

**GIULIANA CRISTINA MOURÃO SOARES**

**PERDA DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE  
TENTO-CAROLINA (*Adenantha pavonina* L.) DURANTE A  
GERMINAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S676p  
2012

Soares, Giuliana Cristina Mourão, 1986-

Perda da tolerância à dessecação em sementes de tento-  
carolina (*Adenantha pavonina L.*) durante a germinação.  
/ Giuliana Cristina Mourão Soares. – Viçosa, MG, 2012.  
v, 49f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 40-49.

1. Sementes - Fisiologia. 2. Enzimas. 3. Sementes –  
Embebição. 4. Extresse oxidativo. I. Universidade Federal  
de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 634.923231

**GIULIANA CRISTINA MOURÃO SOARES**

**PERDA DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE  
TENTO-CAROLINA (*Adenantha pavonina* L.) DURANTE A  
GERMINAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de fevereiro de 2012.

---

Eduardo Euclides de Lima e Borges  
(Coorientador)

---

José Márcio Rocha Faria

---

Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida.

À minha família, pelo amor indescritível.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e à Universidade Federal de Viçosa, que proporcionou os meios para a realização do Curso de Mestrado.

À professora Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias, pela confiança, incentivos e ensinamentos.

Ao professor Eduardo Euclides de Lima e Borges, pelos conselhos e contribuições fundamentais.

Ao professor José Márcio Rocha Faria, pela amizade, idéias e sugestões e, claro, seu grande senso de humor.

Aos professores do curso de Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos.

Aos meus queridos amigos, pela alegria, acolhimento, carinho e cumplicidade.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| RESUMO .....  | iv |
| ABSTRACT .....  | v  |
| 1 INTRODUÇÃO .....  | 1  |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS.....   | 6  |
| 2.1 Material Vegetal .....  | 6  |
| 2.2 Superação da dormência (tratamento pré-germinativo).....                      | 6  |
| 2.3 Determinação do grau de umidade .....   | 6  |
| 2.4 Germinação .....  | 6  |
| 2.5 Curva de embebição.....   | 7  |
| 2.6 Perda da TD durante a germinação.....   | 7  |
| 2.7 Avaliação do conteúdo de DNA nuclear.....                                     | 8  |
| 2.8 Condutividade elétrica .....  | 9  |
| 2.9 Avaliação do sistema de defesa antioxidativo enzimático .....                 | 10 |
| 2.9.1 Obtenção dos extratos enzimáticos brutos .....                              | 10 |
| 2.9.2 Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1).... | 10 |
| 2.9.3 Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....               | 11 |
| 2.9.4 Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) .....            | 11 |
| 2.9.5 Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)... | 12 |
| 2.9.6 Determinação de proteínas .....   | 12 |
| 2.10 Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor .....                | 12 |
| 2.11 Análise dos dados .....  | 13 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 13 |
| 3.1 Caracterização do lote de sementes .....                                      | 13 |
| 3.2 Curva de embebição.....   | 14 |
| 3.3 Perda da TD durante a germinação .....  | 16 |
| 3.4 Conteúdo de DNA nuclear .....   | 19 |
| 3.5 Integridade das membranas celulares .....                                     | 25 |
| 3.6 Análise do sistema antioxidativo enzimático .....                             | 27 |
| 3.7 Avaliação das proteínas resistentes ao calor .....                            | 36 |
| 4. CONCLUSÕES .....   | 39 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 40 |

## RESUMO

SOARES, Giuliana Cristina Mourão, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Perda da tolerância à dessecação em sementes de tento-carolina (*Adenantha pavonina* L.) durante a germinação** Orientadora: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Coorientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges

Ao longo da germinação, sementes ortodoxas tornam-se intolerantes a dessecação e, por isso, têm sido utilizadas em estudos que tentam elucidar as alterações bioquímicas e estruturais associadas com a sensibilidade à dessecação. O presente estudo teve como objetivo avaliar a perda da tolerância à dessecação (TD) durante a germinação de sementes ortodoxas da espécie *Adenantha pavonina*, através da sobrevivência das sementes após a secagem realizada em seguida de diferentes períodos de pré-embrição. A TD foi gradativamente perdida ao longo da germinação, de modo que sementes com raiz primária com 1 mm de comprimento não sobreviveram após sua secagem até o grau de umidade inicial (13%). Pelas taxas de extravasamento de eletrólitos verificou-se que o sistema de membranas de sementes em estágio avançado de germinação (60 horas) foi comprometido após a secagem. Também foi observado que as atividades das enzimas catalase, peroxidase e peroxidase do ascorbato não foram tão prejudicadas após a secagem quanto a enzima dismutase do superóxido. Em sementes frescas foram detectadas três classes de proteínas resistentes ao calor e houve redução na intensidade de suas bandas com o avanço da germinação. O conteúdo relativo de DNA nuclear foi analisado por citometria de fluxo, e verificou-se que a retomada do ciclo celular coincidiu com a completa perda da TD.

## ABSTRACT

SOARES, Giuliana Cristina Mourão, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Loss of desiccation tolerance in germinating *Adenantha pavonina* seeds**  
Adviser: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Co-adviser: Eduardo Euclides de Lima e Borges

On germination, orthodox seeds become intolerant of desiccation. In this condition, these seeds may be a useful model for studies of recalcitrance, in order to elucidate structural and biochemical attributes associated with desiccation sensitivity. Here, we evaluated the loss of desiccation tolerance (DT) in *Adenantha pavonina* germinating seeds, by following the ability of seeds to germinate after desiccation following various periods of preimbibition. DT was progressively lost during germination, and seeds with radicle length of 1 mm did not withstand drying up to 13% of moisture content. By the rates of electrolyte leakage, it was observed that membrane system was damaged when 60-hour imbibed seeds were dried. It was also observed that dehydration decreased the activity of superoxide dismutase, however catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase activities remained unchanged. Three groups of heat shock proteins were detected in fresh seeds, but with the progress of germination the number and intensity of its bands declined. Relative DNA content assessment was done by flow cytometry. These analyses showed that the resumption of cell cycle coincided with the complete loss of DT.

## 1 INTRODUÇÃO

A tolerância à dessecação (TD) é um mecanismo que possibilita organismos passarem por um processo rigoroso de secagem, e manterem suas atividades fisiológicas quando reidratados (Alpert e Oliver, 2002; Bartels, 2005). Dentre as espermatófitas, esta característica é rara em organismos adultos, porém comum em grãos de pólen, esporos e sementes (Bewley, 1979; Tweddle et al., 2003, Alpert, 2005).

A capacidade das sementes de tolerarem a dessecação é uma característica funcional integralmente relacionada ao processo de sucessão ecológica das espécies vegetais. De acordo com Tweddle et al. (2003), espécies pioneiras tendem a produzir sementes tolerantes à dessecação e dormentes, possibilitando a formação de bancos de sementes no solo em habitats sazonais, sujeitos à seca. Em contrapartida, espécies não pioneiras tendem a produzir sementes sensíveis à dessecação e não dormentes, em habitats úmidos e de baixa sazonalidade, persistindo no ambiente como banco de plântulas. Apesar das generalidades, sementes tolerantes à dessecação estão presentes em locais onde sementes sensíveis à dessecação ocorrem (Alpert, 2000).

Em relação à TD, as sementes podem ser classificadas em ortodoxas, intermediárias e recalcitrantes (Hong e Ellis, 1996). Sementes ortodoxas são capazes de tolerar a secagem, sendo possível seu armazenamento por longos períodos de tempo, em condições de baixa umidade, sem que isso afete a sua capacidade de germinação (Roberts, 1973). Sementes recalcitrantes, por outro lado, não toleram a secagem e apresentam um curto período de viabilidade, de no máximo poucos meses (Roberts, 1973), uma vez que são dispersas metabolicamente ativas e com elevado grau de umidade (Pritchard et al., 2004). Sementes intermediárias toleram uma secagem moderada e sua viabilidade é mantida por períodos de tempo intermediários, de no máximo poucos anos (Ellis et al., 1990; Hong e Ellis, 1996).



Em sementes ortodoxas, a aquisição de TD ocorre durante seu processo de formação, próximo à metade da fase de maturação. Durante a deposição de reservas, o grau de umidade das sementes é gradualmente reduzido, promovendo uma redução do metabolismo celular (Alpert e Oliver, 2002). Neste momento, são observadas alterações na expressão gênica e em eventos metabólicos (Golovina e Hoekstra, 2003; Illing et al., 2005; Buitink et al., 2006; Angelovici et al., 2010), que permitem às sementes, após a dispersão, tolerar períodos de seca prolongada.

A dessecação pode causar danos às células durante a remoção de água das sementes. A água apresenta propriedades físicas que a caracterizam como o solvente biológico ideal. A retirada de água acarreta mudanças nas propriedades fisiológicas e bioquímicas das células (Walters et al., 2002). Para que as sementes persistam tolerantes à dessecação, três tipos de danos devem ser reparados: 1) dano mecânico associado com a perda do volume celular; 2) desestabilização ou perda da integridade das membranas celulares; 3) estresse oxidativo relacionado ao metabolismo desordenado (Farrant, 2000; Vicré et al., 2004)

Para prevenir ou minimizar danos causados pela dessecação, as sementes ortodoxas ativam uma série de mecanismos. Os principais mecanismos utilizados são: manutenção das características físicas dos constituintes intracelulares, acúmulo de reservas insolúveis, desdiferenciação intracelular, redução da atividade metabólica, presença de um eficiente sistema antioxidativo, síntese e acúmulo de moléculas protetoras, manutenção do citoesqueleto e da integridade do DNA, e presença e operação de um mecanismo de reparo de danos celulares causados durante a reidratação (Pammenter e Berjak, 1999; Hoekstra et al., 2001; Kermode e Finch-Savage, 2002).

Embora o oxigênio seja necessário para as reações metabólicas nas sementes (Bewley e Black, 1994), este elemento possui elevado poder oxidante e prontamente

forma espécies altamente reativas (EROs) nas células (Farrant et al., 2007). As EROs incluem o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e o radical hidroxila ( $\text{OH}\bullet$ ) (Farrant et al., 2007; Contreras-Porcia et al., 2010). Durante a dessecação das sementes, observa-se um acúmulo de EROs e radicais livres nas células (Leprince et al., 1994; Ntuli et al., 2011), como produto da ruptura de plastídios e do sistema de transporte de elétrons presente em mitocôndrias (Ferreira e Abreu, 2007). Esses compostos podem causar danos a proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, causando danos permanentes em enzimas, cromossomos e membranas. A peroxidação lipídica reduz a fluidez das membranas celulares, interferindo na sua permeabilidade seletiva durante a reidratação (Walters et al., 2002). Esses danos oxidativos podem ser minimizados pela ação de enzimas removedoras de radicais livres, como a dismutase do superóxido, que realiza a dismutação do  $\text{O}_2^-$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e as demais enzimas responsáveis pela eliminação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , como a catalase e as peroxidases (Gill e Tuteja, 2010). Essas enzimas integram o sistema de defesa antioxidativo presente em sementes ortodoxas (Pammenter e Berjak, 1999; Alpert, 2000; Kranner e Birtić, 2005; Spanò et al., 2011).

Em plantas, seis classes de proteínas resistentes ao calor (PRCs) têm sido reportadas como atenuadoras de danos causados por estresse às células (Vierling, 1997; Efe-oğlu, 2009). As PRCs apresentam unidades monoméricas de baixo peso molecular (15 a 42 kD), mas são capazes de se agrupar em oligômeros de 9 a 30 subunidades, dependendo da proteína (Vierling, 1997). Em sementes, as PRCs são associadas como um mecanismo protetor contra danos causados por dessecação (Hoeskstra et al., 2001; Kalembe e Pukacka, 2007, 2011). Muitos estudos mostram que a síntese das PRCs coincide com a aquisição de TD durante o desenvolvimento de sementes ortodoxas (Wehmer et al., 1996; Wehmer e Vierling, 2000; José et al., 2005). Foi sugerido que essas proteínas atuam como chaperonas moleculares durante os processos de dessecação e

reidratação das sementes, interagindo com outras proteínas e prevenindo a agregação inapropriada destas com outros compostos celulares, além de auxiliar no enovelamento-desenovelamento correto das estruturas polipeptídicas (Hoeskstra et al., 2001; Buitink et al., 2002).

Durante a germinação, a TD é progressivamente perdida nas sementes ortodoxas, e o ponto em que isso ocorre de forma irreversível varia de acordo com a espécie (Koster e Leopold, 2003; Corbineau et al., 2004; Faria et al., 2005; Vieira et al., 2010; Guimarães et al., 2011).

De maneira geral, em sementes ortodoxas em processo de germinação, a transição do estado tolerante para o estado sensível à dessecação coincide com a retomada do ciclo celular (Osborne e Boubriak, 1994; Boubriak et al., 2000; Osborne et al., 2002). A interfase, estágio que precede a divisão celular, é dividida em três fases:  $G_1$  (pré-síntese), S (síntese de DNA) e  $G_2$  (pós-síntese). Na fase  $G_1$  são encontradas células com conteúdo de DNA nuclear  $2C$ , e na fase  $G_2$ , células com DNA  $4C$ , considerando a constante  $C$  como o conteúdo de DNA nuclear para a condição haplóide. Foi sugerido que células na fase  $G_2$  ( $4C$ ) são mais sensíveis a estresse do que células na fase  $G_1$  ( $2C$ ) (Śliwińska, 2003). As causas da perda de TD em sementes ortodoxas em processo germinativo não estão completamente elucidadas, mas a replicação do DNA é apontada como um importante marcador da transição do estado tolerante para o estado sensível à dessecação (Osborne et al., 2002).

