

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**RE-INDUÇÃO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES
GERMINADAS DE FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata* L. (WALP.))**

ALEXANDRE CARNEIRO DA SILVA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Agricultura).

BOTUCATU – SP
Agosto - 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**RE-INDUÇÃO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES
GERMINADAS DE FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata* L. (WALP.))**

ALEXANDRE CARNEIRO DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Agricultura).

BOTUCATU – SP
Agosto – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO- BOTUCATU (SP)

S586r Silva, Alexandre Carneiro da, 1982-
Re-indução da tolerância à dessecação em sementes germinadas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) / Alexandre Carneiro da Silva. - Botucatu : [s.n.], 2015
ix, 52 f.: ils., grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2015
Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva
Inclui bibliografia

1. Feijão-Caupi - Cultivo. 2. Estresse hídrico. 3. Germinação - Sementes. I. Silva, Edvaldo Aparecido Amaral da. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu. III. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE CIENCIAS AGRONOMICAS DE BOTUCATU

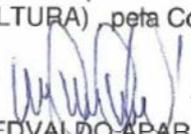
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

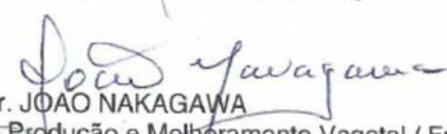
TÍTULO: RE-INDUÇÃO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES GERMINADAS DE
FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata* L. (WALP.))

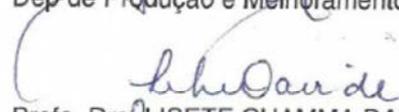
AUTOR: ALEXANDRE CARNEIRO DA SILVA

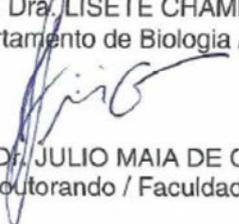
ORIENTADOR: Prof. Dr. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA
(AGRICULTURA) pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA
Dep de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu


Prof. Dr. JOAO NAKAGAWA
Dep de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu


Profa. Dra. LISETE CHAMMA DAVIDE
Departamento de Biologia / Universidade Federal de Lavras


Prof. Dr. JULIO MAIA DE OLIVEIRA
Pós-doutorando / Faculdade de Ciências Agrômicas - FCA


Prof. Dr. CLÁUDIO JOSÉ BARBEDO
Instituto de Botânica / Núcleo de Pesquisa em Sementes

Data da realização: 30 de setembro de 2015.

Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas.

Muito conhecimento, que se sintam humildes.

É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o Céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe. (Leonardo da Vinci).

Ao professor João Nakagawa

DEDICO.

Se não fosse imperador, desejaria ser professor.

Não conheço missão maior e mais nobre que a de dirigir as inteligências jovens e preparar os homens do futuro (D. Pedro II)

Aos bons professores, da academia e da vida...

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Edvaldo Amaral. Pelo acolhimento e orientação durante missão de estudos durante o mestrado. Pelas valiosas contribuições em trabalhos acadêmicos e ensinamentos sobre redação científica. Pela orientação no doutorado. Por ter sido mais que um orientador, um amigo paciente e cuidadoso...

Ao professor João Nakagawa por participar da banca de defesa. Pelos valiosos e privilegiados ensinamentos que não estão nos livros. Pela grande contribuição para o desenvolvimento deste trabalho de Tese, e em outros trabalhos acadêmicos. Por aceitar participar da banca de defesa. Pelo exemplo de dedicação e integridade. Por tantas conversas produtivas...

Ao professor Otoniel Morais. Meu orientador de mestrado, amigo e “pai afetivo”. Por ter aceitado fazer parte da banca de defesa desta Tese, como suplente.

À professora Lisete Chamma Davide. Pelo ter me acolhimento e orientação nas avaliações de citogenética, no Laboratório de Citogenética da UFLA e por aceitar participar da banca de defesa.

Ao doutor Júlio Maia. Pelas sugestões e contribuições para o desenvolvimento desta Tese. Por aceitar fazer parte da banca de defesa. Pelo treinamento em Biologia Molecular, e tantos outros conhecimentos compartilhados.

