



LEANDRO VILELA REIS

**CARACTERIZAÇÃO DA PERDA E REINDUÇÃO DA
TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE
GIRASSOL**

**LAVRAS- MG
2018**

LEANDRO VILELA REIS

**CARACTERIZAÇÃO DA PERDA E REINDUÇÃO DA TOLERÂNCIA À
DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE GIRASSOL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães
Orientador

Profa. Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho
Co-orientadora

**LAVRAS- MG
2018**

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

Reis, Leandro Vilela.

Caracterização da perda e reindução da tolerância à dessecação
em sementes de girassol / Leandro Vilela Reis. - 2018.

61 p. : il.

Orientador(a): Renato Mendes Guimarães.

Coorientador(a): Maria Laene Moreira de Carvalho.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Sensibilidade à dessecação. 2. Proteínas resistentes ao calor.
3. Enzimas antioxidantes. I. Guimarães, Renato Mendes. II.
Carvalho, Maria Laene Moreira de. III. Título.

LEANDRO VILELA REIS

**CARACTERIZAÇÃO DA PERDA E REINDUÇÃO DA TOLERÂNCIA À
DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE GIRASSOL**

**CHARACTERIZATION OF LOSS AND REINDUCTION OF DESICCATION
TOLERANCE IN SUNFLOWER SEEDS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2018

Dr. André Delly Veiga
Dr. Everson Reis Carvalho

IF SUL DE MINAS
UFU

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães
Orientador

Profa. Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho
Co-orientadora

**LAVRAS- MG
2018**

Deus, minha fortaleza...

Aos meus pais Delany e Sonderson, minha namorada Camila, meu irmão Venicius, minha família, amigos, professores e colegas que me acompanharam em minha jornada de aprendizado

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças e nunca me deixar desistir, pelas graças recebidas e por permitir mais essa vitória.

Aos meus pais, Delany e Sonderson (Dinho) por serem exemplo e por todo trabalho que enfrentaram para essa conquista.

À minha namorada Camila por todo seu amor, companheirismo, apoio, incentivo, ajuda, carinho, compreensão e paciência ao longo dessa jornada e também a toda sua família, Leliane, Ana Flávia e Dona Iva, pelo apoio e incentivo.

Ao meu irmão Venicius pela presença, apoio, incentivo e companheirismo.

Aos meus Avós e toda família pelo apoio e confiança. Principalmente meu avô Wilton, que se aqui presente seria um sonho realizado.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) pelas oportunidades de aprendizado e ensinamentos dessa renomada instituição de ensino.

Ao meu orientador Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães, pelo exemplo, amizade, incentivo e disponibilidade sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. André Delly Veiga, professor do IF Sul de Minas - Campus Machado, meu primeiro orientador dos tempos de escola agrícola, pelo incentivo, amizade e sobretudo confiança. Em seu nome agradeço à todos os professores que contribuíram para minha formação.

Ao professor Dr. João Almir Oliveira e a pesquisadora da Embrapa Dr^a. Sttela pela oportunidade de trabalho em suas equipes durante minha formação. Agradeço aos demais professores, pesquisadores e funcionários do Laboratório de Análise de Sementes da UFLA (LAS), pelos ensinamentos, amizade, e oportunidade de trabalhar com uma equipe tão renomada.

Ao programa de pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia, principalmente à Marli por estar sempre disposta a me ajudar.

Aos amigos e companheiros de trabalho do LAS, principalmente ao Diego, Cris, Madeleine, Denilson, Richard, Heloisa, Joana, Xaveco, Girafão, Rafael, Thiago, Rodado, Pordo, Jessica e outros pelo apoio, ajuda nos experimentos e amizade em todos esses anos.

Ao professor Allan Bruce Downie Ph.D. e sua esposa Lynette Dirk Ph.D. pela oportunidade de estagiar em seu laboratório na Universidade do Kentucky- E.U.A., onde tive a grande oportunidade de apreender com o Seed Biology Group, um dos maiores grupos de pesquisa em sementes do mundo.

Ao Núcleo de Estudos em Sementes – NESem, por todos os ensinamentos adquiridos, por todas as oportunidades de crescimento pessoal e profissional.

Aos companheiros da Republica Pé-de-Cana pela amizade verdadeira, apoio e por tantos momentos divertidos que passamos juntos nesses anos de vida universitária.

À todos meus amigos, presentes ou distantes, pela amizade, confiança e torcida.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições para este trabalho.

Aos órgãos de apoio a pesquisa CAPES, CNPq e FAPEMIG pelas oportunidades de todos esses anos como bolsista, e principalmente CNPq que foi o órgão de fomento de minha bolsa ao longo do mestrado.

À todos aqueles que contribuíram de alguma forma, para a minha formação e essa conquista.

OBRIGADO A TODOS!!!

RESUMO

Um obstáculo enfrentado no estudo da recalcitrância é o fato das sementes incluídas neste grupo perderem a viabilidade em curto período. No entanto, ao longo da germinação, sementes ortodoxas tornam-se intolerantes a dessecação e, por isso, têm sido utilizadas como modelo em estudos que tentam elucidar as alterações associadas com a sensibilidade à dessecação. Assim, objetivou-se neste trabalho caracterizar por meio de avaliações fisiológicas e bioquímicas o comportamento de sementes de girassol quanto a perda da tolerância à dessecação durante o processo germinativo, além da reindução da tolerância à dessecação, para maior entendimento da sensibilidade à dessecação. Foram selecionados diferentes tempos de embebição para avaliação da perda da tolerância à dessecação durante o processo germinativo de acordo com a curva de embebição de sementes do híbrido de girassol Hélio 251, sendo eles: testemunha, 0, 6, 12 e 20 horas de embebição, 1 mm e 3 mm de protrusão radicular. Após embebição as sementes foram submetidas a secagem em sílica gel, com exceção do tratamento testemunha que não foi submetido a embebição e secagem. Para tentativa de reindução da tolerância à dessecação, sementes com 1 e 3 mm de radícula foram submetidas a tratamento osmótico com polietilenoglicol (PEG), nas seguintes concentrações: PEG -1,4MPa, PEG -1,8MPa e PEG -2,2MPa. Foi realizado um tratamento apenas secado na sílica gel, tomado como controle da reindução da tolerância à dessecação. As sementes dos referidos tratamentos foram submetidas as avaliações fisiológicas pelos testes de germinação, primeira contagem de germinação, teste de emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência e teste de condutividade elétrica. Foram avaliados também a abundância de proteínas resistentes ao calor (PRCs) e a expressão das isoenzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), esterase (EST), isocitrato liase (ICL) e glutamato desidrogenase (GTDH) por meio de eletroforese. Em sementes de girassol a tolerância à dessecação é perdida após 1 mm de protrusão radicular. Os tratamentos de reindução da tolerância à dessecação com PEG aplicados às sementes de girassol com 1 mm de radícula foram capazes de reestabelecer a sobrevivência em baixas porcentagens, com destaque para o tratamento com PEG -1,8 MPa. Já para sementes com 3 mm de radícula, os tratamentos de reindução da tolerância à dessecação não foram eficientes para restabelecimento da germinação. Ocorre redução na abundância de proteínas resistentes ao calor e na expressão das isoenzimas CAT e POX com a perda da tolerância à dessecação em sementes de girassol. Também houve redução na expressão da isoenzima EST, relacionando-se à baixa qualidade fisiológica das sementes com a perda da tolerância à dessecação. As expressões das isoenzimas de mobilização de reservas, ICL e GTDH, não foram afetadas com a perda da tolerância à dessecação. Os tratamentos de reindução da tolerância à dessecação não alteraram a expressão das isoenzimas estudadas (SOD, CAT, POX, EST, ICL e GTDH).

Palavras-chave: *Helianthus annuus* L. Germinação. Proteínas resistentes ao calor. Enzimas antioxidantes. Sensibilidade à dessecação.

ABSTRACT

An obstacle faced in the study of recalcitrance is the fact that the seeds included in this group lose viability within a short period. However, during germination, orthodox seeds become desiccation intolerant. Although, they have been used as a model in studies that try to elucidate the alterations associated with desiccation sensitivity. Thus, this research aimed to characterize, through physiological and biochemical evaluations, the sunflower seeds behavior related to the loss of desiccation tolerance during the germination process and the reinduction of desiccation tolerance, for a better understanding of the desiccation sensitivity. Different imbibition times were chosen to evaluate the desiccation tolerance loss during the germination process, based on the seeds imbibition curve of the Hélio 251 sunflower hybrid, being: control, 0, 6, 12 and 20 hours of imbibition, 1 mm and 3 mm of radicle protrusion. After imbibition, the seeds were submitted to dehydration in silica gel, except the control treatment that was not submitted to imbibition and dehydration. In order to try to reinduce the desiccation tolerance, seeds with 1 and 3 mm of radicle were submitted to osmotic treatment with polyethylene glycol (PEG) in the following concentrations: PEG -1,4 MPa, PEG -1,8 MPa, and PEG -2,2 MPa. A treatment was only submitted to dehydration in silica gel, taken as a control of the desiccation tolerance reinduction. Seeds of these treatments were submitted to physiological evaluations by germination tests, first germination count, seedling emergence test, emergence speed index, and electrical conductivity test. It was also evaluated the abundance of heat-stable proteins and the expression of isoenzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), esterase (EST), isocitrate lyase (ICL), and glutamate dehydrogenase (GDH), through electrophoresis. Sunflower seeds lost the desiccation tolerance after 1 mm of radicle protrusion. The treatments of desiccation tolerance reinduction, with PEG applied to the sunflower seeds with 1 mm radicle, were able to re-establish germination in low percentages, especially for the treatment with PEG -1.8 MPa. For the seeds with 3 mm radicle protrusion, the treatments of desiccation tolerance reinduction were not efficient for germination re-establishment. There is reduction in the abundance of heat-stable proteins and in the expression of the CAT and POX isoenzymes with the loss of desiccation tolerance in sunflower seeds. In addition, there was a reduction in the esterase isoenzyme expression, related to the low physiological quality of seeds with the loss of desiccation tolerance. The expressions of the reserves mobilization isoenzymes, ICL and GDH were not affected by the loss of desiccation tolerance. The treatments of desiccation tolerance reinduction did not change the expression of the evaluated isoenzymes (SOD, CAT, POX, EST, ICL, and GDH).

Keywords: *Helianthus annuus* L. Germination. Heat-stable proteins. Antioxidant enzymes. Desiccation sensitivity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	Tolerância à dessecação em sementes.....	11
2.2	Mecanismos que conferem a tolerância à dessecação em sementes.....	13
2.2.1	Proteínas resistentes ao calor	13
2.2.2	Sistemas antioxidantes	15
2.2.3	Integridade das membranas celulares.....	16
2.3	Sementes ortodoxas como modelo para o estudo da recalcitrância.....	17
2.4	Reindução da Tolerância à Dessecação	18
2.5	Caracterização da espécie.....	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Local	20
3.2	Material vegetal	21
3.3	Curva de embebição das sementes.....	21
3.4	Caracterização da perda da tolerância à dessecação	21
3.5	Reindução da tolerância à dessecação	22
3.6	Avaliações Fisiológicas	23
3.6.1	Teste de germinação	23
3.6.2	Primeira contagem de germinação (PC)	24
3.6.3	Teste de Emergência de plântulas.....	24
3.6.4	Índice de Velocidade de Emergência (IVE)	24
3.6.5	Condutividade elétrica	24
3.7	Proteínas resistentes ao calor	25
3.8	Atividade de isoenzimas	26
3.9	Análise estatística	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	Curva de embebição	28
4.2	Avaliações fisiológicas	29
4.3	Avaliação de proteínas resistentes ao calor.....	38
4.4	Avaliação das expressões isoenzimáticas.....	40
5	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Em sementes a tolerância à dessecação pode ser definida como, a habilidade de tolerar a secagem, sendo capaz de germinar e produzir plântulas normais após a reidratação, sem que ocorra danos irreversíveis as células e seu metabolismo. A tolerância à dessecação é uma característica desejável para armazenamento *ex situ* das espécies vegetais em bancos de germoplasma, armazenamento de subsistência e para fins comerciais, sendo necessário que as sementes sejam desidratadas a baixos teores de água e submetidas a baixas temperaturas e umidade do ar durante o armazenamento para manutenção de sua qualidade.

Muitas espécies vegetais de interesse produzem sementes recalcitrantes, que não suportam secagem, armazenamento à baixas temperaturas e tem viabilidade e disponibilidade curta ao longo do ano, o que tem sido um grande desafio na tecnologia de sementes para conservação e execução de pesquisas a longo prazo. Por outro lado, as sementes ortodoxas toleram a secagem e o armazenamento, apresentando maior facilidade de manipulação para estudos relacionados tolerância à dessecação.

A capacidade de sobreviver à desidratação das sementes ortodoxas está relacionada a diversos mecanismos de adaptação que evitam danos celulares durante a perda de água ou que os reparem durante a reidratação. Tais mecanismos incluem manutenção da integridade das membranas celulares, sistemas antioxidantes eficientes para eliminação de radicais livres, acúmulo de moléculas protetoras, tais como proteínas resistentes ao calor e açúcares não redutores (DEKKERS et al., 2015)

Pesquisas tentando 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 que produzem sementes recalcitrantes. Sementes ortodoxas germinadas ou em processo germinativo constituem uma importante ferramenta no estudo da sensibilidade à dessecação, pois com o decorrer da germinação, essas sementes perdem progressivamente a tolerância à dessecação, passando a se comportar como as recalcitrantes, podendo ser utilizadas como modelo para estudos da sensibilidade à dessecação (SUN, 1999). Uma grande vantagem do uso de sementes ortodoxas como modelo de estudo da recalcitrância é o contínuo suprimento de material experimental, além da possibilidade de reindução da tolerância à dessecação depois de perda, por meio de aplicação de efeitos de estresse osmótico (BRUGGINK; VAN DER TOORN, 1995).

A identificação das alterações fisiológicas e bioquímicas dos mecanismos reguladores da tolerância à dessecação, podem ser empregadas em programas de melhoramento genético para auxiliar no desenvolvimento de cultivares mais adaptadas à estresses abióticos (SHANKER et al., 2014). Estudos com diferentes espécies agronômicas vêm sendo realizados buscando maior entendimento das mudanças que ocorrem nas sementes à medida que estas perdem água, seja durante processo de desenvolvimento ou testando metodologias de secagem (ROSA, et al., 2005; VEIGA et al., 2007). Porém, são poucos os estudos sobre as mudanças que ocorrem com a perda da tolerância à dessecação em sementes de espécies agronômicas.

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma espécie agronômica que possui sementes classificadas com ortodoxas quanto a tolerância à dessecação, presume-se que a perda de seus mecanismos de tolerância à dessecação durante o processo germinativo possa ser correlacionada a espécies recalcitrantes e possivelmente ser utilizada como espécie modelo de estudo da sensibilidade à dessecação.

Portanto, objetivou-se caracterizar, por meio de avaliações fisiológicas e bioquímicas, o comportamento de sementes de girassol quanto a perda da tolerância à dessecação durante o processo germinativo e da reindução da tolerância à dessecação, gerando informações sobre esses eventos para o aprimoramento dos conhecimentos na área de produção e tecnologia de sementes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Tolerância à dessecação em sementes

Tolerância à dessecação é definida como a habilidade de um organismo sobreviver à níveis críticos de desidratação, sendo capaz de recuperar seu metabolismo normal após a reidratação, sem que ocorra perdas significativas de suas funções e sem causar danos irreversíveis às células (OLIVER; TUBA; MISHLER, 2000). Já Alpert (2005) define o termo como a capacidade de um organismo equilibrar o seu conteúdo interno de água com o ar moderadamente seco e restaurar o seu funcionamento normal após a reidratação.

Esta habilidade de tolerar a secagem está presente em diversos grupos de organismos, sendo comum em espécies de líquens, briófitas, pteridófitas, musgos e algas e rara em outros grupos vegetais (ALPERT, 2000). Em gimnospermas e angiospermas, a tolerância à dessecação ocorre mais em sementes, pólen e esporos. Essas estruturas têm em comum o fato

de que são dispersas para longe da planta-mãe, necessitando assim de suportar períodos de secagem (HOEKSTRA, 2005).

Ainda não se sabe ao certo como algumas espécies vegetais e/ou suas sementes, tornaram-se tolerantes à dessecação, entretanto a hipótese mais aceita é que a tolerância à dessecação em sementes é considerada uma evolução da sensibilidade (PAMMENTER; BERJAK, 2000). Isto porque o ambiente no qual se encontravam os vegetais primitivos era úmido e, durante a evolução, as espécies conquistaram ambientes mais secos. Assim, sementes sensíveis à dessecação são, geralmente, produzidas por espécies típicas de ambientes úmidos (TWEDDLE et al., 2003), visto que as condições ambientais não exerceram nenhuma pressão sobre essas espécies, para que elas evoluíssem para produção de sementes tolerantes à dessecação (PAMMENTER; BERJAK, 2000).

A tolerância à dessecação em sementes é uma característica desejável para conservação *ex situ* das espécies vegetais, uma vez que para a realização do armazenamento é necessário que estas sejam desidratadas (JOSÉ; SILVA; DAVIDE, 2007). Além da redução do teor de água, a manutenção da qualidade fisiológica das sementes armazenadas depende também da temperatura e umidade do ambiente de armazenamento (HARRINGTON, 1972).

Golovina, Hoekstra e Van Aelst (2001) descreveram que em sementes, a tolerância à dessecação pode ser definida como a capacidade de germinar após a secagem. As sementes foram classificadas de acordo com sua capacidade de sobreviver a diferentes teores de água e temperaturas de armazenamento, sendo categorizadas em ortodoxas, recalcitrantes (ROBERTS, 1973) e intermediárias (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990).

A grande maioria das espécies de angiospermas produzem sementes que toleram dessecação e armazenagem a baixas temperaturas por longo período e são denominadas sementes ortodoxas (ROBERTS, 1973). As culturas mais cultivadas mundialmente, tais como arroz, trigo, milho, soja, feijão e girassol produzem sementes tolerantes à dessecação. No entanto, um número significativo de espécies selvagens e agrícolas, principalmente de zonas climáticas úmidas, produzem sementes sensíveis à dessecação. As sementes sensíveis à dessecação ou recalcitrantes não toleram a secagem, armazenamento a baixas temperaturas e tampouco se mantêm viáveis por longos períodos (ROBERTS, 1973). Consequentemente, o uso e a conservação das sementes de espécies recalcitrantes que incluem algumas culturas economicamente importantes, por exemplo, cacau, café canéfora e seringueira, constituem um desafio (BERJAK; PAMMENTER, 2013).

De acordo com Ellis, Hong e Roberts (1990) as sementes classificadas como intermediárias seriam aquelas que suportam a secagem moderada e permanecem viáveis por

períodos de armazenamento superiores ao das recalcitrantes, contudo menor que aqueles apresentados pelas ortodoxas. Atualmente acredita-se que as sementes não se limitam a categorias distintas, mas sim que estejam inseridas em um contínuo de tolerância, onde em um extremo teríamos as sementes extremamente tolerantes, ou ortodoxas, enquanto em outro, as extremamente sensíveis, ou recalcitrantes (PAMMENTER; BERJAK, 1999).