Estudos com sementes recalcitrantes são de difícil execução, devido a sua rápida perda de viabilidade durante o armazenamento. Tentativas de elucidar os eventos moleculares, fisiológicos e bioquímicos relacionados com a sensibilidade à dessecação são de grande importância, uma vez que podem auxiliar na designação de estratégia de conservação de várias espécies de interesse que produzem sementes recalcitrantes. Semen-

tes ortodoxas em processo de germinação desenvolvem comportamento recalcitrante (Sun, 1999) e, por isso, têm sido utilizadas em estudos que tentam compreender a tolerância/sensibilidade à dessecação (Buitink et al., 2003; Faria et al., 2005).

A espécie *Adenanthera pavonina* L. (carolina, tento-carolina, olho-de-dragão, falso-sândalo) pertencente à família Fabaceae-Mimosidae, é nativa da Ásia, mas obteve boa adaptação no Brasil (Corrêa, 1978). É uma espécie arbórea semidecídua, tipicamente tropical e de rápido crescimento (Lorenzi et al., 2003). Sua árvore apresenta o cerne de coloração vermelha e madeira de boa qualidade, tendo sido empregada como espécie ornamental e na indústria madeireira (Rocas, 2002). As sementes são utilizadas no artesanato, devido à sua coloração vermelho brilhante (Lorenzi et al., 2003) e para fins medicinais, devido às suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (Olajide et al., 2004; Ara et al., 2010 ). Produzidas em grande quantidade, as sementes apresentam comportamento ortodoxo (Rocas, 2002) e possuem dormência devido à impermeabilidade do tegumento, que pode ser superada através do pesponte do tegumento (Silva et al., 2009).

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a perda da TD em sementes de *Adenanthera pavonina* durante a germinação; e como objetivos específicos: examinar o conteúdo de DNA nuclear, a integridade de membranas celulares, enzimas do sistema antioxidativo e proteínas resistentes ao calor durante a perda da TD ao longo da germinação.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material Vegetal**

A coleta dos frutos maduros foi realizada em junho de 2011, na região de Muriaé, MG (21° 08' S; 42° 22' O). Após a abertura das vagens, as sementes foram coletadas e beneficiadas no Laboratório de Análise de Sementes Florestais (LASF) do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Após o beneficiamento, as sementes foram armazenadas em câmara fria (5 °C/ 60% UR) até o início dos testes.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Sementes e no Laboratório de Pós-Colheita, da Universidade Federal de Viçosa, MG.

### **2.2 Superação da dormência (tratamento pré-germinativo)**

Como tratamento pré-germinativo para superação da dormência tegumentar, foi realizado o desponte do envoltório com alicate, na região lateral oposta ao hilo (Silva et al., 2009).

### **2.3 Determinação do grau de umidade**

O grau de umidade foi determinado através do método de estufa a 105 °C por 24 horas (Brasil, 2009), com quatro repetições de 20 sementes. O cálculo foi feito na base úmida, sendo o grau de umidade expresso em porcentagem.

### **2.4 Germinação**

Após a aplicação do tratamento pré-germinativo, as sementes foram imersas em solução de Captan<sup>®</sup> 5%, por cinco minutos e, em seguida, quatro repetições de 25 sementes, foram dispostas em rolos de papel umedecidos com água destilada (2,5 vezes o

peso do papel seco) e incubadas em germinador a 25 °C (16h de escuro/8h de luz) (Silva et al., 2009). A germinação foi avaliada diariamente até o décimo quinto dia após a semeadura, e a porcentagem de germinação foi expressa com base no número de plântulas normais desenvolvidas.

## **2.5 Curva de embebição**

Para a caracterização do padrão de embebição de água pelas sementes, duas repetições de 12 sementes foram submetidas ao tratamento pré-germinativo e mantidas nas mesmas condições de germinação citadas anteriormente. Em seguida, cada semente foi pesada individualmente por períodos regulares até a protrusão radicular.

## **2.6 Perda da TD durante a germinação**

Para avaliação da perda da TD durante a germinação, diferentes tempos de embebição foram escolhidos com base nos resultados obtidos na curva de embebição, que são: 0 (controle), 24, 36, 48, 60 e 81 horas (sementes com raiz primária com 1 mm de comprimento).

As sementes foram submetidas ao tratamento pré-germinativo e semeadas e, após cada período de embebição, foram transferidas para um telado acoplado em caixas do tipo *gerbox* contendo sílica gel ativada, a 20 °C, até que fosse atingido o grau de umidade inicial (tempo variável de acordo com cada período prévio de embebição).

O processo de secagem foi monitorado através de pesagens sucessivas das sementes, até que o peso encontrado coincidissem com o peso desejado referente ao grau de umidade desejado, por meio da expressão proposta por Cromarty et al (1985):

$$M_{ud} = \frac{(100 - U_i) \times M_i}{(100 - U_f)}, \text{ onde:}$$

$M_{ud}$  = massa da amostra (g) no grau de umidade desejado após a secagem;

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

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

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

Após o alcance do peso desejado, foi realizada a determinação da umidade para confirmar a obtenção do grau de umidade desejado.

Para garantir a secagem e a manutenção do estado seco, após a obtenção do grau de umidade inicial, as sementes secas foram armazenadas por 72 horas. Depois, foram pré-umidificadas em atmosfera úmida (100% de UR) a 25 °C, por 24 horas, sendo, posteriormente, recolocadas nas condições iniciais de germinação. As sementes que retomaram o seu desenvolvimento e originaram plântulas normais foram consideradas tolerantes à dessecação. O tratamento controle foi constituído de sementes frescas, ou seja, sementes que passaram pelo tratamento pré-germinativo e que não foram submetidas ao processo de embebição/secagem citado anteriormente.

Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes por tratamento (tempos de embebição + controle).

## **2.7 Avaliação do conteúdo de DNA nuclear**

A quantificação do conteúdo de DNA nuclear foi realizada pela técnica de citometria de fluxo. Para isso, eixos embrionários de sementes frescas (controle) e nos tem-

pos de 24, 36, 48, 60 e 81 horas de embebição foram isolados, congelados e armazenados em nitrogênio líquido, até o momento das análises.

As amostras foram levadas para o Laboratório de Citogenética e Citometria de Plantas do Departamento de Biologia Geral da UFV, para o preparo das suspensões nucleares. Pontas de radículas e raízes primárias foram submetidas ao processo de isolamento nuclear de acordo com a metodologia proposta por Carvalho et al. (2008), para posterior análise no citômetro de fluxo Partec PAS II/III (Partec® GmbH, Munster, Germany). Para análise do núcleo corado com DAPI, foi usada uma lâmpada de mercúrio de alta pressão (HBO-100 W) com filtros KG 1, BG 38 e GG 435. Cada suspensão nuclear foi processada no citômetro com pelo menos 5.000 núcleos. Cada tratamento consistiu em três repetições biológicas (um eixo embrionário por repetição).

## **2.8 Condutividade elétrica**

A avaliação da integridade das membranas celulares das sementes, após o processo de embebição/secagem/pré-umificação, foi realizado pelo teste de condutividade elétrica. As sementes foram embebidas por 24, 36, 48, 60 e 81 horas, secas até o grau de umidade inicial, e pré-umidificadas, conforme descrito anteriormente. O controle consistiu de sementes frescas pré-umidificadas.

O teste foi efetuado com quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento. As amostras foram pesadas e colocadas em recipientes plásticos contendo 150 mL de água deionizada, por 24 horas, a 25 °C (ISTA, 1995). O extravasamento de eletrólitos em cada solução foi determinado com um condutivímetro, e os resultados foram expressos em  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ .



## **2.9 Avaliação do sistema de defesa antioxidativo enzimático**

O efeito da secagem sobre as atividades das enzimas dismutase do superóxido, catalase, peroxidase e peroxidase do ascorbato foi avaliado comparando-se as atividades após a embebição e após o processo de embebição/secagem. As análises foram realizadas em eixos embrionários de sementes que foram embebidas por 24, 36, 48, 60 e 81 horas (tratamentos controle), e após a embebição, nestes mesmos tempos, e secagem até o grau de umidade inicial. Os eixos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -20 °C até o início das análises.

### **2.9.1 Obtenção dos extratos enzimáticos brutos**

Os extratos enzimáticos brutos foram obtidos pela homogeneização de 200 mg de eixos embrionários em nitrogênio líquido, seguida da adição de 2 mL do meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M , pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1 % (p/v) (Peixoto et al., 1999). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 xg, por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante utilizado como extrato bruto na determinação das atividades enzimáticas, avaliadas em quatro repetições de cada tratamento.

### **2.9.2 Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1)**

A atividade da dismutase do superóxido foi determinada pela adição de 30 µL do extrato enzimático bruto a 2,97 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM (Del Longo et al., 1993). A reação foi conduzida a 25 °C, numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de

15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotoredução do NBT, foi medida pela absorvância a 560 nm. A absorvância a 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual período, serviu de branco e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação (Giannopolis e Ries, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

### **2.9.3 Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)**

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e  $\text{H}_2\text{O}_2$  12,5 mM (Havir e Mchale, 1987). O decréscimo na absorvância a 240 nm, à temperatura de 25 °C, foi medido no primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Anderson et al., 1995) e o resultado expresso em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína.

### **2.9.4 Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)**

A atividade da peroxidase foi determinada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e  $\text{H}_2\text{O}_2$  20 mM (Kar e Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorvância a 420 nm, a 25 °C, durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Chance e Maehley, 1955) e expressa em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína.

### **2.9.5 Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)**

A atividade da peroxidase do ascorbato foi determinada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM. O decréscimo na absorvância a 290 nm, a 25 °C, foi medido durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar 2,8  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (Nakano e Asada, 1981), e o resultado expresso em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína .

### **2.9.6 Determinação de proteínas**

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão.

### **2.10 Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor**

A detecção de proteínas resistentes ao calor foi realizada em eixos embrionários de sementes frescas (controle) e embebidas por 24, 36, 48, 60 e 81 horas. Para cada tratamento, 100 mg de eixos embrionários foram macerados em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Em seguida, adicionou-se solução tampão (50 mM Tris-HCL, pH 7,5; 500 mM NaCl; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1 mM PMSF), na proporção de 1:10 (peso do material: volume do tampão de extração). Os homogeneizados foram centrifugados a 16000 xg por 30 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante incubado em banho-maria, a 85 °C, por 15 minutos, sendo novamente centrifugado como citado acima. O sobrenadante foi vertido em microtubos e o pellet, descartado. Antes da aplicação no gel, os tubos contendo 70  $\mu\text{L}$  de extrato + 40  $\mu\text{L}$  de solução tampão da amostra (2,5 mL de glicerol; 0,46

g de SDS; 20 mg de azul de Bromofenol e completado o volume para 20 mL de tampão de extração Tris pH 7,5) foram colocados em banho-maria com água em ebulição por 5 minutos. Foram aplicados 25 µL da amostra em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi realizada a 120 V, e os géis foram corados com solução de Coomassie Brilliant Blue 0,05% (Alfenas, 2006), durante 12 horas, e descorados em solução de ácido acético 10%.

### **2.11 Análise dos dados**

O delineamento experimental utilizado em todos os experimentos foi o inteiramente casualizado. A partir dos dados coletados, foram calculadas equações explicativas e realizada a correlação dos dados, com o auxílio do programa Sigma Plot versão 11. Além disso, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey aos 5% de probabilidade, através do programa Sisvar versão 5.3.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Caracterização do lote de sementes**

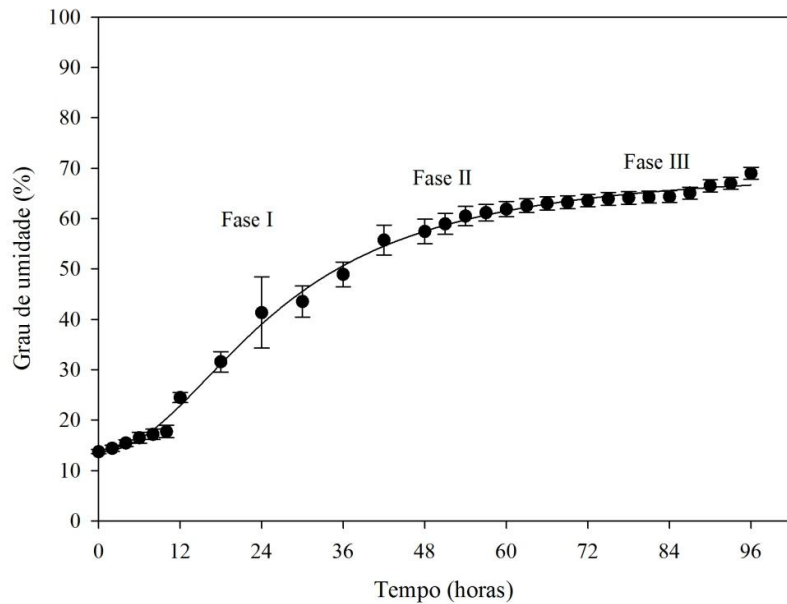
As sementes de *Adenantha pavonina* foram dispersas com reduzido grau de umidade (aproximadamente 13%), característica relacionada a espécies ortodoxas (Hong e Ellis, 1996). O valor médio da porcentagem de germinação encontrado, após a superação da dormência tegumentar, foi de 94%. Esse elevado índice de germinação parece ser um fator intrínseco à espécie, uma vez que outros trabalhos realizados com sementes desta espécie encontraram valores de germinação semelhantes (Ribeiro et al. 2009; Rodrigues et al., 2009; Silva et al., 2009; Costa et al., 2010).

