



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



MECANISMOS DE TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM
SEMENTES DE *Annona crassiflora* MART. E *Annona glabra* L.

MARIANA DE FÁTIMA DE-PIERI-OLIVEIRA

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Biociências, campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Botânica).



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

MECANISMOS DE TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM
SEMENTES DE *Annona crassiflora* Mart, e *Annona glabra* L.

MARIANA DE FÁTIMA DE-PIERI-OLIVEIRA

ORIENTAÇÃO: PROF^a DR^a GISELA FERREIRA

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Biociências, campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Botânica).

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

De-Pieri-Oliveira, Mariana de Fátima.

Mecanismos de tolerância à dessecação em sementes de
Annona crassiflora MART. e *Annona glabra* L. / Mariana de
Fátima De-Pieri-Oliveira. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Gisela Ferreira

Capes: 20303009

1. Annonaceae. 2. Enzimas. 3. Antioxidantes. 4. Proteínas.
5. Secagem. 6. Sementes.

Palavras-chave: Annonaceae; enzimas antioxidantes;
proteínas LEA; secagem de sementes.

“O que com amor faço, não sinto cansaço!”

Desconhecido

DEDICO,
Ao meu marido **Jônata Nascimento de Oliveira**
e aos meus pais **José Claudio De Pieri e Eloisa
de Fátima Alves**, pois vocês são meu porto
seguro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos. Código de Financiamento 001.

Ao Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu, por ceder sua infraestrutura para a realização desse projeto.

Ao Arildo José dos Santos, Arislene Siqueira dos Santos, Daniel Francisco Tavares, Fabrício Francisco Tavares, Pedro Tavares e Sônia Francisco Tavares por disponibilizarem os frutos e sementes de Marolo para a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos e a Universidade Federal de Alagoas (UFAL) por disponibilizarem os frutos e sementes de *Annona glabra* para a realização do trabalho.

A Profa. Dra. Gisela Ferreira, pela orientação, confiança, amizade e dedicação na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos, por viabilizar e auxiliar as análises de proteínas LEA.

A Profa. Dra. Silvia Rodrigues Machado e sua aluna Ma. Daiane Maia de Oliveira por viabilizar e auxiliar as análises anatômicas.

A Profa. Dra. Camila Kissman pelas conversas e auxílio quando precisei.

A Profa. Dra. Carmen Silvia F. Boaro e aos funcionários da Pós-Graduação por todo o auxílio e dedicação.

A Profa. Dra. Elizabeth Orika Ono, por viabilizar as extrações para as análises bioquímicas.

A Profa. Dra. Tatiane Maria Rodrigues pela disposição em ajudar nas análises de ultraestrutura.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Botânica do IBB (UNESP), por todo auxílio, amizade e conversas.

A Deus, por sua infinita bondade e por sempre me abençoar e amparar.

Aos meus pais Eloisa de Fátima Alves e José Claudio De Pieri, meus avós, irmãos e cunhados por cuidarem sempre de mim, não deixando que nada me faltasse, pela confiança, respeito e amor.

Ao meu querido marido Jônata Nascimento de Oliveira por ser meu companheiro de todas as horas e por todo auxílio e paciência durante a realização dos experimentos e escrita.

As minhas amigas Carolina Oville Mimi, Marília Caixeta Sousa e Patrícia Carriel Correa por todos os momentos de alegria e trabalho, sou grata por tudo.

A todos os colegas do laboratório de germinação pelos momentos memoráveis.

A Cibele dos Santos Borges, Paula Prado Pontes, Scarlet Marques de Oliveira e Ana Flávia Quiarato Lozano pela convivência e parceria de sempre.

A Laísa Tais Cabral Rodrigues e Giovanna Shizue Takahashi pela amizade e parceria de sempre.

A Francisca Zildélia da Silva e Felipe Giroto Campos por toda a ajuda nas análises enzimáticas.

A minha família, pelo exemplo de simplicidade e união.

Aos meus amigos, todos, sem exceção! Não deixarei escrito aqui nomes, para não cometer o erro de esquecer alguém. Obrigada pelas risadas, apoio e companhia!

Sumário

RESUMO	8
ABSTRACT-	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. CAPÍTULO 1: Revisão de literatura	13
2.1. <i>Desenvolvimento e maturação de sementes</i>	13
2.2. <i>Tolerância à dessecação (TD) de sementes</i>	13
2.2.1. <i>Proteínas da embriogênese tardia -LEA</i>	14
2.2.2. <i>Carboidratos</i>	16
2.2.3. <i>Proteção aos radicais livres</i>	17
2.3. <i>Família Annonaceae e a tolerância à dessecação</i>	19
3. CAPÍTULO 2: Artigo.....	21
Resumo	22
Abstract	24
3.3. Introdução	26
3.4. Material e Métodos	27
<i>Curva de secagem</i>	28
<i>Teste de germinação</i>	28
<i>Análises bioquímicas</i>	29
<i>Perfil e quantificação de açúcares</i>	30
<i>Determinação de Proteínas LEA</i>	30
<i>Teores de Lipoperóxido</i>	31
<i>Análises estatísticas</i>	31
3.5. Resultados.....	32
3.6. Discussão	46
3.7. Conclusões	51
3.8. Agradecimentos	51
3.9. Literatura Citada	52
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
5. REFERÊNCIAS	56

DE-PIERI-OLIVEIRA, M.F. Mecanismos de tolerância à dessecação em sementes de *Annona crassiflora* Mart. e *Annona glabra* L. 2019. 62p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

RESUMO- Para que as plantas conseguissem conquistar o ambiente terrestre, foi necessário desenvolver habilidades que as tornassem capazes de sobreviver aos desafios de seu *habitat*, dentre as quais estão o desenvolvimento de mecanismos de tolerância à dessecação das sementes. Espécies que habitam locais com grande disponibilidade de água tendem a produzir sementes recalcitrantes e por outro lado, as espécies que habitam locais secos, como os Cerrados, tendem a produzir sementes ortodoxas, conseguindo tolerar períodos de seca sem acumular danos que prejudiquem a germinação. Dentre os sistemas que atuam no mecanismo de tolerância à dessecação estão a atividade de enzimas antioxidantes, o acúmulo de açúcares e a atividade das proteínas da embriogênese tardia (LEA). A família Annonaceae possui espécies inseridas em *habitats* contrastantes, como a *Annona crassiflora*, oriunda do Cerrado e a *Annona glabra*, oriunda de manguezais o que as torna interessantes para avaliar se suas sementes apresentam diferentes respostas frente à tolerância à dessecação. Para alcançar esse objetivo, sementes das duas espécies foram coletadas e avaliadas após submissão a diferentes níveis de secagem (teor inicial de água, 20%, 10% e 5%) e secagem seguida de reidratação. Foram realizados testes de germinabilidade, quantificação enzimática (superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), peroxidase (POD) (EC 1.11.1.7) e catalase (CAT) (EC 1.11.1.6)); de açúcares (frutose, galactose, glicose, manose, sacarose e trealose); determinação de proteínas LEA e teor de lipoperóxido. Os resultados mostraram que as sementes de *A. crassiflora* foram capazes de tolerar secagem até teor de água de 10% e *A. glabra* até 5%, além disso, a atividade das enzimas antioxidantes variou entre as espécies em função da secagem das sementes, de modo que para sementes de *A. crassiflora* a superóxido dismutase foi a enzima que apresentou maiores alterações em sua atividade enquanto que nas sementes de *A. glabra* foram a catalase e a peroxidase. Por outro lado, em ambas as espécies ocorreram reduções do conteúdo de açúcares solúveis totais com a secagem, e após reidratação a redução foi apenas nas sementes de *A. glabra*. Em *A. crassiflora* o número de proteínas LEA foi reduzido com a secagem, o que resultou em menor capacidade das sementes de tolerar os maiores níveis de secagem (teor de água de 5%), enquanto em *A. glabra* o número se manteve e as sementes suportaram secagem até 5%. As respostas distintas destes sistemas juntamente com a redução de danos de membrana celular observada pela análise de lipoperóxido e das taxas de

germinação mostram a ação distinta dos diferentes mecanismos envolvidos para garantir os diferentes níveis de tolerância à dessecação nestas espécies.

Palavras-chave: Annonaceae; enzimas antioxidantes; proteínas LEA; secagem de sementes.

DE-PIERI-OLIVEIRA, M.F. Mechanisms of desiccation tolerance in seeds of *Annona crassiflora* Mart. and *Annona glabra* L. 2019 62.p DISSERTATION (MASTER'S) - INSTITUTE OF BIOSCIENCES, UNESP – SÃO PAULO STATE UNIVERSITY, BOTUCATU.

ABSTRACT- In order for plants to conquer the terrestrial environment, it was necessary to develop skills that would enable them to survive the challenges of their habitat, including the development of seed desiccation tolerance mechanisms. Species that inhabit places with high water availability tend to produce recalcitrant seeds and, on the other hand, species that inhabit dry places, such as Cerrados, tend to produce orthodox seeds, being able to tolerate periods of drought without accumulating germinating damage. Systems that act on the desiccation tolerance mechanism include antioxidant enzyme activity, sugar accumulation, and late embryogenesis (LEA) protein activity. The Annonaceae family has species in contrasting habitats, such as *Annona crassiflora*, from the Cerrado and *Annona glabra*, from mangroves, which makes them interesting to evaluate if their seeds have different responses to desiccation tolerance. To achieve this goal, seeds of both species were collected and evaluated after submission to different drying levels (initial water content, 20%, 10% and 5%) and drying followed by rehydration. Germinability, enzymatic quantification (superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), peroxidase (POD) (EC 1.11.1.7) and catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) tests were performed; sugars (fructose, galactose, glucose, mannose, sucrose and trehalose); determination of LEA proteins and lipoperoxide content. The results showed that *A. crassiflora* seeds were able to tolerate drying up to 10% water content and *A. glabra* up to 5%. Moreover, the activity of antioxidant enzymes varied among species as a function of drying of seeds, for *A. crassiflora* seeds, superoxide dismutase was the enzyme that showed the greatest alterations in its activity, whereas in *A. glabra* seeds it was catalase and peroxidase. On the other hand, in both species there were reductions in the total soluble sugar content with drying, and after rehydration the reduction was only in *A. glabra* seeds. In *A. crassiflora* the number of LEA proteins was reduced with drying, which resulted in lower seed capacity to tolerate the highest drying levels (5% water content), while in *A. glabra* the number remained and seeds could withstand drying up to 5%. The distinct responses of these systems together with the reduction in cell membrane damage observed by lipoperoxide analysis and germination rates show the distinct action of the different mechanisms involved to ensure the different levels of desiccation tolerance in these species.

Keywords: Annonaceae; antioxidant enzymes; LEA proteins; drying of seeds.

1. Introdução

A tolerância à dessecação é a capacidade que determinados organismos possuem de sobreviver às situações de ausência de água. Ao longo da evolução, para que as plantas conseguissem conquistar a terra, esta característica foi fundamental e atualmente é encontrada nos *taxa* dos fungos, plantas (sementes) e bactérias (DEKKERS et al., 2015).

No final do estágio de formação, durante a maturação, a semente pode permanecer hidratada e sem necessitar de um período de repouso pós-maturidade sendo geralmente dispersa pela planta-mãe em locais úmidos e com temperatura relativamente elevada, germina rapidamente e garante vantagem na competição com as outras sementes. Este comportamento indica recalcitrância (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1988). Ao contrário, nas sementes ortodoxas ocorre desidratação e com esta condição, as sementes podem resistir à escassez de água no ambiente e se não existir dormência, reassumir a atividade metabólica para germinar quando estiver em condições favoráveis (ANDRADE et al., 2005; BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998; NEVES, 1994). Existem ainda as intermediárias, que segundo Ellis et al. (1990) toleram alguma secagem, porém não a níveis tão baixos de água quanto às ortodoxas, o que poderia prejudicar a sua longevidade.

As diferentes respostas dos mecanismos presentes nas sementes são consequências das necessidades que as plantas passaram no decorrer dos anos, durante o processo evolutivo. Deste modo, as sementes das plantas que se depararam com a escassez de água, necessitaram desenvolver adaptações para sobreviverem a tais condições. Assim, a maioria das espécies que produzem sementes recalcitrantes são endêmicas dos trópicos e subtropicais úmidos (BERJAK; PAMMENTER, 2008), como exemplo, a *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. originária de regiões naturalmente alagadas e *Euterpe edulis* Mart. originária da Mata Atlântica, ambas recalcitrantes, uma vez que não houve necessidade de adaptação à condição de seca (ANDRADE; PEREIRA, 1997; FISCH; NOGUEIRA JR; MANTOVANI, 2006; PIÑA-RODRIGUES; FIGLIOLIA, 2005).

Segundo Tweddle et al. (2003) a proporção de espécies recalcitrantes diminui à medida que o *habitat* se torna mais seco, sendo mais comuns em zonas de vegetação úmida e relativamente sazonal e menos frequentes, mas não ausentes, em *habitats* áridos e altamente sazonais, o que está de acordo com o levantamento de 50 espécies oriundas do Cerrado realizado por Costa (2009), onde 37 foram classificadas como ortodoxas, nove como recalcitrantes, três intermediárias e uma como recalcitrante/intermediária. Deste modo, no

domínio Cerrado há maior incidência de espécies ortodoxas e estas espécies tiveram que se adaptar a condições de seca ou a restrições hídricas até que condições favoráveis à germinação ocorressem.

As adaptações colaboraram com a evolução das sementes, pois com o desenvolvimento de mecanismos específicos (sistema antioxidante, as proteínas LEA e a atuação dos açúcares) foi possível sobreviver após a desidratação (ZHU, Y et al. 2006 citado por BAI et al., 2015). Tais mecanismos são capazes de evitar os danos celulares provocados pela secagem e garantir o redirecionamento do metabolismo após a reidratação, com a finalidade de reiniciar o processo de germinação (WALTERS, 2000). Em contrapartida, as sementes recalcitrantes, por não apresentarem a fase de secagem durante a maturação, não possuem eficiência dos mecanismos de tolerância à dessecação sendo, portanto dispersas com alto conteúdo de água e conseqüentemente com o metabolismo ativo e por isso, quando expostas a secagem perdem sua viabilidade (BERJAK; PAMMENTER, 2008; BERJAK; VERTUCCI; PAMMENTER, 1993; PAMMENTER; BERJAK, 2000).

De fato, acredita-se que a capacidade de tolerar a dessecação possa estar envolvida com as condições impostas pelo *habitat* em que a espécie está inserida. Um exemplo disso são as sementes de espécies que ocorrem em manguezais que durante o desenvolvimento, prosseguem diretamente da maturação para a germinação, sem passar pela fase da desidratação (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). Porém, existem espécies capazes de tolerar a secagem, inseridas em *habitats* úmidos (CARVALHO; NASCIMENTO; MULLER, 2001), assim como espécies recalcitrantes em *habitats* com escassez de água (BERNARDES et al., 2007).

Como Annonaceae possui espécies presentes nos mais diversos *habitats*, desde Caatingas até manguezais (Flora do Brasil 2020), a família torna-se interessante para o presente estudo, elucidando os aspectos acima mencionados. Como demonstrado por Ferreira et al. (2019), a classificação das sementes de Annonaceae quanto à tolerância à dessecação não está subsidiada pelo estudo dos mecanismos de tolerância à dessecação, havendo lacuna em relação às sementes de Annonaceae. No entanto, pouco tem sido relatado quanto à tolerância à dessecação das sementes da família (CORSATO, 2014). *Annona glabra* L. é espécie nativa e possui como *habitat* natural os estuários e manguezais; *Annona crassiflora* Mart. também é espécie nativa que pode ser encontrada em campo sujo, cerrado e cerradão. Considerando que são espécies da mesma família, oriundas de *habitats* distintos, sendo A.

glabra classificada como ortodoxa (CARVALHO; NASCIMENTO; MULLER, 2001) e *A. crassiflora* não classificada e com os mecanismos de tolerância à dessecação ainda não esclarecidos, o objetivo deste estudo foi avaliar se sementes de *Annona* oriundas de *habitats* contrastantes apresentam diferentes respostas frente à tolerância à dessecação.