A capacidade de tolerar à dessecação é distinta nas diferentes partes da semente, sendo observada maior sensibilidade à dessecação na região da raiz primária (BUITINK et al., 2003; FARIA et al., 2005). Portanto, eixos embrionários são seguramente utilizados como modelo experimental, para avaliação de alterações ocorridas durante a perda e reindução da tolerância à dessecação (DELTOUR, 1985; FARIA et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2011).

2.2 Mecanismos que conferem a tolerância à dessecação em sementes

A capacidade de sobreviver à desidratação depende de diversos mecanismos de adaptação que evitam danos celulares durante a perda de água ou que os reparem durante a reidratação. Tais mecanismos incluem a manutenção da integridade das membranas celulares, sistemas antioxidantes eficientes para eliminação de radicais livres, acúmulo de moléculas protetoras, tais como proteínas resistentes ao calor, açúcares não redutores e expressão de genes reguladores da dessecação e/ou ácido abscísico (ABA) (ANGELOVICI et al., 2010; DEKKERS et al., 2015; LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993).

A tolerância à dessecação de sementes ortodoxas está fortemente relacionada com as interações desses mecanismos, que são capazes de proteger as células contra as consequências da perda de água a diferentes níveis de hidratação. A seguir, serão detalhados alguns destes mecanismos.

2.2.1 Proteínas resistentes ao calor

Um dos mecanismos associados à tolerância à dessecação, durante o desenvolvimento de sementes, é a abundância de proteínas resistentes ao calor (Heat-Stable Proteins) que têm sido correlacionadas com a transição da intolerância para tolerância à dessecação. A estabilidade, propriedades físicas e abundância destas proteínas em organismos que toleram a desidratação sugerem um importante papel nesse processo (BLACKMAN et al., 1991; BOSWELL; MOORE; HAND, 2014).

Dentre as proteínas resistentes ao calor (PRCs), destaca-se a síntese de determinadas proteínas na fase final de maturação, conhecidas como LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteínas (DELAHAIE et al., 2013), cuja a presença e acúmulo nas fases finais do desenvolvimento de sementes têm sido relacionados com aquisição de tolerância à dessecação em diferentes espécies. O padrão de acúmulo, a ocorrência abundante e as características físicas de resistência à desnaturação das proteínas LEA indicam seu importante papel na tolerância à dessecação, protegendo os componentes celulares da falta de água, promovendo ajustes osmóticos ou substituindo a água perdida pela dessecação (HAND et al., 2011).

Proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins) são outro grupo de proteínas usualmente encontrados em plantas submetidas ao déficit hídrico (WEHMEYER; VIERLING, 2000). Algumas famílias funcionam ligando-se às regiões não dobradas das cadeias peptídicas, sugerindo que sua função possa estar relacionada com a manutenção correta da estrutura terciária de certas proteínas (EFEOĞLU, 2009). Assim, como o estresse promove a desnaturação e a agregação de proteínas, uma maior síntese de proteínas de choque térmico ajudaria a proteger outras proteínas durante o estresse osmótico que ocorre após a desidratação da célula (SU; LI, 2008).

Acredita-se que a importância das PRCs na tolerância à dessecação de sementes deve-se ao fato dessas proteínas atuarem como chaperonas, impedindo a desestruturação proteica (FEDER; HOFMANN, 1999). O termo chaperona é utilizado para designar moléculas que atuam na montagem ou manutenção de estruturas moleculares, impedindo que haja interações errôneas, participam da estabilização de proteínas e das membranas em condições de estresse (HAND et al., 2011).

Avaliando a tolerância à dessecação de sementes de soja colhidas em estádios próximos da maturação fisiológica, Veiga et al. (2007) verificaram que o ganho da tolerância à dessecação foi acompanhado do aumento do conteúdo de LEA proteínas. Em embriões de *Arabidopsis thaliana*, também foi observado que as PRCs começam a acumular-se durante a maturação e são abundantes após aquisição da tolerância à dessecação (WEHMEYER; VIERLING, 2000). Em trabalhos com sementes recalcitrantes de *Castanospermum australe*, foi observado que a ausência de LEA proteínas está relacionada a sensibilidade à dessecação dessa espécie (DELAHAIE et al., 2013).

Em estudos com *Medicago truncatula*, Boudet et al. (2006) verificaram que a perda da tolerância à dessecação durante a germinação foi acompanhada da redução do conteúdo de proteínas resistentes ao calor e conseguiram identificar alguns grupos dessas proteínas. Também em estudos com sementes de *Sesbania virgata* (COSTA, 2011) e *Anadenanthera*

pavonina (SOARES et al., 2015), o decréscimo da abundância de proteínas resistentes ao calor, coincidiu com a redução na capacidade das sementes de tolerar a dessecação.

2.2.2 Sistemas antioxidantes

A dessecação das sementes induz o acúmulo de radicais livres nas células, devido a danos na cadeia de transporte de elétrons em mitocôndrias e ruptura de plastídios (LEPRINCE et al., 1994; NTULI et al., 2011). Estas moléculas são prejudiciais 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 (KRANNER; BIRTIC, 2005; KRANNER et al., 2010). A tolerância à dessecação pode ser relacionada, ao menos em parte, à capacidade de as sementes eliminarem o excesso de espécies reativas de oxigênio (EROS) (CONTRERAS-PORCIA et al., 2011).

A incapacidade das sementes sensíveis à dessecação de efetuarem a adequada proteção contra eventos oxidativos, consequentes da desorganização do metabolismo durante a desidratação e o armazenamento, pode ser considerada como uma das principais causas da sensibilidade à dessecação e da reduzida longevidade dessas sementes (PULIDO; CAZALIS; CEJUDO, 2009).

Durante o processo de secagem, a estrutura celular da semente está bastante vulnerável à ação de agentes oxidantes (PAMMENTER; BERJAK, 1999). O controle dos radicais livres é de grande importância para a sobrevivência da semente, visto que eles são altamente destrutivos. Durante a dessecação, pode haver a perda do controle dos mecanismos de manutenção de radicais livres, gerando reações destrutivas na célula e sua consequente morte (KRANNER; BIRTIC, 2005).

Sistemas enzimáticos removedores de radicais livres atuam como agentes antioxidantes na proteção contra EROS. A enzima superóxido dismutase (SOD) considerada a primeira no processo de defesa antioxidante, atua anulando a ação dos superóxidos (O_2^-), catalisando sua conversão a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é um composto menos reativo. Já a catalase e a peroxidase são também enzimas antioxidantes que catalisam a conversão de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O). São consideradas enzimas indispensáveis para a eliminação de EROS, principalmente em condições de estresse severo, pois suas atividades são efetivas principalmente quando há altos níveis de H_2O_2 (GILL; TUTEJA, 2010).

Em estudos sobre tolerância à dessecação de sementes de *Telfairia occidentalis*, espécie sensível à dessecação, Nkang, Omokaro e Egde (2000), concluíram que um aumento no nível de EROS pode estar associado ao declínio da viabilidade das sementes e que a peroxidação pode ocorrer com a desidratação das sementes, sendo afetada pela temperatura de secagem e taxa de dessecação. Em sementes recalcitrantes de *Camellia sinensis* submetidas à dessecação, a produção de EROS foi aumentada, seguida de um aumento de expressão de enzimas antioxidantes, mostrando o efeito negativo de altas concentrações de EROS para germinação de sementes (CHEN et al., 2011).

O acúmulo de radicais livres, a intensificação da peroxidação de lipídios e deesterificação de fosfolipídios, bem como decréscimo da atividade enzimática de superóxido dismutase e peroxidase, foram associadas à perda de tolerância à dessecação em sementes de milho (LEPRINCE et al., 1990). Em sementes de *Sesbania virgata* foi observado decréscimo da atividade da enzima catalase com o aumento da sensibilidade à dessecação (COSTA, 2011).

2.2.3 Integridade das membranas celulares

A integridade das membranas celulares é essencial para manutenção da viabilidade das sementes. As membranas mantêm a integridade celular e delimita a fronteira entre os meios intracelular e extracelular, constituindo uma barreira seletiva, por meio da qual se processam trocas de substâncias e energia entre a célula e o meio exterior. A membrana celular funciona também como um sensor, permitindo à célula modificar-se em resposta a diversos estímulos ambientais (BEWLEY; BLACK, 1994; CORRÊA; AFONSO JÚNIOR, 1999).

Com a secagem, as membranas celulares sofrem um processo de desorganização estrutural, sendo maior a desorganização quanto menor for o grau de umidade das sementes. A permeabilidade seletiva das membranas, que permite a retenção de solutos no interior da célula, perde sua eficiência durante a secagem, assim, a intensidade de liberação de exsudados depende diretamente do estado de organização do sistema de membranas celulares (ALPERT; OLIVER, 2002).

As membranas celulares são compostas principalmente por proteínas e fosfolipídios dispostos em uma camada fluida, cuja organização molecular é estabilizada pela relação entre os componentes da membrana e a água (MARCOS FILHO, 2015). Sendo o processo de peroxidação de lipídeos um evento deteriorativo, associado a danos de membranas das sementes ocorrido devido a estresses, como o da desidratação (BASAVARAJAPPA;

SHETTY; PRAKASH, 1991). Como uma ferramenta de estudos de mudanças bioquímicas, a enzima esterase (EST) pode ser utilizada como marcador molecular para avaliar a integridade do sistema de membranas, sendo sua atuação associada com as reações de hidrólise de ésteres de membranas e o metabolismo de lipídios (SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2004).

As membranas celulares são particularmente vulneráveis a danos durante a perda da tolerância à dessecação ao longo da germinação. 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; FINCH-SAVAGE, 2002). Em sementes de ervilha, milho e soja (KOSTER; LEOPOLD, 1988), a perda da tolerância à dessecação durante a germinação coincidiu com o aumento da permeabilidade das membranas.

O teste de condutividade elétrica é utilizado para analisar indiretamente a integridade de membranas celulares em sementes. O método consiste na quantificação dos eletrólitos em consequência do estado organizacional das membranas. A perda do potencial fisiológico das sementes está diretamente ligada as maiores quantidades de solutos lixiviados, resultado da perda da integridade da membrana (VIEIRA et al., 2002).

2.3 Sementes ortodoxas como modelo para o estudo da recalcitrância

Um grande obstáculo enfrentado no estudo da recalcitrância é justamente o fato destas sementes perderem a viabilidade em curto período de armazenamento, dificultando sua manipulação. Após a dispersão, as sementes recalcitrantes permanecem viáveis por períodos relativamente curtos, dificultando o trabalho com esse tipo de semente (PAMMENTER et al., 1994). Ao contrário, sementes ortodoxas adquirem tolerância à dessecação ao final do desenvolvimento, sendo dispersas com baixos teores de água, e em estado quiescente, sendo mais fácil o trabalho com esse tipo de semente que tolera armazenamento (LEPRINCE; BUITINK, 2010).

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 que produzem sementes recalcitrantes (LEPRINCE; BUITINK, 2010). Durante o processo germinativo sementes ortodoxas perdem progressivamente a tolerância à dessecação, tornando-se comparáveis às recalcitrantes, e por isso têm sido utilizadas para estudo da recalcitrância. Sun (1999) sugeriu o uso desse grupo de sementes como sistema modelo para estudo da recalcitrância. As

evidências são de que muito dos processos, tanto no âmbito fisiológico, como celular e molecular que ocorrem durante a perda da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas, durante o processo germinativo, são similares aqueles responsáveis pela sensibilidade à dessecação em sementes recalcitrantes.

Uma grande vantagem do uso de sementes ortodoxas como modelo de estudo da recalcitrância é o contínuo suprimento de material experimental, além da possibilidade de reindução da tolerância à dessecação depois de perda, por meio de aplicação de efeitos de estresse osmótico (BRUGGINK; VAN DER TOORN, 1995; BUITINK et al., 2003; FARIA et al., 2005).

A utilização de sementes ortodoxas em processo germinativo como modelo pode conferir maior flexibilidade na condução de experimentos que visam o entendimento da sensibilidade à dessecação, facilitando a realização de estudos comparativos.

2.4 Reindução da Tolerância à Dessecação

Durante o processo germinativo, a retomada dos processos metabólicos nas sementes, leva a protrusão radicular e a perda progressiva da tolerância à dessecação adquirida durante a maturação (BUITINK et al., 2003; MAIA et al., 2011). No entanto, após a protrusão radicular, há uma pequena janela de desenvolvimento durante a qual a tolerância à dessecação pode ser reestabelecida em algumas espécies, por meio do tratamento osmótico combinado ou não com aplicação exógena de ácido abscísico (ABA) (BUITINK et al., 2003; COSTA et al., 2015; MAIA et al., 2011).

Com o intuito da compreensão dos eventos relacionados com a tolerância à dessecação, estudos tem permitido o desenvolvimento de metodologias para reinduzir a tolerância à dessecação em sementes em estágios avançados de germinação. Uma das técnicas mais utilizadas para essa reindução em sementes germinadas é o tratamento em solução osmótica de polietilenoglicol (PEG), sob baixas temperaturas (BUITINK et al., 2003; VIEIRA et al., 2010).

A reindução da tolerância à dessecação ocorre devido uma série de mecanismos fisiológicos e estruturais regulados geneticamente (BOUDET et al., 2006; BUITINK et al., 2003). Durante a incubação em solução de polietilenoglicol, as raízes primárias são submetidas a um estresse hídrico moderado (ASHRAF; FOOLAD, 2005), o qual pode produzir uma memória mediada por proteínas, fatores de transcrição e alterações epigenéticas (BRUCE et al., 2007).

Muitos processos fisiológicos em nível celular e molecular, que ocorrem durante a perda da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas germinadas, podem ser similares àqueles responsáveis pela sensibilidade à dessecação evidenciada nas sementes recalcitrantes (SUN, 1999). No entanto, as pesquisas atuais têm buscado correlacionar os eventos metabólicos que ocorrem com o restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas com os eventos que ocorrem com as sementes recalcitrantes (FARIA et al., 2005).

Bruggink e Van der Toorn (1995) demonstraram ser possível restaurar a tolerância à dessecação em sementes ortodoxas germinadas de *Cucumis sativus* e *Impatiens walleriana* e sugeriram que esta abordagem poderia servir como um sistema modelo adequado e confiável em estudos desta natureza. A técnica foi aplicada, com sucesso, para outras espécies, como *Medicago truncatula* (BUITINK et al., 2003), *Tabebuia impetiginosa* (VIEIRA et al., 2010), *Arabidopsis thaliana* (MAIA et al., 2014), *Bauhinia forficata* (RODRIGUES et al., 2015) e *Sesbania virgata* (MASETTO; FARIA; FRAIZ, 2015) por meio de tratamento em solução osmótica de polietilenoglicol, combinados ou não com aplicação exógena de ácido abscísico.

No entanto, a aplicação da técnica de reindução da tolerância à dessecação requer o desenvolvimento de um protocolo adequado para as diferentes espécies. Entre os principais fatores que afetam a eficiência dessa técnica, destaca-se o potencial hídrico das soluções osmóticas de polietilenoglicol (BUITINK et al., 2003).

2.5 Caracterização da espécie

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma dicotiledônea anual pertencente à família Asteraceae, originário da América do Norte (Sudoeste dos Estados Unidos e Norte do México) e a sua utilização como oleaginosa destacou-se a partir da segunda guerra mundial, sendo antes utilizado principalmente como ornamental (CASTRO; SILVA JÚNIOR, 2013).

É uma espécie agronomicamente considerada de comportamento rústico, com ampla capacidade de adaptação às condições edafoclimáticas, por ser uma planta que possui características de resistência tanto ao frio quanto ao calor. Em função de suas características favoráveis e adaptáveis ao clima tropical do Brasil, a cultura do girassol tem se expandido para diversas regiões do país. Esta cultura possui maior tolerância à seca, quando comparada ao milho e a soja, além de contribuir com a rotação e sucessão às culturas subsequentes, principalmente na safrinha (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2018).

O aquênio, fruto do girassol, comumente considerado semente, é do tipo seco, indeiscente, constituído pelo pericarpo e pela semente propriamente dita. A semente não tem endosperma, sendo os cotilédones a única reserva nutritiva para o embrião (NEUMANN et al., 2009).

De acordo com O'Brien (2009), sementes de girassol são classificadas de acordo com sua composição química como oleaginosas, por apresentarem em média, 47,3% de lipídios, 24% de proteínas, 19,9 % de carboidratos e 4% de cinzas em seu conteúdo de matéria seca, com grau de umidade de 4,7%. Esses lipídios em abundância são considerados a base do material de reserva para o processo de germinação.

Em sementes oleaginosas a isocitrato liase (ICL) é uma enzima chave na regulação do ciclo do glioxilato e está diretamente envolvido no metabolismo dos lipídios armazenados como material de reserva (BEWLEY; BLACK, 1994). A abundância de proteínas contribui como material de reserva para as sementes de girassol, sendo a enzima glutamato desidrogenase (GTDH) atuante na oxidação de proteínas de armazenamento para fornecimento de energia para o ciclo de Krebs (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

O girassol produz sementes ortodoxas, em grande quantidade e de fácil manipulação, constituindo-se eficiente ferramenta para estudos de longa duração. Por isso, presume-se que a perda de seus mecanismos de tolerância à dessecação durante o processo germinativo possa ser correlacionada a espécies oleaginosas recalcitrantes e possivelmente ser utilizada como espécie modelo de estudo da sensibilidade à dessecação em trabalhos futuros.

Pouco se conhece a respeito da perda e da reindução da tolerância à dessecação de sementes de girassol. Dessa forma, no presente trabalho foram caracterizadas por meio de avaliação das alterações bioquímicas e fisiológicas, a perda da tolerância à dessecação durante o processo germinativo e a reindução da tolerância à dessecação das sementes de girassol.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O experimento foi conduzido no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil.

3.2 Material vegetal

Foram utilizadas sementes do híbrido simples de girassol Hélio 251, produzidas pela empresa Heliagro Agricultura e Pecuária LTDA na safra 2016/17. O híbrido Hélio 251 possui sementes oleaginosas com percentual de lipídios que varia de 40-44%. Até a realização dos experimentos, as sementes foram armazenadas em câmara fria à 10 °C e 50% UR, em embalagem de papel Kraft multifoliado.

O grau de umidade inicial foi determinado pelo método de estufa a 105 ± 3 °C, por 24 horas (BRASIL, 2009).

3.3 Curva de embebição das sementes

Para determinação do padrão de embebição de água pelas sementes, foi elaborada uma curva, utilizando-se 50 repetições com uma semente cada, sendo cada uma delas pesada individualmente para determinação da evolução da hidratação.