Ao doutor Claudio Jose Barbedo. Por aceitar fazer parte da banca de defesa desta Tese.

À doutora Juliana Bravo. Por aceitar fazer parte da banca de defesa como suplente, e pelo valioso treinamento em Biologia Molecular.

Ao doutor Wilson Vicente Pereira. Por aceitar fazer parte da banca de defesa como suplente.

Ao professor Evaristo Mauro de Castro. Pela orientação e suporte para a realização dos estudos ultracelulares realizados neste trabalho de Tese.

Aos colegas do Laboratório de Sementes da FCA/Agricultura/UNESP, pela troca de experiências e a oportunidade de evoluir com a convivência.

Aos funcionários (as) da Secretária e Laboratórios do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal FCA/NESP. Por proporcionar as melhores condições possíveis de trabalho.

Aos amigos Pedro Bento, Breno Kennedy, Carlos Jorge, Wilson Dourado e Tiago Alexandre, pelo tempo que, como irmãos, dividimos a casa, os problemas, as alegrias, contas...

Aos amigos Gislean Carvalho, Pedro Anderson e Tiago Palhares, pelo acolhimento e ótima convivência durante o período de permanência em Lavras para desenvolvimento de parte desta Tese.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
RESUMO.....	1
SUMMARY.....	3
1 INTRODUÇÃO.....	5
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 Cultivo do feijão-caupi e estresse hídrico.....	7
2.2 Tolerância à dessecação em sementes.....	8
2.3. Re-indução da tolerância à dessecação em sementes germinadas.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Estudos fisiológicos da re-indução da tolerância à dessecação em sementes germinadas de feijão-caupi.....	15
3.1.1 Procedência e caracterização inicial das sementes.....	15
3.1.2 Determinação da curva de embebição.....	16
3.1.3 Determinação das curvas de germinação e perda da tolerância à dessecação.....	16
3.1.4 Re-indução da tolerância à dessecação em sementes germinadas.....	17
3.1.5 Determinação das curvas de secagem.....	17
3.2 Ciclo celular e índice mitótico em raízes primárias de feijão-caupi submetidas à re-indução de tolerância à dessecação.....	18
3.3 Alterações estruturais em células das raízes primárias de sementes germinadas de feijão-caupi submetidas à dessecação e à re-indução da tolerância à dessecação.....	19
3.4 Conteúdos de açúcares em raízes primárias de sementes de feijão-caupi durante a germinação e re-indução da tolerância à dessecação.....	19
3.5. Análises dos dados.....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22

4.1 Estudos fisiológicos da re-indução da tolerância à dessecação em sementes germinadas de feijão-caupi.....	22
4.2 Ciclo celular e índice mitótico em raízes primárias de sementes germinadas de feijão-caupi submetidas à re-indução da tolerância à dessecação.....	28
4.3 Análises ultraestruturais em raízes primárias de sementes germinadas de feijão-caupi em diferentes estágios do processo de re-indução de tolerância à dessecação.....	31
4.4 Análises dos conteúdos de açúcares em raízes primárias de sementes de feijão-caupi durante a germinação e re-indução da tolerância à dessecação.....	35
5 CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
APÊNDICES.....	50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resumo da análise de variância (Fc) para porcentagem de re-indução de tolerância à dessecação em sementes germinadas de feijão-caupi com 1, 2, 3 e 4 mm de comprimento de raiz primária, não tratadas (0 h) e tratadas com solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa, por 24, 48 e 72 horas, à temperatura de 10°C.....26
- Tabela 2.** Resumo da análise de variância (Fc) para o índice mitótico (IM) em sementes germinadas de feijão-caupi com raiz primária nos comprimentos de 1, 2, 3 e 4 mm, não tratadas (0 h) e tratadas com solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa, por 24 horas, à temperatura de 10°C.....29
- Tabela 3.** Contagem de células em diferentes fases de divisão, em sementes germinadas de feijão-caupi com raiz primária nos comprimentos de 1, 2, 3 e 4 mm, não tratadas e tratadas (0 h) solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa à temperatura de 10°C, por 24 horas.....29