2. CAPÍTULO 1: Revisão de literatura

2.1. Desenvolvimento e maturação das sementes

O desenvolvimento e maturação das sementes possuem três fases: Crescimento inicial (expansão e divisão celular); Fase intermediária (expansão celular e deposição de reservas); E a terceira fase, que pode ser subdividida em dois comportamentos distintos em relação à perda de água: As sementes podem passar pela secagem durante um período pré-programado até atingirem níveis de teor de água inferiores a 10%, as quais foram classificadas como ortodoxas (ROBERTS, 1973) ou serem recalcitrantes, não passando por este período de secagem pré-programada e dispersas com o teor de água elevado e prontas para que o processo de germinação ocorra na ausência de dormência (WALTERS, 2000).

2.2. Tolerância à dessecação (TD) de sementes

A água é fundamental na manutenção das estruturas celulares e em sua ausência, as macromoléculas ficam expostas ao ataque de radicais livres, que levam a perda da função ou desestruturação (WALTERS, 2000). Nas sementes, tais danos podem ser evitados com a aquisição da tolerância à dessecação que pode ser adquirida ou não no final do estágio de maturação, momento em que o teor de água pode se manter elevado e indicar que esta semente não será capaz de tolerar a dessecação, ou ter o teor de água reduzido a valores próximos a 10%, um indicativo de que esta semente poderá ser ortodoxa e desenvolver mecanismos específicos capazes de lidar com a ausência de água sendo, portanto tolerante à dessecação (ANDRADE; SCHORN; NOGUEIRA, 2005; BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998). Nos embriões de *Phaseolus vulgaris* L. os danos membranares foram minimizados com a aquisição da tolerância à dessecação (LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993).

Além das sementes ortodoxas e recalcitrantes as sementes de café foram classificadas como intermediárias por não tolerar a dessecação em níveis abaixo de 12% de umidade e armazenamento em temperaturas abaixo de zero. (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990).

O mecanismo de proteção à dessecação é crucial para que sementes ortodoxas consigam tolerar situações de ausência de água e se tornem capazes de redirecionar o metabolismo para que ocorra o processo de germinação quando submetidas a condições ideais (WALTERS, 2000). Assim, a capacidade que determinados organismos possuem de sobreviver a situações de ausência de água é chamada de tolerância à dessecação (TD) e tal capacidade ocorre em fungos, bactérias e plantas (sementes) (DEKKERS et al., 2015).

Costa et al. (2016) identificaram genes compartilhados por múltiplos organismos que possuem a função de codificar proteínas envolvidas na proteção, crescimento e metabolismo energético de espécies tolerantes à dessecação, o que representou avanço para o conhecimento dos mecanismos de proteção à dessecação. Apesar disso, tais mecanismos envolvem muitos processos complexos, dificultando a classificação quanto ao comportamento fisiológico das sementes frente à dessecação.

A limitação da água impacta todos os tipos de organismos em algum estágio durante seu ciclo de vida; portanto, durante a evolução, muitas estratégias foram selecionadas para lidar com o déficit hídrico (BATTAGLIA et al., 2008). As sementes ortodoxas desenvolveram mecanismos específicos capazes de amenizar os danos causados pela dessecação, compostos pela atuação de proteínas da embriogênese tardia (*Late Embryogenesis Abundant*- LEA), carboidratos e enzimas antioxidantes (WALTERS, 2000).

2.2.1. Proteínas da embriogênese tardia -LEA

As proteínas LEA - Proteínas da Embriogênese Tardia (*Late Embryogenesis Abundant*- LEA) são acumuladas na fase final da maturação das sementes, (momento em que ocorre a aquisição da tolerância à dessecação) e durante o déficit hídrico nos órgãos vegetativos, sugerindo o papel de proteção durante a limitação da água (HOEKSTRA et al., 2001). O Ácido Abscísico (ABA) está envolvido com a codificação destas proteínas de modo que no início da embriogênese o conteúdo de ABA é baixo, porém entre as fases intermediária e final do desenvolvimento da semente este conteúdo atinge níveis mais elevados, o que proporciona o acúmulo de RNAs mensageiros responsáveis pela codificação de proteínas, dentre elas, as proteínas LEA (TAIZ et al., 2017).

Tais proteínas estão presentes não somente em plantas, mas também em microrganismos e possuem estrutura altamente conservada e semelhante a das desidrinas

(proteínas produzidas quando tecidos vegetais passam pela secagem) que são consideradas um subgrupo das proteínas LEA (DELSENY et al., 2001).

Inicialmente estas proteínas apresentam forma de bobina, mas ao passarem pelo processo de secagem, essa conformação é alterada para forma alfa-helicoidal que se assemelha aos filamentos intermediários do citoesqueleto. Esta conformação proporciona força e resistência às células vegetais, previne a plasmólise e a deformação celular (WISE; TUNNACLIFFE, 2004) além de atuar na redução do estresse oxidativo durante a desidratação das células, capturando espécies reativas do oxigênio (ROS) e/ou sequestrando íons metálicos que geram as ROS, (TUNNACLIFFE; WISE, 2007). Deste modo as proteínas LEA têm como função proteger as células quando estão em estado anidro, além de estabilizar as membranas e proteínas durante o estresse de baixa temperatura (LIU et al., 2016; PAMMENTER; BERJAK, 2000). As proteínas LEA também são capazes de prevenir a inativação de enzimas, de modo que as interações proteína-proteína são necessárias para a realização da sua função (OLVERA-CARRILLO; REYES; COVARRUBIAS, 2011).

As proteínas LEA, em conjunto com a sacarose, auxiliam na garantia da estabilidade das células em organismos que toleram a dessecação, agindo na formação do estado viscoso da matriz citoplasmática (BERJAK; PAMMENTER, 2008). Assim como alguns açúcares (oligossacarídeos, sacarose e trealose), as proteínas LEA também possuem a habilidade de proteger seus componentes intracelulares conforme ocorre dessecação nas sementes. Durante o desenvolvimento das sementes de soja há um acúmulo dessas proteínas no tecido embrionário, o que confirma a hipótese de que estas proteínas também são responsáveis pela aquisição da tolerância à dessecação das sementes (BLACKMAN et al., 1991). Corsato (2014) também verificou que nas sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. ocorre aumento das proteínas LEA com a diminuição do teor de água aos 91, 116 e 133 dias após a floração. Por outro lado, as sementes recalcitrantes são muito sensíveis à dessecação, o que nos leva a acreditar que alguns destes mecanismos de proteção à dessecação podem estar ausentes. (MARCOS FILHO, 2005).

Um estudo realizado com sementes de milho mostrou que o desempenho fisiológico das sementes tolerantes a dessecação está associado com a presença de proteínas LEA em seus tecidos (ROSA et al., 2005). Do mesmo modo, nas sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. foi observado que com a maturação houve a aquisição da tolerância à dessecação o que inclui o acúmulo de proteínas LEA as quais se mantiveram constantes até o final do processo

de maturação (TEIXEIRA et al., 2018). No entanto, apenas a presença de proteínas LEA não é eficiente para adquirir a capacidade de tolerar a dessecação, pois a tolerância à dessecação é um complexo mecanismo composto pela ação de sistemas como as enzimas antioxidantes, as proteínas e os carboidratos (WALTERS, 2000).

2.2.2. Carboidratos

Os carboidratos são acumulados durante o desenvolvimento da semente; atuam, de modo geral, na proteção contra os danos que a secagem pode causar comprometendo a integridade das células. Em sementes, carboidratos, proteínas e lipídios são os principais tipos de reservas. Uma porcentagem destes carboidratos são os solúveis como glicose, frutose, manose, galactose, sacarose e os oligossacarídeos da série rafínosica, de modo que a galactose e a sacarose desempenham função na proteção à membrana (BUCKERIDGE et al., 2000). Em sementes de *Arabidopsis* a síntese de galactose e rafinose não apresenta efeito no desenvolvimento da semente, mas influencia o tempo de aquisição da tolerância à dessecação durante o desenvolvimento das sementes (JING et al., 2018).

Os carboidratos podem atuar de duas formas nas sementes: como reservas de utilização rápida ou limitar os danos causados pela secagem em sementes maduras formando um estado viscoso ou vítreo capaz de retardar as reações químicas que podem vir a causar danos e impedir a fusão de membranas e consequente rompimento da célula (BUCKERIDGE et al., 2000). Os carboidratos solúveis, quando presentes nas células em proporções adequadas (cerca de 1% da massa seca da semente) contribuem com estado viscoso nas células e não permitem formação de cristais de gelo mesmo em temperatura abaixo de zero (JOSÉ; PINHO; DIAS, 2006). Com a formação deste estado viscoso, os processos bioquímicos que requerem difusão molecular são paralisados e a atividade das espécies reativas do oxigênio minimizadas (PAMMENTER; BERJAK, 2000; ROSA et al., 2005) mantendo-se a estabilidade das membranas durante a perda de água (MELLO et al., 2011). Este acúmulo de carboidratos ocorre durante a maturação das sementes e a concentração desses açúcares é menor durante o processo de embebição. Em soja, Koster; Leopold (1988) observaram redução nas concentrações de sacarose e oligossacarídeos correspondentes à perda da tolerância à dessecação das sementes durante a embebição.

A sacarose é formada por uma molécula de glicose e uma de frutose (BOSCOLO, 2003). Nas sementes tolerantes à dessecação está presente em abundância de modo que seu conteúdo aumenta em resposta à dessecação dos tecidos (CORSATO; FERREIRA;

BARBEDO, 2012; ILLING et al., 2005). Porém a sacarose não é uma molécula estável e tende a se cristalizar quando presente em elevadas concentrações o que pode ser prejudicial às células. É possível amenizar tal cristalização com a presença de oligossacarídeos da série rafínosica capazes de formar o estado viscoso e assim fornecer melhor proteção às células (JOSÉ; PINHO; DIAS, 2006; KIGEL; GALILI, 1995; LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993).

Para que as sementes possam adquirir tolerância à dessecação, os carboidratos, compostos polihidroxil, atuam de modo semelhante a água nas membranas, onde os grupos hidroxila podem se ligar hidrogenamente aos grupos de cabeças polares, fornecendo as interações hidrofílicas necessárias para a estrutura e estabilidade da membrana exposta à ausência de água (KOSTER; LEOPOLD, 1988).

2.2.3. *Proteção aos radicais livres*

Os radicais livres são as espécies reativas do oxigênio (ROS- *Reactive oxygen species*) que são produzidas nas células vivas em quantidades aumentadas com o estresse biótico ou abiótico (MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). O oxigênio nas espécies eucariontes está diretamente envolvido com os processos de divisão celular além de ser um ótimo receptor de elétrons em diferentes reações que ocorrem nas células (HENDRY, 1993).

As ROS, além de serem moléculas sinalizadoras capazes de regular os processos biológicos, também podem ser prejudiciais aos componentes celulares (MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). Um exemplo destes componentes são as membranas celulares que quando atacadas por radicais livres, podem ter suas células deterioradas através da peroxidação dos lipídios (HENDRY, 1993). O início da peroxidação ocorre com a presença dos radicais livres (ROS). Estes radicais que são moléculas quimicamente instáveis atuam perto da região insaturada dos ácidos graxos. Os ácidos graxos, quando peroxidados, causam a diminuição da fluidez da membrana e podem ainda, inativar receptores e proteínas das membranas o que influencia diretamente a permeabilidade dessa célula levando a morte celular (HENDRY, 1993).

Durante o processo de secagem e com a peroxidação de lipídios, vários danos são causados às células e podem ser minimizados pela presença de mecanismos protetores com a ação de algumas enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD), especializadas em remover os radicais livres (ROSA et al., 2005). A desidratação

provoca a desordem do metabolismo, exposição das macromoléculas ao ataque de radicais livres e consequentes danos celulares, pois estes radicais agem principalmente em sítios das membranas expostos pela secagem, além da formação e acúmulo, mesmo com o estado viscoso, de moléculas como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A enzima superóxido dismutase (SOD) é capaz de dismutar o superóxido ($^{\circ}O_2^-$) em H_2O_2 e a catalase (CAT) e a peroxidase (POD) de converter este H_2O_2 em compostos não tóxicos para as células (SILVA et al., 2015). O sistema antioxidante atua especialmente durante a embebição, evento em que a semente redireciona seu metabolismo para que ocorra a germinação (PAMMENTER; BERJAK, 2000).

São poucos os estudos que buscam compreender e comparar os mecanismos antioxidantes e de proteção à secagem das sementes recalcitrantes e ortodoxas. No entanto, no trabalho realizado por Greggains et al. (2000) foi estudado a tolerância à dessecação das sementes de *Acer platanoides* L. (ortodoxas) e *Acer pseudoplatanus* L. (recalcitrantes), onde os autores verificaram que os mecanismos antioxidantes da espécie recalcitrante estavam funcionais apesar da redução na germinação após período de secagem e que nas ortodoxas, também estavam funcionais.

Com a secagem artificial, sementes de milho (*Triticum aestivum* L., cv Charger) classificadas como ortodoxas, não apresentaram alterações na atividade enzimática de SOD e CAT, de modo que a atividade após a maturação foi suficiente para manter o conteúdo de malondialdeído e de H_2O_2 em níveis baixos (LEHNER et al., 2006). Já em sementes de *Antiaris toxicaria* (recalcitrantes) as atividades de SOD e CAT das sementes aumentaram durante a fase inicial de desidratação e diminuíram no decorrer da desidratação; A taxa de produção de radicais superóxidos e os teores de produtos reativos H_2O_2 aumentaram gradualmente com a desidratação (CHENG; SONG, 2008)

A catalase (CAT) é uma das enzimas antioxidantes que mais demonstra atividade em sementes tolerantes à dessecação, como é o caso das sementes de feijão, onde as enzimas com maior atividade frente à secagem foram as catalases (CAT) (BAILLY et al., 2001), assim como em sementes de milho (ROSA et al., 2005) e em sementes de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek (SILVA et al., 2015). Em longo prazo, a falha do sistema antioxidante pode desencadear a morte programada, devido ao envelhecimento e eventual morte do organismo, o que sugere que o sistema antioxidante eficiente é um dos mecanismos subjacentes da tolerância à dessecação (KRANNER; BIRTIC, 2006).

2.3. Família Annonaceae e a tolerância à dessecação

A família Annonaceae é composta por 108 gêneros e 2.040 espécies (CHATROU et al., 2012), apresenta importância por possuir excelente qualidade de frutas como a graviola (*Annona muricata* L.), fruta-do-conde (*A. squamosa* L.) a atemoia (*Annona x atemoya* Mabb.) e algumas em expansão como *A. crassiflora* (marolo) com potencial tanto para consumo *in natura* como industrial (SÃO JOSÉ et al., 2014). É importante também, devido ao potencial medicinal de metabólitos especializados de interesse farmacológico, fitopatológico e na cura contra o câncer, como acetogeninas e alcaloides (GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014). Possui espécies com grande potencial alelopático, como a *Annona glabra*, que exerce efeitos inibitórios na germinação de espécies como *Lactuca sativa* L. (MATSUMOTO et al., 2010). Além de possuir espécies presentes nos mais diversos *habitats*, desde Caatingas até manguezais (FLORA DO BRASIL 2020).