Uma vantagem adaptativa de espécies que produzem sementes ortodoxas é que estas são capazes de sobreviver a períodos de seca prolongada. A dormência tegumentar está estreitamente ligada a esta adaptação, uma vez que a barreira imposta pelo tegumento atua como um modulador das interações entre as estruturas internas da semente e o ambiente externo (Souza e Marcos Filho, 2001). Além disso, em sementes de leguminosas, o hilo atua como uma válvula unidirecional que regula a entrada e saída de vapor de água, permitindo a manutenção do menor grau de umidade alcançado pelas sementes (Hyde, 1954).

### **3.2 Curva de embebição**

O padrão de embebição encontrado para sementes de *A. pavonina* se ajustou a uma equação sigmoideal logística (Figura 1). Segundo Bewley e Black (1994), o processo de absorção de água pelas sementes segue um padrão trifásico. A fase I é caracterizada por uma rápida embebição, seguida de uma fase estacionária, onde ocorre a reativação dos processos metabólicos (fase II), que culmina com um novo aumento na absorção de água concomitante à protrusão radicular (fase III).

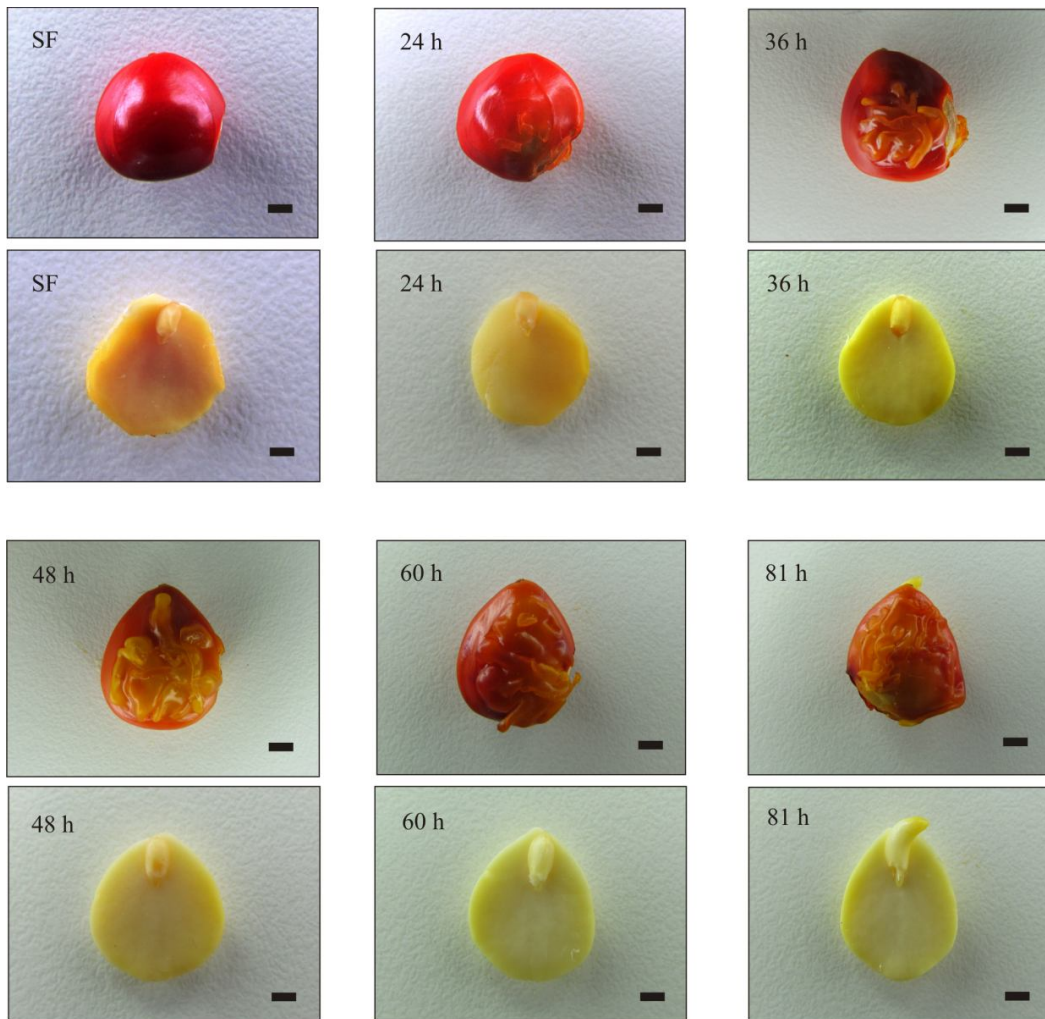
Pela curva obtida, no entanto, a fase I não foi rápida, tendo durado por aproximadamente 48 horas. Embora o tratamento pré-germinativo tenha favorecido a absorção de água, o processo de embebição foi retardado devido ao lento amolecimento do tegumento. Em muitas leguminosas, o tegumento atua como retardador da embebição e, posteriormente, não mais impede a movimentação de água para o interior da semente (Souza e Marcos Filho, 2001). A fase II se estendeu por 24 horas, de modo que o início da fase III aconteceu após 72 horas de embebição. A duração de cada uma dessas fases depende de características inerentes a cada semente, como permeabilidade do tegumento, tamanho da semente e composição do material de reserva (Bewley e Black, 1994).



$$y = \frac{64,96}{1 + \exp\left(-\frac{(x-19,59)}{13,25}\right)} \quad R^2 = 0,9963 \quad (p < 0,0001)$$

**Figura 1** – Curva de embebição de sementes de *Adenantha pavonina* após aplicação do tratamento pré-germinativo, a 25 °C (16h de escuro/8h de luz). As barras representam o desvio padrão. (Ajuste equacional significativo quando  $p < 0,05$ ).

A partir destes resultados, diferentes tempos de embebição foram escolhidos para avaliar a perda da TD durante a germinação, que foram: 0, 24, 36, 48, 60 e 81 horas de embebição (Figura 2). O tempo de 81 horas foi escolhido para representar sementes com 1 mm de raiz primária, uma vez que neste tempo de embebição, dentre as sementes que já apresentavam protrusão radicular, 47% exibiam aquele comprimento de raiz.



**Figura 2** – Aspecto visual das estruturas externas e internas de sementes de *Adenanthemum pavonina*. **SF**. Semente fresca **24 – 60 h**. Sementes embebidas por 24, 36, 48 e 60 horas **81 h**. Semente com raiz primária com 1 mm de comprimento. Escala: 1 mm.

### 3.3 Perda da TD durante a germinação

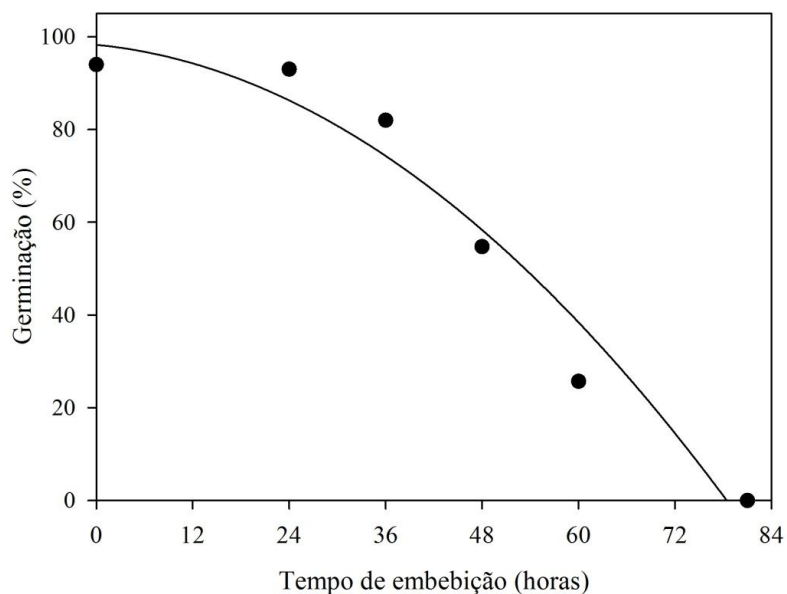
Os valores de germinação relativos à perda da TD em sementes de *A. pavonina* se enquadraram em uma equação quadrática (Figura 3), e apresentaram correlação inversa e significativa em função dos diferentes tempos de embebição (coeficiente de correlação: -0,939  $p=0,00554$ ).

Com o progresso da embebição, a secagem das sementes até o grau de umidade inicial promoveu redução da sobrevivência das mesmas, o que evidencia que o avanço do processo germinativo contribuiu para o aumento da sensibilidade à dessecação. A redução da sobrevivência pode ter acontecido porque células sensíveis à dessecação, quando secas, apresentam distúrbios metabólicos provenientes do aumento da concentração de solutos (sais, aminoácidos, açúcares), alterando a força iônica e o pH da solução intracelular, levando à desnaturação irreversível de proteínas (Nedeva e Nikolova, 1997).

Nos estágios iniciais de germinação (24 e 36 horas), a secagem das sementes até o grau de umidade inicial (aproximadamente 13%), não promoveu danos significativos às sementes (Tabela 1), que mantiveram índices de sobrevivência acima de 82%. A sensibilidade à dessecação tornou-se evidente quando as sementes entraram na fase II. Após 48 horas de embebição, a germinação após a secagem decaiu progressivamente e não houve sobrevivência após a secagem de sementes com raiz primária com 1 mm de comprimento.

Segundo Bewley e Black (1994), a tolerância das sementes à dessecação diminui com o decorrer das fases I e II de embebição, e é perdida durante ou após a fase III. Esta proposta concorda com os resultados encontrados para sementes de *Adenantha pavonina*, cuja perda da TD teve início na transição das fases I e II, e foi perdida de forma irreversível em sementes com raiz primária com 1 mm de comprimento. Pereira (2011) também verificou que sementes de *Copaifera langsdorffii* perderam a TD entre as fases I e II de embebição, porém de forma mais severa. O autor descreve que não haviam sido encontrados relatos de espécies cujas sementes perderam a TD durante a transição das duas primeiras fases de embebição.





$$y = -0,0138x^2 - 0,1679x + 98,2636 \quad R^2 = 0,9555 \quad (p=0,0094)$$

**Figura 3** – Perda da tolerância à dessecação em sementes de *Adenantha pavonina* durante a germinação. Resultados de germinação expressos pela porcentagem de plântulas normais obtidas após as sementes serem submetidas a diferentes tempos de embebição, seguida de secagem até o grau de umidade inicial. (Ajuste equacional significativo quando  $p < 0,05$ ).

**Tabela 1** – Grau de umidade de sementes de *Adenantha pavonina* após diferentes tempos de embebição, e porcentagem de germinação, expressa pelo número de plântulas normais obtidas após o processo de embebição e secagem das sementes até o grau de umidade inicial, seguido de reidratação.

| Tempo (horas) | Grau de Umidade (%) | Germinação (%) |
|---------------|---------------------|----------------|
| 0             | 12,91               | 94 a           |
| 24            | 36,00               | 93 a           |
| 36            | 48,92               | 82 a           |
| 48            | 57,54               | 54,71 b        |
| 60            | 61,69               | 25,68 c        |
| 81            | 64,95               | 0 d            |

Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,5$ ).

De fato, para algumas espécies, o início da perda da TD acontece quando as sementes se encontram em um estado metabólico mais avançado, na transição das fases II e III, conforme observado em sementes de *Glycine max* e *Zea mays* (Koster e Leopold, 1988), *Pisum sativum* (Reisdorph e Koster, 1999), *Triticum aestivum* (Miazek et al., 2001) e *Peltophorum dubium* (Guimarães et al., 2011).

Sabe-se que a capacidade de tolerar a dessecação difere entre os tecidos da semente (Kermode e Fich-Savage, 2002). De acordo com Buitink (2003), a raiz primária é a primeira estrutura a tornar-se sensível à dessecação. Em algumas espécies, no entanto, esta estrutura persiste tolerante à dessecação após a sua protrusão, tornando-se sensível com o avanço do seu comprimento. Esta situação foi observada em sementes de *Sesbania virgata* (Masetto, 2008), *Medicago truncatula* (Faria et al., 2005), *Solanum lycopersicum*, *Abelmoschus esculentus* e *Pisum sativum* (Lin et al., 1998).

Os resultados obtidos neste experimento com sementes de *Adenantha pavonina*, juntamente com os demais trabalhos citados, ilustram que a TD em sementes ortodoxas é um mecanismo complexo e inerente a cada espécie. Além disso, corroboram a proposta de Sun (1999), de que sementes ortodoxas em processo germinativo podem ser utilizadas como modelos experimentais para estudos de sensibilidade à dessecação.

