tabebuia impetiginosa* Mart. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht v. 62, n. 3, p. 257-263, 2010.
- WALTERS, C. et al. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 11, n. 2, p. 135-148, 2001.
- WISE, M. J. LEApin to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. **BMC Bioinformatics**, [s. l.], v. 4, n. 52, p. 1-19, 2003.

XUE, G. P.; DRENTH, J.; MCINTYRE, L. TaHsfA6f is a transcriptional activator that regulates a suite of heat stress protection gene in wheat (*Triticum aestivum* L.) including previously unknown Hsf targets. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, n. 3, p. 1025-1039, 2015.

ARTIGO 3 – ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE *Genipa americana* APÓS TRATAMENTO EM PEG E ABA

RESUMO

As sementes recalcitrantes e intermediárias não suportam o armazenamento em temperaturas abaixo de zero. Isso torna impossível o armazenamento a longo prazo e dificulta o uso dessas espécies em programas de reflorestamento. Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento com PEG e ABA no comportamento das sementes de *Genipa americana* armazenadas em diferentes condições. Diferentes concentrações de PEG e ABA foram testadas em sementes secadas até 10% e 5% de conteúdo de água, e armazenadas a 25 °C, 5 °C e -21 °C por 90 dias. O armazenamento na temperatura de -21 °C reduziu a viabilidade das sementes em todos os tratamentos. Porém, nas demais temperaturas, observou-se aumento da longevidade com o uso de alguns tratamentos, como o ABA 5 µM, PEG -2,1 MPa e PEG -2,1 MPa + ABA 5 µM, quando armazenadas a 25 °C em sementes com 5% de conteúdo de água, e PEG -2,1 MPa + ABA 100 µM, armazenadas a 5 °C com 10% de conteúdo de água. Não foram observadas mudanças no perfil proteico de proteínas totais e proteínas resistentes ao calor durante o armazenamento, enquanto que pequenas alterações foram observadas na atividade das enzimas catalase e peróxido dismutase.

Palavras-chave: Intermediária. Enzimas. PEG. ABA. Proteínas.

ABSTRACT

Recalcitrant and intermediate seeds do not survive to the storage at low temperatures. This makes long-term storage impossible and makes it difficult to use these species in reforestation programs. Thus, this paper aims to evaluate the effect of PEG and ABA treatment on the behavior of *Genipa americana* seeds stored under different conditions. Different concentrations of PEG and ABA were tested on dried seeds up to 5% and 10% water content and stored at 25°C, 5°C and -21°C for 90 days. The storage at -21°C temperature reduced seed viability in all treatments. However, with the other temperatures, an increase in longevity was observed for some of the treatments, such as ABA 5µM, PEG -2,1MPa e PEG -2,1MPa+ ABA 5µM when stored at 25°C in seeds with 5% water content, and PEG -2,1MPa+ ABA 100 when stored at 5°C in seeds with 10% water content. No changes were observed in the protein profiling of total proteins and heat-

resistant proteins during storage, while small changes were observed in the activity of the catalase and peroxide dismutase enzymes.

Keywords: Intermediates. Enzymes. PEG. ABA. Proteins.

INTRODUÇÃO

Sementes tolerantes à dessecação conseguem suportar a perda de água, equipando-se com moléculas protetoras e entrando em um estado quiescente, metabolicamente inativo (ALPERT, 2005), sobrevivendo a longos períodos no estado dessecado (KRANNER; BIRTIC, 2005). Porém, as sementes recalcitrantes são caracterizadas por períodos de vida pós-colheita curtos (dias a alguns meses) (MASETTO et al., 2014). Para a maioria das espécies, a capacidade de armazenamento é ampliada quando a redução do teor de água está associada a diminuição da temperatura (FONSECA; FREIRE, 2003; WALTERS, 1998), havendo uma redução da taxa metabólica (WALTERS; HILL; WHEELER, 2005), impedindo o avanço do processo germinativo (HONG; ELLIS, 2002).

Sementes recalcitrantes e intermediárias não são armazenáveis nas condições adequadas para sementes ortodoxas (DELAHAIE et al., 2013). As sementes recalcitrantes são muito sensíveis à perda de água e não suportam o armazenamento a baixas temperaturas, sendo dispersas da planta mãe com alto conteúdo de água (MEDEIROS; EIRA, 2006; ROBERTS, 1973). Devido à alta umidade no momento da dispersão, sementes desse grupo germinam rapidamente após serem dispersas, sendo muito comum a viviparidade. Mesmo em condições favoráveis de armazenamento, as sementes sensíveis possuem longevidade curta, devido ao metabolismo acelerado, uma vez que as mesmas não entram em estado de quiescência (FONSECA; FREIRE, 2003).

Ao final da maturação, em sementes tolerantes à dessecação, a atividade metabólica é reduzida, minimizando a produção de espécies reativas de oxigênio

(EROs) (PAMMENTER; BERJAK, 1999). Uma produção descontrolada de EROs e um sistema antioxidante falho, podem levar ao estresse oxidativo (DEKKERS et al, 2015; VARGHESE et al., 2011), com danos irreversíveis em lipídios, proteínas e ácidos graxos (KRANNER et al., 2002), como ocorre nas sementes sensíveis à dessecação.

Muitas questões ainda são desconhecidas no que diz respeito aos mecanismos de tolerância à dessecação, em especial, nas espécies sensíveis à dessecação, que apresentam baixa longevidade (PAMMENTER et al., 1994).

O restabelecimento da tolerância à dessecação é possível em sementes ortodoxas em etapas de processo germinativo em que esta já foi totalmente perdida. Para tal, comumente é utilizado o condicionamento em polietilenoglicol (PEG) e ácido abscísico (ABA). Tais tratamentos são realizados com o objetivo de não só restabelecer a tolerância à dessecação, mas compreender os mecanismos e processos que envolvem esta capacidade (BUITINK, et al., 2003; BRUGGINK; OOMS; VAN DER TOORN, 2007; MAIA et al., 2011, 2014; MASETTO et al., 2014; VIEIRA et al., 2010). Com tais estudos, diversos mecanismos ligados à tolerância à dessecação têm sido desvendados, porém, muitos outros processos ainda são pouco compreendidos.

Certos processos de deterioração que ocorrem durante a secagem e armazenamento, como formação de radicais livre e desnaturação de proteínas, são significativamente reduzidos quando as sementes entram no estado vítreo (SUN, DAVIDSON; CHAN, 1998). A baixa mobilidade molecular, controlada pelo estado vítreo, é considerada um dos principais fatores para manter a viabilidade das sementes durante o armazenamento (MURTHY; KUMAR; SUN, 2003). As proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant Proteins*), juntamente com oligossacarídeos e pequenas proteínas de choque térmico, participam da formação do estado vítreo (KALEMBA; PUKACKA, 2008). As proteínas LEA também atuam mantendo a integridade das membranas e de outras proteínas (BRAY,

1993), substituindo moléculas de água por ligação de hidrogênio (BUITINK; LEPRINCE, 2004).

O estresse oxidativo é um dos principais fatores desencadeantes para a deterioração das sementes, e a ativação de um sistema antioxidante eficiente é fundamental para proteção das sementes (MOORE et al., 2009). As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (PO) atuam na eliminação das espécies reativas de oxigênio.

Considerada uma espécie de grande importância ecológica e com potencial econômico, *Genipa americana*, conhecida como jenipapo é utilizada em projetos paisagísticos e arborização urbana (COSTA et al., 2005), produção de madeira, ferramentas e construção civil (LORENZI, 2000), na culinária, para confecção de doces, vinhos, licores, além de ser utilizado na medicina popular (COSTA et al., 2005).