As sementes foram colocadas para embeber em rolos de papel tendo como substrato três folhas de papel germitest saturadas com água destilada e acondicionados em germinador a 25°C sob luz constante, sendo distribuídas 10 sementes por rolo.

As sementes foram pesadas em balança com precisão de 0,0001g de hora em hora durante as primeiras 12 horas, a cada 6 horas, até 24 horas de embebição, e a cada três horas após o início da fase III do processo germinativo. Foi anotado o momento da protrusão das radículas, momento esse em que observou-se a protrusão radicular de mais de 50% das sementes. Para a representação gráfica da curva foram selecionadas apenas as sementes germinadas, as quais totalizaram 49 sementes.

3.4 Caracterização da perda da tolerância à dessecação

Para caracterização da perda da tolerância à dessecação durante o processo germinativo, foram avaliados 4 pontos críticos até a protrusão radicular (0 horas, 6 horas, 12 horas, 20 horas de embebição) e dois pontos após a protrusão radicular (1 mm e 3 mm de protrusão radicular). Pontos estes fundamentados com base na curva de embebição, escolhidos para representar o início e meio de cada uma das fases de germinação das sementes de girassol.

A hidratação das sementes foi conduzida em rolo de papel, contendo três folhas de papel germitest saturadas com água destilada, acondicionados em germinador a 25 °C sob luz constante até serem atingidos os períodos de hidratação pré-estabelecidos.

A desidratação foi feita em caixas plásticas tipo gerbox vedadas com filme plástico, colocando-se as sementes sobre telado, com uma camada de 100 g de sílica gel ao fundo e acondicionadas em BOD a 20 °C. As sementes foram mantidas na referida condição, durante 72 horas, com o intuito de manter as sementes em situação prolongada de estresse.

Após a desidratação, as sementes foram pré-umedecidas em ar úmido em caixas plásticas tipo gerbox vedadas com filme plástico, colocando-se as sementes sobre o telado, com uma camada de 30 mL de água destilada ao fundo, e acondicionadas por 24 horas em BOD a 25 °C, para prevenir danos causados pela embebição (CROWE; CROWE; HOEKSTRA, 1989).

Foi realizado um tratamento com sementes de girassol que não foram submetidas a embebição e nem desidratadas em sílica gel, somente submetidas ao pré- umedecimento em ar úmido, considerado como testemunha.

O grau de umidade após cada procedimento foi determinado pelo método de estufa a 105 ± 3 °C, por 24 horas (BRASIL, 2009).

A análise de sobrevivência foi realizada considerando as sementes que retomaram o crescimento e que produziram plântulas normais, por meio das avaliações fisiológicas descritas no item 3.6.

3.5 Reindução da tolerância à dessecação

Na tentativa de reinduzir a tolerância à dessecação em sementes de girassol, estas foram colocadas para embeber em rolos de papel tendo como substrato três folhas de papel germitest saturadas com água destilada e acondicionados em germinador a 25 °C sob luz constante, e amostradas após 27 horas de embebição, momento em que é possível coletar sementes com radícula de 1 mm, e após 30 horas de embebição quando foram coletadas sementes com radículas de 3 mm. As radículas foram medidas com régua graduada em milímetros para maior precisão.

Foram testados protocolos para tratamentos de pré-secagem com diferentes concentrações de polietilenoglicol (PEG) 6000 nos seguintes potenciais: PEG - 1,4 MPa, PEG - 1,8 MPa e PEG - 2,2 MPa. As sementes foram expostas a esses tratamentos em placas de petri com uma folha de papel filtro ao fundo umedecida com solução de PEG, sendo que

nestas condições as sementes não ficaram completamente submersas, para evitar possíveis condições de hipóxia. As sementes selecionadas com 1 mm e 3 mm de radícula foram mantidas nos referidos tratamentos separadamente por 72 horas em BOD à 5 °C no escuro. Após os três dias, as sementes foram retiradas, lavadas em água corrente para a remoção dos resíduos de solução e secadas sobre papel toalha até que o excesso de água fosse eliminado.

Posteriormente, a secagem foi realizada em caixas plásticas tipo gerbox vedadas com filme plástico, colocando-se as sementes sobre o telado, com uma camada de 100 g de sílica gel ao fundo e acondicionadas em BOD a 20 °C. As sementes foram mantidas na referida condição durante 72 horas, com o intuito de manter as sementes em situação prolongada de estresse. Foi realizado um tratamento sem pré-secagem com PEG, apenas secado na sílica gel, tomado como controle.

Após as referidas combinações de tratamentos de pré-secagem e desidratação, as sementes foram pré-umedecidas em ar úmido em caixas plásticas tipo gerbox vedadas com filme plástico, colocando-se as sementes sobre o telado, com uma camada de 30 mL de água destilada ao fundo, e acondicionadas por 24 horas em BOD a 25 °C, para prevenir danos causados pela embebição (CROWE; CROWE; HOEKSTRA, 1989).

O grau de umidade após cada procedimento foi determinado pelo método de estufa a 105 ± 3 °C, por 24 horas (BRASIL, 2009).

As sementes foram submetidas a análise de sobrevivência, considerando as sementes que retomaram o crescimento e que produziram plântulas normais, por meio das avaliações fisiológicas descritas no item 3.6.

3.6 Avaliações Fisiológicas

3.6.1 Teste de germinação

No teste de germinação foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por tratamento. A semeadura foi realizada em substrato rolo de papel germitest, umedecido com 2,5 vezes o peso do papel em água destilada, e foram mantidos em germinador à 25 °C, por um período de 10 dias. As contagens foram realizadas aos quatro e 10 dias após semeadura e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

3.6.2 Primeira contagem de germinação (PC)

Foi conduzida juntamente ao teste de germinação, avaliando-se o número de plântulas normais aos quatro dias após a semeadura com os resultados expressos em porcentagem.

3.6.3 Teste de Emergência de plântulas

A emergência de plântulas foi realizada sob condições controladas em câmara de crescimento vegetal à 25 °C, utilizando-se quatro repetições de 50 sementes por tratamento, semeadas em bandejas com mistura de areia e terra na proporção de 2:1, umedecidas até 60% da capacidade de campo. A emergência das plântulas foi computada aos 14 dias após a semeadura, avaliando-se o número de plântulas emergidas, sendo os resultados expressos em porcentagem.

3.6.4 Índice de Velocidade de Emergência (IVE)

Concomitante ao teste de emergência foi realizado o índice de velocidade de emergência, computando-se diariamente o número de plântulas emergidas, calculado pela fórmula proposta por Maguire (1962).

3.6.5 Condutividade elétrica

Na avaliação da condutividade elétrica na solução de embebição das sementes, foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por tratamento. As sementes foram pesadas em balança com precisão de 0,001 g e colocadas para embeber em copo plástico descartável de 200 mL contendo 75 mL de água destilada e deionizada, durante um período de 24 horas, em BOD à temperatura de 25 °C, conforme Brandão Júnior et al. (1997). Após o período de condicionamento, as amostras foram agitadas levemente, procedendo-se então a leitura da condutividade elétrica por meio do condutivímetro MS TECNOPON[®], modelo mCA 150, sendo os resultados expressos em $\mu\text{S}^{-1}.\text{cm}^{-1}.\text{g}$ de sementes.

3.7 Proteínas resistentes ao calor

A determinação da abundância de proteínas resistentes ao calor foi realizada por meio da técnica de eletroforese utilizando-se 100 mg de eixo embrionário de sementes para cada uma das três repetições biológicas dos referidos tratamentos da etapa de perda da tolerância à dessecação: testemunha, 0 horas, 6 horas, 12 horas, 20 horas de embebição, 1 mm e 3 mm de protrusão radicular; e também para os tratamentos de reindução da tolerância à dessecação aplicados nas sementes de 1 mm e 3 mm: controle, PEG - 1,4 MPa, PEG - 1,8 MPa e PEG - 2,2 MPa. Nos tratamentos de reindução da tolerância à dessecação foram utilizadas duas repetições biológicas para cada tratamento.

Foram utilizados eixos embrionários para a avaliação da abundância de proteínas resistentes ao calor para que os cotilédones das sementes de girassol não tivessem grande influência nos resultados, devido seu maior volume e menor sensibilidade a dessecação.

Para esta análise os pericarpos das sementes foram removidos manualmente para facilitar a retirada dos eixos embrionários, que foram extraídos com auxílio de lâminas de aço. Os eixos embrionários foram macerados em cadinho na presença de nitrogênio líquido e polivinilpirrolidona (PVP) e armazenados a - 86 °C até a realização das análises.

Foram utilizados 100 mg de cada amostra macerada. Antes da extração, as amostras foram devidamente lavadas com éter, para retirada do óleo. Para cada 100 mg de amostra nos microtubos foi acrescido 300 µL de éter etílico e 300 µL de água, com homogeneização em agitador vórtex e repouso por uma hora em gelo, o material homogeneizado foi centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Depois foi adicionada uma solução tampão de extração (Tris HCl 50 mM pH 7,5; 0,5 M NaCl; 0,005 M MgCl₂; 0,001 M PMSF; e 0,1% βmercaptoetanol) na proporção 1:10 (peso da amostra: volume do tampão), as amostras foram homogeneizadas utilizando vórtex. Posteriormente foram centrifugadas a 14000 rpm por 30 minutos a 4 °C e após esse processo os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos, em seguida, incubados em banho-maria por 15 minutos a 85 °C.

As amostras foram centrifugadas, e pipetados 70 µL do extrato para novos microtubos, as quais foram adicionados 40 µL de tampão da amostra (2,5 mL glicerol; 0,46 g SDS; 20 mg azul de Bromofenol e Tris-HCL 50 mM pH 7,5 para completar um volume final de 20mL).

As amostras foram imersas em água fervente por cinco minutos e 50 µL de cada amostra foram aplicados em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). Foi realizada a corrida eletroforética, a 150 V por 6 h e a coloração do gel feita utilizando-se solução de 0,05% Coomassie Blue por 12 horas com solução de ácido

acético para descoloração, conforme metodologia descrita por Alfenas (2006). Os géis foram fotografados sobre transluminador. As expressões das proteínas resistentes ao calor foram determinadas por meio do software ImageJ® (2018), onde as fotografias dos géis obtidos em eletroforese foram avaliadas pela intensidade e mensuração das isoformas obtidas e os resultados foram expressos em mm^2 .

3.8 Atividade de isoenzimas

A atividade das isoenzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), esterase (EST), isocitrato liase (ICL) e glutamato desidrogenase (GTDH) foram verificadas através da técnica de eletroforese. Foram utilizados 100 mg de eixo embrionário de sementes para cada uma das três repetições biológicas dos referidos tratamentos da etapa de perda da tolerância a dessecação: testemunha, 0 horas, 6 horas, 12 horas, 20 horas de embebição, 1 mm e 3 mm de protrusão radicular; e também para os tratamentos de reindução da tolerância à dessecação aplicados nas sementes de 1 mm e 3 mm: controle, PEG - 1,4 MPa, PEG - 1,8 MPa e PEG -2,2 MPa. Nos tratamentos de reindução da tolerância à dessecação foram utilizadas duas repetições biológicas para cada tratamento.

Foram utilizados eixos embrionários para as avaliações das alterações isoenzimáticas para que os cotilédones das sementes de girassol não tivessem grande influência nos resultados, devido seu maior volume e menor sensibilidade a dessecação. E utilizadas sementes inteiras (somente com a remoção manual dos pericarpos) para a avaliação da isoenzima isocitrato liase, pois representaria melhor a ação dessa isoenzima que está relacionada com a metabolização de reservas lipídicas, sendo a concentração de lipídios em maior porcentagem nos cotilédones.

Para esta análise os pericarpos das sementes foram removidos manualmente para facilitar a retirada dos eixos embrionários, que foram removidos com auxílio de lâminas de aço. Os referidos eixos embrionários foram macerados em cadinho até a formação de um pó fino na presença de nitrogênio líquido e polivinilpirrolidona (PVP) e armazenados a $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização das análises. Para as análises de cada isoenzima foram pesadas, em microtubos, subamostras com 100 mg de material macerado. Antes da extração, as amostras foram devidamente lavadas com éter e água, para retirada do óleo. Para cada 100 mg de amostra nos microtubos foram acrescentados 300 μL de éter etílico e 300 μL de água, com homogeneização em agitador vórtex e repouso por uma hora em gelo, os materiais homogeneizados foram centrifugados a 14000 rpm por 30 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os sobrenadantes

das amostras foram descartados e logo adicionados 300 μL do tampão de extração, foi utilizado tampão fosfato (0,6g de fosfato de sódio bibásico a 0,034 M; 7,0g de sacarose 0,2 M; 2,56 g de PVP; 50 mg de DTT 0,003 M; 100 mg de ácido L ascórbico 0,0057 M; 50 mg de borato de sódio 0,0025 M; 1 g de PEG 6000; completar o volume final para 100 mL; 0,2% de β -mercaptoetanol; sem a necessidade de ajuste de pH) para a extração da peroxidase. Foi utilizado tampão Tris HCl (0,2 mol L^{-1} pH 8,0) + 0,1% de β -mercaptoetanol + 0,1% de Fenilhidrazina para a extração da isocitrato liase, e para as demais enzimas, foi utilizado tampão Tris HCl (0,2 mol L^{-1} pH 8,0), e 0,1% de β -mercaptoetanol. Os materiais foram homogeneizados em agitador vórtex e mantidos por 12 horas a 4 °C, seguido de centrifugação a 14000 rpm por 30 minutos, a 4 °C (ALFENAS, 2006).

As corridas eletroforéticas foram realizadas em sistemas de géis de poliacrilamida, NATIVA-PAGE, em sistema descontínuo (4,5% gel concentrador e 7,5% gel separador). O sistema gel/eletrodo utilizado foi Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 50 μL do sobrenadante das amostras dos tratamentos nas canaletas dos géis e as corridas eletroforéticas foram efetuadas a 4 °C, 150V por seis horas (ALFENAS, 2006). Ao término das corridas, os géis foram revelados para os sistemas isoenzimáticos: SOD (EC.1.15.1.1.), CAT (EC.1.11.1.6), POX (EC 1.11.1.7), EST (EC 3.1.1.1), ICL (EC 4.1.3.1) e GTDH (EC 1.4.1.2.), conforme metodologias descritas por Alfenas (2006). Os géis foram fotografados sobre transluminador. As expressões das isoenzimas foram determinadas por meio do software ImageJ[®] (2018), no qual as fotografias dos géis obtidos em eletroforese foram avaliadas pela intensidade e mensuração das isoformas obtidas e os resultados foram expressos em mm^2 .

3.9 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado neste trabalho foi o inteiramente casualizado (DIC). Os dados dos testes fisiológicos, da abundância de proteínas resistentes ao calor e atividade isoenzimáticas dos tratamentos correspondentes à perda da tolerância a dessecação (testemunha, 0 horas, 6 horas, 12 horas, 20 horas de embebição, 1 mm e 3 mm de protrusão radicular) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com auxílio do software estatístico SISVAR[®] (FERREIRA, 2014) a 5% de probabilidade, pelo teste F, e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Scott-Knott com significância de 5%.

Para os dados dos testes fisiológicos, da abundância de proteínas resistentes ao calor e atividade isoenzimáticas dos tratamentos correspondentes à reindução da tolerância à dessecação foi utilizado o esquema fatorial de 2x4, sendo dois comprimentos de radícula (1

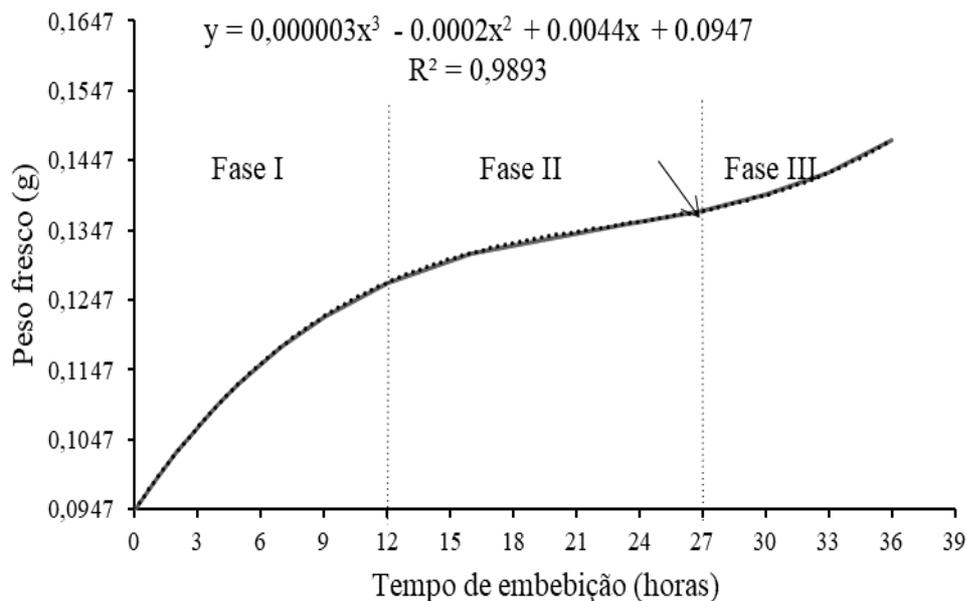
mm e 3 mm) e quatro tratamentos de reindução da tolerância à dessecação (controle, PEG - 1,4 MPa, PEG - 1,8 MPa e PEG - 2,2 MPa). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com auxílio do software estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2014) a 5% de probabilidade, pelo teste F, e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Scott-Knott com significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Curva de embebição

A curva de embebição para as sementes de girassol (FIGURA 1) corresponde ao padrão trifásico descrito por Bewley e Black (1994). Este padrão é caracterizado por uma fase inicial, fase I, de rápida absorção da água, ocorrendo tanto em sementes viáveis como inviáveis, em consequência da diferença do potencial hídrico existente entre a semente e o substrato. Fase II com reduzida velocidade de hidratação na qual ocorre a preparação para germinação por meio da degradação das substâncias de reserva gerando energia para a retomada do crescimento do embrião. E a fase III é marcada pela retomada do crescimento do embrião, tornando-se visível pela protrusão da radícula (MARCOS FILHO, 2015).

Figura 1 - Curva de embebição de sementes de girassol (*Helianthus annuus L.*) sob temperatura de 25 °C. A seta indica o momento da protrusão radicular.



Fonte: Do autor (2018)

Observa-se que a fase I foi caracterizada por um aumento significativo no peso fresco das sementes devido a rápida absorção de água durante as primeiras 12 horas de embebição (FIGURA 1). A seguir notou-se a redução e estabilização da absorção de água durante as próximas 15 horas, caracterizando a fase II. As sementes de girassol iniciaram a fase III do processo de germinação após 27 horas de embebição, quando foi observada a protrusão radicular de mais de 50% das sementes. A duração de cada uma dessas fases depende de características inerentes a cada semente, como permeabilidade do tegumento, tamanho da semente, composição do material de reserva e das condições durante a embebição (BEWLEY; BLACK, 1994).