### **3.4 Conteúdo de DNA nuclear**

A perda da TD durante a germinação coincide com o nível de atividade de células embrionárias, principalmente as da extremidade radicular (Osborne et al., 2002). O crescimento da radícula é inicialmente governado pelo processo de expansão celular. Em seguida, geralmente após a protrusão radicular, observa-se o início da divisão celular (Bewley e Black, 1994). A reativação do ciclo celular foi sugerida como um bom

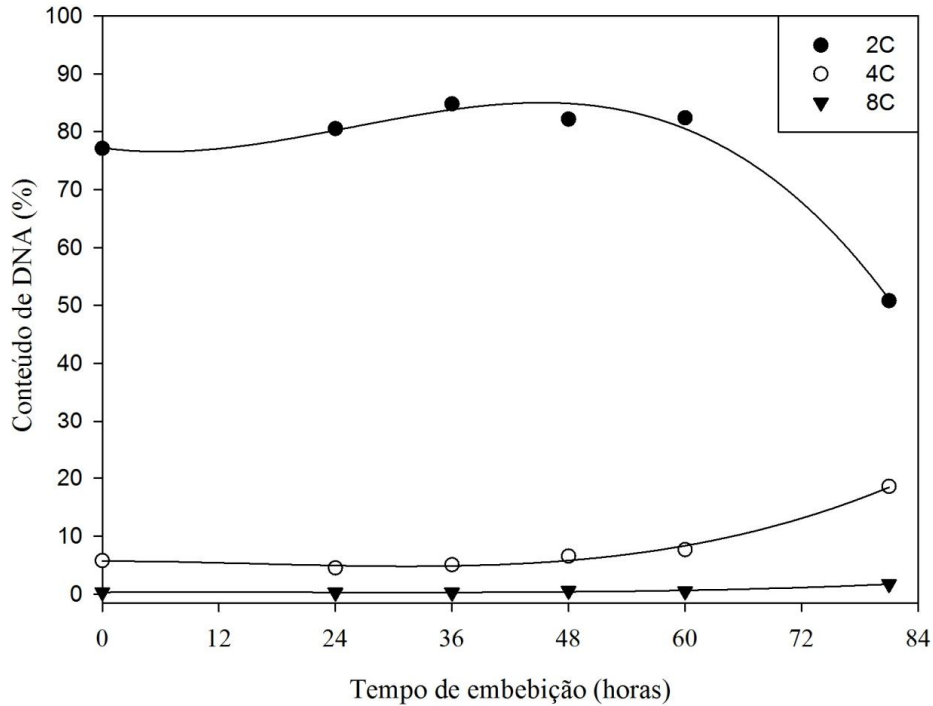
marcador para o desenvolvimento da perda da TD durante a germinação (Bewley, 1979).

Pelas análises de citometria de fluxo em radículas de sementes de *A. pavonina* durante a germinação, foram detectados, principalmente, núcleos com conteúdo de DNA 2C, 4C e 8C (Figura 4). Alterações acentuadas nestes conteúdos foram encontradas em sementes frescas (recém dispersas) e após a germinação, em raízes primárias com 1 mm de comprimento (Figura 5).

Em sementes frescas, a maioria dos núcleos apresentou conteúdo de DNA 2C (77%), e baixa quantidade de DNA 4C (5,8%), indicando que a maioria das células encontra-se retida na fase G<sub>1</sub> do ciclo celular (pré-síntese), e uma pequena parcela retida na fase G<sub>2</sub> (pós-síntese). Esta é uma característica prevalente em sementes ortodoxas (Bino et al, 1993; Castro et al., 2000; Vázquez-Ramos e Sánchez, 2003; Gendreau et al., 2008), embora sementes de algumas espécies tenham sido dispersas com altos níveis de DNA 4C (aproximadamente 40%) (Faria et al., 2005; Oliveira, 2009; Guimarães et al., 2011). Elevado conteúdo de DNA 2C também foi observado em sementes maduras de espécies intermediárias e recalcitrantes, como *Castanea sativa* (Bino et al., 1993), *Inga vera* (Faria et al., 2004) e *Coffea arabica* (Silva et al., 2008), o que indica que as relações entre a TD e os eventos do ciclo celular ainda são esparsas, e que diferentes espécies possam ter desenvolvido mecanismos de controle exclusivos, adaptadas às características específicas de germinação e habitat (Vázquez-Ramos e Sánchez, 2003).

Os baixos níveis de DNA 4C em sementes frescas podem ser explicados pelo efeito da dessecação ao final do processo de maturação de sementes ortodoxas. Segundo Deltour (1985), quando as sementes são desidratadas, o conteúdo de água em células embrionárias decai rapidamente, conseqüentemente, o metabolismo é reduzido e a vis-

cosidade citoplasmática aumenta, inviabilizando a formação de estruturas complexas necessárias para a atividade do ciclo celular.



$$y_{2C} = -0,000354x^3 + 0,0279x^2 - 0,357x + 77,271 \quad R^2 = 0,979 \text{ (p= 0,032)}$$

$$y_{4C} = 0,0000797x^3 - 0,00461x^2 + 0,0378x + 5,676 \quad R^2 = 0,986 \text{ (p= 0,02)}$$

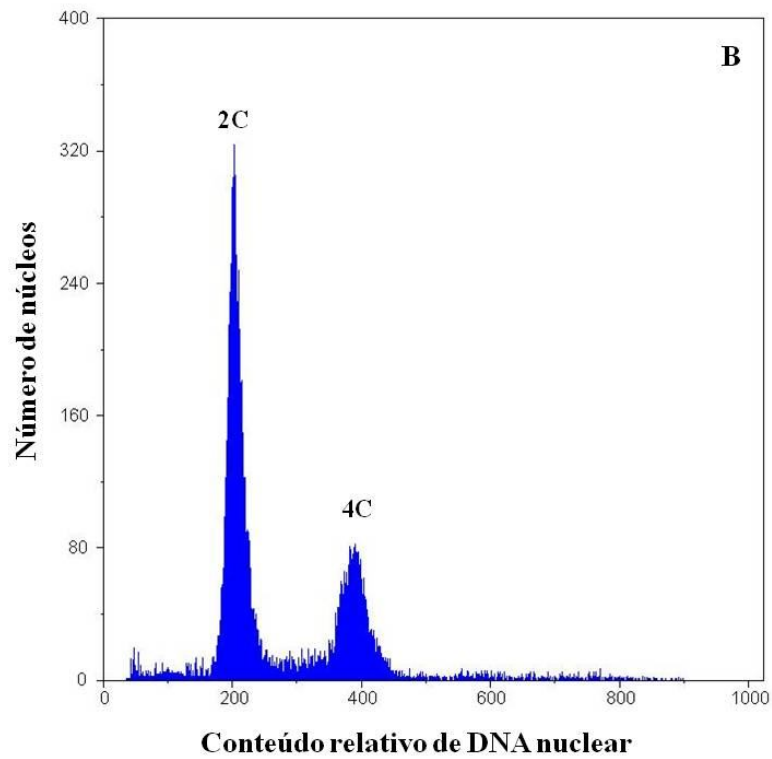
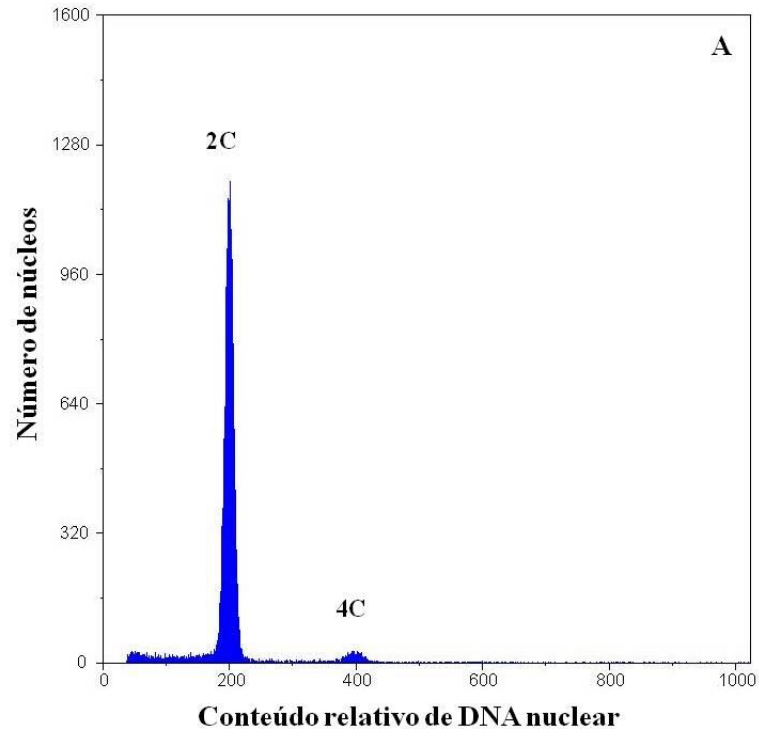
$$y_{8C} = 0,00000917x^3 - 0,000612x^2 + 0,00974x + 0,300 \quad R^2 = 0,948 \text{ (0,074)}$$

**Figura 4** – Conteúdo de DNA nuclear em radículas de eixos embrionários de *Adenantha pavonina* ao longo e após a germinação. (Ajuste equacional significativo quando  $p < 0,05$ ).

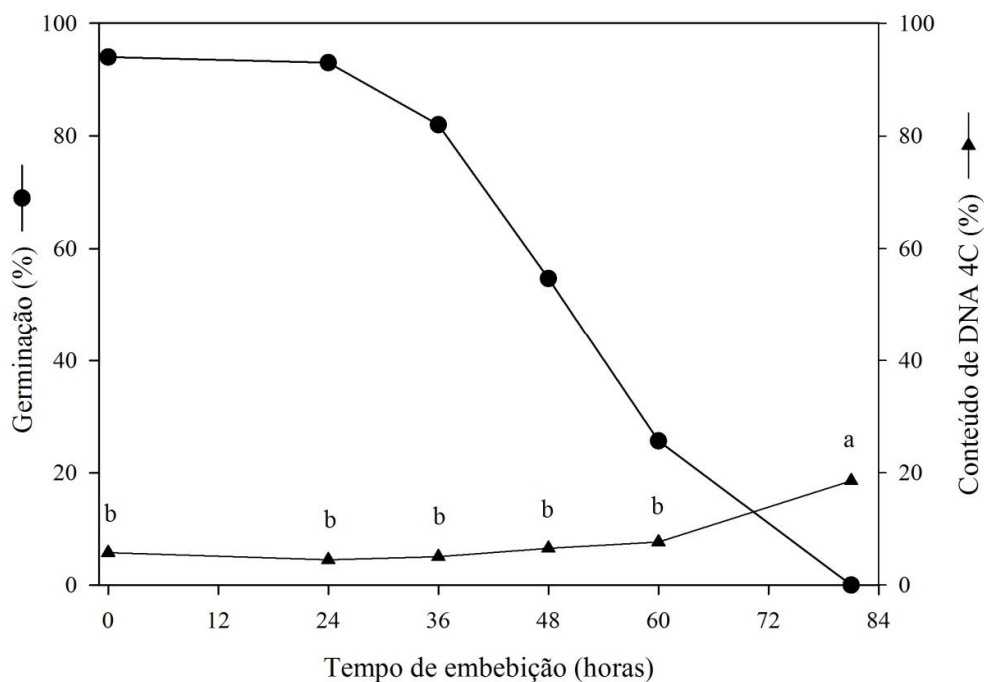
Durante a germinação, poucas alterações nos conteúdos de DNA 2C e 4C foram observadas até as primeiras 60 horas de embebição. Após este período, foi observada uma redução no conteúdo de DNA 2C e aumento de DNA 4C, indicando que a replicação do DNA foi retomada na transição das fases II e III de embebição, momento antecedente à protrusão da radícula. Sabe-se que a embebição não ativa o ciclo celular de imediato. Ao invés disso, tem-se um atraso até que a replicação do DNA torne-se evi-

dente (Vázquez-Ramos e Sánchez, 2003). Esse atraso é necessário para que a integridade do DNA, retido na fase G<sub>1</sub>, seja reconstituída, através da operação de mecanismos de reparo sobre danos causados por dessecação, armazenamento e embebição (Osborne e Boubriak, 1994; Osborne et al., 2002). O aumento do conteúdo de DNA 4C também denota o progresso da germinação em sementes de *Coffea arabica* (Silva et al., 2008), *Leucaena leucocephala* (Oliveira, 2009), *Pinus banksiana* e *Hordeum vulgare* (Śliwińska, 2009). De maneira diferente, a replicação do DNA foi verificada em sementes de *Medicago truncatula* após a germinação, sendo observado aumento do conteúdo de DNA 4C somente quando as raízes primárias atingiram 3 mm de comprimento (Faria et al., 2005).