A *G. americana* é uma árvore de crescimento rápido, encontrada em regiões de clima quente e úmido (CAVALCANTE, 1996). Suas sementes são classificadas como intermediárias quanto à capacidade de tolerância à dessecação e ao armazenamento (CARVALHO; NASCIMENTO, 2000; SALOMÃO, 2004).

As sementes são consideradas um dos principais insumos para a agricultura e silvicultura, além de serem uma das formas de conservação da biodiversidade das florestas, seja através da conservação *ex situ*, pelo armazenamento em bancos de sementes, seja como fonte de propágulos para implantação de plantios para conservação *in situ*. Diante disso, buscou-se prolongar a viabilidade das sementes de *G. americana* durante o armazenamento através do uso de condicionamento com PEG e/ou ABA, avaliando-se as respostas fisiológicas e moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e beneficiamento dos frutos

A coleta foi realizada nos municípios de Lavras e Itumirim, MG. Os frutos foram coletados após a queda natural, o que é considerado uma indicação da maturação das sementes para essa espécie. Após a coleta os frutos foram levados para o beneficiamento. Foi realizada a mistura de areia lavada com as sementes e maceração manual sob água corrente utilizando-se uma peneira para retirada do mesocarpo. Em seguida, as sementes foram levadas para o Laboratório de Sementes Florestais, no Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Lavras, e então dispostas em camada única sobre bancada para secagem da água superficial. As sementes foram armazenadas em sacos plásticos a 5 °C por sete dias, até o início dos testes.

Determinação do conteúdo de água

O conteúdo de água foi determinado pelo método de estufa a 105 °C por 24 horas (BRASIL, 2009), com quatro repetições de 10 sementes cada. O cálculo foi feito na base úmida e os resultados expressos em porcentagem.

Condicionamento, secagem e armazenamento

Antes da secagem, as sementes foram condicionadas em soluções de ABA e polietilenoglicol (PEG 6000) nas seguintes concentrações: ABA 5 μM ; ABA 50 μM ; ABA 100 μM ; PEG -2,1 MPa; ABA 5 μM + PEG -2,1 MPa; ABA 50 μM + PEG -2,1 MPa; ABA 100 μM + PEG -2,1 MPa. As soluções de PEG 6000 foram preparadas de acordo com recomendações de Sun (2002). As sementes foram colocadas em camada única dentro bandejas contendo as soluções, sem que fossem totalmente cobertas, para não prejudicar a oxigenação. As bandejas foram

aconditionadas em câmaras de germinação a 10 °C por 72 horas. As soluções foram trocadas diariamente, para manter o potencial hídrico das soluções. Para manter a mesma temperatura de armazenamento das sementes, antes da troca, as soluções foram armazenadas por duas horas a 10 °C.

Após o período de condicionamento, as sementes foram lavadas em água corrente e colocadas sobre bancadas para retirada da água superficial. Em seguida, as sementes foram secadas, de acordo com a metodologia proposta por Magistralli et al. (2013). As amostras de cada tratamento, mais a testemunha, foram pesadas e colocadas em sacos de tule e em seguida armazenadas em caixas higrostat (caixa com tampa e circulação de ar interna, com um pequeno ventilador, possibilitando a homogeneização da umidade relativa dentro da caixa) contendo soluções salinas por diferentes períodos (MAGISTRALLI et al., 2013) (Tabela 1).

Tabela1. Soluções salinas utilizadas para secagem das sementes de *Genipa americana*

Solução Salina	Concentração em água	Umidade relativa de equilíbrio	Tempo de exposição
LiCl	5g/100ml	95%	144h
MgSO ₄ 7H ₂ O	Solução saturada	89%	240h
NaCl	Solução saturada	75%	288h
Sílica gel	---	10%	120h

Fonte: Adaptado de Magistralli (2013)

Durante a secagem, as sementes foram pesadas diariamente até atingirem o peso alvo referente ao conteúdo de água desejado de 10% e 5%. Para estimar o conteúdo de água, foi utilizada a fórmula proposta por Hong e Ellis (1996) (Fórmula 1). Após 30 dias, quando atingiram o peso alvo, foi confirmado o conteúdo de água através do método de estufa.

$$M = \frac{(100 - CA_i)}{(100 - CA_d)} \times M_i \quad (\text{Fórmula 1})$$

Onde:

M: massa (g) no conteúdo de água desejado

Mi: massa (g) no conteúdo de água inicial

CAi: conteúdo de água inicial (base úmida)

CAd: conteúdo de água desejado (base úmida)

Após atingirem os conteúdos de água desejados (5% e 10%), as sementes secas e controle (sementes frescas) foram colocadas em recipientes hermeticamente fechados e armazenadas em três temperaturas: 25 °C, 5 °C e -21 °C. Após 90 dias de armazenamento as sementes foram retiradas para análise da viabilidade, determinação do conteúdo de água e para análises moleculares.

Avaliação da qualidade das sementes

Antes da montagem dos testes de germinação, as sementes passaram pelo processo de pré-embebição em caixas gerbox durante 24 horas a 25 °C, seguido de desinfestação em hipoclorito de sódio 2% por três minutos, com posterior lavagem em água corrente. Os testes de germinação foram então montados em caixas gerbox com 9 cm de diâmetro, com papel mata borrão e umedecidos com água, e então mantidas em germinador Mangelsdorf a 25 °C com luz constante. Para cada tratamento foi utilizado cinco repetições de 20 sementes cada. As leituras foram realizadas a cada três dias, tendo como critério de germinação a protrusão radicular com 2 mm, durante 60 dias. Ao final do teste, foram avaliadas a porcentagem de sementes germinadas, plântulas normais (sistema radicular desenvolvido com raízes primárias e secundárias, e primeiro par de folhas visíveis) e índice de velocidade de germinação (IVG). O IVG foi calculado de acordo com a fórmula proposta por Maguire (1962).

Padrões eletroforéticos de proteínas totais e resistentes ao calor

A determinação do padrão eletroforético de proteínas totais e resistentes ao calor foi realizado, além da testemunha, nos tratamentos em ABA 5 μM , PEG -2,1 MPa e PEG -2,1 MPa+ ABA 5 μM armazenados a 5 °C por 90 dias.

As sementes foram maceradas em nitrogênio líquido e 100 mg do macerado foi usado para a extração. Ao tubo contendo o macerado foi adicionado 1 mL do tampão de extração (50 mM de Tris HCL pH 7,5, 5 mM de NaCl, 5 mM de MgCl_2 , 0,001 M de inibidor de protease e 1 μL de β -mercaptoetanol). As amostras foram homogeneizadas em vortex e centrifugadas a 12000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi separado em dois tubos: um para proteína total e outro para proteína resistente ao calor, o qual foi aquecido por 15 minutos a 90 °C. Em seguida, todas as amostras permaneceram no gelo por 15 minutos e em seguida foram novamente centrifugadas a 12000 rpm por 30 minutos, a 4 °C. A determinação da concentração proteica nos extratos obtidos foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão. O sobrenadante obtido foi coletado e armazenado a -20 °C.

Foi utilizado gel de poliacrilamida descontínuo, com gel concentrador a 6% e separador a 12,5%. Para cada amostra, foi aplicado 40 μg de proteína e 20 μL do tampão da amostra (2,5 mL de glicerol, 0,46g SDS, 20 mg de bromofenol e completado para 20 mL com tampão de extração Tris HCL pH 7,5). A corrida foi realizada em cuba vertical, modelo SE600 (Hoefer), com tampão contendo 0,1% (p/v) de SDS, glicina 192 mM e trizma-base 25 mM, a 200 V por, aproximadamente, seis horas.