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1.** Curva de embebição de sementes de feijão-caupi embebidas em água à temperatura de 25°C.....23
- Figura 2.** Curvas de germinação e de perda de tolerância à dessecação em sementes de feijão-caupi embebidas em água e posteriormente submetidas à secagem.....24
- Figura 3.** Curvas de secagem de sementes germinadas de feijão-caupi com raiz primária de 2 mm de comprimento, não tratadas (controle) e tratadas com solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa, à temperatura de 10°C, durante 24 horas.....25
- Figura 4.** Re-indução da tolerância à dessecação em sementes germinadas de feijão-caupi com raiz primária de 1, 2, 3 e 4 mm, não tratadas (0 horas) e tratadas com solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa, por 24, 48 e 72 horas, à temperatura de 10°C.....27
- Figura 5.** Índice mitótico (IM) em raízes primárias de sementes germinadas de feijão-caupi com raiz primária nos comprimentos de 1, 2, 3 e 4 mm, não tratadas (controle) e tratadas com solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa à temperatura de 10°C, por 24 horas.....30
- Figura 6.** Eletromicrografia de varredura (MEV) do corte transversal a 0,5 mm da extremidade do ápice da raiz primária da semente germinada de feijão-caupi com 2 mm de protrusão.....31
- Figura 7.** Eletromicrografias de varredura (MEV), na região do procâmbio, do corte transversal a 0,5 mm da extremidade do ápice de raízes primárias de sementes germinadas de feijão-caupi com 2 mm de protrusão.....34
- Figura 8.** Teor de água em radículas de sementes de feijão-caupi não embebidas (0 h) e embebidas em água por 16 horas, em raiz primária de sementes germinada em água com 2 mm de protrusão, e em raiz primária de sementes germinadas em água com 2 mm de protrusão submetidas ao tratamento osmótico por 8, 16 e 24 horas, em solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa à temperatura de 10°C.....36
- Figura 9.** Conteúdos de sacarose e rafinose em radículas de sementes de feijão-caupi não embebidas (0 h) e embebidas em água por 16 horas, em raiz primária de sementes germinada em água com 2 mm de protrusão, e em raiz primária de sementes germinadas em água com 2 mm de protrusão submetidas ao tratamento osmótico por 8, 16 e 24 horas,

em solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa à temperatura de 10°C.....37

RESUMO

A re-indução da tolerância à dessecação (TD) em sementes consiste no tratamento de sementes germinadas, que são sensíveis à dessecação, com soluções osmóticas para o re-estabelecimento da TD. Os objetivos com esse trabalho foram re-induzir a TD em sementes germinadas de feijão-caupi e realizar estudos fisiológicos, citogenéticos e ultraestruturais nas raízes primárias, buscando entender os mecanismos associados à re-indução da tolerância à dessecação. Para a re-indução da tolerância à dessecação, sementes germinadas com 1, 2, 3 e 4 mm de comprimento de raiz primária foram tratadas com solução de polietilenoglicol 6000 com $-1,7$ MPa, à 10°C , pelos períodos de 0, 24, 48 e 72 horas. Após o tratamento as sementes foram secas por 3 dias e reidratadas. Sementes que sobreviveram à secagem foram consideradas re-induzidas à TD. Sementes tratadas e não tratadas com raízes primárias com comprimentos de 1, 2, 3 e 4 mm tiveram as células da região do procâmbio avaliadas quanto aos eventos do mitose e índice mitótico. Além disso, uma análise ultraestrutural foi realizada na região do procâmbio de radículas de sementes não embebidas, e na raiz primária (2 mm de comprimento) de sementes germinadas sem secagem e submetida à secagem, e na raiz primária de sementes germinadas em água e subsequentemente tratadas com solução de polietilenoglicol $-1,7$ MPa à 10°C durante 24 horas, sem secagem e submetidas à secagem. Finalmente, foi quantificado o conteúdo de glicose, sacarose e rafinose nas radículas de