Dentre os poucos estudos relacionados à capacidade de tolerância à dessecação com sementes da família Annonaceae (CARVALHO; NASCIMENTO; MULLER, 2001; CORSATO, 2014; CORSATO; FERREIRA; BARBEDO, 2012), nenhum deles abordou a relação dos mecanismos de tolerância à dessecação com o *habitat* das espécies. O estudo realizado por Corsato; Ferreira; Barbedo (2012) com *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer cujos Domínios fitogeográficos de ocorrência são o Cerrado e a Mata Atlântica evidenciou que esta espécie tolera a dessecação até 5% do teor de água, mas não o armazenamento por períodos superiores a 60 dias. Por outro lado Dalanhol et al. (2013) relatam que *Annona cacans* Warm. que habita a Floresta Pluvial Atlântica é recalcitrante.

Neste contexto, a *Annona crassiflora* Mart., espécie nativa encontrada em áreas de campo sujo, cerrado e cerradão dos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, Bahia e Tocantins e do Distrito Federal, habituada, portanto as variações climáticas do Cerrado, tem como nomes populares: araticum, marolo, bruto, entre outros (BERNARDES et al., 2007). O Cerrado ocupa cerca de 23% do território brasileiro, sendo um dos biomas mais ameaçados do Brasil (KLINK; MACHADO, 2005). *A. crassiflora*, apresenta grande importância para aplicação na medicina popular contra a diarreia (AQUINO et al., 2007) e utilização dos frutos na confecção de geleias, sucos, tortas e iogurtes (BERNARDES et al., 2007). Segundo Silva et al. (2007) as sementes desta espécie apresentam dormência morfofisiológica, a qual pode ser quebrada com a aplicação de baixa temperatura e/ou flutuações de temperatura precedendo a estação chuvosa. Assim, ao quebrar a dormência

fisiológica, a protrusão da radícula ocorre no início da estação chuvosa gerando a oportunidade de formação das mudas. Entretanto, poucos são os estudos dos sistemas envolvidos no mecanismo de tolerância à dessecação, tampouco se a dormência tem algum efeito sobre esses sistemas.

Outra espécie de interesse é *Annona glabra* L., popularmente conhecida como araticunzeiro-do-brejo, pode ser encontrada no norte, nordeste, sul e sudeste do Brasil (CARVALHO; NASCIMENTO; MULLER, 2001). A espécie nativa que ocupa ambientes úmidos como Florestas de Igapó, Florestas de Várzea e Manguezais (FLORA DO BRASIL 2020) pode ser encontrada desde o Estado de Santa Catarina até a Amazônia. Foi classificada como ortodoxa por Carvalho; Nascimento; Muller, (2001), porém é considerada recalcitrante por Infante Mata; Moreno-Casasola, (2005) o que gera dúvidas a respeito da sua resposta frente à secagem. Além disso, nenhum mecanismo de tolerância à dessecação desta espécie foi estudado de modo a caracterizar os fatores envolvidos. Possui grande potencial alelopático, exercendo efeitos inibitórios na germinação de espécies como *Lactuca sativa* L. (MATSUMOTO et al., 2010). As plantas de *A. glabra* apresentam adaptações a ambientes alagados como raízes adventícias, aerênquimas nas raízes e na base do caule, frutos flutuantes e sementes dispersas pela água, o que tende a capacitar seu potencial colonizador.

Quanto aos mecanismos de tolerância relatados em *Annona*, Corsato (2010) demonstrou que a sacarose está diretamente relacionada ao processo de tolerância à dessecação das sementes de *A. emarginata*. Além disso, Corsato (2014) verificou aumento das proteínas LEA à medida que aumentava a secagem, garantindo a germinabilidade. Entretanto, poucos são os estudos reportados para a família Annonaceae acerca dos mecanismos envolvidos neste processo.

3. CAPÍTULO 2

Modulação dos mecanismos de tolerância à dessecação em sementes de *Annona sp* oriundas de *habitats* distintos

Conforme estabelecido pelo programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), os resultados obtidos nesse trabalho estão redigidos na forma de artigo, nas normas da Revista *Annals of Botany*.

Modulação dos mecanismos de tolerância à dessecação em sementes de *Annona sp* oriundas de *habitats* distintos

Mariana de Fátima De-Pieri-Oliveira^{1*}; Gisela Ferreira¹

¹Universidade Estadual Paulista - UNESP, Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Botânica, CP 510, 18608-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.

*Para correspondência. E-mail marideperier.bio@gmail.com

Antecedentes e Objetivos. No decorrer da evolução, algumas sementes desenvolveram mecanismos de proteção contra os danos que a ausência de água poderia causar. Estes mecanismos agem a fim de retirar as espécies reativas do oxigênio e acumular açúcares e proteínas da embriogênese tardia que serão capazes de produzir o estado viscoso e manter a integridade das membranas. A família Annonaceae é composta por espécies oriundas dos mais diversos *habitats*, desde Cerrado até Manguezais, o que pode indicar variações nas respostas das sementes de diferentes espécies em relação à tolerância à dessecação. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar se sementes de *A. crassiflora* e *A. glabra* oriundas de *habitats* contrastantes toleram secagem e se há padrão de resposta dos mecanismos envolvidos com a tolerância à dessecação.

Métodos Sementes de *Annona* que ocorrem naturalmente em condições de ambiente úmido como os estuários (*Annona glabra* L.) e sementes provenientes de ambiente com restrições hídricas como o Cerrado (*Annona crassiflora* Mart.) foram avaliadas após submissão a diferentes níveis de secagem (teor inicial, 20%, 10% e 5% de água) e secagem seguida de reidratação. Foram realizados testes de germinabilidade, quantificação enzimática (superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), peroxidase (POD) (EC 1.11.1.7) e catalase (CAT) (EC 1.11.1.6)) e açúcares (frutose, galactose, glicose, manose, sacarose e trealose); determinação de proteínas da embriogênese tardia (LEA) e teor de lipoperóxido.

Resultados chave Sementes de *A. glabra* oriundas do mangue apresentaram maior tolerância a dessecação do que de *A. crassiflora* provenientes do Cerrado. Em relação às enzimas observaram-se maiores alterações na atividade da peroxidase e a catalase em semente de *A. glabra* e da superóxido dismutase em *A. crassiflora*. Em *A. glabra* o número de proteínas LEA se manteve, o que coincidiu com a capacidade destas sementes de tolerarem a secagem até o teor de 5% de água. Em sementes de *A. crassiflora* o número de proteínas LEA foi reduzido com a secagem até 5% de água, o que condiz com a menor capacidade de tolerar secagem. O conteúdo de açúcares solúveis totais apresentou redução após os diferentes níveis de secagem em ambas espécies e também após a reidratação nas sementes de *A. glabra*. As espécies toleraram a secagem das sementes, no entanto, *A. crassiflora* tolerou até 10% e *A. glabra* até 5% de água.

Conclusões A fim de permitir a tolerância à dessecação de sementes de *A. crassiflora* e *A. glabra* originárias de *habitats* contrastantes, os mecanismos envolvidos atuam de maneira distinta para cada espécie e sem padronização quanto às proteínas LEA, acúmulo de açúcares e atividade enzimática.

Palavras-chave: Annonaceae, secagem de sementes, proteínas LEA, enzimas antioxidantes, ortodoxa, açúcares solúveis.

Modulation of desiccation tolerance mechanisms in *Annona* sp seeds from distinct *habitats*

Mariana de Fátima De-Pieri-Oliveira^{1*}; Gisela Ferreira¹

¹Universidade Estadual Paulista – UNESP, Institute of Bioscience of Botucatu, Department of Botany, CP 510, 18608-970, Botucatu, São Paulo, Brazil.

*For correspondence. E-mail marideperio.bio@gmail.com

Background and Aims. In the course of evolution, some seeds have developed protection mechanisms against damage that the absence of water could cause. These mechanisms act to remove reactive oxygen species and accumulate sugars and proteins from late embryogenesis that will be able to produce the viscous state and maintain membrane integrity. The Annonaceae family is composed of species from different *habitats*, from Cerrado to Mangroves, which may indicate variations in the responses of seeds of different species in relation to tolerance to desiccation. In this context, the objective of this work was to evaluate if *A. crassiflora* and *A. glabra* seeds from contrasting *habitats* tolerate drying and if there is a pattern of response of the mechanisms involved with desiccation tolerance.

Methods Naturally occurring *Annona* seeds in wet environment conditions such as estuaries (*Annona glabra* L.) and water-restricted environment seeds such as Cerrado (*Annona crassiflora* Mart.) were evaluated after submission to different drying levels (initial content, 20%, 10% and 5% water) and drying followed by rehydration. Germinability, enzymatic quantification (superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), peroxidase (POD) (EC 1.11.1.7) and catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) and sugars (fructose, galactose, glucose, mannose, sucrose and trehalose); determination of late embryogenesis (LEA) proteins and lipoperoxide content.

Key Results *A. glabra* seeds from mangrove showed higher tolerance to desiccation than *A. crassiflora* from Cerrado. Regarding the enzymes, there were major changes in peroxidase activity and catalase in *A. glabra* and superoxide dismutase seed in *A. crassiflora*. In *A. glabra* the number of LEA proteins remained, which coincided with the ability of these seeds to tolerate drying to 5% water content. In *A. crassiflora* seeds the number of LEA proteins was reduced with drying up to 5% of water, which corresponds to the lower capacity to tolerate drying. Total soluble sugar content decreased after different drying levels in both species and also after rehydration in *A. glabra* seeds. The species tolerated seed drying, however, *A. crassiflora* tolerated up to 10% and *A. glabra* up to 5% water.

Conclusions In order to allow tolerance to desiccation of *A. crassiflora* and *A. glabra* seeds from contrasting habitats, the mechanisms involved act differently for each species and without standardization for LEA proteins, sugar accumulation and enzymatic activity.

Key words: Annonaceae, seed drying, LEA proteins, antioxidant enzymes, orthodox, soluble sugars.

3.3. INTRODUÇÃO

Ao longo da evolução, para que as plantas conseguissem conquistar a terra, as plantas precisaram desenvolver habilidades que as tornassem capazes de tolerar a dessecação e de sobreviver a situações de ausência de água, esta característica foi fundamental e atualmente é encontrada nos *taxa* dos fungos, plantas (sementes) e bactérias (Dekkers *et al.* 2015).

Sementes de algumas espécies podem permanecer com maiores teores de água no final do estágio de formação, durante a maturação. Tais sementes são dispersas pela planta-mãe em locais úmidos, com temperatura relativamente elevada e germinam rapidamente, garantindo vantagem na competição com as outras sementes. Esta característica indica recalcitrância, como ocorre em sementes de *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. espécie oriunda de regiões naturalmente alagadas (Piña-Rodrigues and Figliolia 2005). Ao contrário, em sementes ortodoxas ocorre dessecação no estágio final de maturação o que garante a capacidade de tolerar condições de ausência de água. Com a reidratação, estas sementes recuperam suas funções biológicas e redirecionam o metabolismo para que ocorra a germinação (Barbedo and Marcos Filho 1998; Andrade *et al.* 2005) como é o caso das 37 espécies ortodoxas encontradas no levantamento de 50 espécies do Cerrado realizado por Costa (2009).

As sementes ortodoxas desenvolveram mecanismos específicos capazes de amenizar os danos causados pela dessecação. Destes mecanismos, um se refere à atuação das enzimas antioxidantes, capazes de evitar os danos causados pelos radicais livres e atuam especialmente durante a embebição, evento em que o metabolismo é redirecionado para que ocorra o processo de germinação (Pammenter and Berjak 2000). Outro está relacionado ao acúmulo de carboidratos, como glicose, frutose, manose, galactose, sacarose e oligossacarídeos da série rafínosica para proteção das membranas (Buckeridge *et al.* 2000; Koster and Leopold, 1988). Um terceiro sistema se refere às proteínas da embriogênese tardia (*Late Embryogenesis Abundant*- LEA) que têm como função proteger as células quando estão em estado anidro (Pammenter and Berjak 2000; Liu *et al.* 2016) e se acumulam no tecido embrionário durante o final do desenvolvimento das sementes (Blackman *et al.* 1991).

Como demonstrado por Ferreira *et al.* (2019) há lacuna a ser preenchida em relação ao conhecimento dos mecanismos de tolerância a dessecação de sementes de Annonaceae, o que também não está associado aos *habitats* de origem das espécies, o que dificulta a classificação das sementes de Annonaceae quanto à tolerância à dessecação.

A família Annonaceae é composta por 108 gêneros e 2.040 espécies (Chatrou *et al.* 2012) e poucos são os trabalhos relacionados a tolerância à dessecação de sementes. Carvalho *et al.* (2001) classificaram as sementes da espécie de *Annona glabra* L. como ortodoxas,

porém a mesma espécie é considerada recalcitrante em estudo realizado por Infante Mata; Moreno-Casola (2005). As sementes de *Annona cacans* Warm. foram classificadas como recalcitrantes por Dalanhol *et al.* (2013) enquanto que as sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer. foram capazes de tolerar a dessecação até 5% do teor de água, mas não resistiram ao armazenamento (Corsato; Ferreira; Barbedo 2012). Nos trabalhos já realizados é possível observar que existe diversidade de respostas até para uma mesma espécie desta família. Neste trabalho a proposta é compreender as alterações nos mecanismos de tolerância à dessecação de duas espécies oriundas de *habitats* distintos, e não apenas determinar se toleram ou não a dessecação.

A *Annona crassiflora* Mart. também conhecida por marolo, araticum ou bruto é nativa e pode ser encontrada em áreas de campo sujo, cerrado e cerradão dos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, Bahia e Tocantins e do Distrito Federal, habituada, portanto às variações climáticas do Cerrado (Bernardes, Estrêla, Navez, *et al.* 2007). É utilizada na medicina popular (Aquino *et al.* 2007) e os frutos são utilizados para a confecção de geleias, sucos, tortas e iogurtes (Bernardes, Estrêla, Navez, *et al.* 2007). Silva *et al.* (2007) observaram a capacidade destas sementes de atravessar a estação seca sem danos, embora o foco do trabalho não era a tolerância a dessecação, mas sim estudo de dormência.

A *Annona glabra* L. popularmente conhecida como araticunzeiro-do-brejo, pode ser encontrada no norte, nordeste, sul e sudeste do Brasil, sendo uma espécie nativa que ocupa ambientes úmidos como Florestas de Igapó, Florestas de Várzea e Manguezais (Flora do Brasil 2020). Possui grande potencial alelopático, exercendo efeitos inibitórios na germinação de espécies como *Lactuca sativa* L. (Matsumoto *et al.* 2010). As plantas de *A. glabra* apresentam adaptações a ambientes alagados como raízes adventícias, aerênquimas nas raízes e na base do caule, frutos flutuantes e sementes dispersas pela água, o que tende a capacitar seu potencial colonizador (Carvalho *et al.* 2001).

Neste contexto, considerando a diversidade de ambientes nos quais a família Annonaceae se encontra, as espécies *A. crassiflora* e *A. glabra* oriundas do Cerrado e do mangue se tornam interessantes para a compreensão da tolerância à dessecação das sementes desta família, em especial por serem oriundas de *habitats* distintos. Deste modo, o objetivo do trabalho foi avaliar se sementes de *A. crassiflora* e *A. glabra* oriundas de *habitats* contrastantes toleram secagem e se há padrão de resposta dos mecanismos envolvidos com a tolerância à dessecação.