Após a corrida, o gel foi transferido para um recipiente e realizado a fixação com 40% de metanol e 7% de ácido acético por 30 minutos. Após, o gel foi colado em solução de coloração 0,08% (p/v) de Comassie Blue G250, 1,6% (v/v) de ácido ortofosfórico e 12% (p/v) de sulfato de amônia e mantido em agitador por 72 horas. Após esse período o gel foi lavado com solução de

descoloração de Tris base 0,1 M com pH 6,5, ajustado com ácido fosfórico. O gel então foi armazenado em água até o momento da digitalização.

Atividades enzimáticas

Os mesmos tratamentos selecionados para análise de proteínas, foram utilizados para análise enzimática. As sementes foram maceradas em nitrogênio líquido e então armazenadas a -80 °C até o momento da extração.

Para as enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) foi usado o tampão Tris HCL 0,2 M pH 8,0 + 0,1% de mercaptoetanol, na proporção de 350 µl por 100 mg de sementes maceradas. A extração da enzima peroxidase (PO) foi realizada com o tampão de extração fosfato (0,034 M de fosfato 0,034 M de fosfato de sódio bi-básico; 0,2 M de sacarose; 2,56% de PVP; 0,003 M de DTT; 5,7 mM ácido ascórbico; 2,5 mM de borato de sódio; 1% 40 de PEG 6000, 0,002% de β-mercaptoetanol). Em seguida, todas as amostras foram homogeneizadas em vortex e deixadas overnight, em geladeira. Após, os tubos foram centrifugados por 60 minutos a 14000 rpm, a 4 °C.

Do sobrenadante, foram aplicados 40 µl das amostras em canaletas individuais de gel descontínuo de poliacrilamida (7,5% no gel separador e 4,5% no concentrador). A corrida foi realizada em cuba modelo SE600 (Hoefer) com tampão de tris-glicina pH 8,9, a 120 V por cinco horas. Em seguida, seguindo a metodologia específica para cada enzima descrita em Alfenas (2006), os géis foram revelados. Todos os géis foram fotografados e os padrões eletroforéticos foram quantificados pelo *software* ImageJ®.

Análises Estatísticas

O experimento foi montado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com esquema fatorial 2 x 8 x 3 (dois conteúdos de água, oito combinações de tratamentos em PEG/ABA e três temperaturas de armazenamento). Todos os dados foram analisados pelo *software* R for Windows e submetidos a análise de GLM (modelos lineares generalizados) e as médias comparadas pelo teste de LSD a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Foi possível observar interação entre os tratamentos na resposta das sementes após o armazenamento.

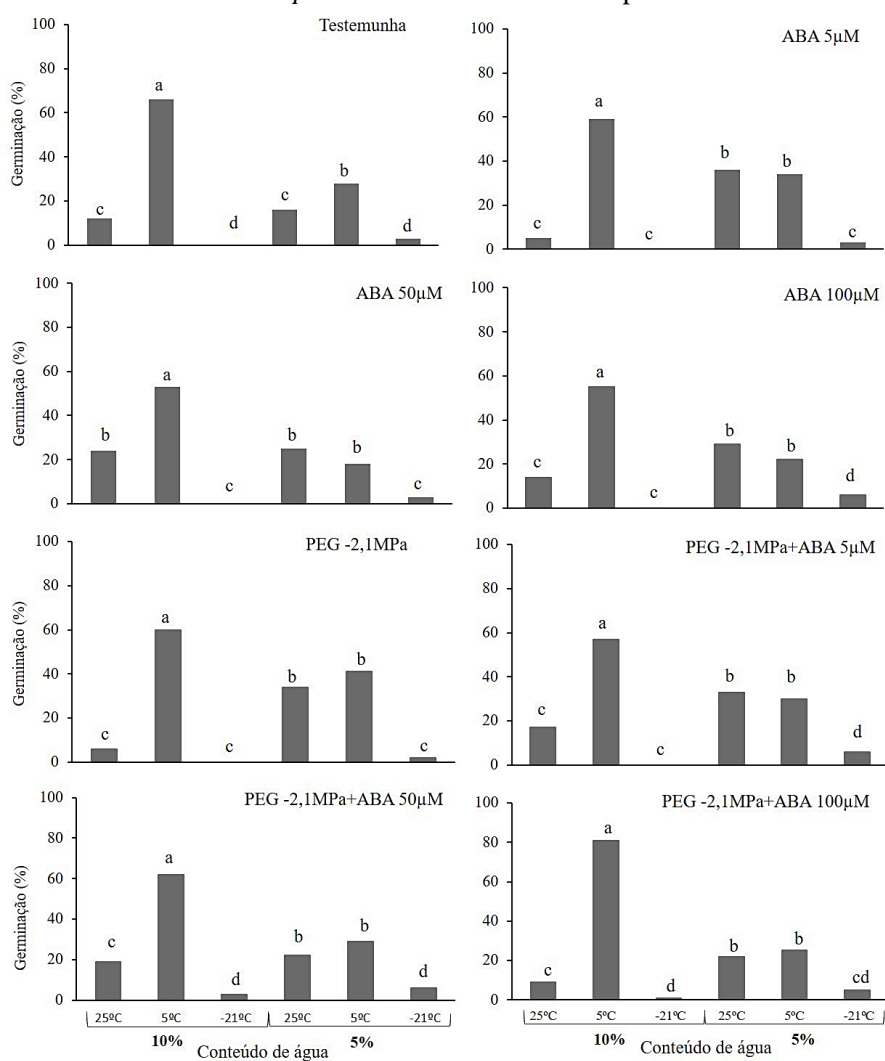
Quando as sementes foram armazenadas na temperatura de -21 °C por 90 dias verificou-se uma redução acentuada na viabilidade das sementes em todos os tratamentos. Por outro lado, o armazenamento de sementes com 10% de conteúdo de água na temperatura de 5 °C resultou na maior manutenção da viabilidade (Figura 1).

Quando analisada a interação dos fatores conteúdo de água e condicionamento em PEG/ABA, observa-se que a germinação das sementes armazenadas na temperatura de -21 °C não apresentou diferenças estatísticas (Figura 2C). Na temperatura de 25 °C, o tratamento das sementes em ABA 5 µM, PEG -2,1 MPa, PEG -2,1 Mpa + ABA 5 µM e ABA 100 µM em sementes com 5% de conteúdo de água apresentaram os melhores resultados, seguido pelo ABA 50 µM em sementes a 10% (Figura 2A).

Em todos os tratamentos, quando as sementes foram secadas até 10% de conteúdo de água, verificou-se maior porcentagem de germinação nas temperaturas de 5 °C, 25 °C e -21 °C (Figura 2D), respectivamente (Tabela 3). No armazenamento das sementes com 5% de conteúdo de água, para todos os tratamentos utilizados, não foram observadas diferenças significativas no

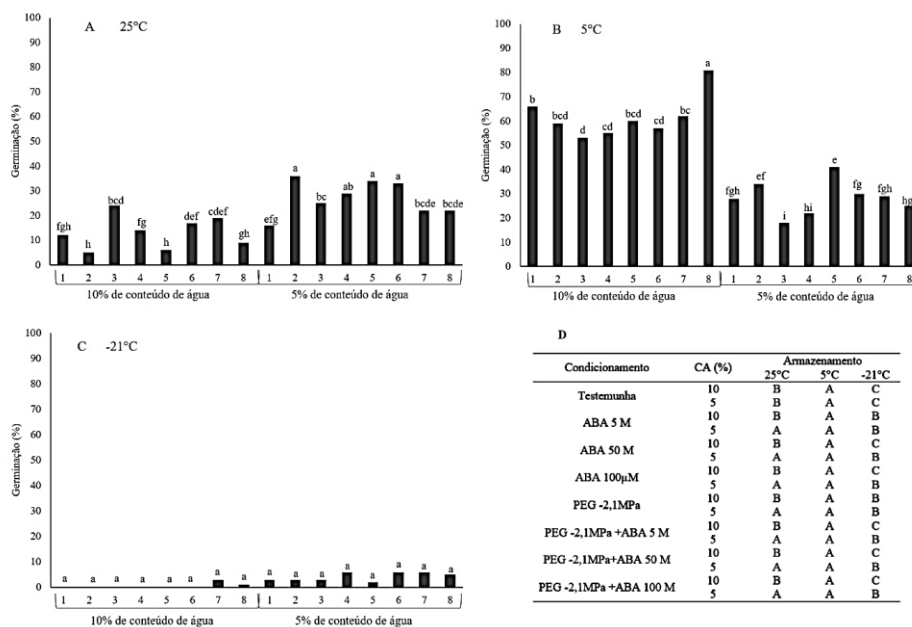
armazenamento a 25 °C e 5 °C, com exceção da testemunha, que apresentou maior viabilidade a 5 °C, seguida por 25 °C e -21 °C, respectivamente (Figura 2D).