sementes não embebidas e embebidas em água durante 16 horas, e em raízes primárias de sementes germinadas com 2 mm de comprimento tratadas (-1,7 MPa 10°C durante 8, 16 e 24 horas) e não tratadas. O tratamento com solução osmótica de PEG à 10°C durante 24 horas foi eficiente para re-induzir a TD em sementes germinadas de feijão-caupi. O tratamento em solução osmótica proporcionou a manutenção das estruturas celulares durante a dessecação e inibiu o progresso do ciclo celular durante o desenvolvimento da raiz primária das sementes germinadas de feijão-caupi, contribuindo para a re-indução da tolerância à dessecação. O acúmulo de sacarose e rafinose são mecanismos de resposta fisiológica em sementes germinadas de feijão-caupi submetidas ao tratamento com solução de polietilenoglicol, que estão relacionados com a re-indução da tolerância à dessecação em feijão-caupi.

Palavra- chave: estresse hídrico, tratamento osmótico, ciclo celular, ultraestrutura celular, metabolismo de açúcar

RE-INDUCTION OF DESICCATION TOLERANCE IN GERMINATED COWPEA (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) SEEDS. Botucatu, 2015. 52p. Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: ALEXANDRE CARNEIRO DA SILVA

Adviser: EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

SUMMARY

The re-induction of desiccation tolerance (DT) in seeds consists in the treatment of germinated seeds, which are desiccation sensitive, in osmotic solutions to re-induce DT. The objectives of this work were to re-induce DT in germinated cowpea seeds, and to perform physiological, cytogenetic and ultrastructural studies in their primary roots aiming at understanding the mechanisms associated with the re-induction of DT. For the re-induction of DT, germinated seeds with 1, 2, 3 and 4 mm in primary root length were treated with a -1.7 MPa polyethylene glycol solution at 10°C, for periods of 0, 24, 48 and 72 hours. After this treatment, the seeds were dried for 3 days and rehydrated. Seeds that survived drying were considered DT. Treated and untreated seeds with primary roots lengths of 1, 2, 3 and 4 mm had their procambium cells evaluated for mitotic events and mitotic index. Also, an ultrastructural analysis was performed in the procambium region of radicles of seeds not imbibed, and in the primary root (2 mm length) of germinated seeds without drying and submitted to drying, and of the primary root from seeds germinated in water and subsequently treated with a -1.7 MPa polyethyleneglycol solution at temperature of 10°C for 24 hours without drying and subjected to drying. Finally, we quantified the contents of glucose, sucrose and raffinose in radicles of seeds not imbibed and imbibed in water for 16 hours, and in 2 mm length primary roots of germinated seeds treated (-1,7 MPa at 10°C for 8, 16 and 24 hours) and untreated. The treatment with osmotic solution of PEG at 10°C for 24 hours was efficient to re-induce DT in germinated seed of cowpea. The treatment with osmotic solution promoted the maintenance of the cell structures during desiccation and inhibited the cell cycle progress during the development of primary root of germinated seeds of cowpea, contributing to the re-induction of desiccation tolerance. The accumulation of sucrose and raffinose are physiological response mechanisms in

germinated seeds of cowpea submitted to treatment with polyethylene glycol solution, which might be related to re-induction of DT in cowpea.

Keywords: hydric stress, osmotic treatment, cell cycle, cell ultrastructure, sugar metabolism

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi é uma espécie leguminosa altamente nutritiva, rica em proteínas, minerais, vitaminas e ácido fólico, e com propriedades antioxidantes (SIDDHURAJU e BECKER, 2007; AKANDE et al., 2007). É um alimento estratégico para segurança alimentar, especialmente para populações de baixa renda das regiões semi-áridas tropicais, onde é também um importante recurso forrageiro (SINGH, 2005; TIMKO et al., 2007).

O feijão-caupi tem a região Centro-Oeste da África como centro de origem, estando na Nigéria o provável centro primário de diversidade genética (FREIRE FILHO et al., 2011). Adaptado ao longo de sua evolução para uma vasta gama de condições climáticas, como a seca, alta umidade e temperaturas extremas, o feijão-caupi é cultivado em diferentes regiões do mundo, principalmente em áreas tropicais da África, Ásia, Europa do Sul, América Central e América do Sul, onde é amplamente consumida (HALL 2012; VILLETH et al., 2015).