Com base nestes resultados foram selecionados diferentes tempos de embebição para a avaliação da perda da tolerância à dessecação, durante o processo germinativo de sementes de girassol, sendo eles: 0 horas, 6 horas, 12 horas e 20 horas de embebição e sementes germinadas com protrusão radicular de 1 mm (27 horas de embebição) e 3 mm (30 horas de embebição). Esses tempos de embebição foram escolhidos para representar o início e meio de cada uma das fases de germinação das sementes de girassol.

4.2 Avaliações fisiológicas

Os valores do grau de umidade das sementes nos pontos estudados dos tratamentos da perda da tolerância à dessecação, antes e após a desidratação em sílica gel estão representados na Tabela 1. O grau de umidade inicial das sementes antes das hidratações encontrava-se próximo dos 7% e no decorrer da embebição chegou a aproximadamente 42%, no momento de protrusão radicular. Porém, após a secagem em sílica gel o grau de umidade chegou próximo dos 5%, pois as sementes não foram somente desidratadas até sua umidade inicial. As sementes foram mantidas por 72 horas em ambiente com sílica gel ativada, pois para uma semente ser considerada tolerante à dessecação, além de tolerar a secagem, ela também deve tolerar a permanência no estado seco por algum tempo (MARTINS, 2015).

Tabela 1 - Valores do grau de umidade (%) antes e após secagem de sementes de girassol submetidas à diferentes períodos de embebição, seguida de secagem em sílica gel.

Tratamentos	Grau de Umidade (%)	
	Antes da Secagem	Após Secagem
Testemunha	6,87	-
0 h de embebição	6,87	4,73
6 h de embebição	26,96	4,66
12 h de embebição	34,83	4,65
20 h de embebição	38,40	4,68
1 mm de radícula	41,55	4,90
3 mm de radícula	42,81	5,17

Fonte: Do autor (2018).

Para a avaliação de sementes de girassol quanto à perda da tolerância à dessecação durante o processo germinativo, foi observado efeito significativo para todos os testes fisiológicos realizados (TABELA 2).

Tabela 2 - Valores médios de primeira contagem de germinação (PC), germinação (G), índice de velocidade de emergência (IVE), emergência (EMERG.) e condutividade elétrica (CE) em sementes de girassol submetidas à diferentes períodos de embebição, seguida de desidratação em sílica gel e posterior reidratação.

Tratamentos	PC (%)	G (%)	IVE	EMERG. (%)	CE ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\text{g}^{-1}$)
Testemunha	79,00 a	89,00 a	10,46 b	97,00 a	48,43 c
0 h de embebição	79,00 a	87,00 a	10,37 b	98,00 a	50,33 c
6 h de embebição	83,00 a	87,00 a	11,20 a	99,00 a	41,88 b
12 h de embebição	82,00 a	88,00 a	11,73 a	99,00 a	35,81 a
20 h de embebição	85,00 a	91,00 a	11,93 a	97,00 a	32,46 a
1 mm de radícula	12,00 b	21,00 b	8,93 c	90,00 b	42,21 b
3 mm de radícula	0,00 c	9,00 c	6,25 d	83,00 c	46,09 c
CV (%)	5,90	4,50	7,89	5,16	6,10

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Do autor (2018).

De acordo com os dados da germinação e primeira contagem da germinação, as sementes de girassol só perderam a tolerância à dessecação após a protrusão radicular (TABELA 2). Os percentuais de plântulas normais não diferiram entre si para os demais tratamentos antes da protrusão radicular, incluindo a testemunha que não foi submetida a desidratação em sílica gel, não havendo assim efeito negativo na viabilidade e vigor das sementes de girassol quando submetidas à embebição, seguida de desidratação em sílica gel, e posterior reidratação, antes do momento da protrusão radicular.

Para as sementes com radícula protundida a determinação da germinação na primeira contagem foi em baixas porcentagens para as sementes com 1 mm de radícula, e nula para sementes com 3 mm de protrusão radicular. Resultados semelhantes são observados para o teste de germinação, onde baixas porcentagens de formação de plântulas normais foram observadas a partir da protrusão radicular, o que reitera que grande parte das sementes ortodoxas após a protrusão radicular perdem a tolerância à dessecação (LEPRINCE et al., 1994).

Para algumas espécies, o início da perda da tolerância à dessecação acontece quando as sementes encontram-se em um estado metabólico mais avançado, na transição da fase II para a fase III de embebição ou até mesmo após a protrusão radicular, conforme observado em sementes de espécies agrícolas como soja e milho (KOSTER; LEOPOLD, 1988), trigo (MIAZEK; BOGDAN; ZAGDANSKA, 2001) e tomate, quiabo e ervilha (LIN; YEN; CHIEN, 1998). Em espécies florestais de *Sesbania virgata* (MASETTO; FARIA; FRAIZ, 2015) e *Medicago truncatula* (FARIA et al., 2005) foi verificado que as sementes germinadas ainda mantinham a tolerância à dessecação após a protrusão radicular tornando-se sensíveis com o avanço de seus comprimentos radiculares.

Em relação ao teste de emergência, as sementes de girassol apresentaram altas porcentagens de plântulas emergidas, mesmo para os tratamentos após a protrusão radicular (TABELA 2). Sendo que os tratamentos antes da protrusão radicular incluindo a testemunha, a qual não foi submetida a desidratação em sílica gel, não diferiram estatisticamente entre si, apresentando maiores porcentagens de emergência em relação aos tratamentos pós protrusão radicular.

A alta porcentagem de emergência de plântulas dos tratamentos de 1 mm e 3 mm de protrusão radicular não corroboram com os resultados do teste de germinação para esses tratamentos (TABELA 2), onde baixas porcentagens de formação de plântulas normais foram observadas a partir da protrusão radicular, caracterizando a perda da tolerância à dessecação. Esse fato acontece porque a capacidade de tolerar à dessecação é distinta nas diferentes partes da semente, e a raiz primária é a primeira parte a se tornar intolerante à secagem (BUITINK et al., 2003). Como observado na Figura 2 – B, C e D, as plântulas de girassol foram consideradas anormais no teste de germinação devido a danos ou interrupção no crescimento da raiz primária causados pela secagem. Embora tenha ocorrido o desenvolvimento de raízes laterais, essas plântulas são consideradas anormais, pois o desenvolvimento da raiz primária é uma estrutura essencial para uma plântula de girassol ser considerada normal (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA, 2006).

Entretanto, no teste de emergência o desenvolvimento das raízes laterais possibilitaram a emergência das plântulas dos tratamentos com protrusões radiculares, mas essas plântulas apresentaram menor tamanho de suas estruturas e até deformações em relação aos tratamentos antes da protrusão radicular (FIGURA 2 – E e F). Em condições de campo, principalmente em ambientes desfavoráveis, essas plântulas provavelmente não sobreviveriam ou não se tornariam uma planta produtiva, pois o desenvolvimento de raízes é fundamental para o crescimento e produção de plantas de girassol (SEILER, 1998).

Figura 2 - Plântulas de girassol oriundas de sementes submetidas à diferentes períodos de embebição, seguida de desidratação e posterior reidratação, nos testes de germinação e emergência. **A**- Plântula normal, durante teste de germinação do tratamento de 1 mm de protrusão radicular; **B**, **C** e **D**- Plântulas anormais, durante teste de germinação dos tratamentos de 1 e 3 mm de protrusão radicular; **E** e **F**- Plântulas durante teste de emergência, lado esquerdo tratamento de 20h de embebição e lado direito tratamento de 3 mm de protrusão radicular.



Fonte: Do autor (2018)

Para o índice de velocidade de emergência os maiores valores foram observados para os tratamentos de 6, 12 e 20 horas de embebição, seguidos pelos tratamentos de 0 horas de embebição e testemunha que não diferiram estatisticamente entre si, e os menores índices de velocidade de emergência para os tratamentos de 1 mm e 3 mm de protrusão radicular (TABELA 2). Fato esse que pode ser relacionado ao efeito de hidrocondicionamento (“priming”), devido a pré-embebição e posterior desidratação das sementes, sendo essa

técnica utilizada para aumentar a velocidade e a uniformidade da germinação de sementes (MARCOS FILHO, 2015). Os menores valores de IVE para os tratamentos de 1 mm e 3 mm de radícula, indicaram queda no vigor das sementes submetidas a esses tratamentos, devido ao aumento da sensibilidade à dessecação nesse estágio de desenvolvimento.

Já os resultados para o teste de condutividade elétrica encontram-se na Tabela 2, onde maiores valores foram observados para as sementes dos tratamentos: testemunha, zero horas de embebição e 3 mm de protrusão radicular, seguido dos tratamentos de seis horas de embebição e 1 mm de protrusão radicular e com menores valores de condutividade elétrica para os tratamentos de 12 e 20 horas de embebição.

Em estudos da perda da tolerância à dessecação durante a germinação de sementes de ervilha, Reisdorph e Koster (1999) constataram que o aumento da permeabilidade das membranas correspondeu a perda progressiva da tolerância à dessecação, o que não foi observado no presente estudo, em que os dados obtidos nas análises de condutividade elétrica e da germinação das sementes submetidas a diferentes tempos de embebição e posterior secagem em sílica gel não se corroboram. Esse fato pode estar relacionado ao efeito de hidrocondicionamento, como observado para o IVE, em que a embebição das sementes e posterior secagem rápida em sílica gel contribuiu para a ação de mecanismos de reparo para reestruturação do sistema de membranas, as sementes que atingiram a fase II de embebição (12 e 20 horas de embebição) apresentaram menor liberação de exsudatos do que as sementes que foram submetidas a pouco tempo, ou nenhum tempo de embebição e as que atingiram a protrusão radicular. A possibilidade de reestruturação do sistema de membranas durante o condicionamento determina a manutenção da permeabilidade seletiva, em que as membranas organizadas não permitem a entrada rápida de água nem a liberação excessiva de exsudatos (MARCOS FILHO, 2015).

Sementes ortodoxas adquirem tolerância à dessecação durante o desenvolvimento e, em geral, esta capacidade é totalmente perdida na fase III do processo germinativo (BEWLEY; BLACK, 1994). Esta afirmação reitera os resultados obtidos no presente trabalho, pois a secagem rápida em sílica gel, com posterior reidratação afetou o desempenho fisiológico das sementes após a protrusão radicular, sendo que as sementes de girassol perderam sua tolerância à dessecação com 1 mm de radícula, ponto que ocorre com aproximadamente 27 horas de embebição e corresponde à fase III da germinação.

A partir da caracterização da perda da tolerância à dessecação em sementes de girassol, tentou-se reestabelecer a tolerância à dessecação perdida em função da protrusão radicular. Para o experimento de reindução da tolerância à dessecação em sementes de

girassol com 1 mm e 3 mm de radícula foi determinado o grau de umidade antes e após cada tratamento de reindução e após a secagem em sílica gel (TABELA 3).

Tabela 3 - Valores do grau de umidade (%) de sementes de girassol com 1 mm e 3 mm de radícula, antes e após tratamento de reindução da tolerância à dessecação (TD) e posterior secagem em sílica gel.

Tratamento de Reindução da TD	Grau de Umidade (%)		
	Antes Reindução	Após Reindução	Após Secagem
1 mm (Controle)	41,55	—	4,90
1 mm PEG -1,4 MPa	41,55	32,11	4,75
1 mm PEG -1,8 MPa	41,55	29,53	4,66
1 mm PEG -2,2 MPa	41,55	24,74	4,62
3 mm (Controle)	42,81	—	5,17
3 mm PEG -1,4 MPa	42,81	33,15	4,89
3 mm PEG -1,8 MPa	42,81	30,22	4,87
3 mm PEG -2,2 MPa	42,81	25,14	4,73

Fonte: Do autor (2018).

O tratamento osmótico com polietilenoglicol (PEG) causa um estresse hídrico moderado nas radículas (ASHRAF; FOOLAD, 2005), como pode ser observado na Tabela 3, em que todos tratamentos com PEG tiveram uma moderada redução do grau umidade, o qual poderia levar a expressão de genes ligados a tolerância à dessecação desativados durante a embebição (BRUCE et al., 2007), podendo reinduzir a tolerância à dessecação em sementes germinadas.

Na análise de variância para os resultados dos testes fisiológicos observa-se efeito significativo para a interação do comprimento radicular e dos tratamentos de reindução da tolerância à dessecação para os testes de germinação, primeira contagem da germinação e condutividade elétrica (TABELA 4).

Tabela 4 - Valores médios de germinação (%), primeira contagem de germinação (PC%) e condutividade elétrica (CE $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) em sementes de girassol com 1 mm e 3 mm de radícula, submetidas à diferentes tratamentos de reindução da tolerância à dessecação (TD), com posterior desidratação em sílica gel e reidratação. (Continua)

Tratamentos de Reindução da TD	Germinação (%)	
	Comprimento Radicular	
	1 mm	3 mm
Controle	21,00 Ca	8,00 Ab
PEG -1,4 MPa	37,00 Ba	12,00 Ab
PEG -1,8 MPa	46,00 Aa	16,00 Ab
PEG -2,2 MPa	33,00 Ba	15,00 Ab
CV (%)	19,22	

Tabela 4 - Valores médios de germinação (%), primeira contagem de germinação (PC%) e condutividade elétrica (CE $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) em sementes de girassol com 1 mm e 3 mm de radícula, submetidas à diferentes tratamentos de reindução da tolerância à dessecação (TD), com posterior desidratação em sílica gel e reidratação. (Conclusão)

PC (%)		
Tratamentos de Reindução da TD	Comprimento Radicular	
	1 mm	3 mm
Controle	10,00 Ca	0,00 Bb
PEG -1,4 MPa	24,00Ba	7,00 Ab
PEG -1,8 MPa	34,00 Aa	10,00 Ab
PEG -2,2 MPa	22,00 Ba	8,00 Ab
CV (%)	16,30	
Condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)		
Tratamentos de Reindução da TD	Comprimento Radicular	
	1 mm	3 mm
Controle	41,06 Aa	45,34 Aa
PEG -1,4 MPa	48,38 Aa	60,56 Bb
PEG -1,8 MPa	46,66 Aa	65,07 Bb
PEG -2,2 MPa	44,67 Aa	62,37 Bb
CV (%)	8,81	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, e minúscula na linha, não diferem entre si, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Do autor (2018).

Para o teste de germinação de sementes de 1 mm de radícula, observa-se maior porcentagem de plântulas normais para o tratamento de reindução da tolerância à dessecação com PEG -1,8 MPa, 46% de plântulas normais (TABELA 4). Para o tratamento somente com secagem em sílica gel (controle) foi observado menores porcentagens no teste de germinação do que os tratamentos da reindução com PEG. Para as sementes com 3 mm de radícula os tratamentos não foram capazes de reinduzir a germinação a altas porcentagens, não houve diferença estatística entre os tratamentos de reindução da tolerância à dessecação com PEG e o controle.

Na primeira contagem de germinação foram encontrados valores superiores para sementes de 1 mm de radícula tratadas com PEG -1,8 MPa, resultado semelhante aos observados para o teste de germinação. Já nas sementes com 3 mm de protrusão radicular os tratamentos de reindução da tolerância à dessecação com PEG foram superiores ao tratamento controle. Valores inferiores foram observados para sementes com 3 mm de protrusão radicular em relação as com 1 mm independentemente do tratamento, para os testes de germinação e primeira contagem da germinação (TABELA 4).

Silva (2015) estudando o restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) obteve resultados semelhantes com relação

ao tratamento de reindução da tolerância à dessecação, onde sementes da espécie em estudo foram capazes de retomar sua germinação com 2 e 3 mm de radícula, quando tratadas com PEG antes da secagem. Em sementes de *Sesbania virgata*, o tratamento osmótico com PEG antes da desidratação foi capaz de prevenir a morte de 45% das plântulas com raiz primária de 3 mm de comprimento, não havendo sobrevivência das plântulas não tratadas (MASETTO; FARIA; FRAIZ, 2015).

No teste de condutividade elétrica não foi observada diferença significativa entre os tratamentos com PEG e o controle para as sementes de 1 mm de radícula. Nas sementes com 3 mm de protrusão radicular os tratamentos de reindução da tolerância à dessecação com PEG obtiveram maiores valores de lixiviação de exsudatos em relação ao controle. Os tratamentos de reindução da tolerância à dessecação com PEG para as sementes com 3 mm de radícula apresentaram maiores valores de liberação de exsudatos em relação ao controle, provavelmente por terem passado por um período de secagem lenta por 72 horas em PEG antes de serem submetidos a secagem rápida em sílica gel, sendo que o tratamento controle foi imediatamente desidratado em sílica gel, secagem rápida. Secagem lenta permite atividade metabólica característica da deterioração, pelo fato de as sementes passarem um maior período com alta umidade e a secagem rápida permite certa estagnação de reações químicas devido a rápida desidratação (BEWLEY et al., 2013).

Nos testes de emergência e índice de velocidade de emergência houve efeito isolado dos fatores estudados. Em relação ao comprimento radicular os maiores valores foram para sementes com 1 mm de protrusão radicular (TABELA 5).

Tabela 5 - Valores médios de emergência (%) e índice de velocidade de emergência (IVE) em sementes de girassol com 1 mm e 3 mm de radícula, submetidas à diferentes tratamentos de reindução da tolerância à dessecação, com posterior desidratação em sílica gel e reidratação.

Comprimento Radicular	Emergência (%)	IVE
1 mm	94,00 A	9,14 A
3 mm	82,00 B	6,14 B
CV (%)	3,52	6,58

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de F, a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Do autor (2018).

Pelos valores obtidos no teste de emergência e IVE observa-se que nas sementes com radícula de 3 mm houve queda no vigor, devido ao aumento da sensibilidade à dessecação nesse estágio de desenvolvimento. A perda da tolerância à dessecação em sementes de

girassol segue padrão semelhante ao obtido por Buitink et al. (2003) e Silva (2015) para sementes de *Medicago truncatula* e *Vigna unguiculata*, respectivamente, no qual a medida que o processo de germinação avança a tolerância à dessecação é perdida.

Para o fator tratamentos de reindução da tolerância à dessecação, maiores porcentagens de emergência foram observadas para os tratamentos de reindução com PEG do que em relação ao tratamento controle (TABELA 6). Já para o índice de velocidade de emergência, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos de reindução com PEG e o controle.

Tabela 6 - Valores médios de emergência (%) e índice de velocidade de emergência (IVE) em sementes de girassol com 1 mm e 3 mm de radícula, submetidas à diferentes tratamentos de reindução da tolerância à dessecação (TD), com posterior desidratação em sílica gel e reidratação.

Tratamentos de Reindução da TD	Emergência (%)	IVE
Controle	84,00 B	7,40 A
PEG -1,4 MPa	91,00 A	7,96 A
PEG -1,8 MPa	91,00 A	7,70 A
PEG -2,2 MPa	88,00 A	7,50 A
CV (%)	3,52	6,58

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Do autor (2018).