Em sementes de *Adenanthera pavonina*, a maior parcela de núcleos com DNA 4C foi observada em raízes primárias com 1 mm de comprimento, coincidindo com a completa redução da capacidade das sementes tolerarem a dessecação (Figura 6), evidenciada por uma correlação inversa e significativa entre a TD e o conteúdo de DNA 4C (coeficiente de correlação: -0,853; p=0,0324). O aumento do conteúdo de DNA 4C também foi correlacionado com a perda da TD em sementes de *Leucaena leucocephala* (Oliveira, 2009), quando as sementes apresentaram 1 mm de raiz primária. Em contrapartida, a perda da TD precedeu a retomada do ciclo celular em sementes de *Medicago truncatula* (Faria et al., 2005) e *Peltophorum dubium* (Guimarães et al., 2011).



**Figura 5** – Histogramas de citometria de fluxo demonstrando o conteúdo de DNA nuclear em radículas de sementes de *Adenantha pavonina* antes e após a germinação. **A.** Sementes frescas. **B.** Raízes com 1 mm de comprimento.



**Figura 6** – Conteúdo de DNA 4C e perda da tolerância à dessecação em sementes de *Adenantha pavonina* durante e após a germinação. Resultados de germinação expressos pela porcentagem de plântulas normais obtidas de sementes submetidas a diferentes tempos de embebição e secas até o grau de umidade inicial. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, aos 5% de probabilidade.

Deltour (1985) sugeriu que núcleos com conteúdo de DNA 4C (fase  $G_2$ ) são mais sensíveis a estresses, como a dessecação, do que núcleos com conteúdo de DNA 2C (fase  $G_1$ ). Isso porque células na fase  $G_2$  oferecem maior alvo a fatores que induzem mutações no material genético, como radiações e radicais livres (Bino et al., 1993).

Assim, para sementes de *Adenantha pavonina*, o conteúdo de DNA nuclear pode ser utilizado como um sinalizador do progresso da germinação e da consequente perda da capacidade das sementes de tolerar a dessecação.

### 3.5 Integridade das membranas celulares

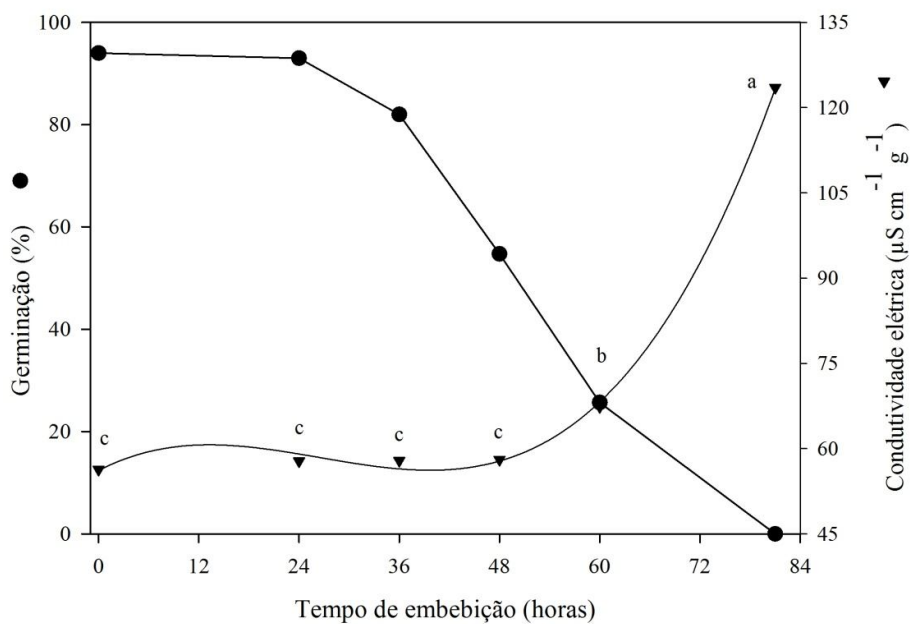
As membranas celulares são compostas principalmente por proteínas e fosfolípidos dispostos em uma camada fluida, cuja organização molecular é estabilizada pela relação entre os componentes da membrana e a água (Marcos Filho, 2005). A permeabilidade seletiva das membranas, que permite a retenção de solutos no interior da célula, perde sua eficiência durante a secagem (Alpert e Oliver, 2002). Assim, a intensidade de liberação de exsudados depende diretamente do estado de organização do sistema de membranas celulares.

O teste de condutividade elétrica foi realizado para analisar indiretamente a integridade de membranas celulares em sementes de *Adenantha pavonina* submetidas a diferentes períodos de embebição e secagem até o grau de umidade inicial. Os resultados encontram-se na Figura 7.

Não foi observada diferença significativa na condutividade elétrica das soluções de sementes frescas e sementes secas após a embebição por até 48 horas. Houve aumento significativo no extravasamento de eletrólitos de sementes embebidas por 60 horas e secas posteriormente. O valor máximo de condutividade elétrica obtido foi na solução de sementes que apresentaram raiz primária com 1 mm de comprimento e secas em seguida.

Os resultados obtidos nas análises de condutividade elétrica e da sobrevivência das sementes submetidas a diferentes tempos de embebição e secas até o grau de umidade inicial se correlacionaram de forma inversa e significativa (coeficiente de correlação: -0,818;  $p=0,0469$ ).





$$y_{\text{condutividade}} = 0,000511x^3 - 0,0408x^2 + 0,764x + 57,896 \quad R^2 = 0,998 \quad (p=0,003)$$

**Figura 7** – Condutividade elétrica e perda da tolerância à dessecação em sementes de *Adenantha pavonina* submetidas a diferentes períodos de embebição, seguida de secagem até o grau de umidade inicial. Resultados de germinação expressos pela porcentagem de plântulas normais obtidas após a embebição e secagem das sementes (Ajuste equacional significativo quando  $p < 0,05$ ).

Embora a perda da TD tenha iniciado na transição das fases I e II de embebição (36 e 48 horas), os dados de condutividade elétrica indicam que o sistema de membranas das sementes manteve-se íntegro após a embebição e secagem das sementes. Com o progresso da embebição (60 horas), a capacidade das sementes tolerarem a dessecação foi reduzida de forma acentuada, sendo esta capacidade completamente perdida após a germinação. Com base nos dados de condutividade elétrica, sugere-se que a estrutura funcional das membranas celulares foi comprometida pela secagem das sementes, o que pode ter favorecido a redução e a completa perda de TD. Resultados semelhantes foram

observados em sementes de canola (Bagniewska-Zadwoma, 2008), ervilha, milho e soja (Koster e Keopold, 1988), onde a perda da TD durante a germinação coincidiu com o aumento da permeabilidade das membranas.

Por meio de análises ultraestruturais em sementes de *Copaiifera langsdorffii*, Pereira (2011) verificou que sementes embebidas por 144 horas, quando submetidas à secagem, apresentaram danos à estrutura celular, com aparente desprendimento da plasmalema em relação à parede celular, bem como lise de células. Vários autores relataram danos irreparáveis à estrutura celular quando da secagem de sementes em processo germinativo (Guimarães, 2009; Oliveira, 2009; Corbineau et al., 2004).

As membranas celulares são particularmente vulneráveis a danos durante a perda da TD ao longo da germinação (Marcos Filho, 2005). Assim, em sementes, a integridade das membranas é de importância crucial para a manutenção da viabilidade, de modo que qualquer ruptura indevida, gerada durante a secagem, pode causar consequências imediatas às sementes durante a reidratação (Kermode e Finch-Savage, 2002).

Dessa forma, sugere-se que a perda da TD em sementes de *Adenanthera pavonina* possa estar relacionada a danos nas membranas celulares causados pela dessecação.

### **3.6 Análise do sistema antioxidativo enzimático**

A dessecação das sementes promove um acúmulo de EROs e radicais livres nas células (Leprince et al., 1994; Ntuli et al., 2011), devido a ruptura de plastídios e da cadeia de transporte de elétrons em mitocôndrias (Ferreira e Abreu, 2007). Esses radicais, em níveis elevados, são potencialmente tóxicos à integridade celular, sendo capazes de induzir a oxidação e despolimerização de ácidos nucleicos, a desnaturação de proteínas e a peroxidação dos lipídios da membrana plasmática (Kranter et al., 2010). Em função disso, as sementes ortodoxas são providas de um sistema de defesa antioxi-

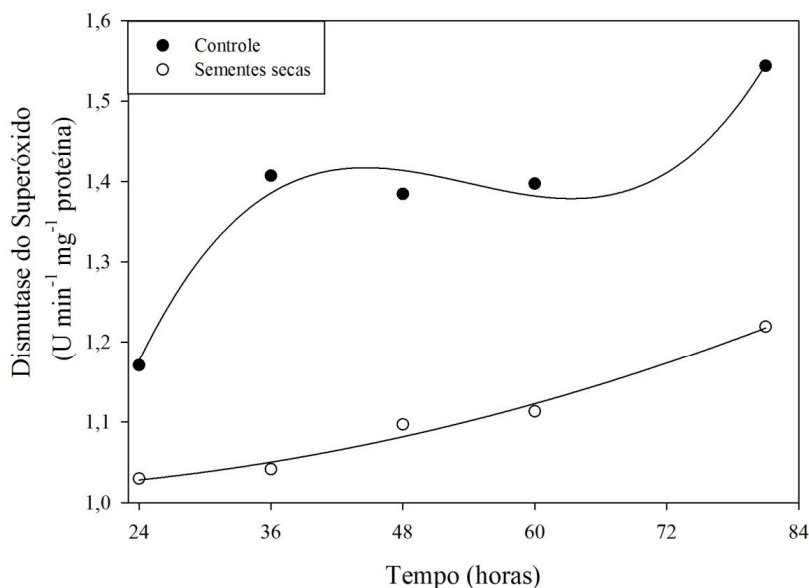
dativo (Pammenter e Berjak, 1999), para a manutenção dos níveis homeostáticos desses radicais.

Em sementes de *Adenanthera pavonina*, o sistema antioxidativo foi avaliado pela atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) e peroxidase do ascorbato (APX). As análises foram realizadas em eixos embrionários de sementes embebidas por diferentes períodos (controle), e após a embebição e secagem das sementes até o grau de umidade inicial.

A SOD é uma metaloenzima distribuída em diferentes compartimentos celulares: mitocôndrias, peroxissomos, citossol e, possivelmente, no espaço extracelular (Alscher et al., 2002). Constitui a primeira linha de defesa contra as EROs, realizando a dismutação do radical superóxido ( $O_2^-$ ) em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Gill e Tuteja, 2010).

Os resultados da atividade da SOD encontram-se na Figura 8 e na Tabela 2. Após 36 horas de embebição, a atividade da SOD aumentou em aproximadamente 20% e manteve-se constante até 60 horas de embebição. Em seguida, houve um aumento de 14% na atividade desta enzima, quando as sementes apresentaram raiz primária com 1 mm de comprimento.

A partir das primeiras 36 horas de embebição, a secagem das sementes promoveu uma redução significativa na atividade da SOD (decréscimo médio de 35%). Apesar do conteúdo de  $O_2^-$  não ter sido avaliado no presente trabalho, sugere-se que mesmo com a redução da atividade, a SOD minimizou, em certa parte, o efeito tóxico dos radicais  $O_2^-$  acumulados nas sementes secas após 48 horas de embebição, uma vez que após a secagem o sistema de membranas permaneceu íntegro e a sobrevivência manteve-se acima de 50%.



$$y_{\text{controle}} = 0,0000117x^3 - 0,00189x^2 + 0,0989x - 0,270 \quad R^2 = 0,978 \quad (p=0,163)$$

$$y_{\text{sementes secas}} = 0,000044x^2 + 0,00102x + 1,028 \quad R^2 = 0,979 \quad (p=0,021)$$

**Figura 8** – Atividade da dismutase do superóxido (SOD) em eixos embrionários de sementes de *Adenantha pavonina* embebidas por diferentes períodos (controle), e de sementes inicialmente embebidas e posteriormente secas até o grau de umidade inicial (sementes secas). (Ajuste equacional significativo quando  $p < 0,05$ ).

**Tabela 2** – Atividade da dismutase do superóxido (SOD) em eixos embrionários de sementes de *Adenantha pavonina* embebidas por diferentes períodos (controle), e de sementes inicialmente embebidas e posteriormente secas até o grau de umidade inicial (sementes secas).

|                | Atividade da SOD (U min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína) |          |          |          |          |
|----------------|--|----------|----------|----------|----------|
|                | Períodos de embebição (horas)                                    |          |          |          |          |
|                | 24   | 36       | 48       | 60       | 81       |
| Controle       | 1,170 Ca   | 1,407 Ba | 1,384 Ba | 1,397 Ba | 1,601 Aa |
| Sementes Secas | 1,031 Aa   | 1,045 Ab | 1,099 Ab | 1,116 Ab | 1,221 Ab |

Médias acompanhadas de letras iguais na linha (maiúsculas) ou na coluna (minúsculas) não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A partir das 60 horas de embebição, a integridade das membranas celulares foi comprometida após a secagem das sementes, e a capacidade de tolerar a dessecação decaiu acentuadamente (Figura 7). Provavelmente, a absorção de oxigênio pelas células aumentou com o avanço da embebição, elevando os níveis de  $O_2^-$ . Com isso, a partir de 60 horas de embebição, a secagem das sementes promoveu acúmulo de  $O_2^-$  nas células, devido à ineficiência da SOD na remoção desses radicais após a secagem.