Figura 1. Efeito do condicionamento em PEG, do tratamento com ABA, do conteúdo de água e temperatura de armazenamento na viabilidade de sementes de *Genipa americana* armazenadas por 90 dias.



Legenda. Em cada gráfico, as médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de LSD ao nível de 5% de probabilidade.
Fonte: do autor (2018).

Figura 2. Efeito do conteúdo de água das sementes e dos tratamentos em PEG/ABA na viabilidade de sementes de *Genipa americana* armazenadas por noventa dias em diferentes temperaturas.



Legenda. Conteúdo de água das sementes: 10 e 5%; condicionamento: 1-sementes não condicionadas e tratadas; 2-ABA 5µM; 3-ABA 50µM; 4-ABA 100µM; 5-PEG -2,1 MPa; 6- PEG -2,1 MPa + ABA 5µM; 7- PEG -2,1 MPa + ABA 50µM; 8- PEG -2,1MPa+ABA 100µM; temperaturas de armazenamento: 25, 5 e -21°C (A, B e C, respectivamente). Nos painéis A, B e C, as mesmas letras indicam ausência de diferenças estatísticas pelo teste LSD ($p < 0,05$) entre os condicionamentos e conteúdo de água das sementes para cada temperatura de armazenamento. No painel D, as mesmas letras, na linha, indicam ausência de diferenças estatísticas para cada condicionamento e para cada conteúdo de água em cada temperatura de armazenamento. CA – conteúdo de água

Fonte: do autor (2018).

Quando analisa-se o efeito da interação dos tratamentos x temperatura em cada conteúdo de água, observa-se, para as sementes com 10% de conteúdo de água que o condicionamento em PEG -2,1 Mpa + ABA 100 µM na temperatura de 5 °C foi o melhor tratamento para manutenção da viabilidade das sementes por 90 dias de armazenamento, seguida pela testemunha (sementes não condicionadas), condicionamento em PEG -2,1 Mpa + ABA 50 µM, PEG -2,1

MPa e tratamento com ABA 5 μM na mesma temperatura (Figura 3A). Para o armazenamento das sementes com 5% de conteúdo de água, o melhor resultado encontrado foi o condicionamento PEG -2,1 MPa armazenado a 5 °C, seguido pelo tratamento com ABA 5 μM e armazenado a 25 °C e a 5 °C, e o condicionamento em PEG -2,1 MPa e PEG -2,1 Mpa + ABA 5 μM e armazenado a 25 °C, respectivamente (Figura 3B). Os piores resultados foram encontrados quando as sementes foram armazenadas na temperatura de -21 °C, independentemente do conteúdo de água e das sementes armazenadas. (Figura 3 A e B).

Sementes armazenadas com 10% de conteúdo de água apresentaram maior germinação após armazenamento por 90 dias na temperatura de 5 °C quando comparado com sementes secadas até 5% de conteúdo de água (Figura 3C). O mesmo comportamento foi observado em relação a formação de plântulas normais, com exceção aos tratamentos testemunha (sem condicionamento e tratamento com ABA) e PEG -2,1 Mpa + ABA 100 μM , que não apresentaram diferença significativa quando armazenados nos conteúdos de água de 5% e 10%. (Tabela 1).

Por outro lado, quando as sementes secas a 5% de conteúdo de água foram armazenadas a 25 °C, verificou-se maior viabilidade quando realizou-se o tratamento das sementes com ABA 100 μM , condicionamento em PEG -2,1 MPa, PEG -2,1 Mpa + ABA 5 μM e PEG -2,1 Mpa + ABA 50 μM (Figura 3C).

Já para o armazenamento na temperatura de -21 °C não houve diferença estatística para a porcentagem de germinação e plântulas normais entre os tratamentos (Figura 3C e Tabela 1).

De uma forma geral, o armazenamento das sementes a 5 °C possibilitou a maior formação de plântulas normais quando comparado com o armazenamento a 25 °C e -21 °C. Em todos os condicionamentos com sementes a 10% de conteúdo de água, o armazenamento a 5 °C foi superior as demais temperaturas. Para as sementes com 5% de conteúdo de água, o armazenamento na temperatura de 5 °C

foi superior nos tratamentos onde as sementes foram condicionadas em PEG -2,1 MPa e PEG -2,1 MPa + ABA 5 μ M. Os demais tratamentos não tiveram efeitos significativos sobre a formação de plântulas normais (Figura 3C).

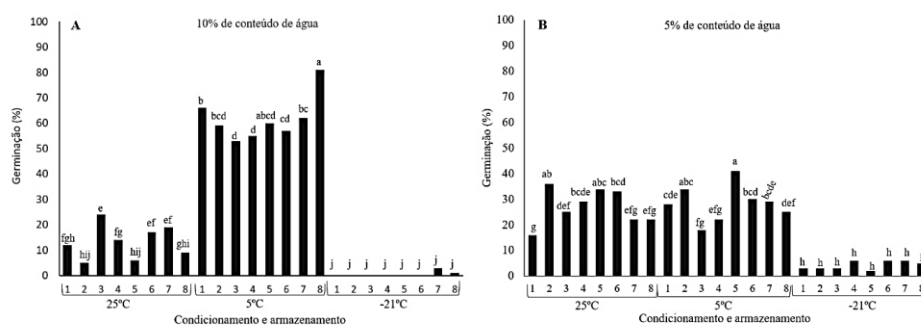
Quando avaliada a porcentagem de plântulas normais em função de cada temperatura observa-se que na temperatura de 25 °C, o tratamento das sementes em ABA 5 μ M e o condicionamento em PEG -2,1 MPa + ABA 5 μ M no conteúdo de água de 5% resultaram na maior formação de plântulas normais ($p < 0,05$), seguidos pelos tratamentos em ABA 50 μ M e condicionamento em PEG -2,1 MPa + ABA 50 μ M em sementes com 10% de conteúdo de água (Figura 3A).

No armazenamento a 5 °C, sementes secadas até 10% de conteúdo de água, condicionadas em PEG -2,1 MPa + ABA 100 μ M e PEG -2,1 MPa e testemunha, apresentaram maior porcentagem de plântulas normais em comparação aos demais tratamentos (Figura 3B).

O tratamento das sementes em ABA e condicionamento em PEG e armazenamento nas temperaturas de 25 °C e -21 °C não promoveram alterações significativas no índice de velocidade de germinação de sementes armazenadas com 5% e 10% de conteúdo de água. Na temperatura de 5 °C, em todos os tratamentos, com exceção do tratamento das sementes em ABA 100 μ M, o IVG no conteúdo de água de 10% foi superior a de 5% (Tabela 3).

Quando avalia-se a influência das temperaturas de armazenamento no IVG, observa-se que em todos os tratamentos, nos quais as sementes foram secas a 10% de conteúdo de água, o armazenamento na temperatura de 5 °C foi superior quando comparado com as demais, enquanto que em sementes secadas a 5% de conteúdo de água, apenas o condicionamento em PEG -2,1 MPa + ABA 5 μ M e armazenado a 5 °C apresentou IVG maior que o de sementes secadas até 10% de conteúdo de água. Os demais tratamentos, nos dois conteúdos de água estudados não afetaram significativamente o IVG nas temperaturas testadas (Tabela 3).