A alta porcentagem de emergência de plântulas dos tratamentos de reindução da tolerância à dessecação em sementes de girassol com 1 mm e 3 mm de radícula não corroboram com os resultados do teste de germinação para esses tratamentos (TABELA 4), onde foram observadas baixas porcentagens de formação de plântulas normais para todos tratamentos. Situação essa, semelhante à ocorrida anteriormente para o experimento da perda da tolerância à dessecação durante o processo germinativo, em que como observado na Figura 2 – B, C e D, as plântulas de girassol foram consideradas anormais no teste de germinação, devido a danos no crescimento da raiz primária, que é uma estrutura essencial para uma plântula de girassol ser considerada normal (ISTA, 2006). Entretanto, no teste de emergência o desenvolvimento de raízes laterais possibilitaram a emergência das plântulas de todos tratamentos, mas essas plântulas apresentaram menor tamanho de suas estruturas e até deformações (FIGURA 2 – E e F), sendo que em condições de campo, principalmente em ambientes desfavoráveis, essas plântulas provavelmente não sobreviveriam ou não tornariam uma planta produtiva (SEILER, 1998).

Pelos dados obtidos nos tratamentos da tentativa de reindução da tolerância à dessecação é possível observar que o tratamento utilizando PEG -1,8 MPa em sementes com 1

mm de radícula permitiu um restabelecimento da tolerância à dessecação de 46% de germinação, mesmo com a redução do grau de umidade a 4,87%.

4.3 Avaliação de proteínas resistentes ao calor

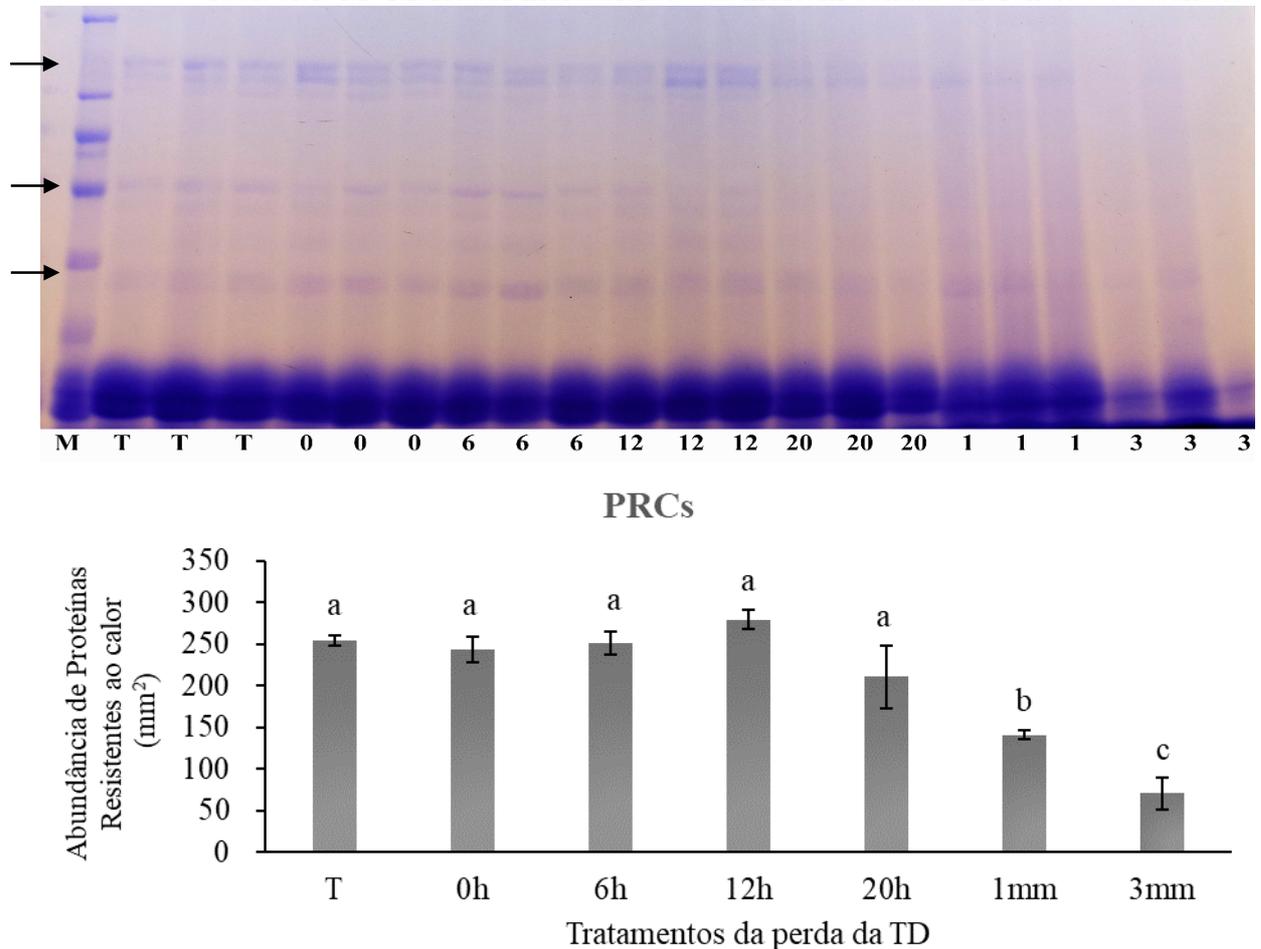
O padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor (PRCs) dos tratamentos de caracterização da perda da tolerância à dessecação, durante o processo germinativo de sementes de girassol, é apresentado na Figura 3.

É possível observar a presença de proteínas resistentes ao calor durante todo o processo germinativo, mas estas diminuem sua abundância com a protrusão radicular, coincidindo com o momento de perda da tolerância à dessecação das sementes de girassol. A abundância de PRCs não diferiu estatisticamente para os tratamentos antes da protrusão radicular, que apresentaram bandas mais intensas. Os tratamentos após a protrusão radicular apresentaram desaparecimento ou menor intensidade de bandas de proteínas resistentes ao calor, sendo a menor abundância para o tratamento de 3 mm de radícula, tratamento esse com menor sobrevivência de plântulas.

Resultados semelhantes foram encontrados em sementes de *Sesbania virgata* (COSTA, 2011), *Medicago truncatula* (BOUDET et al., 2006) e *Anadenanthera pavonina* (SOARES et al., 2015), onde o decréscimo dos conteúdos de PRCs também coincidiram com a redução na capacidade das sementes de tolerar a dessecação, fornecendo subsídios para a atuação dessas proteínas, como um mecanismo associado a tolerância à dessecação.

Em relação ao padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor, dos tratamentos de reindução da tolerância à dessecação em sementes de girassol (FIGURA 4), houve somente efeito isolado do fator comprimento radicular, no qual as sementes com 1 mm de radícula apresentaram maior abundância de PRCs em relação as com 3 mm de protrusão radicular. A redução na abundância das proteínas resistentes ao calor, com o aumento do comprimento radicular, está relacionada com a maior sensibilidade à dessecação nesse estágio de desenvolvimento.

Figura 3 - Abundância de proteínas resistentes ao calor (PRCs) de eixos embrionários de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) submetidas aos tratamentos de caracterização da perda da tolerância à dessecação (TD) durante o processo germinativo. Tratamentos: T- testemunha; 0- 0 horas de embebição; 6- 6 horas de embebição; 12- 12 horas de embebição; 20- 20 horas de embebição; 1- sementes com 1 mm de protrusão radicular; 3- sementes com 3 mm de protrusão radicular. M- Marcador molecular. Setas indicam bandas diferentes ou ausentes.

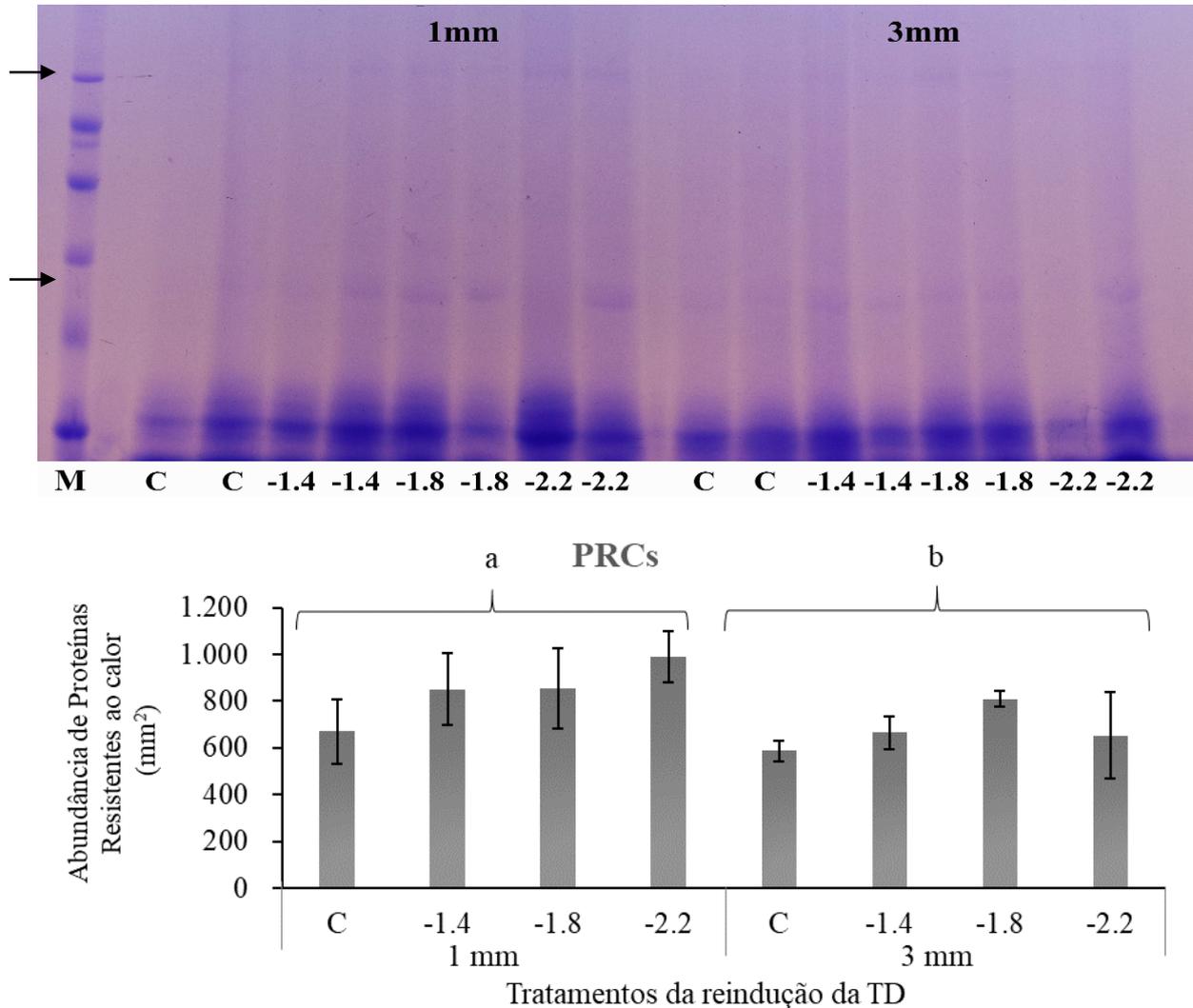


Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.

Fonte: Do autor (2018)

Foram verificados o aparecimento de bandas de proteínas resistentes ao calor de maior peso molecular, mas com pouca intensidade, para os tratamentos de reindução com PEG, sugerindo que esses tratamentos osmóticos possam ter reativado genes responsáveis pela produção dessas proteínas. Essa reativação não foi em quantidade suficiente para o restabelecimento total da tolerância à dessecação em sementes germinadas, mas parcialmente como o ocorrido com sementes de 1 mm de radícula, no qual observou-se maior porcentagem de plântulas normais para o tratamento de reindução da tolerância à dessecação com PEG -1,8 MPa (TABELA 4).

Figura 4 - Abundância de proteínas resistentes ao calor (PRCs) de eixos embrionários de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) de 1 mm e 3 mm de protrusão radicular submetidas a diferentes tratamentos de reindução da tolerância à dessecação (TD). Tratamentos: C – controle; -1,4 - PEG -1.4 MPa; -1,8 - PEG -1.8 MPa; -2,2 - PEG -2.2 MPa. M- Marcador molecular. Setas indicam bandas diferentes ou ausentes.



Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.
Fonte: Do autor (2018)

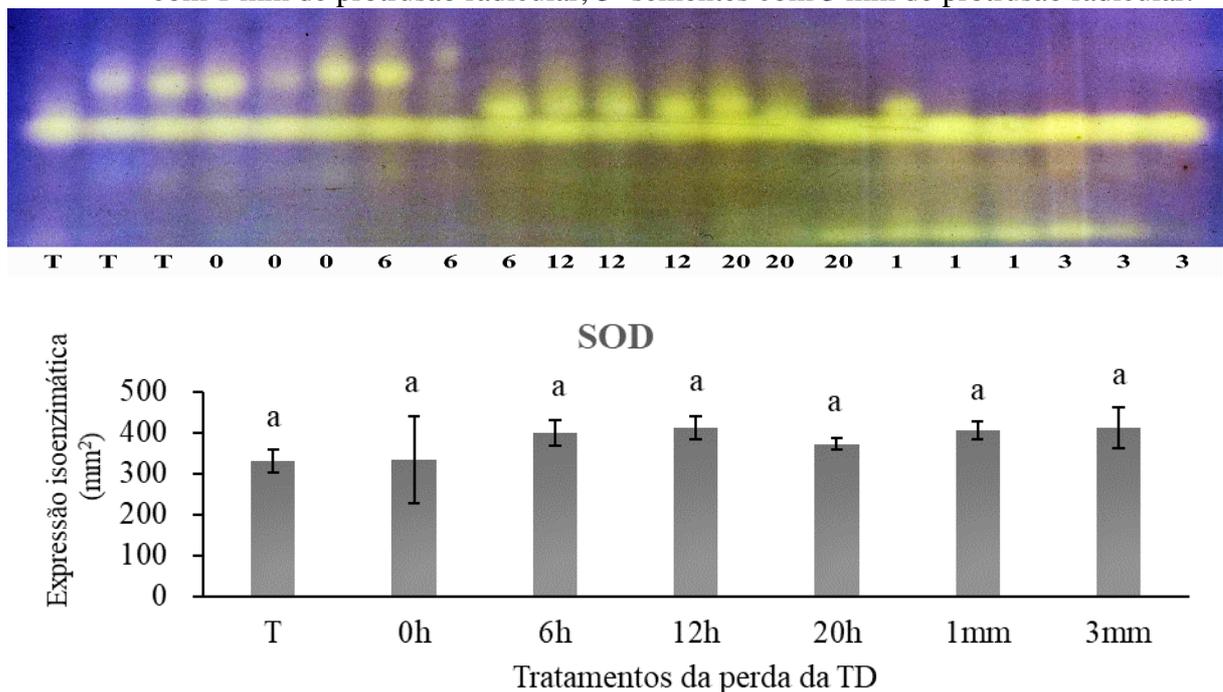
4.4 Avaliação das expressões isoenzimáticas

Superóxido dismutase

A expressão da isoenzima superóxido dismutase (SOD) em eixos embrionários de sementes de girassol antes e durante o processo germinativo foi aproximadamente constante, não diferindo estatisticamente para os tratamentos da perda da tolerância à dessecação

(FIGURA 5). Contudo, o desaparecimento de isoformas e surgimento de nova isoforma após a protrusão radicular sugere modificação no metabolismo (PIRES et al., 2017), provavelmente devido ao momento da perda da tolerância à dessecação.

Figura 5 - Expressões da isoenzima superóxido dismutase (SOD) de eixos embrionários de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) submetidas aos tratamentos de caracterização da perda da tolerância à dessecação (TD) durante o processo germinativo. Tratamentos: T- testemunha; 0- 0 horas de embebição; 6- 6 horas de embebição; 12- 12 horas de embebição; 20- 20 horas de embebição; 1- sementes com 1 mm de protrusão radicular; 3- sementes com 3 mm de protrusão radicular.



Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.

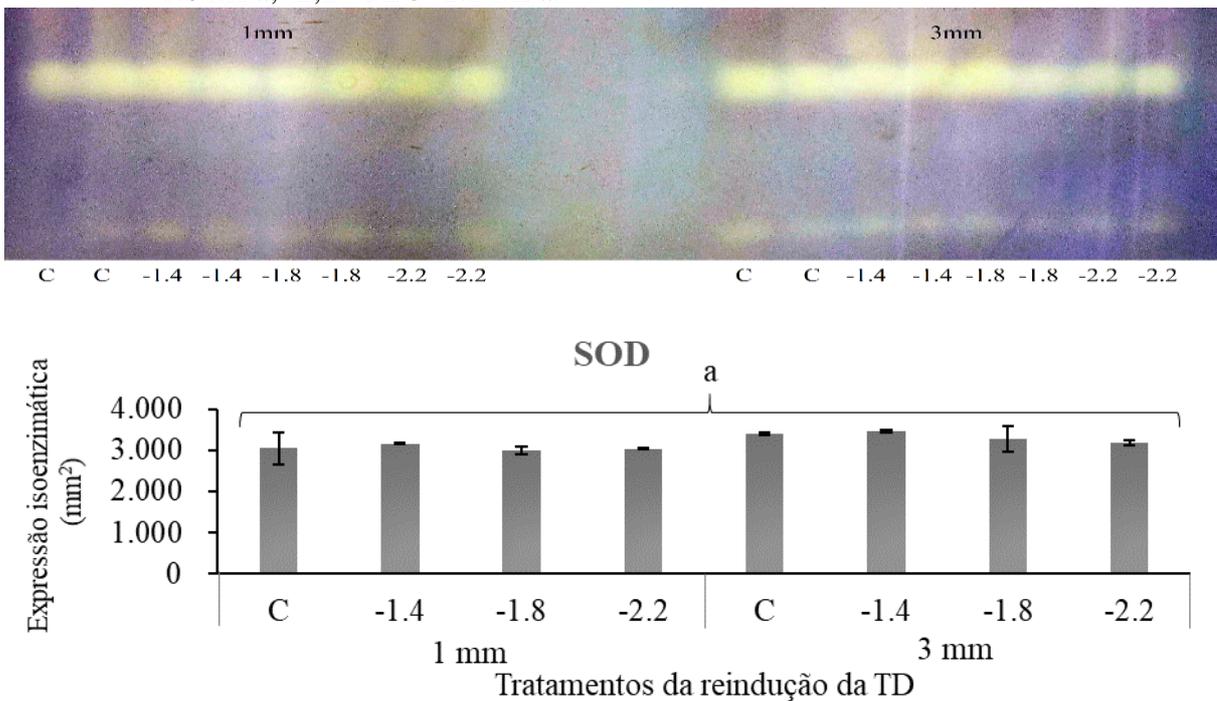
Fonte: Do autor (2018)

Resultados semelhantes foram observados por Albuquerque et al. (2009), nos quais não houve alteração do perfil enzimático da SOD ao longo do processo germinativo de sementes de sucupira preta (*Bowdichia virgilioides*). No entanto, Leprince et al. (1990) trabalhando com sementes de milho, constatou que houve redução significativa nas atividades da SOD concomitante com o início da perda da tolerância à dessecação. Já em estudos com sementes de *Erythrina Falcata*, Artur (2014) observou o contrário, no qual o padrão da isoenzima superóxido dismutase apresentou uma atividade crescente ao longo da embebição até que as radículas atingissem 3 mm de comprimento.