3.4.MATERIAL E MÉTODOS

Foram instalados dois experimentos, um com *A. crassiflora*, com frutos provenientes de região do Cerrado (*stricto sensu*) do município de Paraguaçu, MG e outro com *A. glabra* cujos frutos foram obtidos na região de mangue do município de Maceió-Alagoas e cedidos pela UFAL (Universidade Federal de Alagoas).

Para cada experimento, o delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x2 (Níveis de secagem x secas/reidratadas) com quatro repetições de 15 sementes por tratamento para cada análise bioquímica (Enzimas antioxidantes, conteúdo e perfil de açúcares e proteínas LEA) e esquema fatorial 4x2 (Níveis de secagem x com/sem Regulador) para o teste de germinação apresentando quatro repetições de 25 sementes por tratamento. Neste caso o regulador GA₃ foi utilizado, pois Silva *et al.* (2007) e Carvalho *et al.* (2001) relatam a ocorrência de dormência.

Os frutos de *A. crassiflora* (marolo) e de *A. glabra* foram despolidos manualmente e com as sementes recém-extraídas foi determinado o teor inicial de água e a aplicação dos tratamentos. O teor de água inicial foi determinado pelo método de estufa a 105°C ± 3°C por 24 horas e os resultados apresentados em porcentagem, sendo a base à massa fresca da semente (Brasil, 2009). O teor inicial de água para sementes de *A. crassiflora* foi de 35,53% enquanto que para sementes de *A. glabra* foi de 37,09%.

Curva de secagem

Para a curva de secagem as sementes foram secas em estufa de circulação forçada à 30°C pelo período necessário até atingirem o teor de 5%. Os teores e os tempos foram anotados e a partir desta curva, as sementes foram secas até atingirem os diferentes níveis: 20%, 10% e 5% os quais eram os tratamentos de ambas as espécies.

Teste de germinação

Após a secagem as sementes de ambas as espécies receberam dois tratamentos: embebidas em solução de Progibb[®] 400 na concentração de 400 mg L⁻¹ de Giberelina (GA₃) e em água, por 48h, com aeração constante (Ferreira *et al.* 2014).

O teste foi realizado em rolos de papel para germinação (GERMITEST) umedecidos com 2,5 vezes o peso do papel, com 25 sementes por repetição, acondicionados em sacos de polietileno. Os sacos foram mantidos em câmara de germinação com temperatura e

fotoperíodo alternados, 20°C/18 horas de escuro e 30°C/6 horas de claro (Brasil, 2009), e analisadas as seguintes variáveis: porcentagem, tempo médio, velocidade e frequência da germinação. As sementes foram consideradas germinadas com 2 mm de raiz primária (Hadas 1976).

Análises bioquímicas

Foram selecionadas para as análises bioquímicas quatro repetições de 15 sementes por tratamento, as quais foram maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer à temperatura de -80°C até a realização das análises.

As análises da superóxido dismutase SOD (EC 1.15.1.1) foram realizadas com metodologia de Beauchamp and Fridovich (1971), de modo que o sistema de reação foi composto por 30µL de extrato enzimático, tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,8 uma mistura de “nitrobluetetrazolium” (NBT) 33 µmol.L⁻¹ + EDTA 0,66 mmol.L⁻¹ (5:4) e mistura L-metionina 10 mmol.L⁻¹ + riboflavina 3,3 mol.L⁻¹ (1:1) com um volume total de 3,0 mL. Em seguida os tubos foram iluminados por 5 minutos a 25°C e a redução do NBT a “blue formazan” foi medida no espectrofotômetro UV-visível a 560 nm. Com a atividade de SOD expressa em U mg⁻¹ de proteína.

A atividade da peroxidase POD (EC 1.11.1.7) foi determinada conforme as condições apresentadas no trabalho de Teisseire and Guy (2000), no qual o sistema de reação foi composto por 100 µL de extrato enzimático diluído no tampão de extração; tampão fosfato de potássio 50 mmol.L⁻¹, pH 6,5, pirogalol (1,2,3-benzenotriol) 20 mmol.L⁻¹ e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 5 mmol.L⁻¹. A condução da reação foi em temperatura ambiente por 5 minutos de modo que resultou na formação de purpurugalina a qual foi medida em espectrofotômetro UV-visível a 430nm, cujo coeficiente de extinção molar (2,47 mmol.L⁻¹.cm⁻¹) foi usado para calcular a atividade específica da enzima expressa em µmol de purpurugalina min⁻¹ de proteína.

Para a determinação da atividade da catalase CAT (E.C. 1.11.1.6), o sistema de reação por 80 segundos, foi composto de 50 µL de extrato enzimático, tampão fosfato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mmol L⁻¹, num volume final de 1 mL. Após leituras de absorbância a 240 nm, utilizou-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar do H₂O₂ (39,4 mmol L⁻¹ cm⁻¹). A atividade da enzima foi expressa em mKat µg. proteína (Peixoto *et al.* 1999).

Perfil e quantificação de açúcares

As amostras para a análise de açúcares foram acondicionadas em sacos de polietileno e envoltas com papel alumínio em seguida congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer (-80°C) até a realização das análises. Para a extração dos açúcares solúveis totais, foram utilizados 200 mg de sementes (endosperma e embrião) moídas para cada tratamento. Estas amostras foram extraídas em etanol 80 % seguindo a metodologia de Garcia *et al.* (2006), o que resultou na fração de açúcares solúveis totais, os quais tiveram seu volume ajustado com etanol. A quantificação dos açúcares solúveis totais foi realizada pela análise colorimétrica utilizando-se a metodologia do fenol sulfúrico de Dubois *et al.* (1956).

Posteriormente separou-se 1ml das amostras para a purificação que foi realizada em resina catiônica e aniônica Dowex. O pH das amostras foi neutralizado com hidróxido de amônio e posteriormente, armazenadas em freezer. As amostras foram liofilizadas e ressuspendidas em 5 ml de água deionizada. Em seguida, foi realizada a cromatografia líquida de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (HPAEPAD) (Coluna HPLC C18, 250x4.6mm, 5µm) com gradiente de eluição de Hidróxido de Sódio (625mM), Água ultrapura (Milli Q) e Acetato de Sódio (0,5M). Na determinação do perfil de açúcares solúveis das amostras foi possível a identificação de açúcares como frutose, galactose, glicose, manose, sacarose e trealose.

Determinação de Proteínas LEA

A metodologia para a extração foi descrita por (Rosa *et al.* 2005). Endosperma e embrião macerados em tampão de extração 50 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ e 1 mM do inibidor de protease PMSF na proporção de 1:10 (peso do material: volume do tampão). O material foi centrifugado a 12000 rpm à 4°C por 60 minutos e o sobrenadante incubado em banho-maria a 85°C por 15 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas a 12000 rpm a 4°C por 40 minutos de modo que o sobrenadante resultou na fração de proteínas LEA.

Foram adicionados 80 µL de tampão da amostra (2,5 mL de glicerol, 0,46g SDS, 20mg de azul de bromofenol, Tris-HCl pH = 7,5) em 20 µL de cada extrato, seguido de uma incubação em banho-maria com água em ebulição por cinco minutos. Foi aplicado 10 µL de cada amostra em gel de poliacrilamida nas concentrações de 12,5% (gel separador) e 4% (gel de empilhamento). A corrida eletroforética aconteceu em sistema vertical em temperatura ambiente e voltagem constante de 100V por 100 minutos. Após a corrida, os géis foram

corados em solução de Comassie Brilliant Blue a 0,05% por 24 horas e descorados com solução de etanol a 5%, ácido acético 10% e água 85%, conforme Alfenas (1988).

As imagens dos géis digitalizadas através do Image Master VDS e software analisador de imagens do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu - SP. Este programa foi utilizado para determinar o IOD (Intensidade de Densidade Óptica) de cada banda proteica e os resultados expressos em intensidade de bandas.

Teores de Lipoperóxido

Os níveis de peroxidação de lipídeos foram avaliados utilizando a metodologia de Heath and Packer (1968). Para tanto, utilizados 100 mg de endosperma e embrião, os quais foram maceradas em almofariz juntamente com 2ml de um meio de reação constituído por ácido tiobarbitúrico (0,25%, m/v) e ácido tricloro acético (10%, m/v). A solução foi acondicionada em tubos de ensaio vedados e incubados em banho-maria a 95°C por 1 hora. A solução resultante foi centrifugada a 12000 rpm por 40 minutos a 25°C. A leitura do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro em dois comprimentos de onda 532 e 600 nm. O montante de malondialdeído (MDA) formado foi calculado utilizando um coeficiente de extinção de 155 mM⁻¹ cm⁻¹.

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de homogeneidade entre as variâncias, sendo que os dados para análise da enzima catalase das sementes de *A. crassiflora* necessitaram de transformação utilizando a raiz quadrada para que atendessem as inferências estatísticas. Os dados das demais análises não necessitaram de transformações. Em seguida foram analisados por intermédio da análise de variância (ANOVA) *Two way* e as médias comparadas pelo teste Tukey em nível de significância de 5% (p<0,05) (Pimentel and Gomes, 2000).

3.5.RESULTADOS

As espécies *Annona crassiflora* e *A. glabra* apresentaram variações nas respostas metabólicas relacionadas ao mecanismo de tolerância à dessecação que não eram as esperadas de acordo com os ambientes de origem. Respostas distintas entre as espécies foram observadas quanto à variedade e intensidade de proteínas da embriogênese tardia – *LEA* (Fig. 1 e 2), o acúmulo de açúcares (Tabelas 1, 2, 3 e 4) e atividade do sistema antioxidante (Tabelas 5 e 6) após as sementes serem submetidas aos diferentes níveis de secagem e também quando foram reidratadas após alcançarem cada um dos referidos níveis.

Em sementes secas e reidratadas com o objetivo de reativar o metabolismo dando início ao processo germinativo foi possível detectar incremento das atividades dos sistemas envolvidos com a capacidade das sementes em tolerar a dessecação. Além disso, com o acréscimo do ácido giberélico GA_3 na solução de reidratação se verificou aumento da germinabilidade das sementes de *A. crassiflora* e *A. glabra* (Fig. 3 e 4 respectivamente).

Germinabilidade

As sementes de *A. crassiflora* secas até 5% e posteriormente embebidas em solução de GA_3 apresentaram baixa porcentagem de germinação (32%) em relação às sementes dos demais teores de secagem, nos quais foram alcançados 68% de germinação (teor inicial de água), 71% de germinação com 20% e 10% de água, indicando que as sementes desta espécie não suportaram secagem até 5% de água. Se compararmos as respostas das sementes embebidas em solução de GA_3 com as sementes embebidas em água é possível observar que as sementes do tratamento com água apresentaram porcentagem de germinação menor do que as embebidas em solução de GA_3 (Fig. 3).

Em relação a velocidade de germinação (VG) das sementes de *A. crassiflora*, as sementes tratadas com GA_3 germinam mais rápido do que as sementes embebidas em água. Dentre as sementes tratadas com GA_3 àquelas que foram secas até 5% apresentaram menor velocidade de germinação. As sementes secas até 5% também apresentaram maior tempo médio para germinar (TMG) além de menor sincronização (Fig. 3).

As sementes de *A. glabra* apresentaram maior porcentagem de germinação (91%) quando foram secas a 5% e reidratadas em solução com GA_3 em comparação com os demais (Inicial, 20% e 10%) e quando reidratadas somente em água, houve maior porcentagem de

germinação das sementes com teores de 5% e 10%, indicando que esta espécie apresenta capacidade de suportar a secagem, enquanto *A. crassiflora* não.

A germinação das sementes de *A. glabra* que foram reidratadas com água após serem secas até 5% foi maior do que sementes com teor inicial de água (30,25% e 5% de sementes germinadas, respectivamente), embora com menor número de proteínas LEA. E sementes que foram secas até 5% e reidratadas com GA₃ alcançaram 91% de germinação, diferindo daquelas dos demais teores de água (55% de germinação com teor inicial, 87% com teor de 20% e 35% com 10%) e daquelas com 5% que não receberam GA₃ (30,25% de germinação) (Fig. 4).

A velocidade de germinação (VG) foi maior nas sementes embebidas em solução de GA₃ se comparada às sementes embebidas em água. O tempo médio de germinação (TMG) foi menor nas sementes reidratadas com GA₃, exceto nas sementes mantidas com teor de água inicial, que germinaram em menor tempo médio, no entanto apenas 5% das sementes germinaram (Fig. 4).

Assim, de modo geral, como nas sementes de *A. crassiflora*, foi possível observar que as sementes de *A. glabra* reidratadas com GA₃ apresentaram germinação mais rápida e uniforme nos teores inicial, 20% e 5%, maior sincronização na germinação e menor tempo para germinar (Fig. 4).

Proteínas de embriogênese tardia – LEA

Em relação às proteínas da embriogênese tardia (LEA) em sementes de *A. crassiflora* foram registradas aquelas com peso molecular variando entre 11 e 231 KDa (Fig. 1). Com a secagem, houve redução no número de proteínas de dez (teor inicial de água) para quatro (5% de água). Com a reidratação das sementes após secagem as proteínas LEA se apresentaram em maior número nos teores de 10% e 20% (14 proteínas) e redução para cinco proteínas ao serem reidratadas após atingir 5% de secagem (Fig. 1), o que pode estar relacionado à menor tolerância à secagem até este nível.

Em sementes de *A. glabra* as proteínas LEA apresentaram peso molecular variando de 10 a 250 KDa. As diferenças no número de proteínas foram menos evidentes que em *A. crassiflora*, oscilando entre cinco e oito proteínas, independente da secagem ou reidratação (Fig. 2). Desta maneira, a redução no número de proteínas LEA encontrado em *A. crassiflora* com a secagem até 5% parece estar relacionada com a menor porcentagem e velocidade de

germinação de sementes de *A. crassiflora*, enquanto a pequena variação e o menor número de proteínas, detectado em sementes de *A. glabra* até alcançar o teor de 5% de água, coincidem com as respostas de maior porcentagem e velocidade de germinação.

Açúcares solúveis

Os açúcares encontrados nas sementes de *A. crassiflora* foram sacarose, frutose e trealose enquanto que nas sementes de *A. glabra* apenas foram encontradas sacarose e frutose. Em ambas as espécies não foram detectadas galactose, glicose e manose.

Os resultados referentes às concentrações de açúcares solúveis totais não apresentaram interações significativas entre os tratamentos para ambas as espécies (Tabelas 1 e 3). No entanto, se observou redução na média das concentrações de açúcares solúveis totais das sementes secas até 5%. Em sementes de *A. glabra* reidratadas, se verificou ainda, a redução na média das concentrações de açúcares solúveis totais.

Em relação à sacarose também não foram observadas interações entre os tratamentos, somente foram observadas reduções nas concentrações médias de sacarose, nas duas espécies, na medida em que ocorreu aumento da secagem das sementes até 5%. Para as sementes de *A. glabra* também se verificou a redução na média das concentrações de sacarose nas sementes reidratadas em relação às sementes secas (Tabela 4).