Figura 3. Efeito dos tratamentos em PEG/ABA e da temperatura de armazenamento na porcentagem de germinação de sementes de *Genipa americana* armazenadas por 90 dias



C	Condicionamento	Armazenamento		Conteúdo de água (%)		Condicionamento	Armazenamento		Conteúdo de água (%)	
		25°C	5°C	10	5		25°C	5°C	10	5
Testemunha		25°C	5°C	a	a	PEG -2,1MPa	25°C	5°C	b	a
		-21°C	a	b	5°C		-21°C	a	b	
		25°C	a	a	-21°C		a	a		
ABA 5 μM		25°C	5°C	a	a	PEG -2,1MPa+ABA 5μM	25°C	5°C	b	a
		-21°C	a	a	-21°C		a	a		
		25°C	b	a	25°C		b	a		
ABA 50 μM		25°C	5°C	a	b	PEG -2,1MPa+ABA 50μM	25°C	5°C	a	b
		-21°C	a	a	-21°C		a	a		
		25°C	a	a	25°C		a	a		
ABA 100 μM		25°C	5°C	a	a	PEG -2,1MPa+ABA 100μM	25°C	5°C	a	a
		-21°C	a	b	-21°C		a	b		
		25°C	a	a	25°C		a	a		

Legenda. Condicionamento: 1-Testemunha; 2-ABA 5μM; 3-ABA 50μM; 4-ABA 100μM; 5-PEG -2,1 MPa; 6- PEG -2,1 MPa +ABA 5μM; 7- PEG -2,1 MPa + ABA 50μM; 8- PEG -2,1 MPa + ABA 100μM. Temperatura de armazenamento: 25, 5 e -21°C. Conteúdo de água no armazenamento: 10 e 5%. Nos painéis A e B, as mesmas letras indicam ausência de diferenças estatísticas entre os condicionamentos e a temperatura de armazenamento para cada conteúdo de água das sementes. No painel C, as mesmas letras na linha, indicam ausência de diferenças estatísticas para cada condicionamento e temperatura de armazenamento nos conteúdos de água das sementes. Para comparação, utilizou-se o teste de LSD a 5% de probabilidade.

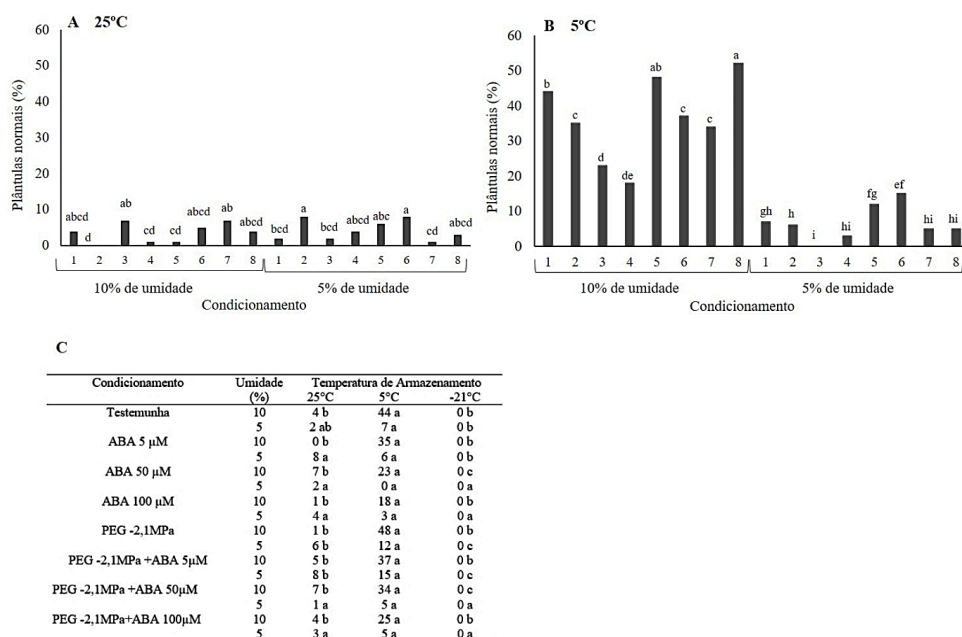
Fonte: do autor (2018).

Tabela 1. Efeito do condicionamento em PEG, tratamento com ABA e da temperatura de armazenamento na porcentagem de plântulas normais de *Genipa americana* armazenadas em diferentes conteúdo de água.

Condicionamento	Armazenamento	Conteúdo de água (%)	
		10	5
Testemunha	25°C	4 a	2 a
	5°C	44 a	7 b
	21°C	0,0 a	0,0 a
ABA 5 µM	25°C	0,0 b	8 a
	5°C	35 a	6 b
	21°C	0,0 a	0,0 a
ABA 50 µM	25°C	7 a	2 a
	5°C	28 a	0,0 a
	21°C	0,0 a	0,0 a
ABA 100 µM	25°C	1 a	4 a
	5°C	48 a	3 a
	21°C	0,0 a	0,0 a
PEG -2,1MPa	25°C	1 a	6 a
	5°C	48 a	12 b
	21°C	0,0 a	0,0 a
PEG -2,1 MPa + ABA µM	25°C	5 a	8 a
	5°C	37 a	15 b
	21°C	0,0 a	0,0 a
PEG -2,1 MPa + ABA 50 µM	25°C	7 a	1 b
	5°C	34 a	5 b
	21°C	0,0 a	0,0 a
PEG -2,1 MPa + ABA 100 µM	25°C	4 a	3 a
	5°C	52 a	5 b
	21°C	0,0 a	0,0 a

Legenda. As médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste de LSD ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 4. Efeito do conteúdo de água, condicionamento em PEG e tratamento com ABA na porcentagem de plântulas normais de *Genipa americana* armazenadas por noventa dias nas temperaturas de 25°C, 5°C e -21°C.



Legenda. Temperaturas de armazenamento: 25, 5 e -21°C (A e B respectivamente). Condicionamentos: 1-Testemunha; 2-ABA 5µM; 3-ABA 50µM; 4-ABA 100µM; 5-PEG -2,1 MPa; 6- PEG -2,1MPa + ABA 5µM; 7- PEG -2,1 MPa + ABA 50µM; 8- PEG -2,1 MPa + ABA 100µM. Nos painéis A e B, as mesmas letras indicam ausência de diferenças estatísticas entre os tratamentos e o conteúdo de água das sementes para cada temperatura de armazenamento. No painel C, as mesmas letras na linha, indicam ausência de diferenças estatísticas para cada tratamento para cada conteúdo de água nas diferentes temperaturas de armazenamento. Para comparação, utilizou-se o teste de LSD a 5% de probabilidade. Fonte: do autor (2018)

Tabela 3. Efeito da temperatura e condicionamento e tratamento com ABA no índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de *Genipa americana* armazenadas nas temperaturas de 25°C, 5°C e -21°C com 5% e 10% de conteúdo de água.