Para os tratamentos de reindução da tolerância à dessecação, observa-se uma constante expressão da isoenzima SOD, não havendo diferença estatística para nenhum dos fatores estudados (FIGURA 6).

A detecção da atividade da SOD ao longo desses processos, sugere que ela esteja participando da proteção contra radicais superóxidos. Do grupo das enzimas antioxidantes a enzima superóxido dismutase é a primeira a entrar em ação, anulando a ação dos superóxidos (O_2^-), catalisando sua conversão a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é um composto menos reativo (GILL; TUTEJA, 2010).

Figura 6 – Expressões da isoenzima superóxido dismutase (SOD) de eixos embrionários de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) de 1 mm e 3 mm de protrusão radicular submetidas a diferentes tratamentos de reindução da tolerância à dessecação (TD). Tratamentos: C – controle; -1,4 - PEG -1.4 MPa; -1,8 - PEG -1.8 MPa; -2,2 - PEG -2.2 MPa.



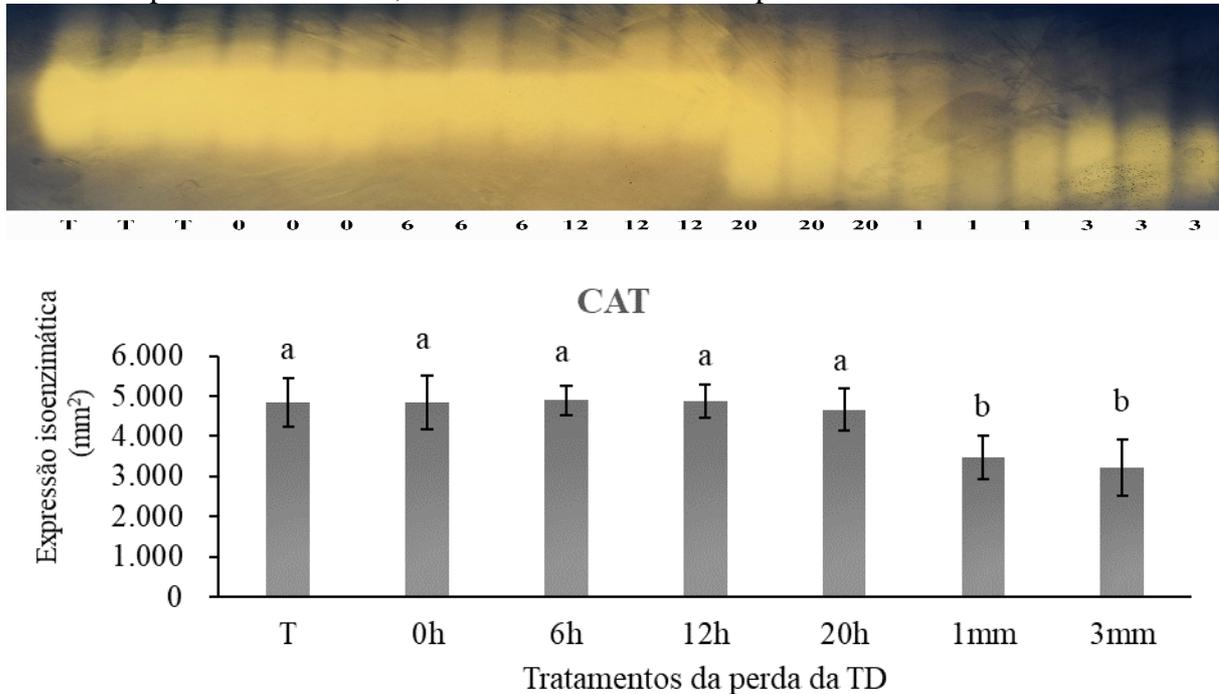
Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.

Fonte: Do autor (2018)

Catalase

A expressão da isoenzima catalase (CAT) referente aos tratamentos de caracterização da perda da tolerância à dessecação durante o processo germinativo de sementes de girassol é apresentado na Figura 7.

Figura 7 – Expressões da isoenzima catalase (CAT) de eixos embrionários de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) submetidas aos tratamentos de caracterização da perda da tolerância à dessecação (TD) durante o processo germinativo. Tratamentos: T- testemunha; 0- 0 horas de embebição; 6- 6 horas de embebição; 12- 12 horas de embebição; 20- 20 horas de embebição; 1- sementes com 1 mm de protrusão radicular; 3- sementes com 3 mm de protrusão radicular.



Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.

Fonte: Do autor (2018)

É possível observar um padrão de expressão uniforme para a isoenzima catalase ao longo do processo germinativo das sementes de girassol até 20 horas de embebição e queda da expressão após a protrusão radicular. Apesar de ter ocorrido uma suave modificação no padrão de expressão da CAT no tratamento de 20 horas de embebição, a expressão da catalase não diferiu estatisticamente dos tratamentos antes da protrusão radicular, que apresentaram alta expressão dessa isoenzima. Já os tratamentos após a protrusão radicular apresentaram baixa expressão da CAT, coincidindo com o momento de perda da tolerância à dessecação das sementes de girassol, reiterando a importância desses sistemas antioxidantes para tolerância à dessecação.

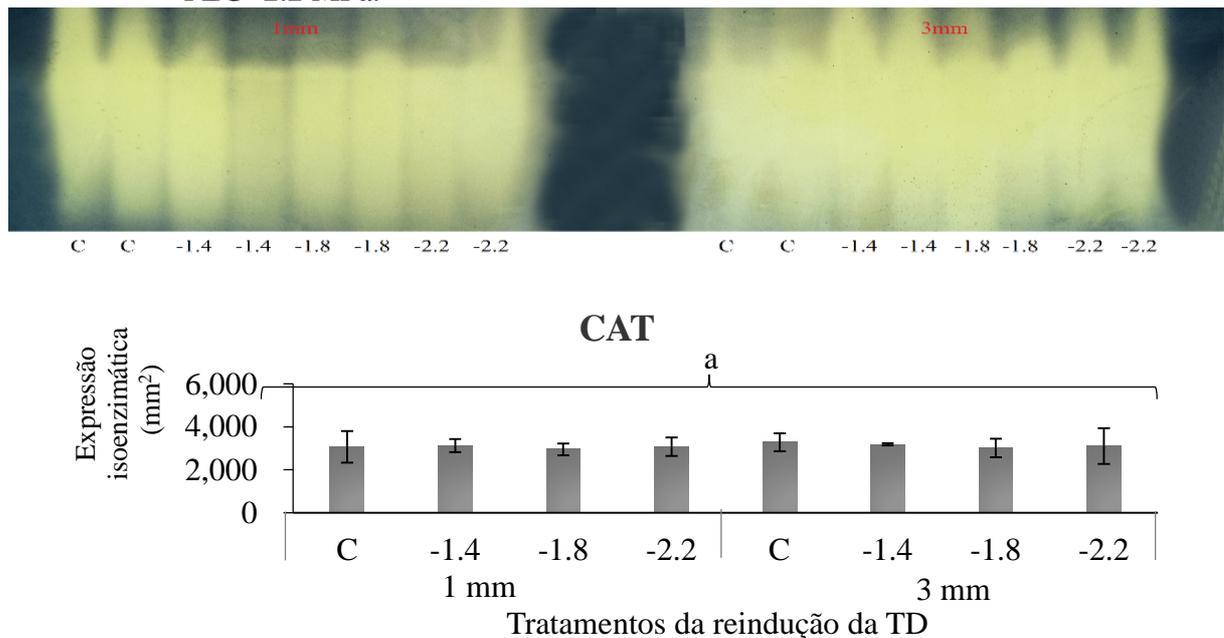
Resultados semelhantes foram observados em estudos do processo germinativo de sementes de café (RESENDE, 2006) e sucupira preta (ALBUQUERQUE et al., 2009), nos quais a atividade da catalase foi maior nas primeiras horas de embebição, reduzindo sua expressão com o avanço do processo germinativo. Em sementes de *Sesbania virgata* com

protrusão radicular de 3 mm, houve redução na atividade da CAT quando foram desidratadas até 10% de umidade, coincidindo com queda no percentual de sobrevivência das sementes (COSTA, 2011).

Em relação a expressão da catalase nos tratamentos de reindução da tolerância à dessecação de sementes de girassol (FIGURA 8), nota-se um padrão uniforme, não havendo diferença estatística para nenhum dos fatores estudados.

Com o restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes de *Medicago truncatula* houve o aumento da expressão da enzima catalase (BUITINK et al., 2006), o que não foi observado no presente estudo com sementes de girassol.

Figura 8 – Expressões da isoenzima catalase (CAT) de eixos embrionários de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) de 1 mm e 3 mm de protrusão radicular submetidas a diferentes tratamentos de reindução da tolerância à dessecação (TD). Tratamentos: C – controle; -1,4 - PEG -1.4 MPa; -1,8 - PEG -1.8 MPa; -2,2 - PEG -2.2 MPa.



Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.
Fonte: Do autor (2018)

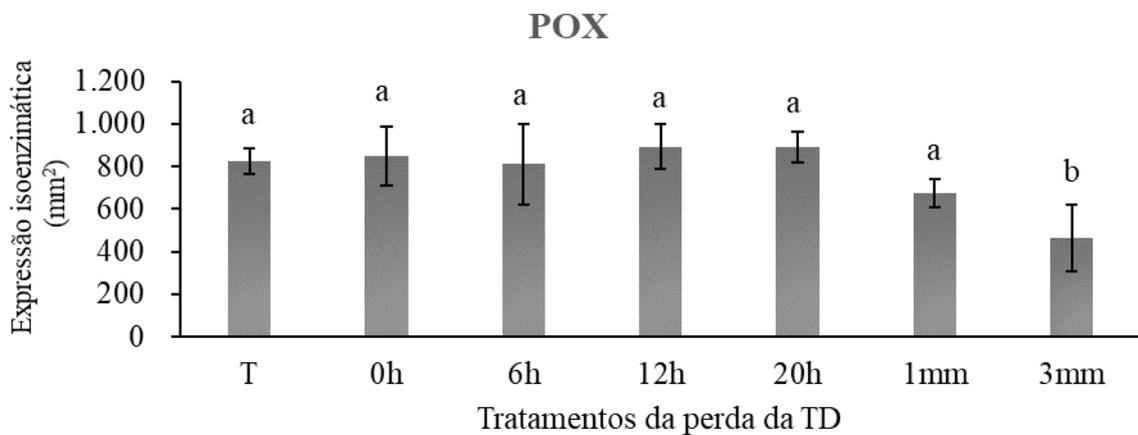
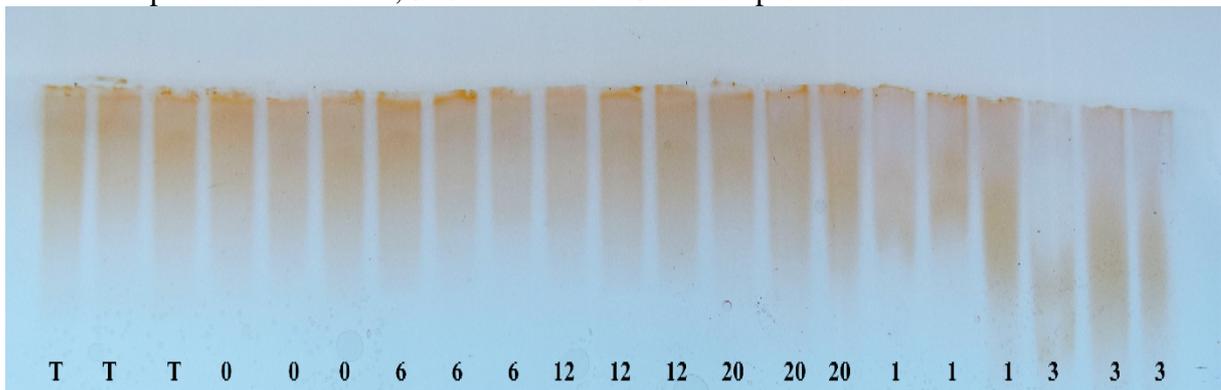
Peroxidase

A expressão da isoenzima peroxidase (POX) referente aos tratamentos de caracterização da perda da tolerância à dessecação durante o processo germinativo de sementes de girassol é apresentado na Figura 9.

O padrão da expressão da peroxidase foi semelhante ao longo do processo germinativo das sementes de girassol, não diferindo estatisticamente para os tratamentos até a protrusão

radicular de 1 mm, havendo uma queda da expressão dessa isoenzima com a protrusão radicular de 3 mm, concomitantemente ao momento de perda da tolerância à dessecação das sementes de girassol. Padrão esse semelhante ao obtido para isoenzima catalase.

Figura 9 - Expressões da isoenzima peroxidase (POX) de eixos embrionários de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) submetidas aos tratamentos de caracterização da perda da tolerância à dessecação (TD) durante o processo germinativo. Tratamentos: T- testemunha; 0- 0 horas de embebição; 6- 6 horas de embebição; 12- 12 horas de embebição; 20- 20 horas de embebição; 1- sementes com 1 mm de protrusão radicular; 3- sementes com 3 mm de protrusão radicular.



Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.

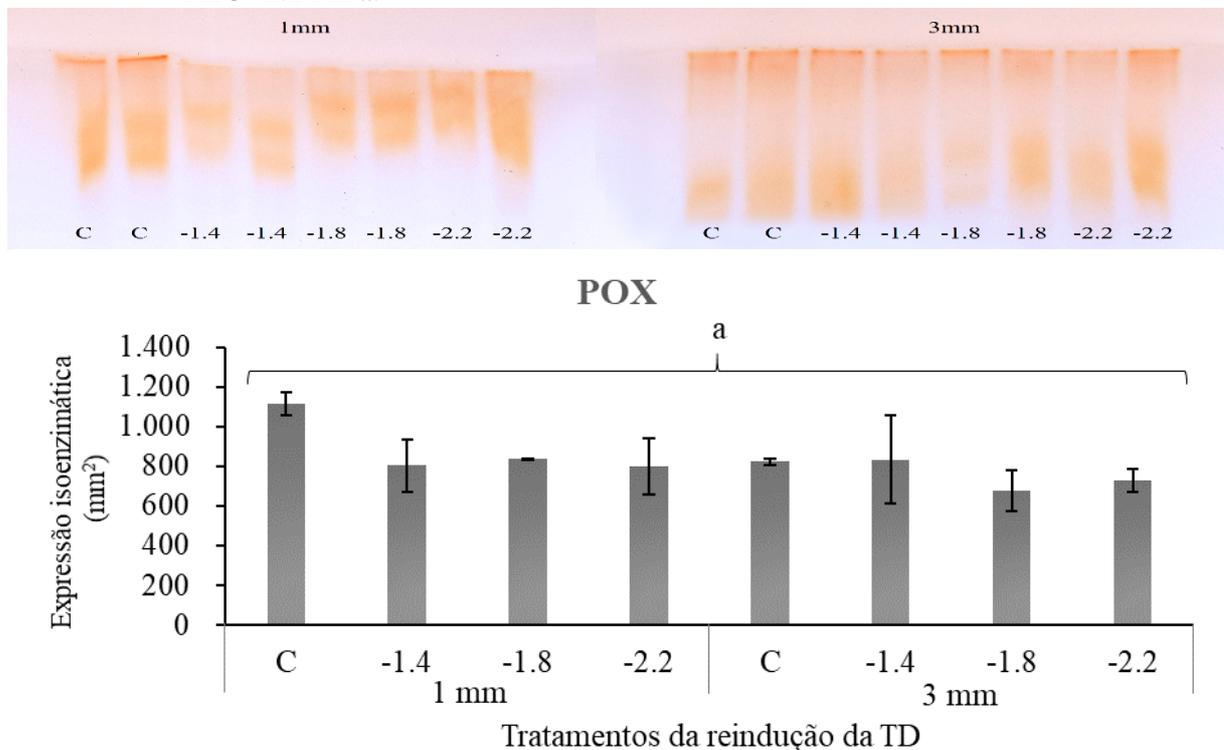
Fonte: Do autor (2018)

Em sementes de milho, houve decréscimo na atividade da POX juntamente com o início da perda da tolerância à dessecação (LEPRINCE et al., 1990), semelhante ao ocorrido no presente estudo. Tang (2000) em estudo com sementes de *Pinus taeda*, observou que a maior atividade da peroxidase foi relacionada ao estado de tolerância à dessecação, quando comparado ao estado intolerante, que apresentou menor atividade da POX. No entanto, em estudo da perda da tolerância à dessecação em sementes de *Anadenanthera colubrina*, Martins (2015) observou-se que a atividade enzimática da peroxidase manteve-se uniforme ao longo

do processo germinativo, com um acentuado aumento após a protrusão radicular, momento de perda da tolerância à dessecação dessa espécie, podendo esse aumento na atividade da POX não estar associado com a perda da tolerância à dessecação, mas com o desenvolvimento de plântulas.

Para os tratamentos de reindução da tolerância à dessecação, observa-se um padrão semelhante de expressão da isoenzima peroxidase para todos os tratamentos, não havendo diferença estatística para nenhum dos fatores estudados (FIGURA 10).

Figura 10 - Expressões da isoenzima peroxidase (POX) de eixos embrionários de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) de 1 mm e 3 mm de protrusão radicular submetidas a diferentes tratamentos de reindução da tolerância à dessecação (TD). Tratamentos: C – controle; -1,4 - PEG -1.4 MPa; -1,8 - PEG -1.8 MPa; -2,2 - PEG -2.2 MPa.



Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.

Fonte: Do autor (2018)

Para a manutenção dos níveis das espécies reativas de oxigênio (EROS) em equilíbrio nas células, é necessário que as enzimas SOD, CAT e POX atuem de forma conjunta e integrada (MITTLER, 2002). Embora a expressão da enzima superóxido dismutase tenha permanecido aproximadamente constante durante o processo germinativo, as enzimas catalase e peroxidase tiveram sua expressão diminuída com a protrusão radicular. Provavelmente o desequilíbrio entre a atividade da SOD e da CAT e POX pode ter contribuído no acúmulo de

EROS após secagem de sementes com protrusão radicular, e conseqüentemente, para perda da tolerância à dessecação.

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 tolerância à dessecação em sementes de girassol, pode estar associada a falhas no sistema antioxidativo enzimático, devido a diminuição da atividade das enzimas catalase e peroxidase. Os tratamentos de reindução da tolerância à dessecação utilizados não foram capazes de restabelecer a atividade das enzimas CAT e POX, para auxílio na recuperação da tolerância à dessecação.