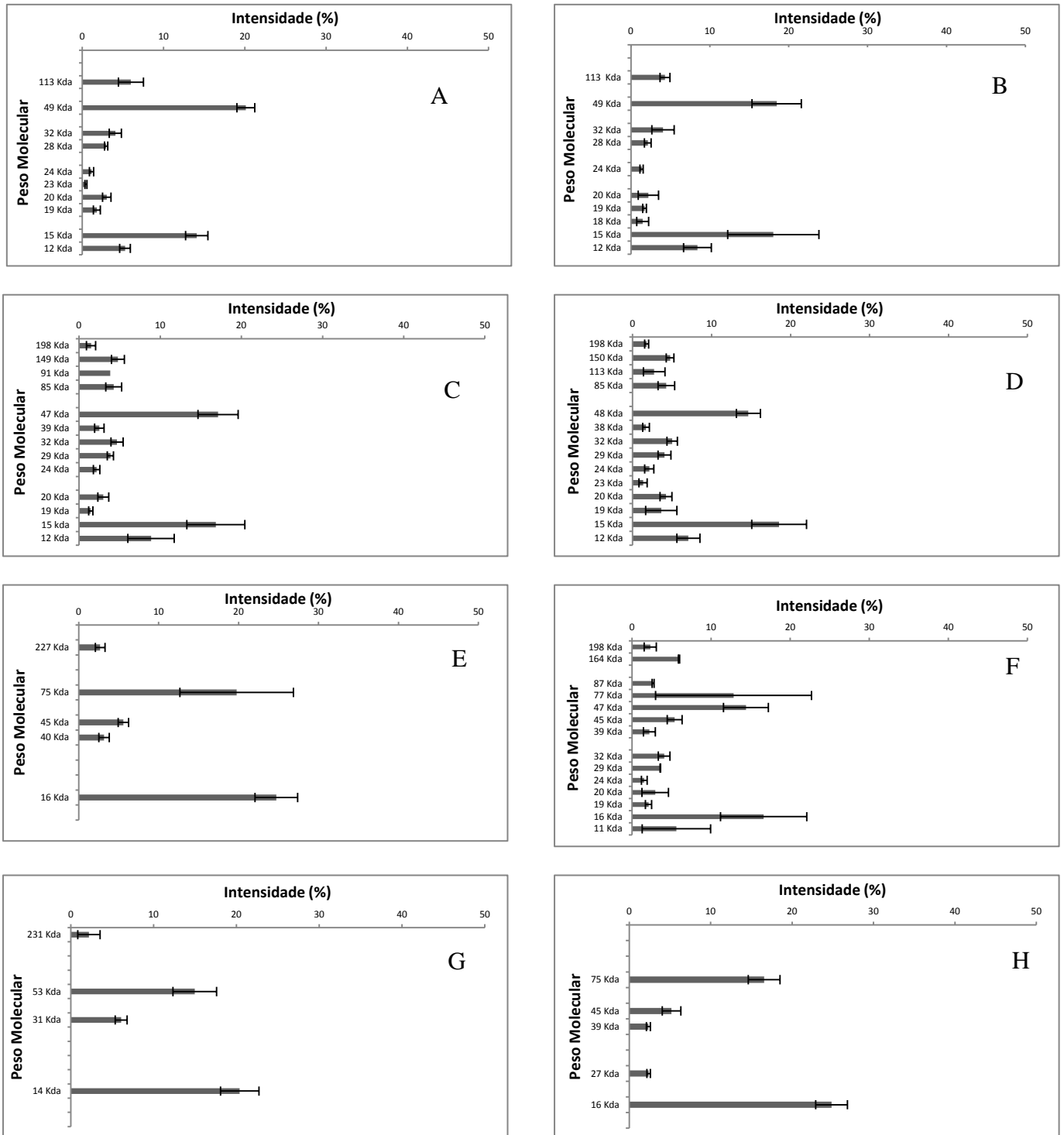


FIG. 1. Intensidade de bandas de proteínas LEA (%) após corrida eletroforética das sementes de *Annona crassiflora* Mart. que foram secas até os diferentes teores de água: (A) 35,53% (teor inicial), (C) 20%, (E) 10%, (G) 5% e sementes que foram secas e reidratadas: (B) 35,53% (teor inicial), (D) 20%, (F) 10%, (H)- 5%. Barras de desvio padrão comparando os diferentes pesos moleculares.

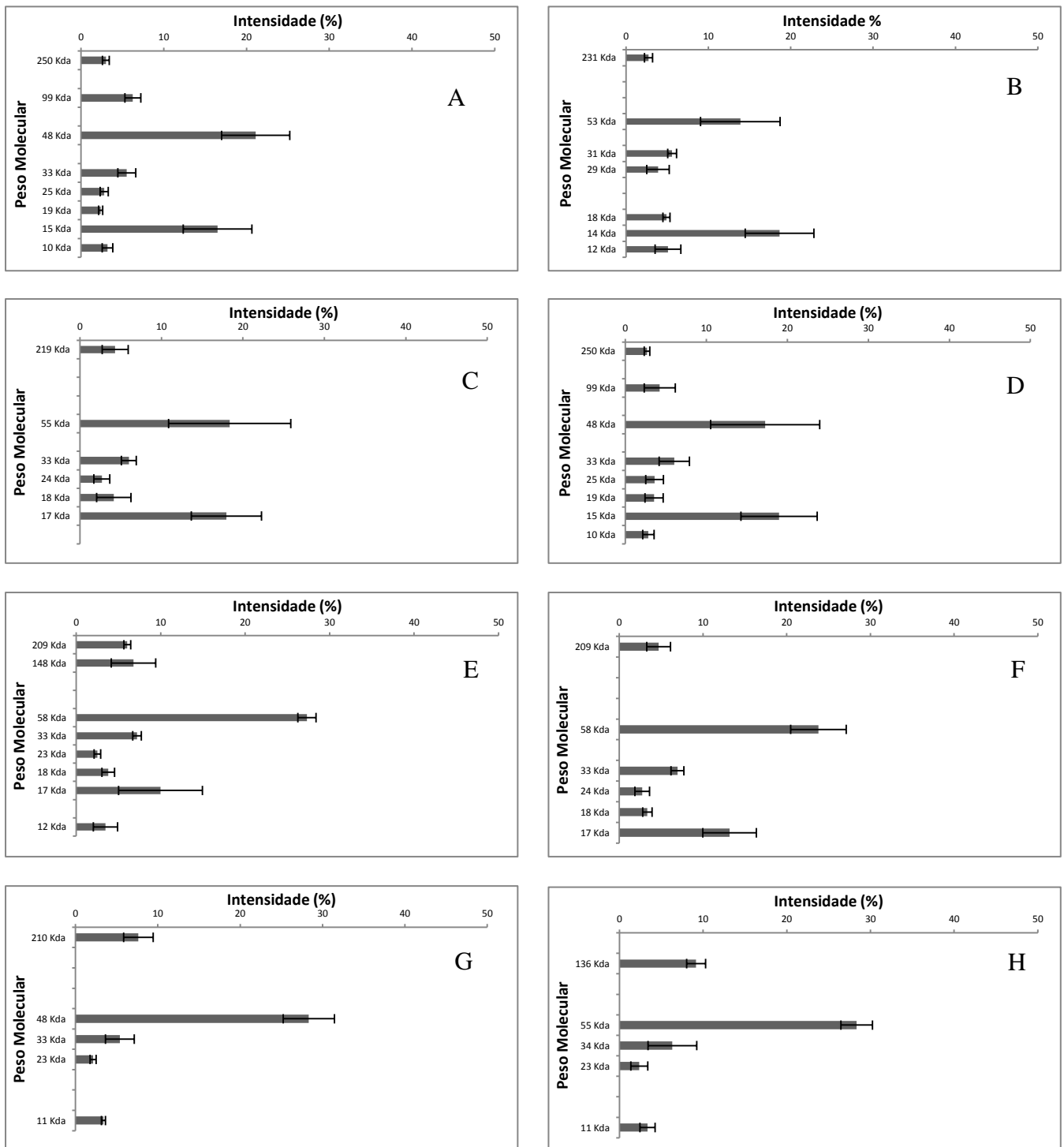


FIG. 2. Intensidade de bandas de proteínas LEA (%) após corrida eletroforética das sementes de *Annona glabra* L. que foram secas até os diferentes teores de água: (A) 37,09% (teor inicial), (C) 20%, (E) 10%, (G) 5% e sementes que foram secas e reidratadas: (B) 37,09% (teor inicial), (D) 20%, (F) 10%, (H) 5%. Barras de desvio padrão comparando os diferentes pesos moleculares.

Em relação às concentrações de frutose se verifica aumento médio em sementes secas de *A. crassiflora* até os teores de 20% e de 5% (0,028 e 0,030 respectivamente) independente da reidratação (Tabela 2), enquanto para *A. glabra* se obteve interação significativa entre os tratamentos, com aumento em sua concentração à medida que se aumentava a secagem do

teor inicial até 5% (0,021 para 0,046) e redução na concentração de frutose à medida que as sementes secas até 5% eram reidratadas (0,016) (Tabela 4).

TABELA 1. *Conteúdo de açúcares solúveis totais (mg g⁻¹ MS) das sementes de A. crassiflora submetidas a diferentes níveis de secagem (35,53%, 20%, 10% e 5%) e tratadas com secagem e reidratação.*

mg g ⁻¹ MS			
	Secas	Reidratadas	Média
35,53%	40,74	31,78	36,26 a
20%	36,48	34,97	35,73 a
10%	31,89	25,88	28,88 ab
5%	26,48	28,31	27,39 b
CV (%) =	18,42		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

Nas sementes de *A. glabra* não foi detectada a trealose (Tabela 4). Em sementes de *A. crassiflora* os maiores valores de trealose foram encontrados em sementes com 10% de água (0,020) e sementes reidratadas e com 20% de água (0,018) sem, portanto, haver padrão de resposta em relação à secagem (Tabela 2).

Sistema antioxidante

Com o aumento da secagem das sementes de *A. crassiflora* ocorreu redução significativa da atividade de SOD (primeira enzima a atuar desmutando o superóxido (°O₂- em H₂O₂) entre os teores de 20% e 5%. Esta redução coincide com o aumento significativo da peroxidação de lipídeos de 13,08 (teor inicial de água) para 19,75 quando as sementes alcançaram 5% de água, indicando o maior dano de membrana provocado pela secagem (Tabela 5).

TABELA 2. Conteúdo de sacarose, D-frutose, trealose (mg g^{-1} MS) das sementes de *A. crassiflora* submetidas a diferentes níveis de secagem (35,53%, 20%, 10% e 5%) e tratadas com secagem e reidratação.

Sacarose (mg g^{-1} MS)			
	Secas	Reidratadas	Média
35,53%	0,493	0,469	0,499 a
20%	0,426	0,351	0,456 b
10%	0,339	0,258	0,284 c
5%	0,278	0,305	0,336 c
	CV (%) =	15,95	
Frutose (mg g^{-1} MS)			
	Secas	Reidratadas	Média
35,53%	0,013	0,018	0,015 b
20%	0,021	0,035	0,028 a
10%	0,015	0,016	0,016 b
5%	0,033	0,027	0,030 a
	CV (%) =	32,85	
Trealose (mg g^{-1} MS)			
	Secas	Reidratadas	
35,53%	0,005 b A	0,008 b A	
20%	0,009 b B	0,018 a A	
10%	0,020 a A	0,009 b B	
5%	0,007 b A	0,007 b A	
	CV (%) =	40,31	

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

TABELA 3. *Conteúdo de açúcares solúveis totais (mg g⁻¹ MS) das sementes de A. glabra submetidas a diferentes níveis de secagem (37,09%, 20%, 10% e 5%) e tratadas com secagem e reidratação.*

[] mg g ⁻¹ MS			
	Secas	Reidratadas	Média
37,09%	41,80	32,93	37,36 a
20%	26,70	24,97	25,83 b
10%	36,49	25,77	31,13 ab
5%	29,03	27,13	28,08 b
Média	33,50 A	27,70 B	
	CV(%) =	15,97	

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

Por outro lado, quando as sementes de *A. crassiflora* foram reidratadas após a secagem, não se observaram diferenças na atividade da SOD em função da redução nos teores de água da semente, mas os valores são maiores do que aqueles observados nas sementes secas, indicando aumento da atividade da enzima. No entanto, quando as sementes foram reidratadas após atingirem 5% de teor de água, o aumento na atividade de SOD (de 0,0935 para 0,1444) levou a redução da peroxidação lipídica (de 19,75 para 14,89) e, portanto, redução nos danos da membrana celular (em relação às sementes secas). Neste caso fica evidente a ação do sistema enzimático reduzindo o nível de radicais livres resultantes da elevada secagem (Tabela 5).

Outro aspecto a ser observado nas sementes de *A. crassiflora* foi a alta atividade da SOD e elevada peroxidação lipídica em sementes recém-extraídas dos frutos, com teor de água inicial (35,5%) e que foram mantidas em água para reidratação (Tabela 5). Este dano pode ter sido causado pelo aumento do estresse hídrico em função da imersão em água para reidratação, exigindo maior atividade enzimática para conter o dano de membrana, o que foi inevitável, mas não resultou em redução da porcentagem de germinação em relação às sementes com teores de 20 e 10% (Fig. 3). Quanto à atividade de POD e CAT não foram observadas diferenças entre os tratamentos.

TABELA 4- Conteúdo de sacarose e D-frutose (mg g^{-1} MS) das sementes de *A. glabra* submetidas a diferentes níveis de secagem (37,09%, 20%, 10% e 5%) e tratadas com secagem e reidratação.

Sacarose (mg g^{-1} MS)			
	Secas	Reidratadas	Média
37,09%	0,426	0,424	0,425 a
20%	0,326	0,298	0,312 c
10%	0,364	0,336	0,350 b
5%	0,242	0,210	0,226 d
Média	0,339 A	0,317 B	
CV (%) =		8,44	
Frutose (mg g^{-1} MS)			
	Secas	Reidratadas	
37,09%	0,021 b B	0,036 a A	
20%	0,023 b A	0,019 ab A	
10%	0,033 ab A	0,034 ab A	
5%	0,046 a A	0,016 b B	
CV (%) =		31,64	

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

Nas sementes de *A. glabra* observou-se o aumento da atividade de SOD nas sementes imersas em água após a retirada dos frutos (37,09% de H_2O) e naquelas que foram secas até 5% e reidratadas (de 0,02 para 0,07 e de 0,03 para 0,07 respectivamente) (Tabela 6). Em relação à POD e CAT se verificou redução da atividade quando o teor de água foi reduzido a 10% e as sementes foram colocadas para reidratar (0,0010 para 0,0006 e de 0,6827 para 0,4665 respectivamente). A POD apresentou maior atividade nas sementes secas nos teores de 20% e 10% se comparadas as reidratadas e aumento da atividade quando as sementes alcançaram 5% em relação ao teor inicial das sementes secas. Por outro lado a CAT atuou de modo significativo com aumento da atividade quando as sementes foram secas até 5% e colocadas para reidratar em relação ao teor inicial. Em ambos os casos (POD e CAT) houve aumento da atividade com a secagem das sementes até 5%, no entanto o aumento da atividade da POD ocorreu em sementes secas e da CAT em sementes reidratadas (Tabela 6).

TABELA 5. Atividade de superóxido dismutase [SOD ($U\ mg\ de\ proteína^{-1}$)], peroxidase [POD ($\mu mol.min\ mg\ de\ proteína^{-1}$)], catalase [CAT ($mKat\ \mu g^{-1}$)] e teores de lipoperóxido ($nmol\ MDA\ g^{-1}\ MS$) das sementes de *Annona crassiflora* submetidas a diferentes níveis de secagem (35,53%, 20%, 10% e 5%) e tratadas com secagem e reidratação.