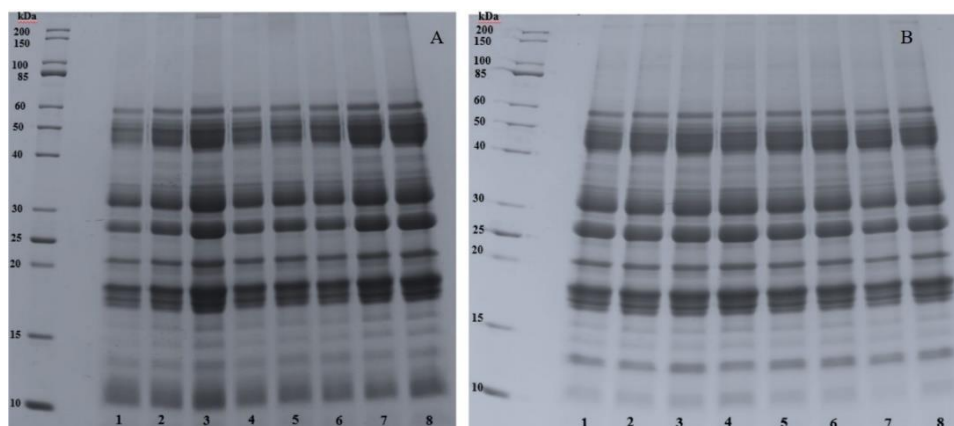
Tratamentos	Temperatura de armazenamento	Conteúdo de água (%)	
		10	5
Testemunha	25°C	0,18 aB	0,23 aA
	5°C	2,05 aA	0,42 bA
	21°C	0,0 aB	0,0 aA
ABA 5 µM	25°C	0,07 aB	0,59 aA
	5°C	1,57 aA	0,55 bA
	21°C	0,0 aB	0,02 aA
ABA 50 µM	25°C	0,39 aAB	0,25 aA
	5°C	1,09 aA	0,20 bA
	21°C	0,0 aB	0,02 aA
ABA 100 µM	25°C	0,21 aAB	0,27 aA
	5°C	0,97 aA	0,3 aA
	21°C	0,0 aB	0,06 aA
PEG -2, 1MPa	25°C	0,07 aB	0,39 aA
	5°C	1,81 aA	0,72 bA
	21°C	0,0 aB	0,01 aA
PEG -2,1 MPa + ABA 5 µM	25°C	0,23 aB	0,54 aA
	5°C	1,62 aA	0,59 bA
	21°C	0,0 aB	0,07 aA
PEG -2,1 MPa + ABA 50 µM	25°C	0,33 aB	0,21 aA
	5°C	1,69 aA	0,45 bA
	21°C	0,03 aB	0,05 aA
PEG -2,1 MPa + ABA 100 µM	25°C	0,17 aB	0,33 aA
	5°C	2,24 aA	0,42 bA
	21°C	0,003 aB	0,041 aA

Legenda. As médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna dentro de cada tratamento, não diferem entre si pelo Teste de LSD ao nível de 5% de probabilidade.

Diante dos resultados fisiológicos obtidos, as análises de perfil proteico e enzimático foram realizadas em sementes armazenadas a 5 °C, tratadas com ABA 5µM, condicionadas em PEG 2,1 MPa e PEG -2,1 MPa + ABA 5µM.

Não foram observadas variações na abundância de proteínas totais e resistentes ao calor pelo perfil proteico (Figura 5 A e 5B).

Figura 5. Padrão eletroforético das proteínas totais e resistentes ao calor de sementes de *Genipa americana* após diferentes tratamentos, secas a 5% e 10% de conteúdo de água e armazenadas por 90 dias a 5°C.

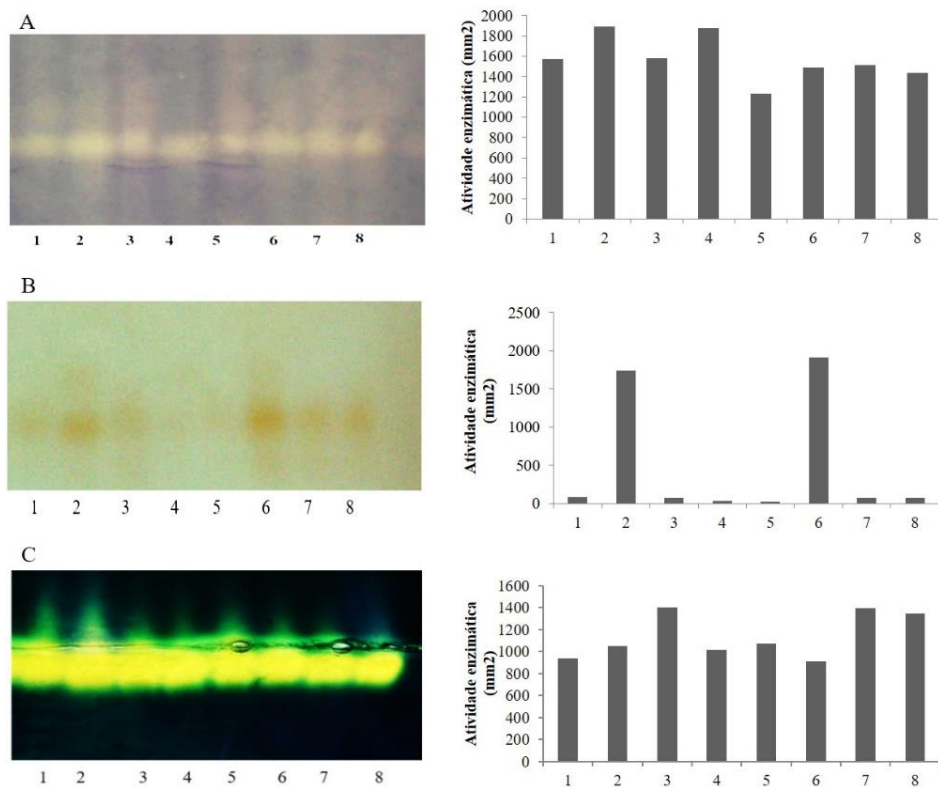


Legenda: Tratamentos: **1** - Sementes secas a 10% de conteúdo de água (testemunha); **2** - Sementes secas a 10% de conteúdo de água tratadas com ABA 5 μM ; **3** - Sementes condicionadas em PEG -2,1MPa e secas a 10% de conteúdo de água; **4** - Sementes condicionadas em PEG -2,1MPa + ABA 5 μM e secas a 10% de conteúdo de água; **5** - Sementes secas a 5% (testemunha); **6** - Sementes tratadas com ABA 5 μM e secas a 5% de conteúdo de água; **7** - Sementes condicionadas em PEG -2,1MPa e secas a 5% de conteúdo de água; **8** - Sementes condicionadas em PEG -2,1MPa + ABA 5 μM e secas a 5% de conteúdo de água.

Fonte: do autor (2018)

Com relação a atividade enzimática, a enzima SOD (Figura 6A) apresentou uma menor atividade nas sementes com 5% de conteúdo de água, quando as sementes apresentavam menor porcentagem de germinação e de plântulas normais (Figura 2B e 4B). A enzima PO (Figura 6B) apresentou baixa atividade em todos os tratamentos, com exceção de quando as sementes foram tratadas com ABA 5 μM . A enzima CAT (Figura 6C) não apresentou alteração significativa na atividade, sendo observada somente uma ligeira redução nos tratamentos que utilizaram PEG.

Figura 6. Atividade de enzimas do sistema antioxidante em sementes de *Genipa americana* submetidas a tratamento com PEG e ABA, secas a diferentes conteúdos de água e armazenadas por 90 dias a 5°C.



Legenda. Géis de eletroforese após coloração para revelação das enzimas A- superóxido dismutase (SOD); B – peroxidase (PO); C- catalase (CAT) (lado esquerdo), e representação numérica da intensidade das bandas (lado direito). Tratamentos: **1** – sementes secas a 10% de conteúdo de água (testemunha); **2** - sementes secas a 10% de conteúdo de água e tratadas com ABA 5 µM; **3** - sementes secas a 10% e condicionadas em PEG -2,1MPa; **4** - sementes secas a 10% de conteúdo de água e condicionadas em PEG -2,1MPa + ABA 5 µM; **5** – sementes secas a 5% de conteúdo de água (testemunha); **6** - sementes secas a 5% de conteúdo de água e tratadas com ABA 5 µM; **7** - sementes secas a 5% de conteúdo de água e condicionadas em PEG -2,1MPa; **8**- sementes secas a 5% de conteúdo de água e condicionadas em PEG -2,1MPa + ABA 5 µM.