Sabe-se que os radicais  $O_2^-$  em excesso podem gerar radicais hidroxilas ( $OH^\bullet$ ), através de reações do tipo Haber-Weiss, que são dez mil vezes mais rápidas do que a dismutação do  $O_2^-$  (Gill e Tuteja, 2010). O radical  $OH^\bullet$  é considerado o mais potente oxidante celular sendo, provavelmente, o responsável pela peroxidação de lipídios nas membranas e pela destruição de várias macromoléculas celulares (Scandalios, 1993) e, devido à ausência de um mecanismo enzimático para a eliminação deste radical, o excesso de  $OH^\bullet$  pode levar à morte celular (Gill e Tuteja, 2010). Por isso, sugere-se que a redução na atividade da SOD possa estar relacionada a danos oxidativos nas células.

De acordo com Gill e Tuteja (2010), o excesso de  $H_2O_2$  nas células pode causar danos ao metabolismo celular, uma vez que este composto é capaz de oxidar os grupos tiol (-SH) de enzimas, inativando-as. O  $H_2O_2$  é removido do metabolismo celular pela ação da catalase, peroxidase e peroxidase do ascorbato (Arora et al., 2002).

A catalase é uma enzima tetrâmera que contém um grupo heme-protéico em cada subunidade, e converte o  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular (Horváth et al., 2002). A catalase é predominantemente encontrada nos peroxissomos, onde o  $H_2O_2$  é gerado como subproduto da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos, fotorrespiração e catabolismo das purinas (Gill e Tuteja, 2010).

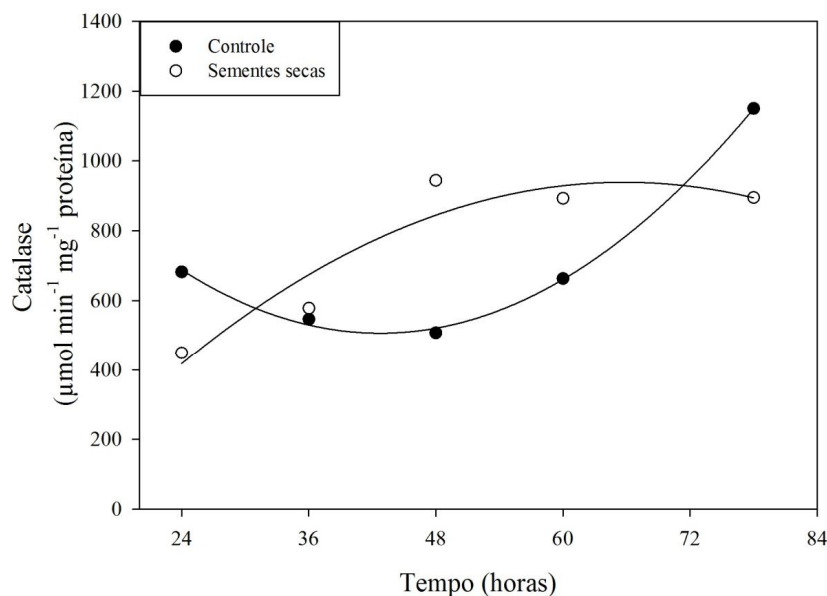
Os resultados obtidos da atividade da enzima CAT encontram-se na Figura 9 e Tabela 3. Após 24 horas de embebição, a secagem das sementes reduziu em aproxima-

damente 32% a atividade da CAT em relação ao controle. Porém, com o avanço da embebição (aumento da sensibilidade à dessecação), a secagem subsequente não comprometeu a atividade da CAT, que permaneceu estatisticamente igual e até mesmo superior ao controle em alguns tempos de embebição (48 e 60 horas).

A peroxidase (POX) é uma enzima que utiliza o  $H_2O_2$  para oxidar diferentes substratos (Asada, 1992). Amplamente distribuída nos compartimentos celulares, a POX encontra-se associada às paredes celulares, membranas celulares, organelas, vacúolos e citossol (Gill e Tuteja, 2010). Além de possuir uma distribuição mais ampla nas células do que a da CAT, a POX apresenta menor massa molecular (35 kDa), permitindo uma mobilidade mais rápida onde sua ação é requerida (Siegel, 1993).

Os resultados da atividade da POX encontram-se na Figura 10 e Tabela 4. O padrão da atividade da POX, após a embebição e secagem das sementes, foi muito semelhante à obtida pela CAT. Após a secagem, a atividade da POX foi estatisticamente igual e até mesmo superior ao controle no tempo de embebição 48 horas.

A peroxidase do ascorbato (APX) realiza a eliminação de  $H_2O_2$  nas células utilizando o ascorbato como doador de elétrons para a reação (Asada, 1992). Esta enzima é encontrada principalmente no citossol (Arora et al., 2002), podendo estar associada às mitocôndrias, peroxissomos e apoplasto (Mittler, 2002).



$$y_{\text{controle}} = 0,517x^2 - 44,171x + 1450,585 \quad R^2 = 0,998 \quad (p = 0,002)$$

$$y_{\text{sementes secas}} = 0,299x^2 - 39,297x + 353,235 \quad R^2 = 0,898 \quad (p = 0,102)$$

**Figura 9** – Atividade da catalase (CAT) em eixos embrionários de sementes de *Adenantha pavonina* embebidas por diferentes períodos (controle), e de sementes inicialmente embebidas e posteriormente secas até o grau de umidade inicial (sementes secas). (Ajuste equacional significativo quando  $p < 0,05$ ).

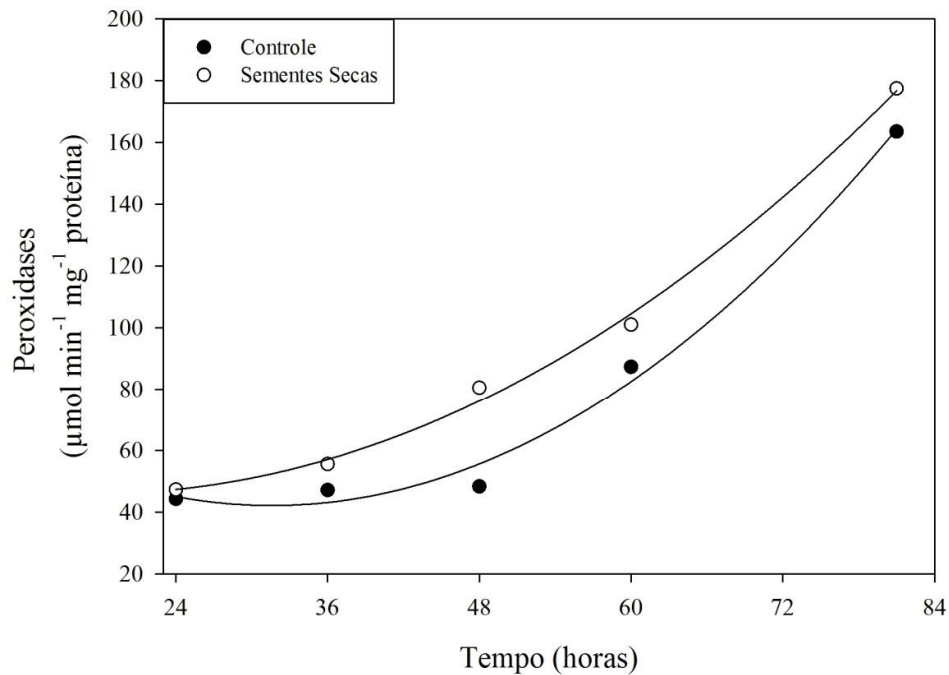
**Tabela 3** – Atividade da catalase (CAT) em eixos embrionários de sementes de *Adenantha pavonina* embebidas por diferentes períodos (controle), e de sementes inicialmente embebidas e posteriormente secas até o grau de umidade inicial (sementes secas).

|                | Atividade da CAT ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prote\acute{a}na}^{-1}$ ) |            |            |            |             |
|----------------|---|------------|------------|------------|-------------|
|                | Períodos de embebição (horas)   |            |            |            |             |
|                | 24  | 36         | 48         | 60         | 81          |
| Controle       | 682,441 Ba  | 547,784 Ba | 506,894 Bb | 667,338 Bb | 1097,752 Aa |
| Sementes Secas | 454,641 Bb  | 581,332 Ba | 944,278 Aa | 897,433 Aa | 900,422 Aa  |

Médias acompanhadas de letras iguais na linha (maiúsculas) ou na coluna (minúsculas) não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os resultados obtidos da atividade da APX encontram-se na Figura 11 e Tabela 5. A atividade da APX não foi comprometida quando as sementes foram embebidas por até 60 horas e secas até aproximadamente 13% de umidade. No entanto, quando as sementes com raiz primária de 1 mm foram secas, foi observado uma redução em aproximadamente 34% na atividade da APX.

Segundo Mittler (2002), a APX possui maior afinidade pelo  $H_2O_2$  ( $\mu M$ ) em relação à CAT e à POX (mM). No entanto, no presente trabalho, a atividade da CAT foi superior às atividades da POX e APX, o que indica que a CAT foi a enzima mais atuante na remoção do  $H_2O_2$  do metabolismo celular.



$$y_{\text{controle}} = 0,0610x^2 - 4,045x + 108,073 \quad R^2 = 0,992 \quad (p = 0,008)$$

$$y_{\text{secas}} = 0,0412x^2 - 1,834x + 68,455 \quad R^2 = 0,994 \quad (p = 0,006)$$

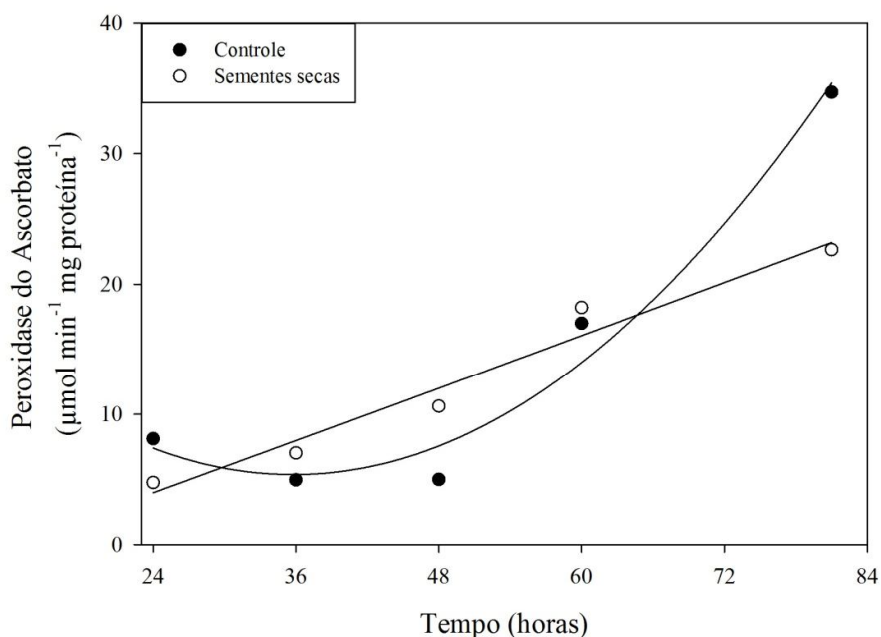
**Figura 10** – Atividade da peroxidase (POX) em eixos embrionários de sementes de *Adenantha pavonina* embebidas por diferentes períodos (controle), e de sementes inicialmente embebidas e posteriormente secas até o grau de umidade inicial (sementes secas). (Ajuste equacional significativo quando  $p < 0,05$ ).



**Tabela 4** – Atividade da enzima peroxidase (POX) em eixos embrionários de sementes de tento-carolina hidratadas por diferentes períodos (controle), e de sementes inicialmente hidratadas e posteriormente secas até o grau de umidade inicial (sementes secas).

| Atividade da POX ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$ ) |                               |            |            |            |            |
|--|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|
|  | Períodos de embebição (horas) |            |            |            |            |
|  | 24                            | 36         | 48         | 60         | 81         |
| Controle   | 44,335 Ca                     | 47,086 Ca  | 46,947 Cb  | 86,929 Ba  | 166,036 Aa |
| Sementes Secas   | 47,228 Da                     | 55,414 CDa | 80,188 BCa | 100,665 Ba | 177,664 Aa |

Médias acompanhadas de letras iguais na linha (maiúsculas) ou na coluna (minúsculas) não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



$$y_{\text{controle}} = 0,015x^2 - 1,05x + 24,139 \quad R^2 = 0,973 \quad (p=0,0265)$$

$$y_{\text{sementes secas}} = 0,0000832x^2 + 0,329x - 3,957 \quad R^2 = 0,963 \quad (p=0,036)$$

**Figura 11** – Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) em eixos embrionários de sementes de *Adenantha pavonina* embebidas por diferentes períodos (controle), e de sementes inicialmente embebidas e posteriormente secas até o grau de umidade inicial (sementes secas). (Ajuste equacional significativo quando  $p < 0,05$ ).