SOD - ($U\ mg^{-1}$)		
	Secas	Reidratadas
35,53%	0,1217 Bab	0,1824 Aa
20%	0,1612 Aa	0,1468 Aa
10%	0,1008 Bab	0,1770 Aa
5%	0,0935 Bb	0,1444 Aa
CV(%)	21,86	
POD - ($\mu mol.min\ mg^{-1}$)		
	Secas	Reidratadas
35,53%	0,0009 Aa	0,0009 Aa
20%	0,0008 Aa	0,0010 Aa
10%	0,0006 Aa	0,0006 Aa
5%	0,0011 Aa	0,0009 Aa
CV (%)	32,00	
CAT - ($mKat\ \mu g^{-1}$)		
	Secas	Reidratadas
35,53%	0,6289 Aa	0,6821 Aa
20%	0,7793 Aa	0,7050 Aa
10%	0,6302 Aa	0,6674 Aa
5%	0,5350 Aa	0,7402 Aa
CV (%)	17,89	
LIOPERÓXIDO - ($nmol\ MDA\ g^{-1}\ MS$)		
	Secas	Reidratadas
35,53%	13,0877 Bb	29,0668 Aa
20%	11,6563 Ab	10,4752 Ab
10%	13,0144 Ab	10,4961 Ab
5%	19,7547 Aa	14,8906 Bb
CV (%)	15,33	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey à 5% probabilidade.

TABELA 6. Atividade de superóxido dismutase [SOD (U mg de proteína⁻¹)], peroxidase [POD (μmol.min mg de proteína⁻¹)], catalase [CAT (mKat μg⁻¹)] e teores de lipoperóxido (nmol MDA g⁻¹ MS) das sementes de *Annona glabra* submetidas a diferentes níveis de secagem (37,09%, 20%, 10% e 5%) e tratadas com secagem e reidratação.

SOD - (U mg ⁻¹)		
	Secas	Reidratadas
37,09%	0,0155 Bc	0,0656 Aa
20%	0,0694 Aa	0,0464 Aa
10%	0,0634 Aab	0,0605 Aa
5%	0,0334 Bbc	0,0729 Aa
CV(%)	33,75	
POD - (umol.min mg ⁻¹)		
	Secas	Reidratadas
37,09%	0,0006 Ab	0,0004 Aa
20%	0,0009 Aab	0,0005 Ba
10%	0,0010 Aab	0,0006 Ba
5%	0,0011 Aa	0,0008 Aa
CV (%)	30,97	
CAT - (mKat μg ⁻¹)		
	Secas	Reidratadas
37,09%	0,4327 Aa	0,3695 Ab
20%	0,6546 Aa	0,5145 Aab
10%	0,6827 Aa	0,4665 Bab
5%	0,6750 Aa	0,6543 Aa
CV (%)	32,75	
LIOPERÓXIDO - (nmol MDA g ⁻¹ MS)		
	Secas	Reidratadas
37,09%	19,3720 Aa	15,1445 Ba
20%	17,9360 Aa	15,3859 Aa
10%	17,1045 Aa	17,2927 Aa
5%	17,4413 Aa	17,3945 Aa
CV (%)	10,53	

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

Em sementes de *A. glabra* o sistema enzimático composto pela POD, SOD e CAT atuou de modo efetivo possibilitando secagem até 5%, sem a detecção de variação na peroxidação lipídica, tanto em sementes secas como reidratadas, indicando ausência de dano significativo de membrana, o que permitiu a tolerância à dessecação, resultando em germinação de 91% das sementes (Fig. 4).

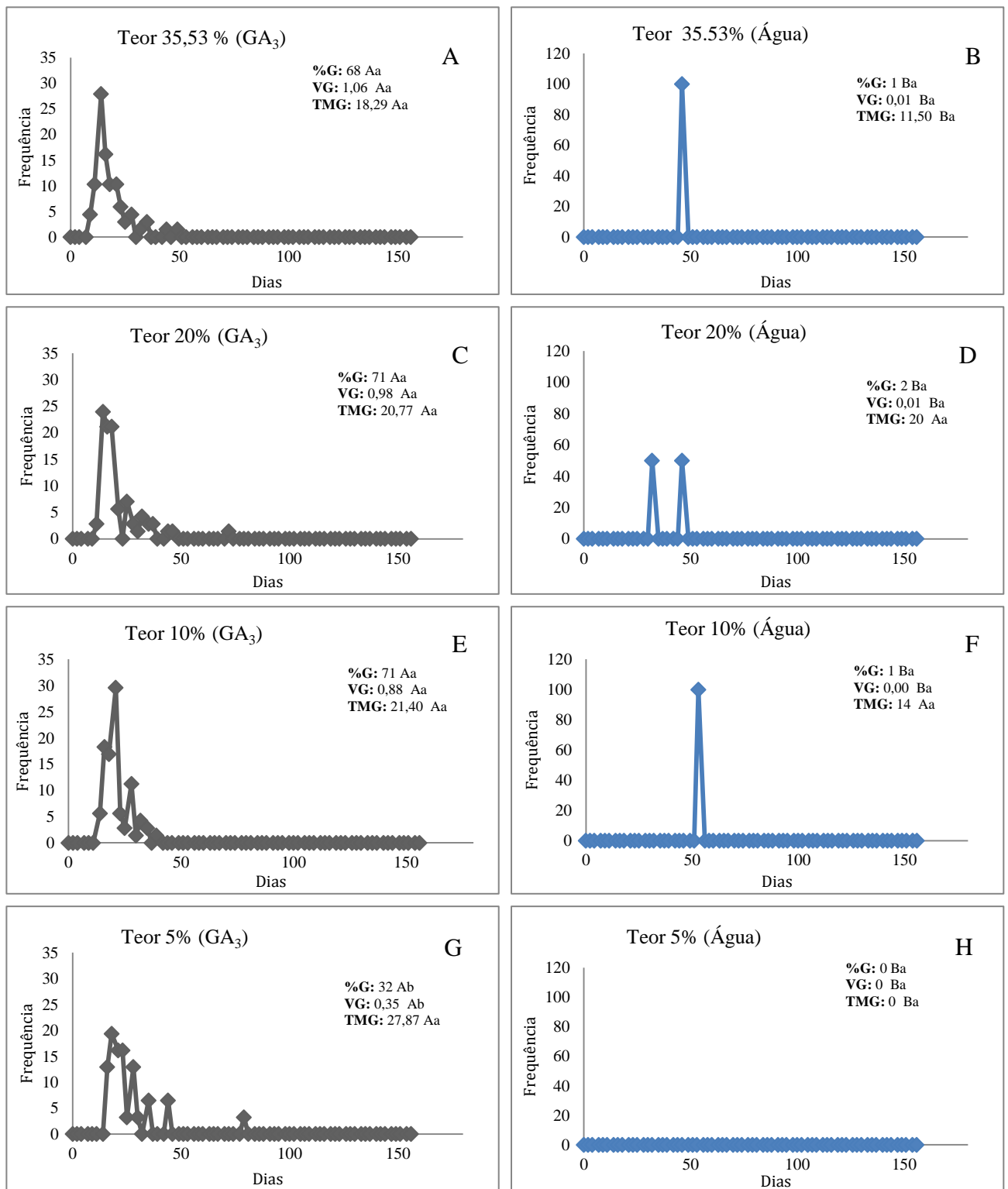


Fig. 3. Germinação (%G), Frequência (%), Velocidade de germinação em número de sementes por dia (VG) e Tempo Médio de Germinação (dias) (TMG) de sementes de *A. crassiflora* submetidas a diferentes níveis de secagem e embebidas em GA₃: (A) 35,53%; (C) 20%; (E) 10% e (G) 5% e embebidas em água: (B) 35,53%; (D) 20%; (F) 10% e (H) 5%. Letras maiúsculas comparam os tratamentos de GA₃ e água em um mesmo teor de água e as minúsculas comparam os teores entre si para os tratamentos com água ou GA₃ pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

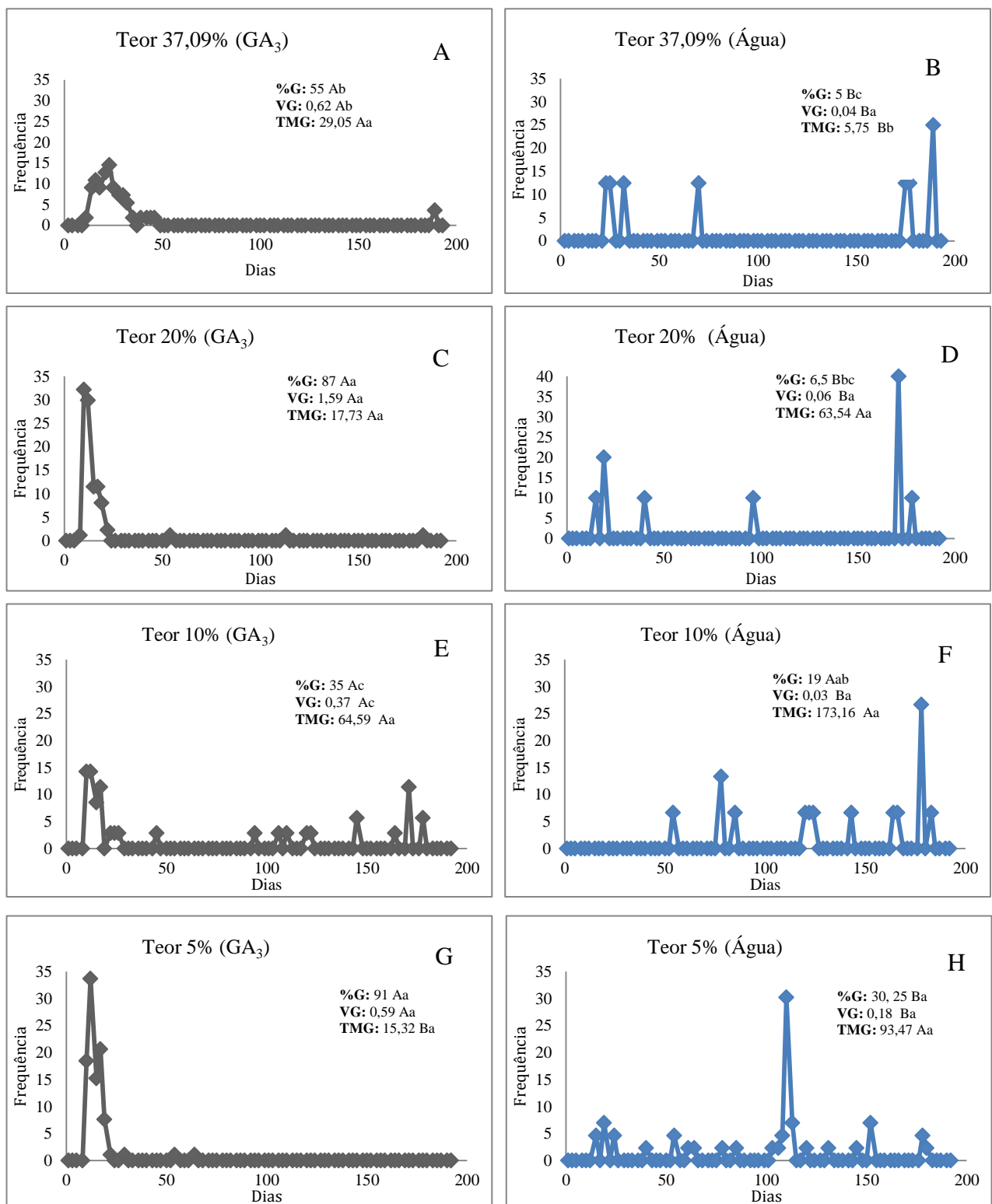


Fig. 4. Germinação (%G), Frequência (%), Velocidade de germinação em número de sementes por dia (VG) e Tempo Médio de Germinação (dias) (TMG) de sementes de *A. glabra* submetidas a diferentes níveis de secagem e embebidas em GA₃: (A) 37,09%; (C) 20%; (E) 10% e (G) 5% e embebidas em água: (B) 37,09%; (D) 20%; (F) 10% e (H) 5%. Letras maiúsculas comparam os tratamentos de GA₃ e água em um mesmo teor de água e as minúsculas comparam os teores entre si para os tratamentos com água ou GA₃ pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

3.6.DISSCUSSÃO

O mecanismo de proteção à dessecação é crucial para que sementes ortodoxas consigam tolerar situações de ausência de água e se tornem capazes de redirecionar o metabolismo para que ocorra o processo de germinação. Portanto, a tolerância à dessecação é um complexo mecanismo composto pela ação de proteínas de embriogênese tardia, carboidratos e complexos enzimáticos (Walters 2000). No entanto, conforme se observa neste trabalho, nem sempre espécies de *habitats* com maior disponibilidade de água como a *A. glabra* apresentam os mecanismos de tolerância relacionados com a recalcitrância bem definidos, assim como espécies de ambientes mais secos, como a *A. crassiflora*, não possuem todas as características para ser consideradas ortodoxas, com restrição no nível de tolerância à dessecação.

Germinabilidade

Como forma de caracterizar as espécies quanto ao estímulo à germinabilidade, foi possível detectar que ambas as espécies apresentavam dormência. O TMG, velocidade e sincronização da germinação foram favorecidos pelo uso do GA₃, assim como a ausência de germinação nas sementes de *A. crassiflora* sem o uso do GA₃ confirma dormência relatada por Silva *et al.* (2007) (Fig. 3).

Da mesma forma, as sementes de *A. glabra* apresentaram maior velocidade de germinação com o uso de GA₃ e TMG variando de 29 a 15 dias, enquanto sem GA₃ esse período alcançou até 173 dias quando a secagem foi de 10%. Além disso, a velocidade e a sincronização da germinação foram favorecidas com a aplicação de GA₃ e a dormência superada (Fig 4). As sementes de *A. glabra* se mostraram capazes de tolerar a secagem até 5% de água, com 91% de sementes germinadas, resultado semelhante àqueles observados por Carvalho *et al.* (2001) que obtiveram 95% de germinação nas sementes secas até 3,8%. No trabalho de Infante Mata and Moreno-Casasola (2005) também foi observado que as sementes de *A. glabra* secas a sombra e ao sol por quatro meses, apresentaram elevada porcentagem de germinação, apesar disso, os autores a consideram recalcitrantes, porém com o presente estudo foi possível compreender a atuação dos mecanismos destas sementes frente a secagem o que está de acordo com o trabalho de Carvalho *et al.* (2001) e não concorda com a sua classificação como recalcitrante.

Neste estudo a redução no número de proteínas LEA nas sementes de *A. crassiflora* submetidas à secagem pode estar relacionada com a intolerância ao teor de 5% de água, de modo que nos teores de 20% e 10% essa variedade e intensidade de proteínas aumentam com a reidratação e só reduzem no teor de 5%. O menor número de proteínas observado quando as sementes secam até 5% e são reidratadas coincide com redução da germinação, de 68%, 71% e 71% (com teor inicial de água, 20% e 10% respectivamente) para 32% com 5%, demonstrando que provavelmente o acúmulo de LEAs seja um dos sistemas envolvidos com a capacidade de TD desta espécie. Observa-se ainda que o sistema atuou independente da existência de dormência nas sementes da espécie, uma vez que se detectou a variação no número de proteínas com o aumento da secagem e reidratação em água, mas a germinação foi nula quando o regulador GA₃ não foi acrescentado na solução de reidratação.

Em *A. glabra* o que se observou foi pequena variação no número de proteínas e capacidade da espécie em tolerar a secagem até o teor de 5%, o que pode indicar a ação de proteínas específicas da família de LEAs agindo, sem a necessidade de grande número de proteínas de diferentes pesos moleculares. Neste contexto, os resultados demonstraram que as LEAs presentes atuaram conforme proposto por Pammenter and Berjak (2000) e Leduc *et al.* (2012), como moléculas osmoprotetoras durante a perda de água, evitando a ocorrência de danos à membrana durante a embebição, da mesma forma que os açúcares. Além disso, se observou elevada porcentagem de germinação (91%) com a secagem até 5%, o que também é um indicativo de tolerância à dessecação da espécie.