Embora o feijão-caupi seja adaptado a condições ambientais adversas, limitantes para o cultivo de algumas outras culturas, sua produtividade pode ser afetada por estresses abióticos, destacando-se a baixa disponibilidade hídrica, provocada por períodos de seca ou veranicos, que ocorrem com frequência nos campos de produção

de grãos do Brasil. Eventos como esses podem ocasionar a dessecação das sementes no solo em estágios avançados da germinação, quando estas já perderam a capacidade de tolerar a dessecação, causando morte das sementes e plântulas, ocasionando falhas no estande de plantas, com efeitos diretos sobre a produtividade das culturas.

A tolerância à dessecação é a capacidade que alguns organismos têm de tolerar a perda de mais de 90% do seu conteúdo total de água e retomar o metabolismo e desenvolvimento normal após a reidratação (COLVILLE e KRANNER, 2010). Comum em sementes de várias espécies de plantas, a tolerância à dessecação permite que sementes armazenadas em estado seco sobrevivam por um longo período e resistam à restrição hídrica após a semeadura no campo. No entanto, após a germinação, a tolerância à dessecação é gradativamente reduzida, até ser totalmente perdida com o desenvolvimento da plântula (BUITINK et al., 2003).

A re-indução da tolerância à dessecação é uma técnica que consiste no tratamento de sementes germinadas em soluções osmóticas, com potencial hídrico negativo o suficiente para paralisar o crescimento da raiz primária durante o período de tratamento, associado ou não a baixas temperaturas e hormônios vegetais como o ácido abscísico. O tratamento em solução osmótica provoca um estresse hídrico leve nos tecidos, capaz de ativar mecanismos de defesa que podem conferir tolerância à dessecação e permitir que sementes germinadas submetidas à dessecação retomem o desenvolvimento normal após a reidratação. A compreensão da fisiologia e das respostas metabólicas à re-indução da tolerância à dessecação em sementes germinadas é um passo importante para o desenvolvimento de técnicas que possam conferir a tolerância à dessecação após a germinação no campo.

Estudos têm demonstrado a eficiência da re-indução da tolerância à dessecação em sementes germinadas (BUITINK et al., 2003, 2006; FARIA et al., 2005; MAIA et al., 2011, 2014). No entanto, é necessário desenvolver um protocolo adequado para cada espécie, que envolve a determinação do potencial hídrico da solução osmótica, tempo de tratamento na solução osmótica e temperatura de incubação, entre outros fatores.

Não há estudos sobre a re-indução da tolerância à dessecação em sementes germinadas de feijão-caupi. Assim, os objetivos com esse trabalho foram re-induzir a tolerância à dessecação em sementes germinadas de feijão-caupi e realizar estudos fisiológicos, citogenéticos e ultraestruturais em radículas e raízes primárias de sementes germinadas de feijão-caupi, associados à re-indução da tolerância à dessecação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultivo de feijão-caupi e estresse hídrico

O feijão-caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. é uma espécie leguminosa bastante cultivada nos trópicos semi-áridos da África, Brasil e Estados Unidos (ROCHA et al., 2009). O feijão-caupi é um importante alimento, com importância justificada principalmente, pelo seu alto teor de proteína (AKANDE, 2007), sendo uma das fontes alimentares mais importantes e estratégicas para as regiões tropicais e subtropicais do planeta (TORRES et al., 2015), além de ser um componente essencial dos sistemas de produção nas regiões secas dos trópicos, cobrindo parte da Ásia, Estados Unidos, Oriente Médio e América Central e do Sul (SINGH et al., 2002).