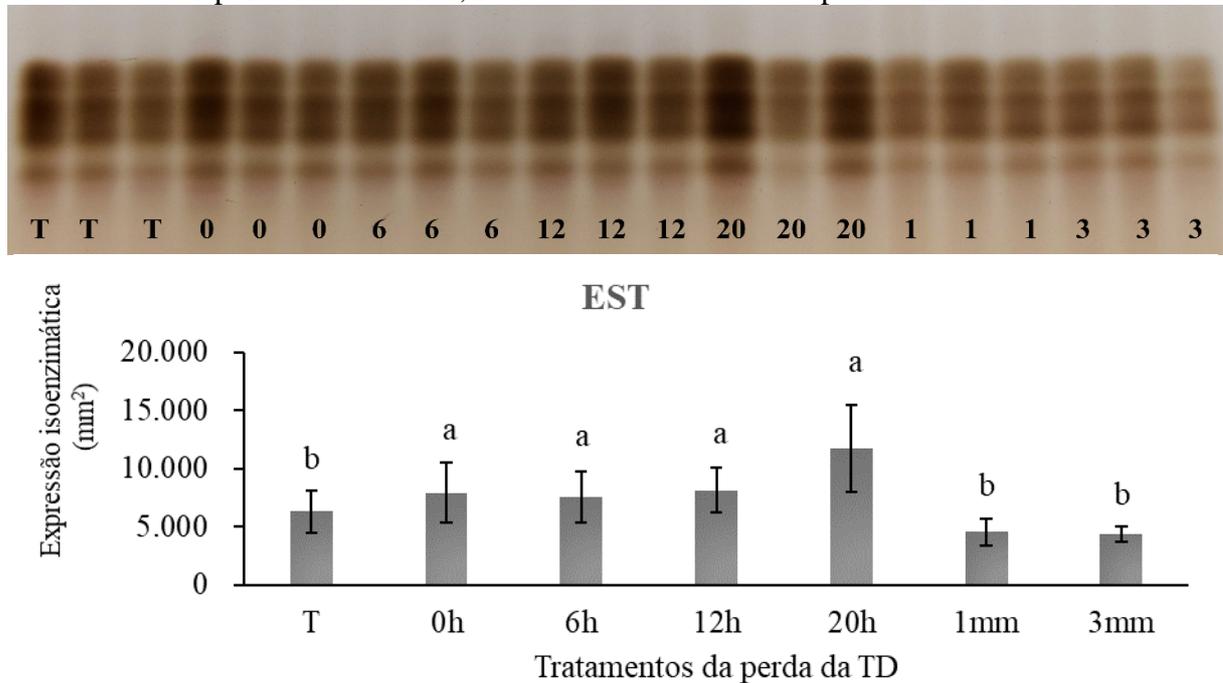
Esterase

A expressão da isoenzima esterase (EST) referente aos tratamentos de caracterização da perda da tolerância à dessecação durante o processo germinativo de sementes de girassol é apresentado na Figura 11.

As maiores expressões da esterase ocorreram nos tratamentos de 0, 6, 12 e 20 horas de embebição, seguida de desidratação em sílica gel, que não diferiram estatisticamente entre si. As menores expressões foram observadas no tratamento testemunha e após a protrusão radicular, 1 mm e 3 mm de radícula.

As maiores expressões da isoenzima EST, para os tratamentos antes da protrusão radicular, provavelmente está relacionado ao fato desses tratamentos terem passado por um período de secagem de 72 horas em sílica gel, causando maior peroxidação lipídica devido ao estresse da desidratação, o que não ocorreu no tratamento testemunha, por não ter passado pelo estresse de desidratação em sílica gel. Já nos tratamentos pós-protrusão radicular a intensidade das bandas foi reduzida, indicando rompimento de membranas, aumento da permeabilidade do tegumento devido ao momento de protrusão radicular e baixa qualidade fisiológica dessas sementes com a perda da tolerância à dessecação.

Figura 11 - Expressões da isoenzima esterase (EST) de eixos embrionários de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) submetidas aos tratamentos de caracterização da perda da tolerância à dessecação (TD) durante o processo germinativo. Tratamentos: T- testemunha; 0- 0 horas de embebição; 6- 6 horas de embebição; 12- 12 horas de embebição; 20- 20 horas de embebição; 1- sementes com 1 mm de protrusão radicular; 3- sementes com 3 mm de protrusão radicular.



Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.

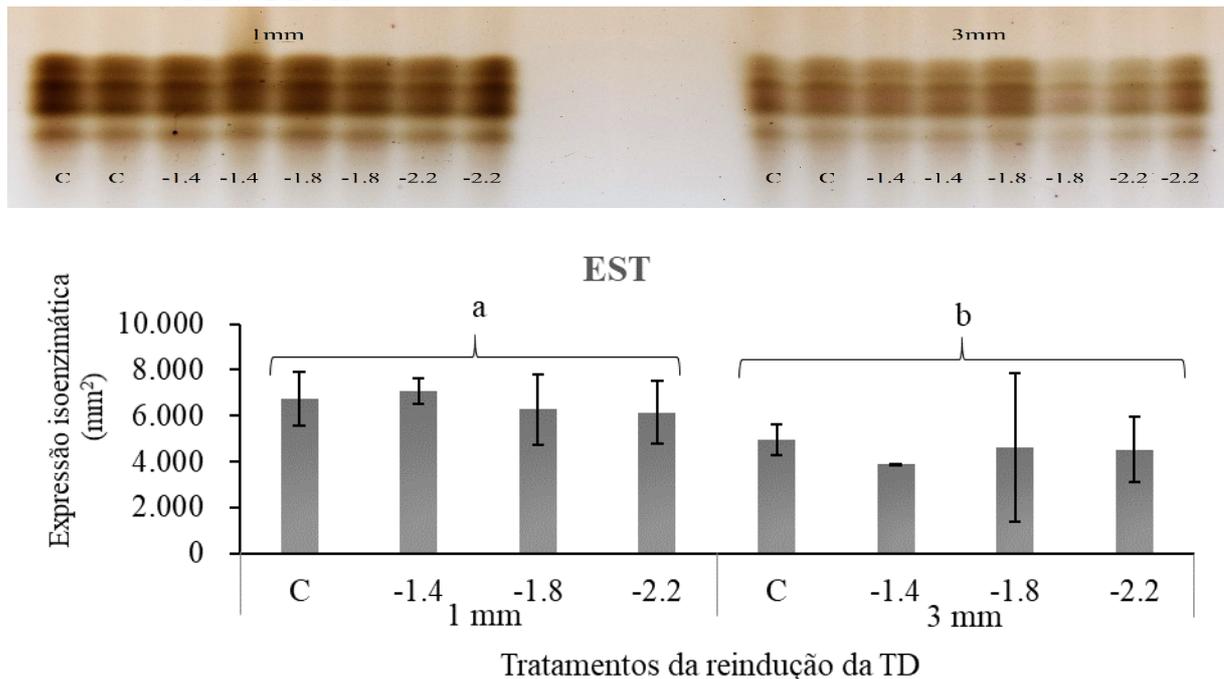
Fonte: Do autor (2018)

Pires et al. (2017) estudando as alterações fisiológicas e enzimáticas durante o processo germinativo de sementes de gergelim submetidas a diferentes potenciais osmóticos, obteve resultados semelhantes em relação a enzima esterase, a qual diminuiu sua expressão após o momento de protrusão radicular, indicando uma menor peroxidação lipídica e um aumento da permeabilidade do tegumento devido ao rompimento para protrusão radicular.

Em relação ao padrão eletroforético da esterase dos tratamentos de reindução da tolerância à dessecação de sementes de girassol (FIGURA 12), houve somente efeito isolado do fator comprimento radicular, no qual as sementes com 1 mm de radícula apresentaram maior intensidade de bandas da isoenzima EST em relação as com 3 mm de protrusão radicular. A redução na expressão da esterase, com o aumento do comprimento radicular, está relacionada com o maior grau de deterioração dessas sementes, devido aos estresses de desidratação. Aung e McDonald (1995) observaram uma diminuição da atividade da esterase com um processo crescente de deterioração em sementes de amendoim. Carvalho et al. (2014) verificaram menor expressão da EST em sementes de soja ao longo do armazenamento em

condições não controladas, coincidindo com diminuição na germinação e vigor dessas sementes.

Figura 12 - Expressões da isoenzima esterase (EST) de eixos embrionários de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) de 1 mm e 3 mm de protrusão radicular submetidas a diferentes tratamentos de reindução da tolerância à dessecação (TD). Tratamentos: C – controle; -1,4 - PEG -1.4 MPa; -1,8 - PEG -1.8 MPa; -2,2 - PEG -2.2 MPa.



Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.

Fonte: Do autor (2018)

Isocitrato liase

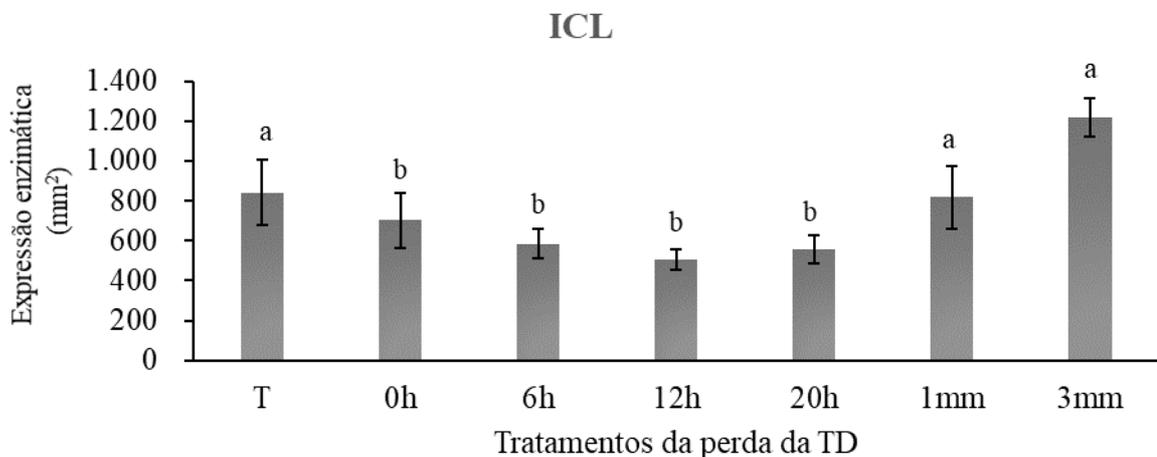
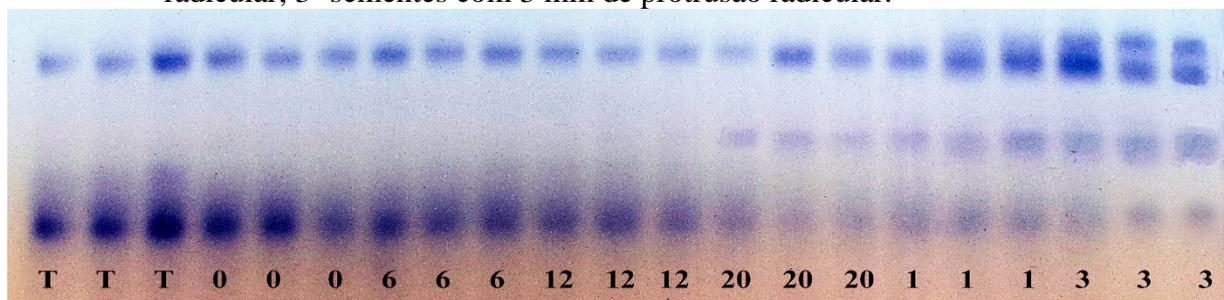
A expressão da isoenzima isocitrato liase (ICL) referente aos tratamentos de caracterização da perda da tolerância à dessecação durante o processo germinativo de sementes de girassol é apresentado na Figura 13.

Observa-se maiores expressões da isoenzima ICL para a testemunha e os tratamentos com protrusão radicular, que não diferiram estatisticamente entre si, e uma menor expressão para os tratamentos antes da protrusão radicular, que foram submetidos a 72 horas de desidratação em sílica gel.

Com base na expressão dessa enzima verifica-se que, em sementes de girassol, a isocitrato liase tem uma atividade pré-existente devido a sua expressão nas sementes utilizadas como testemunha, as quais não foram embebidas e nem desidratadas em sílica gel.

A desidratação das sementes após períodos de embebição pré-determinados pode ter causado um estresse, que afetou a atividade dessa enzima. Contudo, com a protrusão radicular foi requerida uma maior atividade de ICL para metabolização das reservas lipídicas das sementes de girassol, afim de se obter carboidrato, e distribuí-lo para as plântulas em crescimento (CIONI; PINZAUTI; VANNI, 1981), o que explica a alta atividade desta enzima no momento protrusão radicular.

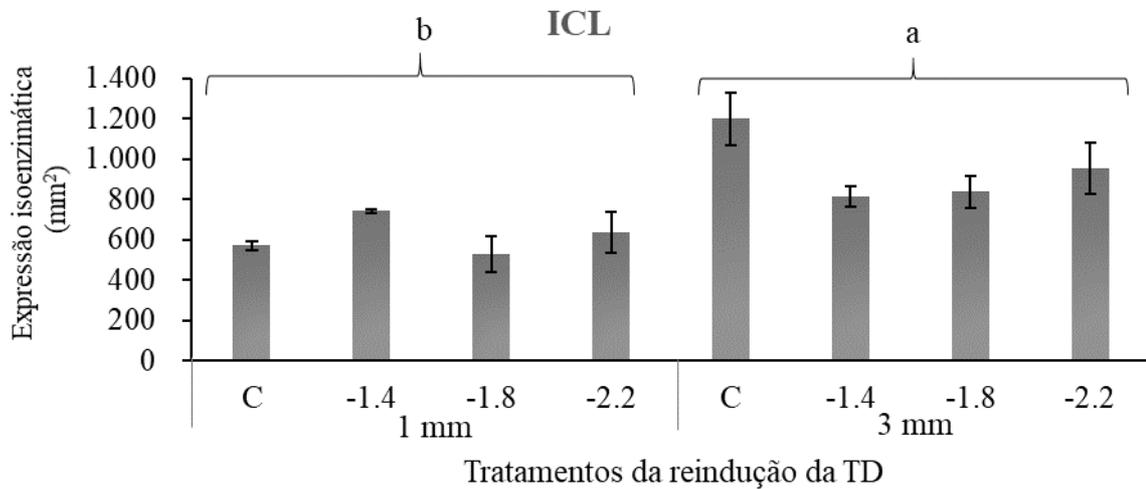
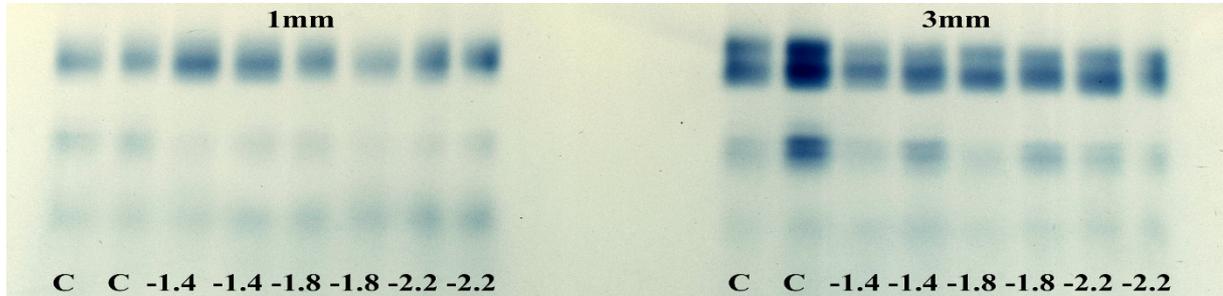
Figura 13 – Expressões da isoenzima isocitrato liase (ICL) de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) submetidas aos tratamentos de caracterização da perda da tolerância à dessecação (TD) durante o processo germinativo. Tratamentos: T- testemunha; 0- 0 horas de embebição; 6- 6 horas de embebição; 12- 12 horas de embebição; 20- 20 horas de embebição; 1- sementes com 1 mm de protrusão radicular; 3- sementes com 3 mm de protrusão radicular.



Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.
Fonte: Do autor (2018)

Em relação ao padrão eletroforético da isocitrato liase dos tratamentos de reindução da tolerância à dessecação de sementes de girassol (FIGURA 14), houve somente efeito isolado do fator comprimento radicular, no qual as sementes com 3 mm de radícula apresentaram maior intensidade de bandas da isoenzima ICL em relação as com 1 mm de protrusão radicular.

Figura 14 – Expressões da isoenzima isocitrato liase (ICL) de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) de 1 mm e 3 mm de protrusão radicular submetidas a diferentes tratamentos de reindução da tolerância à dessecação (TD). Tratamentos: C – controle; -1,4 - PEG -1.4 MPa; -1,8 - PEG -1.8 MPa; -2,2 - PEG -2.2 MPa.



Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.
Fonte: Do autor (2018)

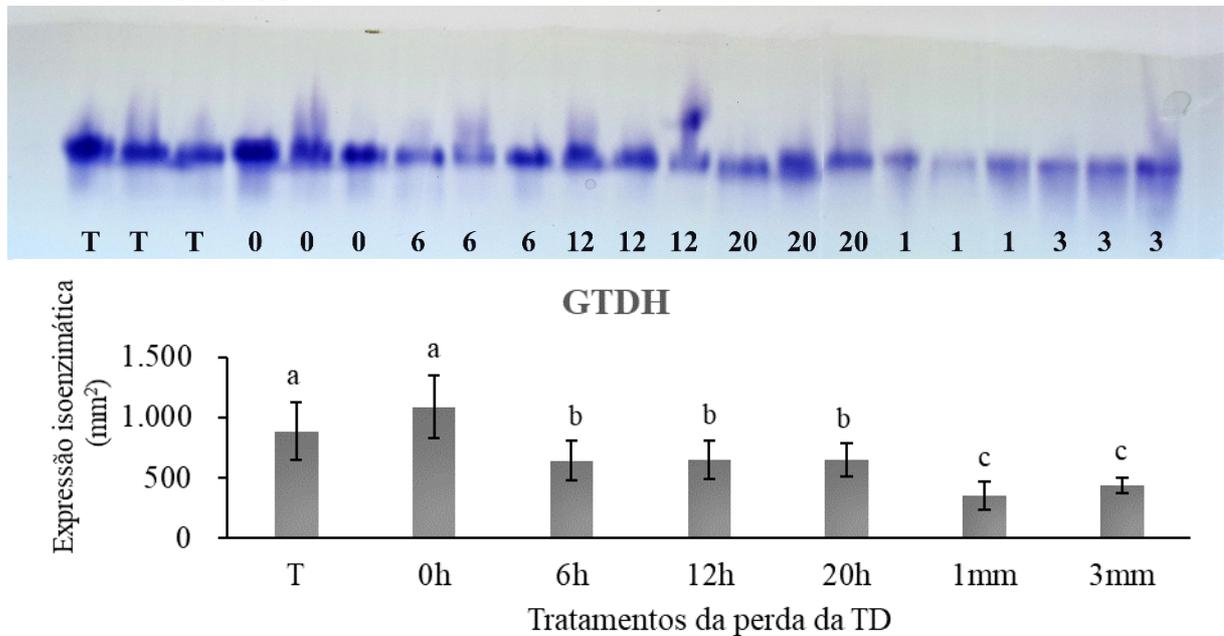
O aumento na expressão da isocitrato liase, com o crescimento radicular, está relacionado com a maior necessidade de metabolização de reservas lipídicas para o desenvolvimento, nesse estágio de crescimento. A atividade da isocitrato liase aumenta durante a germinação das sementes, obtendo-se valores máximos de expressão da mesma quando ocorre o máximo da proporção de lipídios degradados para a síntese de sacarose (MARTINS et al., 2000).