Desta maneira, a redução no número de proteínas LEA encontrado em *A. crassiflora* com a secagem até 5% parece estar relacionada com a menor porcentagem e velocidade de germinação de sementes de *A. crassiflora*, enquanto a pequena variação e o menor número de proteínas detectadas em sementes de *A. glabra* até alcançar o teor de 5% de água, coincidem com as respostas de maior porcentagem e velocidade de germinação.

No trabalho de Corsato (2014) com sementes de *A. emarginata* (intermediárias) ocorre o acúmulo de proteínas LEA, tanto na variedade como na intensidade de proteínas à medida que estas sementes vão se desenvolvendo e sendo secas, o que difere dos resultados obtidos neste trabalho, no qual as sementes de *A. crassiflora*, quando secas a 10% e 5% reduzem seu conteúdo de LEA e somente vão acumular LEA quando são secas a 10% e reidratadas, o que também não acontece com as sementes de *A. glabra* as quais não apresentam grandes variações no conteúdo de LEA.

Açúcares solúveis

Os açúcares, assim como as proteínas da embriogênese tardia (LEA) e o sistema antioxidante atuam na proteção contra os danos de secagem em sementes. A atuação dos carboidratos na limitação destes danos se dá pela formação de um estado viscoso ou vítreo capaz de retardar as reações químicas que poderiam danificar as células, além de impedir a fusão das membranas e o rompimento celular (Buckeridge *et al.* 2000).

De modo geral, o conteúdo de açúcares solúveis totais e a quantidade de sacarose foram reduzidos em ambas às espécies à medida que se aumentou a secagem e reidratou as sementes. Estes açúcares podem ter sido utilizados no processo germinativo, pois ao reidratar as sementes, o metabolismo é reativado e consequentemente se inicia a degradação de substâncias de reserva presentes nas sementes (Ataíde *et al.* 2017).

Por outro lado, conforme proposto por diversos autores (Illing *et al.* 2005; Corsato *et al.* 2012) em sementes tolerantes à dessecação a sacarose está presente em abundância de modo que seu conteúdo aumenta em resposta à dessecação dos tecidos, como ocorre com sementes de feijão (Bailly *et al.* 2001), mas não foi observado neste trabalho em nenhuma das espécies. Essa redução no conteúdo dos açúcares totais, e inclusive da sacarose nos leva a hipotetizar que nestas espécies não é necessário o acúmulo de sacarose para a proteção, de modo que os outros mecanismos envolvidos na tolerância à dessecação podem ter sido ativados para a proteção da semente ou podendo este papel de proteção, ter sido desempenhado por outros açúcares.

Neste trabalho, se observaram aumentos pontuais na concentração de frutose e trealose em sementes de *A. crassiflora*, sendo que há aumento significativo na concentração de trealose em sementes secas até 10%, o que pode ser um indicativo da ação deste açúcar na tolerância a dessecação observada neste nível de secagem. Esta resposta é coincidente com o maior número de bandas de LEA já mencionado, aumento da atividade da SOD e reduzida peroxidação lipídica, o que pode ter garantido a tolerância à dessecação e germinação com este teor de água. No entanto, durante a reidratação a trealose é reduzida indicando sua metabolização. Nas sementes de *A. glabra* a frutose foi o açúcar que se acumulou nas sementes secas com o aumento do nível de secagem, parecendo ser este o participante mais efetivo na TD quando as sementes alcançam 5% de água. No entanto, este açúcar também é reduzido com a reidratação, da mesma forma que a trealose nas sementes de *A. crassiflora*.

Os açúcares envolvidos com a tolerância a dessecação variam em função da espécie estudada, conforme se verificou neste experimento, por exemplo, para sementes de

Caesalpinia echinata secas e armazenadas por 30 dias a -18°C , observou-se o aumento no nível de ciclitóis, sacarose, rafinose e estaquiose, enquanto que para as sementes de *Erythrina speciosa*, sob as mesmas condições, os açúcares que apresentaram níveis marcadamente altos foram apenas a rafinose e estaquiose (Mello *et al.* 2011). Cabe observar que embora em mesmas condições ambientais, são comparadas espécies de diferentes gêneros, enquanto que neste estudo são variações observadas em espécies de um mesmo gênero, secas nas mesmas condições.

Sistema antioxidante

O sistema antioxidante é capaz de reduzir o estresse oxidativo na desidratação de células, capturando espécies reativas do oxigênio (ROS) e/ou sequestrando íons metálicos que geram ROS (Tunnacliffe and Wise 2007), além de possivelmente contribuir com os açúcares em condições de seca para a proteção das membranas (Hoekstra *et al.* 2001).

A desidratação pode causar danos nas células das sementes e consequente aumento da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A enzima superóxido dismutase (SOD) é capaz de dismutar o superóxido ($^{\circ}\text{O}_2$) em H_2O_2 e a catalase (CAT) e a peroxidase (POD) de converter este H_2O_2 em compostos não tóxicos para as células (Silva *et al.*, 2015).

Deste modo, em sementes de *A. crassiflora* a redução de SOD acarretou em dano de membrana no teor de 5% das sementes secas. Contudo, quando as sementes secas a 5% foram reidratadas a atividade da SOD aumentou e a peroxidação lipídica diminuiu indicando possível reparo. Porém a porcentagem de germinação foi baixa em relação aos demais tratamentos, indicando que apesar do sistema antioxidante estar ativo, os danos causados pela secagem foram severos o suficiente para impedir o restabelecimento celular. Deste modo, a espécie não tolerou a secagem até 5% o que resultou em baixa porcentagem de germinação (32%) em relação aos demais teores de água estudados.

O aumento da atividade da SOD com a reidratação pode estar relacionado à resposta ao estresse causado pela seca, e não somente ao fato do sistema antioxidante atuar durante a embebição redirecionando seu metabolismo para que ocorra o processo de germinação, conforme proposto por Pammenter and Berjak (2000). Além disso, não foram observadas variações na atividade da POD e CAT em resposta as variações nos níveis de secagem, não sendo possível detectar ação efetiva do sistema enzimático na tolerância à dessecação desta espécie.

Por outro lado, as sementes reidratadas apresentaram aumento na atividade de SOD e do dano de membrana, demonstrando incapacidade de evitá-lo. No entanto, apesar do dano, a germinação não foi comprometida o que indica que este dano de membrana pareceu menos severo e não prejudicou o desenvolvimento do embrião. Já a redução do teor de água até 5% nas sementes de *A. crassiflora* foi danosa para a germinação mesmo com o sistema antioxidante ativo, inclusive as enzimas CAT e POD que não apresentaram diferenças entre os tratamentos.

Nas sementes de *A. glabra* o sistema enzimático (SOD, POD e CAT) atuou em conjunto e de modo efetivo evitando danos significativos de membrana, e garantindo germinabilidade das sementes com secagem de até 5%. O aumento da atividade da POD nas sementes secas até 5% e da CAT em sementes reidratadas a partir de 5% pode ter sido satisfatório no conjunto das atividades enzimáticas garantindo a redução de radicais livres no sistema.

Como é possível observar, ambas espécies foram capazes de tolerar a secagem pelo menos até o teor de 10% e o sistema antioxidante atuou de maneira distinta para cada espécie, esta atuação distinta do sistema antioxidante também pode ser observada em sementes de feijão, onde as enzimas que atuaram apresentando alta atividade na tolerância à dessecação foram a catalase (CAT) e a glutaciona redutase (GR), enquanto que as enzimas superóxido dismutase (SOD) e a ascorbato peroxidase (APX) apresentaram baixa atividade (Bailly *et al.* 2001). Por outro lado, em sementes de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek a catalase apresentou maior atividade, enquanto que a peroxidase reduziu sua atividade (Silva *et al.* 2015). Já em outro trabalho realizado com sementes de milho, os resultados também apontam que a tolerância dessas sementes à temperatura de 50°C está associada à atividade da enzima catalase, porém pouco relacionada à atividade das enzimas superóxido dismutase e peroxidase (Rosa *et al.* 2005).

Além disso, no estudo realizado com sementes de duas espécies da mesma família com classificações de tolerância à dessecação distintas (*Acer pseudoplatanus* L. (recalcitrantes) e *Acer platanoides* L. (ortodoxas)), foi possível observar a atividade dos mecanismos antioxidantes em ambas, porém nas sementes recalcitrantes (*Acer pseudoplatanus* L.) além da atividade destes mecanismos, também ocorre a redução nas taxas respiratórias durante a maturação, enquanto que nas sementes ortodoxas (*Acer platanoides* L.), além da ação dos mecanismos antioxidantes, estas também apresentam maior concentração de proteínas LEA e carboidratos, o que indica a tolerância à dessecação (Greggains *et al.* 2000).

Em síntese os resultados demonstraram que embora as espécies estudadas sejam oriundas de *habitats* distintos (*A. crassiflora* do Cerrado e *A. glabra* de Mangue), as sementes foram dispersas com teores de água semelhantes, (35,53% para *A. crassiflora* e 37,09% para *A. glabra*) e apresentaram capacidade de tolerar a secagem, no entanto, com limites diferentes de tolerância e atuação distinta dos mecanismos de tolerância à dessecação. Para *A. crassiflora* o limite para dessecação foi de 10% sem redução da porcentagem de germinação (71%) e até 5% em *A. glabra*, com 91% de germinação, em ambos os casos com o uso de GA₃ (Fig. 3 e 4).

3.7.CONCLUSÕES

Há modulação dos mecanismos relacionados a tolerância à dessecação com respostas específicas para cada espécie, sem a ocorrência de padronização quanto às proteínas LEA, acúmulo de açúcares e/ou atividade enzimática para garantir a tolerância à dessecação das sementes de *A. crassiflora* e *A. glabra* de *habitats* contrastantes.

3.8.AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e a todos os colaboradores do trabalho.

3.9.LITERATURA CITADA

- Alfenas, AC, Brune, W. 1998.** Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: Alfenas, AC. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa, MG: UFV, p.151-182.
- Andrade ACSD, Pereira TS. 1997.** Comportamento de armazenamento de sementes de palmitheiro (*Euterpe edulis* Mart.). *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **32**: 987–991.
- Andrade RR, Schorn LA, Nogueira AC. 2005.** Tolerância à dessecação em sementes de *Archantophoenix alexandrae* Wendl. and drude (Palmeira Real Australiana). *Ambiência - Revista do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais*. **1**: 279–288.
- Annona* in **Flora do Brasil 2020 em construção. Acesso em: 16 Dez. 2018.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro.Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB117159>>.
- Annonaceae in **Flora do Brasil 2020 em construção. Acesso em: 15 Dez. 2018** Jardim Botânico do Rio de Janeiro.Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB110219>>.
- Aquino FDG, Machado B, Walter T, Ribeiro F. 2007.** Espécies Vegetais de Uso Múltiplo em Reservas Legais de Cerrado - Balsas , MA. *Revista Brasileira de biociências*. **5**: 147–149.
- Ataíde GDM, Borges EEDL, Picoli EADT, Filho ATL, Flores AV. 2017.** Changes in seed reserves of *Melanoxylon brauna* Schott. (Fabaceae Caesalpinoideae) during germination at different temperatures. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. **12**: 372–379.
- Bailly C, Audigier C, Ladonne F, Wagner MH, Coste F, Corbineau F, Côme D. 2001.** Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *Journal o Experimental Botany*. **52**: 701–708.
- Barbedo CJ, Marcos Filho J. 1998.** Tolerância à dessecação em sementes. *Acta Botanica Brasilica*. **12**: 145–164.
- Beauchamp C, Fridovich I. 1971.** Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels1. *Analytical Biochemistry*. **44**: 276–287.
- Bernardes TG, Estrêla CT, Naves RV, Rezende CFA, Mesquita MAM, Pires LL. 2007.** Efeito do armazenamento e de fitohormônios na qualidade fisiológica de sementes de *Araticum* (*Annona crassiflora* Mart.). *Pesquisa Agropecuaria Tropical*. **37**: 163–168.
- Bernardes TG, Estrêla CT, Navez RV, Rezende CFA, Mesquita MAM, Pires LL. 2007.** Efeito do armazenamento e de fitohormônios na qualidade fisiológica de sementes de *Araticum* (*Annona crassiflora* Mart.). *Pesquisa Agropecuária Tropical*. **37**: 163–168.

- Blackman SA, Wettlaufer SH, Obendorf RL, Leopold AC. 1991.** Maturation Proteins Associated with Desiccation Tolerance in Soybean1. *Plant physiology*. **96**: 868–874.
- Brasil. 2009.** Ministério da Agricultura. Regra de análise de sementes. *Brasília: Departamento de Produção Vegetal*, p. 398.
- Buckeridge MS, Tiné MAS, Santos HP Dos, Lima DU De. 2000.** Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. edição esp: 137–162.
- Carvalho JEU, Nascimento WMO, Muller CH. 2001.** Tolerância de sementes de Araticu,-do-brejo (*Annona glabra* L.) ao dessecamento e ao congelamento. *Revista Brasileira de Fruticultura*. **23**: 179–182.
- Chatrou LW, Pirie MD, Erkens RHJ, et al. 2012.** A New Higher-level Classification of The Pantropical Flowering Palnt Family Annonaceae Informed by Molecular Phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **169**: 5–40.
- Corsato JM. 2014.** Maturação e aquisição de tolerância à dessecação de sementes de *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. RAINER. *Tese de Doutorado* 186.
- Corsato JM, Ferreira G, Barbedo CJ. 2012.** Desiccation tolerance in seeds of *Annona emarginata* (Schldtl .) H . Rainer and action of plant growth regulators on germination. *Brazilian Society of Plant Physiology*. **24**: 253–260.
- Costa CJ. 2009.** Armazenamento e conservação de sementes de espécies do Cerrado. *EMBRAPA Cerrados*. 30p. (EMBRAPA Cerrados ISSN:1517-5111, ISSN Online:2176-5081; Documento, 265).
- Dalahol SJ, Mombach TC, Toderke ML, Nogueira V, Bortolinia MF. 2013.** Dormência em sementes de *Annona cacans* Warm. (Annonaceae). *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, **11**: s183–s189.
- Dekkers BJW, Costa MCD, Maia J, Bentsink L, Ligterink W, Hilhorst HWM. 2015.** Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. *Planta*. **241**: 563–577.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956.** Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*. **28**: 350–356.
- Ellis RH, Hong TD, Roberts EH. 1990.** An Intermediate Category of Seed Storage Behaviour ? *Journal of Experimental Botany*. **41**: 1167–1174.
- Ferreira G, De-La-Cruz-Chacón I, Silvia C, et al. 2019.** Propagation of Annonaceous plants. *Revista Brasileira de Fruticultura*. **41**: e-500.
- Ferreira G, Rosa A, Esquinca G, et al. 2014.** Water uptake by *Annona diversifolia* SAFF .

And A . *purpurea* MOC . & Sessé ex dunal seeds (Annonaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*. **36**: 288–295.

Fisch STV, Nogueira Jr LR, Mantovani W. 2006. Fenologia reprodutiva de *Euterpe edulis* Mart. Na Mata Atlântica (Reserva ecológica do Tabiju, Pindamonhangaba – SP). *Biota Neotropica*. **6**: 31–37.

Garcia IS, Souza A, Barbedo CJ, Dietrich SMC, Figueiredo-Ribeiro RCL. 2006. Changes in soluble carbohydrates during storage of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) seeds, an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Biology*. **66**: 739–745.