No Brasil, o feijão-caupi tem grande importância nas regiões Norte e Nordeste, que têm tradição em seu cultivo, comércio e consumo (ROCHA et al., 2009), desempenhando papel estratégico na segurança alimentar, notadamente para as populações de menor poder aquisitivo. Nos últimos anos essa cultura tem despertado o interesse de agricultores que praticam agricultura empresarial devido ao desenvolvimento de novas cultivares de porte ereto e semi-ereto e com maiores níveis de produtividade que as

cultivares convencionais, permitindo a colheita mecanizada e expansão das áreas de cultivo (FREIRE FILHO et al., 2006). Com isto, tem-se viabilizado o cultivo do feijão-caupi em grandes áreas das regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste, como cultura principal ou de safrinha (BEZERRA et al., 2012).

A implantação da cultura do feijão-caupi é realizada por meio de semeadura diretamente no campo. Dessa forma, é de fundamental importância que a qualidade fisiológica, sanitária e física das sementes de feijão-caupi seja conhecida antes da semeadura, e que atendam aos padrões de qualidade estabelecidos para comercialização pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (BRASIL, 2005).

Existe uma grande variabilidade genética para as características morfológicas de sementes de feijão-caupi, observada entre os vários genótipos existentes dessa espécie, tais como a cor do tegumento e peso de 100 sementes, as quais podem estar relacionadas com a germinação e vigor (SILVA et al., 2014). Sementes de feijão-caupi cultivar BRS Guariba possuem forma arredondada, tegumento branco, ausência de halo e peso de sementes de 19,5 g. Essa cultivar apresenta moderada resistência à seca e às altas temperaturas (FREIRE FILHO, 2004).

A produtividade do feijão-caupi pode ser afetada por uma série de estresses bióticos e abióticos, que alteram o crescimento e o desenvolvimento da planta, dentre os quais se destacam os estresses decorrentes da baixa disponibilidade hídrica, provocados por períodos de estiagem e altas temperaturas (SILVA et al., 2012).

O feijão-caupi é uma planta classificada como moderadamente tolerante tanto à deficiência hídrica quanto ao excesso de água no solo (BOYER, 1978). Vários trabalhos têm sido realizados para estudar os efeitos do estresse hídrico na produtividade e as respostas fisiológicas da planta a essa condição (COSTA et al., 1997; NASCIMENTO et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2011; BASTOS et al., 2012; MENDES et al., 2007). No entanto, a maioria desses estudos foi realizada em plantas jovens, cujo desenvolvimento inicial ocorreu em condições ambientais favoráveis, para então serem submetidas às condições de estresse. São escassos estudos sobre os efeitos do estresse hídrico durante a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de feijão-caupi.

2.2 Tolerância à dessecação em sementes

No processo de evolução das plantas, para tornar possível a colonização de ambientes em terra firme, a seleção para características como crescimento rápido, maior altura de plantas e produtividade massa seca, favoreceu a perda da tolerância à dessecação (TD) em tecidos vegetativos (ALPERT 2005, 2006; ILLING et al., 2005; OLIVER et al. 2000, 2005), no entanto a tolerância à dessecação foi mantida em sementes e pólen (ALPERT 2006; GAFF e OLIVER 2013). O confinamento da TD para sementes significou uma vantagem importante, pois permitiu às plantas fugir de uma época estressante ou período de seca e sobreviver ao período desfavorável (DEKKERS et al., 2015).

A habilidade das plantas para tolerar períodos de restrição de água durante o ciclo de vida é fundamental para a adaptação e sobrevivência nos diferentes ambientes onde se desenvolvem. A capacidade de tolerar quase completa dessecação foi um passo evolutivo importante que desempenhou um papel fundamental na colonização terra seca (FARRANT e MOORE 2011).

A tolerância à dessecação é definida como a capacidade de certos organismos para lidar com a perda de água a níveis abaixo de 0,1 g H₂O por grama de massa seca e subsequente reidratação, sem acúmulo de dano letal ou irreversível (LEPRINCE e BUITINK 2010). Segundo Colville e Kranner (2010), as formas de vida tolerantes à dessecação são capazes de perder mais de 90% do seu conteúdo de água e reassumir seu metabolismo quando a água for novamente disponibilizada. Organismos dessecação tolerantes estão presentes em todos os reinos, tanto nos procariontes quanto nos eucariontes, incluindo microrganismos, plantas e animais inferiores (LEPRINCE e BUITINK, 2015).