**Tabela 5** – Atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX) em eixos embrionários de sementes de tento-carolina hidratadas por diferentes períodos (controle), e de sementes inicialmente hidratadas e posteriormente secas até o grau de umidade inicial (sementes secas).

|                | Atividade da APX ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$ ) |          |            |           |           |
|----------------|--|----------|------------|-----------|-----------|
|                | Períodos de embebição (horas)  |          |            |           |           |
|                | 24   | 36       | 48         | 60        | 1 mm      |
| Controle       | 8,31 Ca  | 4,94 Ca  | 4,86 Cb    | 16,996 Ba | 34,742 Aa |
| Sementes Secas | 4,76 Ca  | 7,004 Ca | 10,492 BCa | 18,301 Aa | 22,932 Ab |

Médias acompanhadas de letras iguais na linha (maiúsculas) ou na coluna (minúsculas) não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para a manutenção dos níveis homeostáticos das EROs nas células é necessário que as enzimas SOD, CAT, POX e APX atuem de forma conjunta e integrada (Mittler, 2002). Embora as atividades das enzimas CAT, POX e APX não tenham sido prejudicadas pela secagem das sementes, provavelmente o desequilíbrio entre as atividades destas enzimas e a da SOD possa ter auxiliado no acúmulo de EROs após a secagem. De acordo com Leprince et al. (1994), a transição do estado tolerante para o estado sensível à dessecação, durante a germinação de sementes ortodoxas, pode estar relacionada com o acúmulo de EROs nas células. Por isso, sugere-se que a perda da TD em sementes de *Adenanthera pavonina* possa estar relacionada a falhas no sistema antioxidativo enzimático.

Em sementes de milho, houve redução significativa nas atividades da SOD e POX quando sementes embebidas por 48 horas foram secas até 10% de umidade, concomitante com o início da perda da TD (Leprince et al., 1990). Sementes de *Sesbania virgata* com raiz primária com 3 mm de comprimento apresentaram redução na atividade da CAT quando foram secas até 10% de umidade, e houve redução de 75 pontos percentuais na sobrevivência das sementes (Costa, 2011).

O sistema antioxidativo já foi amplamente estudado durante a aquisição de TD em sementes ortodoxas (Bailly et al., 2001; Brandão Junior, 2002; Varghese e Naithani, 2002; Wu et al., 2009; Pukacka e Ratajczak, 2010; Spanò et al., 2011). No entanto, trabalhos sobre a relação deste sistema com a perda da TD durante a germinação são mais escassos (Leprince et al., 1990; Costa, 2011), o que representa um campo promissor para pesquisas futuras acerca das limitações da TD.

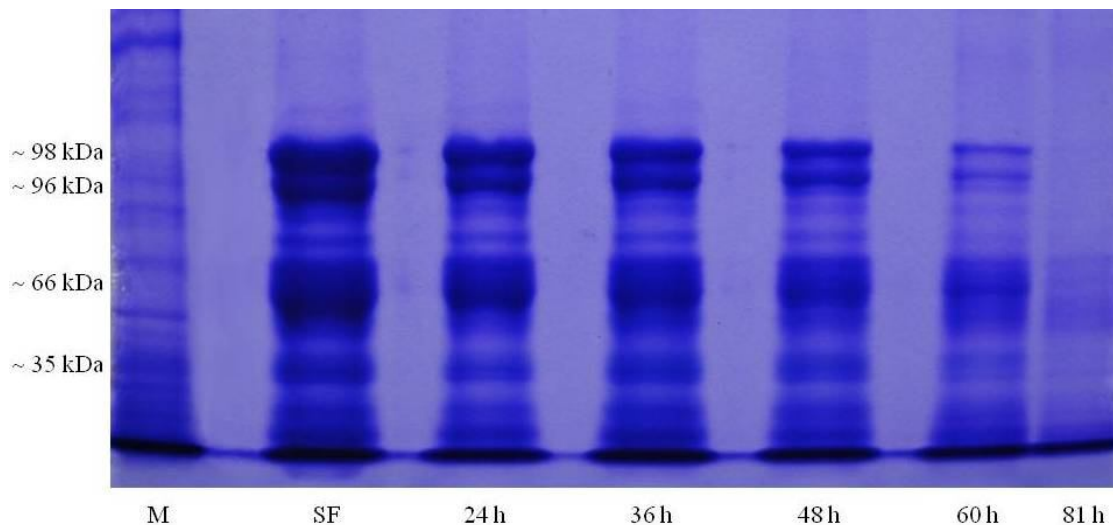
### **3.7 Avaliação das proteínas resistentes ao calor**

Em sementes ortodoxas, as proteínas resistentes ao calor (PRCs), juntamente com as proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), são associadas ao mecanismo protetor contra danos causados por dessecação (Pammenter e Berjak, 1999; Wehmeyer e Vierling, 2000; Kalemba e Pukacka, 2007). As proteínas LEA possuem uma grande quantidade de resíduos polares em suas estruturas e, durante a dessecação, promovem a estabilização de macromoléculas celulares através de ligações de hidrogênio (Hoeskstra et al., 2001). Já as PRCs atuam, principalmente, como chaperonas moleculares, cuja função é garantir a manutenção e proteger a estrutura desenovelada de proteínas durante e após a dessecação, impedindo que elas se agreguem de forma inapropriada (Efeoğlu, 2009). Tanto as proteínas LEA quanto as PRCs são acumuladas durante o desenvolvimento das sementes, antes ou durante o processo de secagem ao final da maturação (Blackman et al. 1991; Farrant et al., 1993; Wehmeyer et al., 1996; José et al., 2005).

O padrão eletroforético de PRCs em eixos embrionários de sementes de *Adenantha pavonina* encontra-se na Figura 12. As análises foram realizadas em sementes frescas e ao longo da germinação.

Em sementes frescas, foram detectadas quatro frações protéicas com pesos moleculares de aproximadamente 98, 96, 66 e 35 kDa, de modo que as três primeiras apre-

sentaram-se de forma robusta e a última em menor intensidade. Sementes de *Sesbania virgata* (Costa, 2001) e milho (José et al., 2005) também apresentaram quatro frações de PRCs; enquanto sementes de *Acer platanoides* e *A. pseudoplatanus* apresentaram, respectivamente, duas e três frações de PRCs (Kalemba e Pukacka, 2011), o que indica que a distribuição dessas proteínas pode variar entre espécies.



**Figura 12** Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor de eixos embrionários de sementes de *Adenantha pavoninai*. **M.** Marcador molecular **SF.** Sementes frescas **24 – 60 h.** Sementes embebidas por 24, 36, 48 e 60 horas **81 h.** Sementes com raiz primária com 1 mm de comprimento.

De acordo com seus pesos moleculares, as PRCs podem ser classificadas em seis grupos: PRCs100, PRCs90, PRCs70, PRCs60, pPRCs (pequenas PRCs – 17 a 30 kDa) e ubiquitinas (8,5 kDa) (Kalemba e Pukacka, 2007). Em sementes de *A. pavonina* foram encontradas três classes, PRCs90, PRCs60 e pPRCs.

As proteínas da classe PRCs90 predominam no citoplasma e atuam na manutenção da conformação das estruturas protéicas, mas também possuem papel-chave na rede de transdução de sinais, degradação e transporte de proteínas. Tanto as proteínas da classe PRCs60 como as da classe pPRCs atuam como chaperonas moleculares, no en-

tanto, aquelas são encontradas em mitocôndrias e cloroplastos, e estas estão associadas ao núcleo, citoesqueleto e membranas celulares (Efeoğlu, 2009; Mahmood et al., 2010).

Após 24 horas de embebição, houve uma leve redução na intensidade das bandas das três classes de PRCs, que permaneceram estáveis até as 48 horas de embebição. Após 60 horas, as classes PRCs90 e pPRCs reduziram de forma mais acentuada, e não foram detectadas em sementes com raiz primária com 1 mm de comprimento, que apresentaram traços da classe PRCs60 .

Em sementes de *A. pavonina*, o aumento da sensibilidade à dessecação coincidiu com a redução dos níveis de PRCs a partir das 60 horas de embebição, uma vez que após a secagem, a sobrevivência das sementes decaiu para 25% e não houve sobrevivência após a secagem das sementes com raiz primária com 1 mm de comprimento. Resultados semelhantes foram encontrados em sementes de *Sesbania virgata* (Costa, 2011) e *Medicago truncatula* (Boudet et al., 2006), onde o decréscimo dos conteúdos de PRCs também coincidiu com a redução na capacidade das sementes de tolerar a dessecação.

A partir das 60 horas de embebição, a redução da disponibilidade das proteínas PRCs90, PRCs60 e pPRCs pode ter favorecido a desnaturação e degradação de proteínas celulares após a secagem das sementes, provavelmente devido a falhas no sistema de manutenção e reconfiguração das estruturas protéicas. Por isso, propõe-se que em sementes de *Adenanthera pavonina* a perda da TD possa estar relacionada com a redução dos níveis de PRCs.

#### 4. CONCLUSÕES

A perda da tolerância à dessecação em sementes de *Adenantha pavonina* começa nos estágios iniciais de germinação, sendo totalmente perdida ao término da germinação.

Em sementes de *A. pavonina*, houve correlação entre a perda da tolerância à dessecação após a germinação e a retomada do ciclo celular em células da radícula.

A integridade celular de sementes de *A. pavonina* em processo germinativo foi comprometida pela secagem, devido a falhas de mecanismos protetores, como o sistema antioxidativo enzimático e as proteínas resistentes ao calor.

O padrão de perda de tolerância à dessecação observado em sementes de *A. pavonina*, em processo germinativo, pode ser utilizado como modelo em estudos de sensibilidade à dessecação.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Alfenas AC** (2006) **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismo**. 2 ed. UFV, Viçosa. 627 p

**Alpert P** (2000) The discovery, scope, and puzzle of desiccation tolerance in plants. **Plant Ecology** 151: 5-17

**Alpert P, Oliver MJ** (2002) Drying without dying. In Black M, Pritchard HM (eds) **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford, Oxon, UK: CABI Publishing, pp 3-43

**Alpert P** (2005) The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. **Integrative and Comparative Biology** 45:685-695

**Alscher RG, Erturk N, Heath LS** (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany** 53:1331-1341

**Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR** (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology** 109: 1247-1257

**Angelovici, R, Galili G, Fernie AR, Fait A** (2010) Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends in Plant Science** 15: 211-218

**Ara A, Arifuzzaman M, Ghosh CK, Hashem MA, Ahmad MU, Bachar SC, Nahar L, Sarker** (2010) Anti-inflammatory activity of *Adenantha pavonina* L., Fabaceae, in experimental animals. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 20: 929-932

**Arora A, Sairam RK, Srivastava GC** (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science** 82: 1227-1238

**Asada K** (1992) Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum** 85: 235-241

**Bagniewska-Zadwoma A** (2008) The root microtubule cytoskeleton and cell cycle analysis through desiccation of *Brassica napus* seedlings. **Protoplasma** 233:177-185

**Bailly C, Audigier C, Ladonne F, Wagner MH, Coste F, Corbineau F, Côme D** (2001) Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. **Journal of Experimental Botany** 52: 701-708

- Bartels D** (2005) Desiccation tolerance studied in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. **Integrative and Comparative Biology** 45: 696-701
- Beauchamp C, Fridovich I** (1971) Superoxide Dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry** 44: 276-287
- Bewley JD** (1979) Physiological aspects of desiccation tolerance. **Annual Review of Plant Physiology** 30: 195-238
- Bewley JD, Black M** (1994) **Physiology of development and germination**. Second Ed. Plenum Press, New York. 445 p
- Bino RJ, Lanteri S, Verhoeven HA, Kraak HL** (1993) Flow cytometric determination of nuclear replication stage in seed tissues. **Annals of Botany** 72: 181-187
- Blackman SA, Wettlaufer SH, Obendorf RL, Leopold AC** (1991) Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology** 96: 868-874
- Boudet J, Buitink J, Hoekstra FA, Rogniaux H, Larré C, Sator P, Leprince O** (2006) Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. **Plant Physiology** 140: 1418-1436
- Boubriak I, Dini M, Berjak P, Osborne D** (2000) Desiccation and survival in the recalcitrant seeds of *Avicennia marina*: DNA replication, DNA repair and protein synthesis. **Seed Science and Research** 10: 307-315
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding **Analytical Biochemistry** 72: 248-254
- Brandão Junior DS, Vieira MGGC, Hilhorst HWM** (2002) Aquisição da tolerância à dessecação nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia** 26: 673-681
- Brasil** (2009) **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, DF: Mapa/ACS, Brasília. 399 p
- Buitink J, Hoekstra FA, Leprince O** (2002) Biochemistry and biophysics of tolerance systems *In* Black M, Pritchard HM (eds) **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford, Oxon, UK: CABI Publishing, pp 293-318



**Buitink J, Vu BL, Satour P, Leprince O** (2003) The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. Seeds. **Seed Science Research** 13: 273-286.