González-esquinca AR, De-la-cruz-chacón I, Castro-moreno M, Orozco-castillo JA, Saldaña CAR-. 2014. Alkaloids and Acetogenins in Annonaceae development: Biological considerations. *Revista brasileira de fruticultura*. **36**: 1–16.

Hadas A. 1976. Water Uptake and Germination of Leguminous Seeds in Soils of Changing Matric and Osmotic Water Potential. *Journal of Experimental Botany*. **27**: 480–489.

Heath R, Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated Chloroplasts I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation Department. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **125**: 189–198.

Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J. 2001. Mechanism of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*. **6**: 431–438.

Illing N, Denby KJ, Collett H, Shen A, Farrant JM. 2005. The Signature of Seeds in Resurrection Plants: A Molecular and Physiological Comparison of Desiccation Tolerance in Seeds and Vegetative Tissues. *Integrative and Comparative Biology*. **45**: 771–787.

Infante Mata D, Moreno-Casasola P. 2005. Effect of in situ storage, light, and moisture on the germination of two wetland tropical trees. *Aquatic Botany*. **83**: 206–218.

Koster KL, Leopold AC. 1988. Sugars and Desiccation Tolerance in Seeds. *Plant Physiology*. **88**: 829–832.

Leduc SNM, Silva JPN, Gaspar M, Barbedo CJ, Figueiredo-Ribeiro RDCL. 2012. Hidratos de carbono não estruturais de sementes imaturas de *C. echinata* (Leguminosae) estão envolvidos na indução de tolerância à dessecação. *Australian Journal of Botany*. **60**: 42–48.

Liu Y, Liang J, Sun L, Yang X, Li D. 2016. Group 3 LEA Protein , ZmLEA3 , Is Involved in Protection from Low Temperature Stress. *frontiers in plant science*. **7**: 1–10.

Matsumoto RS, Ribeiro JPN, Takao LK, Lima MIS. 2010. Potencial alelopático do extrato

- foliar de *Annona glabra* L. (Annonaceae) *Acta Botanica Brasilica*. **24**: 631–635.
- Mello JIO, Centeno DC, Barbedo CJ, Figueiredo-Ribeiro RCL. 2011.** Changes in carbohydrate composition in seeds of three tropical tree species submitted to drying and storage at freezing temperature. *Seed Science and Technology*. **39**: 465–480.
- Pammenter NW, Berjak P. 2000.** Evolutionary and ecological aspects of recalcitrant seed biology. *Seed Science Research*. **10**: 301–306.
- Peixoto PHP, Cambraia J, Sant’Anna R, Mosquim R, Moreira AM. 1999.** Aluminum Effects on Lipid Peroxidation and on the Activities of Enzymes of Oxidative Metabolism in Sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. **11**: 137–143.
- Pimentel-Gomes, F. 2000.** Curso de estatística experimental. 14. Ed. Piracicaba: ESALQ. 468 p.
- Piña-Rodrigues FCM, Figliolia MB. 2005.** Embryo immaturity associated with delayed germination in recalcitrant seeds of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. (Myristicaceae). *Seed Science and Technology*. **33**: 375–386.
- Rosa SDVF Da, Pinho ÉVR Von, Vieira ESN, Veiga RD, Veiga AD. 2005.** Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas LEA associadas à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem. *Revista brasileira de sementes*. **27**: 91–101.
- São José AR, Pires MM, Freitas ALGE, Ribeiro DP, Perez LAA. 2014.** Atualidades e perspectivas das Anonáceas no mundo. *Revista Brasileira de Fruticultura*. **36**: 86–93.
- Silva EAA, Melo DLB, Davide AC, et al. 2007.** Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. *Annals of Botany*. **99**: 823–830.
- Silva LA da, Sales JDF, Oliveira JA, Pinho ÉV de R Von, Santos HO dos, Soares MA. 2015.** Desiccation tolerance of *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek (Rhamnaceae) seeds. *Acta Scientiarum*. **37**: 181–189.
- Teisseire H, Guy V. 2000.** Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Science*. **153**: 65–72.
- Tunnacliffe A, Wise MJ. 2007.** The continuing conundrum of the LEA proteins. : 791–812.
- Walters C. 2000.** Levels of Recalcitrance in Seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. **12**: 7–21.

4. Considerações finais

Levando em consideração a importância da família Annonaceae, a diversidade de ambientes nos quais a família se encontra e a capacidade de tolerar a dessecação de espécies oriundas de *habitats* com menor disponibilidade de água, é importante o esclarecimento do modo como os mecanismos de tolerância à dessecação de sementes da família Annonaceae oriundas de *habitats* contrastantes atuam.

Com os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que os mecanismos de tolerância à dessecação atuam de modo distinto para que sementes de *A. crassiflora* e *A. glabra*, oriundas de *habitats* contrastantes, sejam capazes de tolerar diferentes níveis de secagem.

5. Referências

ALFENAS, A.C.; BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: ALFENAS, A.C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: **fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa, MG: UFV, 1998. p.151-182.

ANDRADE, A. C. S. D.; PEREIRA, T. S. Comportamento de armazenamento de sementes de palmito (*Euterpe edulis* Mart.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 987–991, 1997.

ANDRADE, R. DO R.; SCHORN, L. A.; NOGUEIRA, A. C. Tolerância à dessecação em sementes de *Archontophoenix alexandrae* Wendl. and drude (Palmeira Real Australiana). **Ambiência - Revista do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 1, n. 2, p. 279–288, 2005.

Annona in **Flora do Brasil 2020** em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB117159>>. Acesso em: 16 Dez. 2018.

Annonaceae in **Flora do Brasil 2020** em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB110219>>. Acesso em: 15 Dez. 2018

AQUINO, F. D. G. et al. Espécies Vegetais de Uso Múltiplo em Reservas Legais de Cerrado - Balsas, MA. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 147–149, 2007.

ATAÍDE, G. D. M. et al. Changes in seed reserves of *Melanoxylon brauna* Schott. (Fabaceae Caesalpinoideae) during germination at different temperatures. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 12, n. 3, p. 372–379, 2017.

BAI, B. et al. Metabolic patterns associated with the seasonal rhythm of seed survival after dehydration in germinated seeds of *Schismus arabicus*. **BMC Plant Biology**, v.15, n.37, p. 1–11, 2015.

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

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

BATTAGLIA, M. et al. The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins [W]. **Plant Physiology**, v. 148, n. September, p. 6–24, 2008.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276–287, 1971.

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

BERJAK, P.; VERTUCCI, C. W.; PAMMENTER, N. W. Effects of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation-sensitivity in recalcitrant seeds of *Camellia sinensis*. **Seed Science Research**, v. 3, n. 3, p. 155–166, 1993.

BERNARDES, T. G. et al. Efeito do armazenamento e de fitohormônios na qualidade fisiológica de sementes de Araticum (*Annona crassiflora* Mart.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 3, p. 163–168, 2007.

BLACKMAN, S. A. et al. Maturation Proteins Associated with Desiccation Tolerance in Soybean. **Plant Physiology**. v. 96, p. 868–874, 1991.

BOSCOLO, M. Sucochemistry: synthesis and potentialities for applications of some sucrose chemical derivates. **Química nova**, v. 26, n. 6, p. 906–912, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regra de análise de sementes**. Brasília: Departamento de Produção Vegetal, p. 398, 2009.

BUCKERIDGE, M. S. et al. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista brasileira de fisiologia vegetal**, v. edição esp, n. 12, p. 137–162, 2000.

CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O.; MULLER, C. H. Tolerância de sementes de Araticum-do-brejo (*Annona glabra* L.) ao dessecação e ao congelamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 1, p. 179–182, 2001.

CHATROU, L. W. et al. A New Higher-level Classification of The Pantropical Flowering Palnt Family Annonaceae Informed by Molecular Phylogenetics. **Botanical Journal of the**

Linnean Society, v. 169, p. 5–40, 2012.

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

CORSATO, J. M. TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE ARATICUM-DE-TERRA-FRIA (*Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. RAINER). 95p. **Dissertação (Mestrado)** Instituto de Biociências, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

CORSATO, J. M. MATURAÇÃO E AQUISIÇÃO DE TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO DE SEMENTES DE *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. RAINER. 185p. **Tese (Doutorado)** Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, 2014.

CORSATO, J. M.; FERREIRA, G.; BARBEDO, C. J. Desiccation tolerance in seeds of *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer and action of plant growth regulators on germination. **Brazilian Society of Plant Physiology**, v. 24, n. 4, p. 253–260, 2012.

COSTA, C. J. **Armazenamento e conservação de sementes de espécies do Cerrado**. Planaltina-DF: EMBRAPA CERRADOS 2009. 30p. (EMBRAPA CERRADOS ISSN:1517-5111, ISSN Online: 2176-5081; Documentos, 265).

COSTA, M. C. D. et al. Key genes involved in desiccation tolerance and dormancy across life forms. **Plant Science**, p. 1–7, 2016.

DALANHOL, S. J. et al. Dormência em sementes de *Annona cacans* Warm. (Annonaceae). **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 11, n. 1, p. s183–s189, 2013.

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

DELSENY, M. et al. Late Embryogenesis Abundant (LEA) protein gene regulation during Arabidopsis seed maturation. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p. 419–427, 2001.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

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

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

FERREIRA, G. et al. Water uptake by *Annona diversifolia* SAFF. And *A. purpurea* MOC. & Sessé ex dunal seeds (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n.

edição especial, p. 288–295, 2014.

FERREIRA, G. et al. Propagation of Annonaceous plants. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 1, p. e-500, 2019.

FISCH, S. T. V.; NOGUEIRA JR, L. R.; MANTOVANI, W. Fenologia reprodutiva de *Euterpe edulis* Mart. Na Mata Atlântica (reserva ecológica do Tabiju, Pindamonhangaba – SP). **Biota Neotropica**, v. 6, n. 3, p. 31–37, 2006.

GARCIA, I. S. et al. Changes in soluble carbohydrates during storage of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) seeds, an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 2B, p. 739–745, 2006.

GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. et al. Alkaloids and Acetogenins in Annonaceae development: Biological considerations. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. edição especial, p. 1–16, 2014.

GREGGAINS, V. et al. Metabolism-induced free radical activity does not contribute significantly to loss of viability in moist-stored recalcitrant seeds of contrasting species. **New Phytologist**, v. 148, n. 2, p. 267–276, 2000.

HADAS, A. Water Uptake and Germination of Leguminous Seeds in Soils of Changing Matric and Osmotic Water Potential. **Journal of Experimental Botany**, v. 27, n. 98, p. 480–489, 1976.

HEATH, R.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated Chloroplasts I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation Department. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, p. 189–198, 1968.

HENDRY, G. A. F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, v. 3, n. 3, p. 141–153, 1993.

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

ILLING, N. et al. The Signature of Seeds in Resurrection Plants: A Molecular and Physiological Comparison of Desiccation Tolerance in Seeds and Vegetative Tissues. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, p. 771–787, 2005.

INFANTE MATA, D.; MORENO-CASASOLA, P. Effect of in situ storage, light, and moisture on the germination of two wetland tropical trees. **Aquatic Botany**, v. 83, n. 3, p. 206–218, 2005.

JING, Y. et al. Functional characterization of galactinol synthase and raffinose synthase in desiccation tolerance acquisition in developing *Arabidopsis* seeds. **Journal of Plant Physiology**, v. 230, n. December 2017, p. 109–121, 2018.

JOSÉ, S. C. B. R.; PINHO, É. V. DE R. VON; DIAS, M. A. G. S. Açúcares e Tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 60–68, 2006.

KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed Development and Germination**. Plenum, New York, 1995.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 707–713, 2005.

KOSTER, K. L.; LEOPOLD, A. C. Sugars and Desiccation Tolerance in Seeds. **Plant Physiology**, v. 88, n. 3, p. 829–832, 1988.

KRANNER, I.; BIRTIC, S. A Modulating Role for Antioxidants in Desiccation Tolerance. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, n. 5, p. 734–740, 2006.

LEDUC, S. N. M. et al. Hidratos de carbono não estruturais de sementes imaturas de *C. echinata* (Leguminosae) estão envolvidos na indução de tolerância à dessecação. **Australian Journal of Botany**, v. 60, n. 1, p. 42–48, 2012.

LEHNER, A. et al. Changes in wheat seed germination ability , soluble carbohydrate and antioxidant enzyme activities in the embryo during the desiccation phase of maturation. **Journal of Cereal Science**, v. 43, p. 175–182, 2006.

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

LIU, Y. et al. Group 3 LEA Protein , ZmLEA3 , Is Involved in Protection from Low Temperature Stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. July, p. 1–10, 2016.

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

MATSUMOTO, R. S. et al. Potencial alelopático do extrato foliar de *Annona glabra* L . (Annonaceae) Após o fracionamento líquido : líquido foram obtidas três. **Acta Botanica Brasílica**, v. 24, n. 3, p. 631–635, 2010.

MELLO, J. I. O. et al. Changes in carbohydrate composition in seeds of three tropical tree species submitted to drying and storage at freezing temperature. **Seed Science and Technology**, v. 39, n. 2, p. 465–480, 2011.

MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459–483, 2007.

NEVES, C. S. V. J. Sementes recalcitrantes - Revisão de Literatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 1.459-1.467, 1994.

OLVERA-CARRILLO, Y.; REYES, J. L.; COVARRUBIAS, A. A. Late embryogenesis abundant proteins Versatile players in the plant adaptation to water limiting environments.

Plant Signaling and Behavior, v. 6, n. 4, p. 586–589, 2011.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Evolutionary and ecological aspects of recalcitrant seed biology. **Seed Science Research**, v. 10, n. 03, p. 301–306, 2000.

PEIXOTO, P. H. P. et al. Aluminum Effects on Lipid Peroxidation and on the Activities of Enzymes of Oxidative Metabolism in Sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137–143, 1999.

PIMENTEL-GOMES, F. Curso de estatística experimental. 14. Ed. Piracicaba: ESALQ, 2000. 468 p.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. Embryo immaturity associated with delayed germination in recalcitrant seeds of *Virola surinamensis* (Rol .) Warb . (Myristicaceae). **Seed Science and Technology**, v. 33, p. 375–386, 2005.

ROBERTS, E. H. et al. Oxidative processes and the control of seed germination. **Seed Ecology**, v. 189218, 1973.

ROSA, S. D. V. F. DA 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**, v. 27, n. 2, p. 91–101, 2005.

SÃO JOSÉ, A. R. et al. Atualidades e perspectivas das Anonáceas no mundo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 86–93, 2014.

SILVA, L. A. DA et al. ‘ Desiccation tolerance of *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek (Rhamnaceae) seeds. **Acta Scientiarum**, v. 37, n. 2, p. 181–189, 2015.

SILVA, E. A. A. et al. Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. **Annals of Botany**, v. 99, n. 5, p. 823–830, 2007.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 2017.

TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant science**, v. 153, p. 65–72, 2000.

TEIXEIRA, F. P. et al. Maturation and Desiccation Tolerance in Seeds of *Sesbania virgata* (Cav .) Pers . **Floresta e Ambiente**, v. 25, n. 4, p. e20160419, 2018.

TUNNACLIFFE, A.; WISE, M. J. The continuing conundrum of the LEA proteins. **Naturwissenschaften**, p. 791–812, 2007.

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

WALTERS, C. Levels of Recalcitrance in Seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. Edição especial, p. 7–21, 2000.

WISE, M. J.; TUNNACLIFFE, A. POPP the question : what do LEA proteins do? **Trends**

In Plant Science, v. 9, n. 1, p. 13–17, 2004.