Nas plantas, a tolerância à dessecação é rara em brotos e raízes, no entanto é comum em sementes e pólen (DEKKERS et al., 2015). A tolerância à dessecação é uma característica importante para as sementes, permitindo que suportem a desidratação e uma ampla gama de condições de estresse que seriam prejudiciais para plantas adultas, como as temperaturas extremas e o déficit hídrico (FENNER e THOMPSON, 2005; GAFF e MELVIN, 2013) como, por exemplo, superar períodos de estresse ambiental, estabilizar a unidade biológica por longos períodos pela suspensão da atividade metabólica e tolerar as condições extremas do ambiente (LEPRINCE e BUITINK, 2010).

Quanto ao grau de tolerância à dessecação, as sementes são classificadas como ortodoxas, intermediárias e recalcitrantes. As sementes ortodoxas

toleram secagem a teores de água de até 5%. Sementes intermediárias toleram secagem de até 10 a 12,5%, enquanto que as sementes recalcitrantes não toleram dessecação a graus inferiores a 15 ou 20% (ROBERTS, 1973; HONG e ELLIS, 1996). Após a dispersão, as sementes ortodoxas podem permanecer viáveis por longos períodos, podendo ser armazenadas em um estado relativamente hidratado (CHEN e ARORA, 2011). As sementes recalcitrantes não secam durante a maturação e permanecem metabolicamente ativas durante o desenvolvimento e após a dispersão da planta mãe (COLVILLE e KRANNER, 2010), o que inviabiliza o armazenamento.

Embora essa classificação seja amplamente aceita e utilizada, atualmente considera-se que a tolerância à dessecação não é uma situação absoluta, mas sim, que ocorre dentro de um processo contínuo, na qual há gradientes de tolerância à dessecação entre as espécies, formado pelo máximo de ortodoxia em um extremo e o máximo de recalcitrância no outro (BERJAK e PAMMENTER 2000).

A tolerância à dessecação é adquirida durante o desenvolvimento das sementes. Entre os mecanismos envolvidos na aquisição da tolerância à dessecação em sementes, estão relacionados a presença de sistema antioxidante enzimático e não enzimático, acúmulo de moléculas protetoras, como proteínas dos tipos LEA (*late embryogenesis abundant proteins*) e HSP (*heat-shock proteins*), presença de moléculas anfipáticas e oleosinas, desligamento do metabolismo e presença de determinados açúcares (PAMMENTER e BERJAK, 1999; HOEKSTRA et al., 2001; BOUDET et al., 2006), e mudanças estruturais nas células (BOUCHER et al., 2010), mobilidade estrutural e molecular dentro das células durante a secagem (WALTERS et al., 2015).

A resposta à dessecação compreende uma matriz complexa de mecanismos protetores contra estresse mecânico causado pela remoção da água, incluindo a modificação da parede celular e membranas, do citoesqueleto, e compactação da cromatina (DEKKERS et al., 2015). Para tolerar a dessecação é necessário que as sementes sejam capazes de manter a integridade das membranas celulares e das organelas para reparar danos quando a água estiver novamente disponível (VERTUCCI e FARRANT, 1995).

A germinação é o evento que, para as sementes da maioria das espécies já estudadas, coincide com a redução na tolerância à dessecação, e à medida que o processo de germinação progride a tolerância à dessecação das sementes é gradativamente reduzida, até que seja totalmente perdida (BUITINK et al., 2003).

Para que a germinação ocorra é necessário que os processos de ativação e regulação do ciclo celular, replicação e reparo do DNA sejam iniciados (OSBORNE, 1983). O alongamento da radícula dentro das sementes ocorre como resultado da embebição e reativação do metabolismo e do ciclo celular, podendo envolver tanto expansão como divisão celular (GÓRNIK, 1997; CASTRO e HILHORST, 2004). Quando as células se encontram com seu ciclo celular ativo, ou seja, quando em processo de síntese de DNA ou de divisão celular, tornam-se mais sensíveis ao estresse (DELTOUR e BARSY, 1985), o que pode ser relacionado à perda de tolerância à dessecação durante o progresso do processo germinativo.