Fonte: do autor (2018)

DISCUSSÃO

A perda de viabilidade de sementes sensíveis à dessecação é dependente, primariamente, do seu conteúdo de umidade e da temperatura na qual foram armazenadas (BEWLEY et al., 2013). Em sementes de *G. americana* o armazenamento na temperatura de 5 °C foi superior aos demais pois manteve uma maior viabilidade das sementes quando comparado com o armazenamento a 25 °C e -21 °C, respectivamente. O mesmo resultado foi encontrado para sementes de *Araucaria angustifolia* (GARCIA et al., 2014). Walters et al. (2001), sugerem que em temperaturas mais elevadas, como o que ocorreu a 25 °C neste trabalho, a perda de viabilidade é consequência direta do dano ligado a maior atividade metabólica.

O baixo conteúdo de água e baixa temperatura podem induzir uma diminuição nas reações enzimáticas envolvidas na perda de viabilidade da semente (PRIESTLEY et al., 1986). Em sementes de *Ginkgo biloba*, o nível de peroxidação lipídica foi maior em sementes armazenadas a 25 °C do que a 4 °C (TOMMASI et al., 2006). Acredita-se que o mesmo possa ter ocorrido nas sementes de *G. americana*, uma vez que temperaturas mais altas aceleram a deterioração das sementes (BEWLEY et al., 2013).

Um dos primeiros sintomas de deterioração das sementes é o atraso no processo germinativo (BEWLEY et al., 2013). Isto explica a redução no índice de velocidade de germinação das sementes de *G. americana* em sementes armazenadas a 25 °C com 10% de conteúdo de água, e consequente redução na porcentagem de germinação. Quando os danos afetam os principais sistemas funcionais (membranas, organelas, enzimas, ácidos nucleicos), as sementes sensíveis à dessecação não conseguem repará-los, culminando na perda de viabilidade e morte celular (BEWLEY et al., 2013).

Em condições de armazenamento a longo prazo, as sementes provavelmente estão no estado vítreo devido as condições de baixa temperatura e conteúdo de água (MURTHY; KUMAR; SUN, 2003). Nessas condições, o

citoplasma encontra-se com uma viscosidade extremamente alta e com baixíssima mobilidade molecular, o que previne ou inibe muitos processos deletérios nas sementes (BUTINK et al., 1998), como a ação de radicais livres.

A baixa porcentagem de germinação das sementes que foram armazenadas a -21 °C pode estar relacionada ao fato de que as espécies recalcitrantes e intermediárias não são capazes de formar o estado vítreo, e os tratamentos utilizados não possibilitaram tal defesa. Os organismos resistentes à dessecação formam o estado vítreo durante a secagem, porém, os organismos sensíveis à dessecação geralmente perdem a viabilidade porque o estado vítreo não foi formado (BUTINK; LEPRINCE, 2004). Sementes de *G. americana* pode não conter componentes necessários para formação do estado vítreo eficiente para proteção celular, tais como proteínas LEA e açúcares, como rafinose e estaquiase. O estado vítreo é importante pois possibilita uma viscosidade extremamente alta na célula, de modo que a mobilidade molecular seja muito baixa, impedindo a ocorrência de danos mecânicos, impedindo ou dificultando reações químicas indesejáveis e mantendo a estabilidade celular (BERJAK; PAMMENTER, 2013; KOSTER, 1991).

Apesar de algumas espécies, como em *Brassica napus*, a qual o uso do PEG melhorou significativamente a expressão gênica relacionada aos mecanismos de tolerância à dessecação (LANG et al., 2017), em sementes de *G. americana*, o condicionamento não afetou a resposta das sementes. Para que as sementes sensíveis à dessecação possam ser secadas e armazenadas a baixas temperaturas, é necessário reduzir o estresse oxidativo durante a secagem e induzir a vitrificação (BERJAK; PAMMENTER, 2013).

O acúmulo de EROs é capaz de deteriorar e oxidar lipídios, proteínas e DNA (RUGHANI et al., 2015). Para evitar danos causados por EROs em sementes tolerantes à dessecação, na secagem ocorre a redução da atividade metabólica e produção de moléculas protetoras (DEKKERS et al., 2015).

Observou-se uma redução na atividade da SOD em sementes com 5% de conteúdo de água após o armazenamento, a qual está associada com uma menor porcentagem de germinação na espécie estudada. O mesmo foi observado em sementes de *Araucaria bidwillii* (FRANCINI et al., 2006) e *Trichilia dregeana* (VARGHESE et al., 2011), acreditando-se que a redução na atividade de SOD tenha contribuído para o aumento do estresse oxidativo nas sementes de *G. americana*. Segundo Francini et al. (2006), a diminuição na atividade de SOD pode estar relacionada, em parte, pelo excesso de H_2O_2 presente, inibindo a síntese dessa enzima, e também a sensibilidade à dessecação da semente (LI; SUN, 1999). O aumento da atividade da SOD diminuiria o nível de O_2 e prolongaria a viabilidade no armazenamento (CHAITANYA; NAITHANI, 1994) porém, isto não foi observado nas sementes de *G. americana*, mesmo com aplicação de PEG e ABA.

O aumento da atividade da CAT está frequentemente relacionado a capacidade das sementes minimizarem danos causados por dessecação (BAILLY et al., 2001). Embora tenha sido observado um aumento da atividade da CAT em sementes condicionadas em PEG, este não foi suficiente para manter a viabilidade das mesmas.

O aumento da enzima PO nas sementes de *G. americana*, pode ser um reflexo de estresse, com o objetivo de reduzir danos oxidativos, aumentando a expressão/atividade de algum sistema antioxidante, como forma de proteger as células dos radicais livres e EROs (LEPRINCE; BUITINK, 2010). A PO utiliza peróxidos como aceptor de hidrogênio, contribuindo no aumento dos mecanismos de defesa e na prevenção de perda da viabilidade (USHIMARU et al., 2001).

Os antioxidantes enzimáticos não foram capazes de conter o estresse oxidativo durante o armazenamento em sementes de *Ginkgo biloba* (TOMMASI et al., 2006), assim como as atividades do sistema antioxidante não tiveram

correlação com o armazenamento das sementes de *Oryza sativa* (GAO et al., 2016). Acredita-se que o mesmo ocorra com as sementes de *G. americana*.

As proteínas resistentes ao calor, devido a sua natureza hidrofílica, atuam como tampão de hidratação juntamente com açúcares, contribuindo para formação do estado vítreo, reduzindo a mobilidade dos radicais livres, impedindo reações de oxidação (CASTRO; GUIMARÃES; FARIA, 2017). Essas também desempenham papel de proteção das estruturas celulares, membranas e outras proteínas (DEKKERS, et al., 2015). Nas sementes de *G. americana*, os padrões de proteínas resistentes ao calor se mostraram estáveis, indicando que o condicionamento em PEG e tratamento com ABA não foram capazes de induzir mudanças no padrão proteico das sementes.

CONCLUSÕES

Os tratamentos das sementes em PEG e ABA não reduziram a sensibilidade das sementes de *G. americana* ao armazenamento a -21 °C.

O potencial de armazenamento das sementes de *G. americana* aumenta com o uso dos tratamentos ABA 5µM, PEG -2,1 MPa e PEG -2,1 Mpa + ABA 5 µM quando as sementes são armazenadas a 25 °C com 5% de conteúdo de água e PEG -2,1 Mpa + ABA 100 µM e a 5 °C com 10% de conteúdo de água.