**Buitink J, Leger JJ, Guisle I, Vu BL, Wuillème S, Lamirault G, Le Bars A, Le Meur N, Becker A, Küster H, Leprince O** (2006) 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** 47: 735-750

**Carvalho CR, Clarindo WR, Praça MM, Araújo FS, Carels N** (2008) Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. **Plant Science** 174: 613-617

**Castro RD, Lammeren AAM van, Groot SPC, Bino RJ, Hilhorst HWM** (2000) Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. **Plant Physiology** 122: 327-335

**Chance B, Maehley AC** (1955) Assay of catalases and peroxidases. **Methods Enzymology** 2: 764-775

**Contreras-Porcia L, Thomas D, Flores V, Correa JÁ** (2010) Tolerance to oxidative stress induced by desiccation in *Porphyra columbina* (Bangiales, Rhodophyta). **Journal of Experimental Botany** 62: 1815-1829

**Corbineau , Berjak P, Pammenter N, Vinel D, Picard MA, Côme D** (2004) Reversible cellular and metabolic changes induced by dehydration in desiccation-tolerant wheat seedling shoots. **Physiologia Plantarum** 122:28-38

**Corrêa MP** (1978) **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. 2 ed. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro. 307 p

**Costa PA, Lima ALS, Zanella F, Freitas H** (2010) Quebra de dormência em sementes de *Adenantha pavonina* L. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 40: 83-88

**Costa MCD** (2011) **Armazenamento de plântulas de *Sesbania virgata***. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 79 p

**Cromarty AS, Ellis RH, Roberts EH** (1985) **Design of seed storage facilities for genetic conservation**. IPGRI, Roma. 100 p

**Del Longo OT, González A, Pastori GM, Trippi V** (1993) Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology** 34: 1023-1028

**Deltour R** (1985) Nuclear activation during early germination of the higher plant embryo. **Journal of Cell Science** 75: 43-83

**Efeoğlu B** (2009) Heat shock proteins and heat shock response in plants. **G.U. Journal of Science** 22: 67-75

**Ellis R H, Hong TD, Roberts EH** (1990) An intermediate category of seed storage behaviour? **Journal of Experimental Botany** 41: 1167-1174

**Faria JMR, Lammeren AAM van, Hilhorst HWM** (2004) Desiccation sensitivity and cell cycle aspects in seeds of *Inga vera* subsp. affinis. **Seed Science Research** 14: 165-178

**Faria JMR, Buitink J, Lammeren, AAM van, Hilhorst HWM** (2005) Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of Experimental Botany** 56: 2119-2130

**Farrant JM, Pammenter NW, Berjak P** (1993) Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation-tolerant types. **Seed Science Research** 3: 1-13

**Farrant JM** (2000) A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. **Plant Ecology** 151: 29-39

**Farrant JM, Brandt W, Lindsey GG** (2007) An overview of mechanisms of desiccation tolerance in selected angiosperm resurrection plants. **Plant Stress** 1: 72-84

**Ferreira ICFR, Abreu RMV** (2007) Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise** 2: 32-39

**Gendreau E, Romaniello S, Barad S, Leymarie J, Benech-Arnold R, Corbineau F** (2008) Regulation of cell cycle activity in the embryo of barley seeds during germination as related to grain hydration. **Journal of Experimental Botany** 59: 203: 212

**Giannopolitis CN, Ries SK** (1977) Superoxide Dismutases. **Plant Physiology** 59: 309-314

**Gill SS, Tuteja N** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry** 48: 909-930

**Golovina EA, Hoekstra FA** (2003) Acquisition of desiccation tolerance in developing wheat embryos correlates with appearance of a fluid phase in membranes. **Plant, Cell and Environment** 26: 1815-1826

**Guimarães CC** (2009) **Perda da tolerância à dessecação em sementes de *Peltophorum dubium* durante e após a germinação.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 76 p

**Guimarães CC, Faria JMR, Oliveira JM, Silva EAA** (2011) Avaliação da perda da tolerância à dessecação e da quantidade de DNA nuclear em sementes de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert durante e após a germinação. **Revista Brasileira de Sementes** 33: 207-215

**Havir EA, McHale NA** (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology** 84: 450-455

**Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J** (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science** 6: 431-438

**Hong TD, Ellis RH** (1996) **A protocol to determine seed storage behaviour.** Rome: International Plant Genetic Resources Institute. 55p

**Horváth E, Szalai G, Pál M, Páldi E, Janda T** (2002) Differences between the catalase isozymes of maize (*Zea mays* L.) in respect of inhibition of various phenolic compounds. **Acta Biologica Szegediensis** 46: 33-34

**Hyde EOC** (1954) The function of the hilum in some Papilionaceae in relation to the ripening of the seed and the permeability of the testa. **Annals of Botany** 18: 241-256

**Illing N, Denby KJ, Collett H, Shen A, Farrant JM** (2005) The signature of seeds in resurrection plants: a molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. **Integrative and Comparative Biology** 45: 771-787

**ISTA – International seed testing association** (1995) **Handbook of vigour test methods.** 3 ed. Zürich. 117p

**José SCBR, Von Pinho EVR, Von PinhoRG, Silveira CM** (2005) Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes** 40: 115-121

**Kalembe EM, Pukacka S** (2007) Possible roles of LEA proteins and sHSP in seed protection: a short review. **Biological Lett.** 44: 3-16

**Kalemba EM, Pukacka S** (2011) Association of protective proteins with dehydration and desiccation of orthodox and recalcitrant category seeds of three *Acer* genus species. **Journal of Plant Growth Regulation** pp. 1-12 doi: 10.1007/s00344-011-9246-4

**Kar M, Nishra D** (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology** 57: 315-319

**Kermode AR, Finch-Savage BE** (2002) Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development *In* Black M, Pritchard HM (eds) **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford, Oxon, UK: CABI Publishing, pp 149-184

**Koster KL, Leopold AC** (1988) Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology** 88: 829-832

**Koster KL, Reisdorph N, Ramsay JL** (2003) Changing desiccation tolerance of pea embryo protoplasts during germination. **Journal of Experimental Botany** 54: 1607-1614

**Kranner I, Birtić S** (2005) A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. **Integrative and Comparative Biology** 45: 734-740

**Kranner I, Minibayeva FV, Beckett RP, Seal CE** (2010) What is stress? Concepts, definition and applications in seed science. **New Phytologist** 188: 655-673

**Leprince O, Deltour R, Thorpe PC, Atherton NM, Hendry GAF** (1990) The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist** 116: 573-580

**Leprince O, Atherton NM, Deltour R, Hendry GAF** (1994) The involvement of respiration in free radical processes during loss of desiccation tolerance in germinating *Zea mays* L. **Plant Physiology** 104: 1333-1339

**Lin TP, Yen WL, Chien CT** (1998) Disappearance of desiccation tolerance of imbibed crop seeds is not associated with the decline of oligosaccharides. **Journal of Experimental Botany** 49: 1203-1212

**Lorenzi H, Souza HM, Torres MAV, Bacher, LB** (2003) **Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa. 608 p

**Mahmood T, Safdar W, Abbasi BH, Naqvi MS** (2010) An overview on the small heat shock proteins. **African Journal of Biotechnology** 9: 927-949

**Marcos-Filho J** (2005) **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Fealq, Piracicaba. 495 p

**Masetto TE** (2008) **Reestabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Sesbania virginata* e *Cedrela fissilis***. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 92 p

**Miazek A, Bogdan J, Zagdanska B** (2001) Effects of water during germination of wheat seeds. **Biologia Plantarum** 44: 397-403

**Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science** 7: 405-409

**Mundree SG, Baker B, Mowla S, Peters S, Marais S, Willigen AV, Govender K, Marenda A, Muyanga S, Farrant JM, Thomson JA** (2002) Physiological and molecular insights into drought tolerance. **African Journal of Biotechnology** 1: 28-38

**Nakano Y, Asada K** (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology** 22: 867-880

**Nedeva D, Nikolova** (1997) A Desiccation tolerance in developing seeds. **Bulgarian Journal of Plant Physiology** 23: 100-113

**Ntuli TM, Finch-Savage WE, Berjak P, Pammenter NW** (2011) Increased drying rate lowers the critical water content for survival in embryonic axes of english oak (*Quercus robur* L.) seeds. **Journal of Integrative Biology** 53: 270-280

**Olajide OA, Echianu CA, Adedapo AA, Makinde AM** (2004) Anti-inflammatory studies on *Adenanthera pavonina* seed extract. **Inflammopharmacology** 2: 197-202

**Oliveira JMD** (2009) **Perda da tolerância à dessecação em sementes de *Leucaena leucocephala* durante a germinação**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 71 p

**Osborne DJ, Boubriak II** (1994) DNA and desiccation tolerance. **Seed Science and Research** 4:175-185

**Osborne DJ, Boubriak I, Leprince O** (2002) Rehydration of dried systems: membranes and the nuclear genome *In* Black M, Pritchard HM (eds) **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford, Oxon, UK: CABI Publishing, pp 343-364

**Pammenter NW, Berjak P** (1999) A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation tolerance mechanisms. **Seed Science Research** 9: 13-37.

**Peixoto PHP, Cambraia J, Sant'ana R, Mosquim PR, Moreira MA** (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 11: 137-143

**Pereira, WVS** (2011) **Tolerância à dessecação em sementes de *Copaifera langsdorffii* e *Tapirira obtusa*** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 82 p

**Pritchard HW, Daws MI, Fletcher BJ, Gaméné CS, Msanga HP, Omondi W** (2004) Ecological correlates of seed desiccation tolerance in tropical african dryland trees. **American Journal of Botany** 91: 863–870

**Pukacka S, Ratajczak E** (2010) Ascorbate and glutathione metabolism during development and desiccation of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. **Plant Growth Regulation** 61: 77-83

**Reisdorph NA, Koster K** (1999) Progressive loss of desiccation tolerance in germinating pea (*Pisum sativum*) seeds. **Physiologia Plantarum** 105: 266-271

**Ribeiro VV, Braz MSS, Brito NM** (2009) Tratamentos para superação de dormência de sementes de terno. **Biotemas** 22: 25-32

**Roberts EH** (1973) Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology** 1: 499-514

**Rocas NA** (2002) *Adenanthera pavonina* L. In **Vozzo JA Tropical tree seed manual - Part II, Species descriptions (A to C)**. Agriculture Handbook 721, U.S. Dept. of Agriculture/Forest Service. Disponível em: <http://www.rngr.net/publications>

**Rodrigues APAC, Oliveira AKM, Laura VA, Yamamoto CR, Chermouth KS, Freitas MH** (2009) Tratamentos para superação da dormência de sementes de *Adenanthera pavonina* L. **Revista Árvore** 33: 617-623

**Scandalios JG** (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology** 103: 7-12

**Siegel BZ** (1993) Plant peroxidases – an organismic perspective. **Plant Growth Regulation** 12: 303-312

**Silva EA, Toorop PE, Lammeren, AAM van, Hilhorst HWM** (2008) ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* ‘Rubi’) seed germination. **Annals of Botany** 102: 1-9

**Silva AIS, Corte VB, Pereira MD, Cuzzuol GRF, Leite ITA** (2009) Efeito da temperatura e de tratamentos pré-germinativos na germinação de sementes de *Adenanthera pavonina* L. **Semina: Ciências Agrárias** 30: 815-824

**Śliwińska E** (2003) Cell cycle and germination of fresh, dried and deteriorated sugarbeet seeds as indicators of optimal harvest time. **Seed Science and Research** 13: 131-138

**Śliwińska E** (2009) Nuclear DNA replication and seed quality. **Seed Science and Research** 19: 15-25

**Souza FHD, Marcos-Filho J** (2001) The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. **Revista Brasileira de Botânica** 24: 365-375

**Spanò C, Bottega S, Grilli I, Lorenzi R** (2011) Responses to desiccation injury in developing wheat embryos from naturally and artificially dried grains. **Plant Physiology and Biochemistry** 49: 363-367

**Sun WQ** (1999) Desiccation sensitivity of recalcitrant seeds and germinated orthodox seeds: can germinated orthodox seeds serve as a model system for studies of recalcitrance? *In Proceedings of IUFRO Seed Symposium 1998: Recalcitrant Seeds*. Kuala Lumpur, Malaysia: FRIM, Malaysia, pp 29-42

**Tweddle JC, Dickie JB, Baskin CC, Baskin JM** (2003) Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. **Journal of Ecology** 91: 294-304

**Varghese B, Naithani SC** (2002) Desiccation-induced changes in lipid peroxidation, superoxide level and antioxidant enzymes activity in neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds. **Acta Physiologiae** 24: 79-87

**Vázquez-Ramos JM, Sánchez MP** (2003) The cell cycle and seed germination. **Seed Science Research** 13:113-130

**Vicré M, Farrant JM, Driouich A** (2004) Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species. **Plant, Cell and Environment** 27 1329-1340

**Vieira CV, Silva EAA, Alvarenga AA, Castro AM, Toorop PE** (2010) Stress-associated factors increase after desiccation of germinated seeds of *Tabebuia impetiginosa* Mart. **Plant Growth Regulation** 62: 257-263

**Vierling E** (1997) The small heat shock proteins in plants are members of an ancient family of heat induced proteins. **Acta Physiologiae Plantarum** 19: 539-547

**Wehmeyer N, Hernandez LD, Finkelstein RR, Vierling E** (1996) Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. **Plant Physiology** 112: 747-757

**Wehmeyer N, Vierling E** (2000) The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. **Plant Physiology** 122: 1099-1108

**Walters C, Farrant JM, Pammenter NW, Berjak P** (2002) Desiccation stress and damage *In* Black M, Pritchard HM (eds) **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford, Oxon, UK: CABI Publishing, pp 263-291

**Wu JH, Wang WQ, Song SQ, Cheng HY** (2009) Reactive oxygen species scavenging enzymes and down-adjustment of metabolism level in mitochondria associated with desiccation-tolerance acquisition of maize embryo. **Journal of Integrative Biology** 51: 638-645