Glutamato desidrogenase

A expressão da isoenzima glutamato desidrogenase (GTDH) referente aos tratamentos de caracterização da perda da tolerância à dessecação durante o processo germinativo de sementes de girassol é apresentado na Figura 15.

Esta isoenzima apresentou diminuição de sua expressão ao longo do processo germinativo. Os tratamentos não submetidos a embebição apresentaram maior expressão da GTDH, mesmo o tratamento submetido a 72 horas de desidratação em sílica gel, seguidos da diminuição da expressão dessa enzima nos tratamentos que foram submetidos a 6, 12 e 20 horas de embebição, as quais não diferiram estatisticamente entre si. A menor expressão foi observada para os tratamentos após a protrusão radicular.

Figura 15 – Expressões da isoenzima glutamato desidrogenase (GTDH) de eixos embrionários de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) submetidas aos tratamentos de caracterização da perda da tolerância à dessecação (TD) durante o processo germinativo. Tratamentos: T- testemunha; 0- 0 horas de embebição; 6- 6 horas de embebição; 12- 12 horas de embebição; 20- 20 horas de embebição; 1- sementes com 1 mm de protrusão radicular; 3- sementes com 3 mm de protrusão radicular.



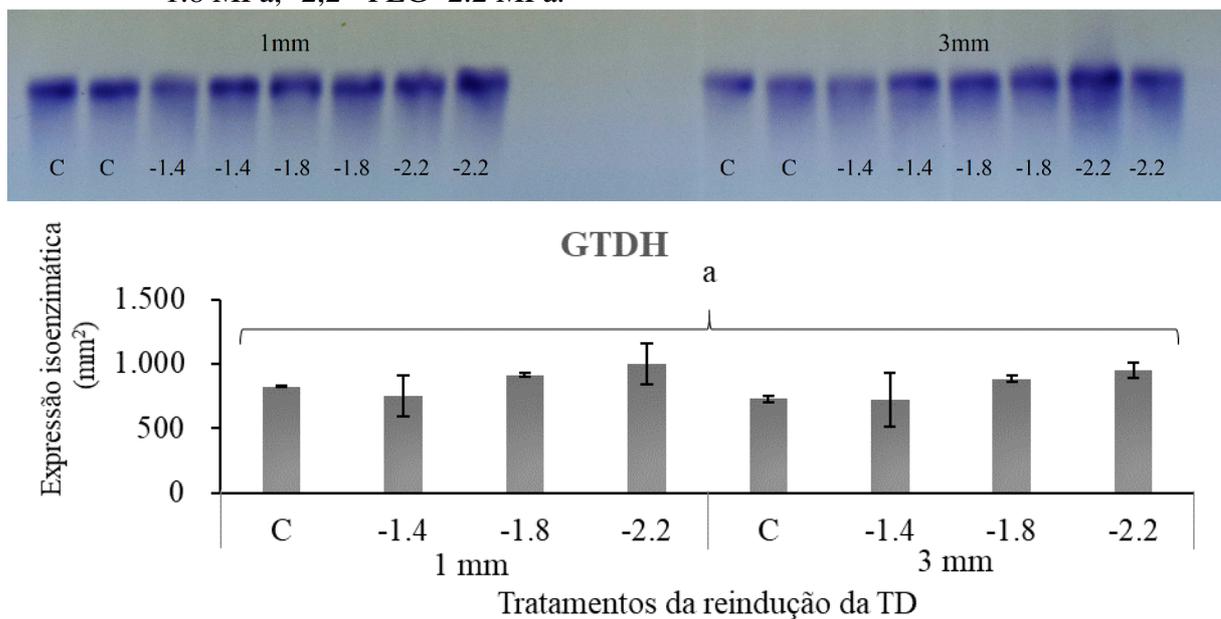
Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.
Fonte: Do autor (2018)

Esse comportamento é esperado durante o processo germinativo, pois esta enzima trabalha para fornecer intermediários para o ciclo de Krebs. No entanto, no período de germinação, as sementes começam a exigir maior metabolização de lipídeos para a geração de energia do que os intermediários do ciclo de Krebs, o que explica a diminuição da GTDH ao longo do processo germinativo, e o aumento da atividade da isocitrato liase com a protrusão radicular (FIGURA 13).

Pires et al. (2017) estudando as alterações fisiológicas e enzimáticas durante o processo germinativo de sementes de gergelim, verificaram que a enzima GTDH apresentou atividade constante até antes da protrusão radicular, com diminuição da atividade dessa enzima após esse momento, coincidindo com o aumento da atividade da isocitrato liase.

Para os tratamentos de reindução da tolerância à dessecação, observa-se um padrão semelhante de expressão da isoenzima glutamato desidrogenase para todos tratamentos, não havendo diferença estatística para nenhum dos fatores estudados (FIGURA 16).

Figura 16 – Expressões da isoenzima glutamato desidrogenase (GTDH) de eixos embrionários de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) de 1 mm e 3 mm de protrusão radicular submetidas a diferentes tratamentos de reindução da tolerância à dessecação (TD). Tratamentos: C – controle; -1,4 - PEG -1.4 MPa; -1,8 - PEG -1.8 MPa; -2,2 - PEG -2.2 MPa.



Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Barras verticais representam o desvio padrão das médias.

Fonte: Do autor (2018)

Embora a diminuição na atividade desta enzima seja esperada com o avanço do processo germinativo, sua atividade após a protrusão radicular indica que o estresse da desidratação não foi prejudicial ao ponto de inibir sua atividade.

5 CONCLUSÕES

Em sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) a tolerância à dessecação é perdida após 1 mm de protrusão radicular.

Os tratamentos de reindução da tolerância à dessecação com polietilenoglicol (PEG) aplicados as sementes de girassol com 1 mm de radícula foram capazes de restabelecer a sobrevivência em baixas porcentagens, com destaque para o tratamento com PEG -1,8 MPa.

Os tratamentos de reindução da tolerância à dessecação com polietilenoglicol (PEG) não foram eficientes para restabelecer a germinação das sementes de girassol com 3 mm de radícula.

Ocorre redução da abundância de proteínas resistentes ao calor com a perda da tolerância à dessecação em sementes de girassol.

Não foram observadas alterações da expressão da isoenzima superóxido dismutase (SOD) com a perda da tolerância à dessecação em sementes de girassol.

Ocorre redução da expressão das isoenzimas catalase (CAT) e peroxidase (POX) com a perda da tolerância à dessecação em sementes de girassol, principalmente com 3 mm de radícula.

A redução na expressão da isoenzima esterase (EST) está relacionada à baixa qualidade fisiológica das sementes de girassol com a perda da tolerância à dessecação.

A expressão das isoenzimas de mobilização de reservas, isocitrato liase (ICL) e glutamato desidrogenase (GTDH) não foram afetadas com a perda da tolerância à dessecação em sementes de girassol.

Os tratamentos de reindução da tolerância à dessecação não alteraram a expressão das isoenzimas estudadas (SOD, CAT, POX, EST, ICL e GTDH).

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, K. S. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a embebição de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 12-19, 2009.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2.ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006.
- ALPERT, P. The discovery, scope and puzzle of desiccation tolerance in plants. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 151, n. 1, p. 5–17, 2000.
- ALPERT, P. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. **Integrative and Comparative Biology**, Mclean, v. 45, n. 5, p. 685–695, 2005.
- ALPERT, P.; OLIVER, M. J. Drying without dying. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Ed). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallington: CABI, 2002. cap. 1, p. 3-43.
- 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.
- ARTUR, M. A. S. **Processos fisiológicos e anatômicos associados à embebição e perda da tolerância à dessecação em sementes de *Erythrina falcata* Benth**. 2014. 76p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Pre-sowing seed treatment - A shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 88, p. 223-271, 2005.
- AUNG, U. T.; MCDONALD, M. B. Changes in esterase activity associated with peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed deterioration. **Seed Science Technology**, Zurich, v. 23, p. 101-111, 1995.
- BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 19, n. 2, p. 279- 286, 1991.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Frontiers in Plant Science**, New Haven, v. 4, n. 478, p. 1–9, 2013.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum, 1994.
- BEWLEY, J. D. et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3rd ed. New York: Springer, 2013.
- BLACKMAN, S. et al. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, Washington, v. 96, n. 3, p. 868–74, 1991.

- BOSWELL, L. C.; MOORE, D. S.; HAND, S. C. Quantification of cellular protein expression and molecular features of group 3 LEA proteins from embryos of *Artemia franciscana*. **Cell Stress and Chaperones**, [s. l.] v. 19, n. 3, p. 329–341, 2014.
- BOUDET, J. et al. 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**, Bethesda, v. 140, n. 4, p. 1418–1436, 2006.
- BRANDÃO JUNIOR, D.S. et al. Adequação do teste de condutividade elétrica para determinar a qualidade fisiológica de sementes de girassol. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.7, n. 1/2, p. 184, 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 398 p.
- BRUCE, T. J. et al. Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, Limerick, v. 173, n. 6, p. 603-608, 2007.
- BRUGGINK, T.; VAN DER TOORN, P. Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 5, n. 1, p. 1–4, 1995.
- BUITINK, J. et al. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 13, n. 4, p. 273–286, 2003.
- 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. **Plant Journal**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 735-750, 2006.
- CARVALHO, E. R. et al. Alterações isoenzimáticas em sementes de cultivares de soja em diferentes condições de armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 12, p. 967-976, 2014.
- CASTRO, L. S.; SILVA JÚNIOR, A. G. Análise da volatilidade de preços do óleo de girassol no Brasil de 1960 a 2011. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 76-84, 2013.
- CHEN, Q. et al. Proteomic profiling and redox status alteration of recalcitrant tea (*Camellia sinensis*) seed in response to desiccation. **Planta**, Berlin, v. 233, n. 3, p.583–592, 2011.
- CIONI, M.; PINZAUTI, G.; VANNI, P. Comparative biochemistry of the glyoxylate cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.70, n.1, p.1-26, 1981.
- CONTRERAS-PORCIA, L. et al. Identification of Copper-Induced Genes in the Marine Alga *Ulva compressa* (Chlorophyta). **Marine Biotechnology**, New York, v. 13, n. 3, p. 544–556, 2011.
- CORRÊA, P. C.; AFONSO JÚNIOR, P. C. Uso do teste de condutividade elétrica na avaliação dos danos provocados por diferentes taxas de secagem em sementes de feijão. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 1, n. 1, p. 21-26. 1999.

COSTA, M. C. D. **Armazenamento de plântulas de *Sesbania virgata***. 2011. 79 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

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.

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

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.

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

EFEOĞLU, B. Heat Shock Proteins and Heat Shock Response in Plants. **Gazi University Journal of Science**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 67–75, 2009.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An Intermediate Category of Seed Storage Behaviour ? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167–1174, 1990.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Girassol**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/girassol>>. Acesso em 10/01/2018.

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

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 61, p. 243–282, 1999.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

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.

GOLOVINA, E. A; HOEKSTRA, F. A; VAN AELST, A C. The competence to acquire cellular desiccation tolerance is independent of seed morphological development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 358, p. 1015–1027, 2001.

- GUIMARÃES, C. C. et al. 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**, Londrina, v. 33, p. 207-215, 2011.
- HAND, S. C. et al. LEA Proteins During Water Stress: Not Just for Plants Anymore. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 73, p. 115–134, 2011.
- HARRINGTON, J. F. **Seed storage and longevity**. In: KOZLOWSKI, T. T. (Ed.). Seed biology. New York: Academic, 1972. cap. 3, p. 145-245.
- HOEKSTRA, F. A. Differential Longevities in Desiccated Anhydrobiotic Plant Systems. **Integrative and Comparative Biology**, Mclean, v. 45, n. 5, p. 725–733, 2005.
- ImageJ®. **Image Processing and Analysis in Java**. [s.l.] 2018. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/> . Acesso em 05/01/2018.
- ISTA. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **ISTA Handbook on seedling evaluation**. 3rd ed., ISTA: Basserdorf, 2006.
- JOSÉ, A. C.; SILVA, E. A. DA; DAVIDE, A. C. Classificação fisiológica de sementes de cinco espécies arbóreas de mata ciliar quanto a tolerância à dessecação e ao armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 171–178, 2007.
- KERMODE, A.R.; FINCH-SAVAGE, B. E. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Ed). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallington: CABI, 2002. cap. 5, p. 149-184.
- KOSTER, K.L.; LEOPOLD, A.C. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Washington, v. 88, n. 3, p. 829-832, 1988.
- KRANNER, I.; BIRTIC, S. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. **Integrative and Comparative Biology**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 734-40, 2005.
- KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, Cambridge, v. 188, n. 3, p. 655–673, 2010.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**, 4 ed., São Paulo: Servier, 2006.
- LEPRINCE, O. et al. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating mayze (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, Cambridge, v. 116, n. 4, p. 573-580, 1990.
- LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 4, p. 231–246, 1993.

- LEPRINCE, O. et al. The Involvement of Respiration in Free Radical Processes during Loss of Desiccation Tolerance in Germinating *Zea mays* L. (An Electron Paramagnetic Resonance Study). **Plant Physiology**, Washington, v. 104, n. 4, p. 1333–1339, 1994.
- LEPRINCE, O.; BUITINK, J. Desiccation tolerance: From genomics to the field. **Plant Science**, Limerick, v. 179, n. 6, p. 554–564, 2010.
- LIN, T.; YEN, W.; CHIEN, C. Disappearance of desiccation tolerance of imbibed crop seeds is not associated with the decline of oligosaccharides. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, n. 324, p. 1203-1212, 1998.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p.176-77, 1962.
- MAIA, J. et al. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds and its associated transcriptome. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 12, e29123, 2011.
- MAIA, J. et al. Abscisic acid (ABA) sensitivity regulates desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis* seeds. **New Phytologist**, Cambridge, v. 203, n. 1, p. 81–93, 2014.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed., Londrina: ABRATES, 2015.
- MARTINS, A. da S. **Aspectos fisiológicos e moleculares da tolerância à dessecação em sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan**. 2015. 80 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.
- MARTINS, C. A. O. et al. Atividade da isocitrato-liase durante a germinação de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.22, n. 1, p.42-46, 2000.
- MASETTO, T. E.; FARIA, J. M. R.; FRAIZ, A. C. R. Loss and re-establishment of desiccation tolerance in the germinated seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) (Pers.). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 37, n. 3, p. 313–320, 2015.
- MIAZEK, A.; BOGDAN, J.; ZAGDANSKA, B. Effects of water during germination of wheat seeds. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 44, n. 3, p. 397-403, 2001.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p.405-410, 2002.
- NEUMANN, M. et al. Girassol (*Helianthus annuus* L.) para produção de silagem de planta inteira. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, Guarapuava, v. 2, n. 3, p. 181-190, 2009.
- NKANG, A.; OMOKARO, D.; EGBE, A. Effects of desiccation on the lipid peroxidation and activities of peroxidase and polyphenoloxidase in seeds of *Telfairia occidentalis*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 28, n. 1, p. 1–9, 2000.
- NTULI, T. M. et al. Increased Drying Rate Lowers the Critical Water Content for Survival in Embryonic Axes of English Oak (*Quercus robur* L.) Seeds. **Journal of Integrative Plant Biology**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 270–280, 2011.

O'BRIEN, R. D. **Fat and oils: formulating and processing of applications**. 3 ed. Boca Raton: CRC Press, 2009.

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

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.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Some thoughts on the evolution and ecology of recalcitrant seeds. **Plant Species Biology**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 153–156, 2000.

PIRES, R. M. O. et al. Physiological and enzymatic alterations in sesame seeds submitted to different osmotic potentials. **Genetics and Molecular Research**, [s. l.], v. 16, n. 3, 2017.

PULIDO, P.; CAZALIS, R.; CEJUDO, F. J. An antioxidant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress. **Plant Journal**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 132–145, 2009.

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

RESENDE, M. L. **Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a germinação de sementes de café (*Coffea arabica*) cv. Rubi**. 2006. 119p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

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

RODRIGUES, A. C. et al. Reindução da tolerância à dessecação em sementes de *Bauhinia forficata* link (Fabaceae). **Cerne**, Viçosa, v. 21, n. 4, p. 579–586, 2015.

ROSA, D. V. F. S. et al. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas lea associadas à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 27, n. 2, p. 91–101, 2005.

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

SEILER, G. J. Influence of temperature on primary and lateral root growth of sunflower seedling. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 40, n. 2, p. 135–146, 1998.

SHANKER, A. K. et al. Drought stress responses in crops. **Functional & Integrative Genomics**, Berlin, v. 14, n. 1, p. 11–22, 2014.

SILVA, A. C. da. **Re-indução da tolerância à dessecação em sementes germinadas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. (Walp.))**. 2015. Tese (Doutorado em Agronomia (Agricultura)) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2015.

SOARES, G. C. M. et al. Physiological and biochemical changes during the loss of desiccation tolerance in germinating *Adenanthera pavonina* L. seeds. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 4, p. 2001–2011, 2015.

SU, P. H.; LI, H. M. Arabidopsis stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. **Plant Physiology**, Washington, v. 146, n. 3, p. 1231–1241, 2008.

SUN, W. Q. Desiccation sensitivity of recalcitrant seeds and germinated orthodox seeds: can germinated orthodox seeds serve as a model system for studies of recalcitrance? In: IUFRO seed symposium “recalcitrant seeds”, 1998, Kuala Lumpur. **Proceedings...**: Kuala Lumpur: Forest Research Institute, 1999. p. 29–42.

TANG, W. . Peroxidase activity of desiccation-tolerant loblolly pine somatic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 36, n. 6, p. 488–491, 2000.

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

VEIGA, A. D. et al. Tolerância de sementes de soja à dessecação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 773–780, 2007.

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.

VIEIRA, R. D. et al. Electrical conductivity and initial moisture content of soybean seeds. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n. 9, p.1333-1338, 2002.

WEHMEYER, N.; VIERLING, E. 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**, Washington, v. 122, n. 4, p. 1099–1108, 2000.