Não foram observadas mudanças no perfil proteico na análise de proteínas totais e proteínas resistentes ao calor durante o armazenamento, no entanto pequenas alterações foram observadas na atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. **Eletrforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2 ed., Viçosa: Editora UFV, 2006.

ALPERT, P. Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 209, n.9, p. 1575-1584, 2006.

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

BERJAK, P; PAMMENTER, N. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrance seeds. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, p. 1-9, 2013.

BEWLEY, J. D. et al. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3 rd. New York: Springer. 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254. 1976.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009, 399p.

BRAY, E.A. Molecular responses to water déficit. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 103, n. 4, p. 1035-1040. 1993.

BRUGGINK, G.T.; OOMS, J. J. J.; VAN DER TOORN, P. Induction of longevity in primed seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 9, n. 1, p. 49-53, 2007.

BUITINK, J., et al. Starvation, osmotic stress and desiccation tolerance lead to expression of different genes of the regulatory b and g subunits of the SnRK1 complex in germinating seeds of *Medicago truncatula*. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 55-67, 2003.

BUITINK J. et al. Influence of water content and temperature on molecular mobility and intracellular glasses in seeds and pollen. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 118, n. 2, p. 531-541, 1998.

BUITINK, J.; LEPRINCE, O. Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. **Cryobiology**, Rockville, v. 48, n. 3, p. 215-228, 2004.

CARVALHO, J. E. R.; NASCIMENTO, W. M. O. Sensibilidade de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) ao dessecamento e ao congelamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 11, p. 53-56, 2000.

CASTRO, L. E.; GUIMARÃES, C. C.; FARIA, J. M. R. Physiological, cellular and molecular aspects of the desiccation tolerance in *Anadenanthera colubrina* seeds during germination. **Brazilian Journal Biology**, [s. l.], v. 77, n. 4, p. 774-780, 2017.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 6 ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1996.

CHAITANYA, K.S.K.; NAITHANI, S.C. Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Gaertn. **New Phytologist**, Cambridge, v. 126, n. 4, p. 623-627, 1994.

COSTA, M. C. et al. Substratos para produção de mudas de jenipapo (*Genipa americana* L.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 1, p. 19-24, 2005.

DEKKERS, B. J. W. et al. Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. **Planta**, Berlin, v. 241, n. 3, p. 563-577, 2015.

DELAHAIE, J. et al. LEA polypeptide profiling of recalcitrant and orthodox legume seeds reveals ABI3-regulated LEA protein abundance linked to desiccation tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 14, p. 4559-4573, 2013.

FONSECA, S. C. L.; FREIRE, H.B. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 2, p. 297-303, 2003.

FRANCINI, A. et al. Enzymatic and non-enzymatic protective mechanisms in recalcitrant seeds of *Araucaria bidwillii* subjected to desiccation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 556-5563, 2006.

GAO, J. et al. Comparative proteomic analysis of seed embryo proteins associated with seed storability in rice (*Oryza sativa L*) during natural aging. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 103, p. 31-44, 2016.

GARCIA, C. et al. Conservação da viabilidade e vigor de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze durante o armazenamento. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 4, p. 857-867, 2014.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Storage. In: VOZZO, J. A. **Tropical tree seed manual**. Washington: U.S. Dept. of Agriculture, Forest Services, 2002, p. 125-136

HONG, T.D.; ELLIS, R.H. **A protocol to determine seed storage behavior: a protocol to determine seed storage behaviour**. Rome: IPGRI, 1996.

KALEMBA, E. M.; PUKACKA, S. Association of protective proteins with dehydration and desiccation of orthodox and recalcitrant category seeds of three *Acer* genus species. **Journal Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 31, n. 3, p.351-362. 2012.

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

KRANNER, I.; BIRTIC, S. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. **Integrative and Comparative Biology**, Mclean, v. 45, n. 5, p.734-740, 2005.

KRANNER, I. et al. Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. **The Plant Journal**, [s. l], v. 31, n. 1, p. 13-24, 2002.

LANG, S. et al. Functional characterization of BnHSFA4a as a heat shock transcription factor in controlling the re-establishment of desiccation tolerance in seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 68, n. 9, p. 2361-2375, 2017.

LEPRINCE, O.; BUITINK, J. Desiccation tolerance: from genomics to the field. **Plant Science**, Oxford, v. 179, n. 6, p. 554-564, 2010.

LI, C.; SUN, W. Q. Desiccation sensitivity and activities of free radical-scavenging enzymes in recalcitrant *Theobroma cacao* seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 9, n. 3, p. 209-217, 1999.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas no Brasil. 3 ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000.

MAGISTRALLI, P. R. et al. Physiological behavior of *Genipa americana* L. seeds regarding the capacity for desiccation and storage tolerance. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 495-500, 2013.

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

MAIA, J. et al. Abscisic acid (ABA) sensitivity regulates desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis* seeds. **New Phytologist**, Cambridge, v. 203, n. 1, 81-93, 2014.

MAIA, J. et al. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds and its associated transcriptome. **Plos One**, Cambridge, v. 6, n. 12, 2011.

MASETTO, T. E. et al. Re-induction of desiccation tolerance after germination of *Cedrela fissilis* Vell. Seeds. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 3, p. 1273-1825, 2014.

MEDEIROS, A. C. S.; EIRA, M. T. S. **Comportamento fisiológico, secagem e armazenamento de sementes florestais nativas**. Colombo: EMBRAPA, 2006. Circular Técnica.

MOORE, J. P. et al. Towards a systems-based understanding of plant desiccation tolerance. **Plant Science**, Limerick, v. 14, n. 2, p. 110-117, 2009.

MURTHY, U. M. N.; KUMAR, P. P.; SUN, W. Q. . Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 384, p. 1057-1067, 2003.

PAMMENTER, N. W. et al. Why do stored hydrated recalcitrant seeds die? **Seed Science Research**, Cambridge, v. 4, n. 2, p. 187-191, 1994.

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

PRIESTLEY, D. A. Loss of seed quality in storage. In: _____ **Seed Ageing: Implications for Seed Storage and Persistence in the Soil** New York: Comstock Publishing Associates; 1986. p. 39–75.

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

RUGHANI, G. et al. Lipid peroxidation and in-situ localization of ROS in assorted seeds exposed to salinity and artificial ageing. **Applied Science Report**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 123-127, 2015.

SALOMÃO, A. N. Desiccation, storage and germination of *Genipa Americana* seeds. In: SACANDÉ, M. et al. **Comparative storage: biology of tropical tree seeds**. Rome: IPGRI, 2004. p. 263-26,

SUN, W. Q. Methods for the study of water relations under desiccation stress. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. New York: Wiley, 2002, cap. 2, p. 47-83.

SUN, W. Q., DAVIDSON, P.; CHAN, H. S. O. Protein stability in the amorphous carbohydrate matrix: relevance to anhydrobiosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, Amsterdam, v. 1425, n. 1, p. 245-254. 1998.

TOMMASI, F. et al Effects of storage temperature on viability, germination and antioxidant metabolism in *Ginkgo biloba* L. seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, n. 5-6, p. 359-368, 2006.

USHIMARU, T. et al. Antioxidative enzymes in seedlings of *Nelumbo nucifera* germinated under water. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 112, n. 1, p. 39-46, 2001.

VARGHESE, B. et al. Diferencial drying rates of recalcitrant *Trichilia dregeana* embryonic axes: a study of survival and oxidative stress metabolismo. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 142, n.4, p. 326-338, 2011.

VIEIRA, C. V. et al. Stress-associated factors increase after desiccation of germinated seeds of *Tabebuia impetiginosa* Mart. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht v. 62, n. 3, p. 257-263, 2010.

WALTERS, C. et al. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 11, n. 2, p. 135-148, 2001.

WALTERS, C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 8, n. 2, p. 223- 244, 1998.

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