A perda da tolerância à dessecação em sementes tem sido correlacionada com o início e ativação do ciclo celular (BOUBRIAK et al., 2000, OSBORNE et al., 2002). As sementes passam de tolerantes para sensíveis à dessecação, quando as células da radícula entram na fase G2 do ciclo celular, quando a quantidade de DNA já está duplicada (SARACCO et al., 1995; FARIA et al., 2005). Embora a ativação do ciclo celular e a duplicação do DNA estejam sendo relacionadas há bastante tempo com a perda da tolerância à dessecação em durante o processo de germinação das sementes, essa relação ainda não está muito clara (SARGENT et al., 1981; FARIA et al., 2005). Em sementes de tomate, por exemplo, a síntese de DNA precede a germinação. Assim, se a duplicação do DNA ou ativação do ciclo celular é o fator chave para a perda de DT continua a ser questionável (DEKKERS et al., 2015).

Algumas características físicas intracelulares, como redução do grau de vacuolização ou diminuição em volume, revestimento de corpos lipídicos por proteínas e desdiferenciação intracelular têm sido relacionadas com a aquisição da tolerância à dessecação (HOEKSTRA et al., 2001; MOORE et al., 2008; MAIA et al., 2011).

O acúmulo de açúcares não redutores ajuda a preservar o funcionamento e as estruturas das membranas devido à capacidade que têm de substituir parcialmente a água, mantendo o espaçamento entre os fosfolipídeos, impedindo transições da fase líquido cristalino para a fase gel da bicamada, evitando a cristalização da fase aquosa (PAMMENTER e BERJAK, 1999; HOEKSTRA et al 2001; FARRANT et al., 2009).

Açúcares possuem papel fundamental na tolerância à dessecação, pois atuam como solutos compatíveis durante a fase inicial de perda de água, através da

estabilização de macromoléculas, mantendo a conformação e funcionalidade das membranas celulares (STEADMAN et al., 1996; HOEKSTRA et al., 2001), além disso, alguns açúcares também contribuem para a formação do estado vítreo (HOEKSTRA et al., 2001) e são capazes de diminuir o efeito de moléculas reativas de oxigênio (NISHIZAWA et al., 2008). A sacarose, principal carboidrato solúvel encontrado em sementes maduras de várias espécies (CASTILHO et al., 1990), além de atuar como substrato para reações metabólicas que ocorrem sob temperaturas baixas, pode ter um efeito crioprotetor direto sobre as membranas celulares quando em altas concentrações, contribuindo para a tolerância à dessecação e ao congelamento em algumas espécies (UEMURA e STEPONKUS, 2003).

A sacarose é um açúcar importante para a formação do estado vítreo (KIGEL e GALILI, 1995), que se caracteriza como uma solução líquida com propriedades de viscosidade de um sólido, que não forma cristais mesmo em temperaturas muito baixas e com estabilidade numa ampla faixa de temperatura (KOSTER, 1991). A formação do estado vítreo previne a desnaturação de moléculas e formação de agregados moleculares, ocupa espaços em tecidos e, durante a desidratação, serve para evitar aumento excessivo do colapso nos tecidos, a concentração de solutos e alteração de pH (BURKE, 1986).

Quando está concentrada em níveis correlacionados com a tolerância à dessecação, não é estável e tende a cristalizar, não formando o estado vítreo (KIGEL E GALILI, 1995). A presença de oligossacarídeos da série rafínosica pode prevenir a cristalização da sacarose, fornecendo uma melhor proteção comparada com a sacarose isoladamente (LEPRINCE et al., 1993).

A relação entre sacarose e oligossacarídeos da série rafínosica tem sido demonstrada importante para conferir tolerância à dessecação. Caffrey et al. (1988), demonstraram que a relação de massa de 1:0,3, entre a sacarose e a rafinose, inibiu a cristalização, e que a lixiviação em vesículas artificiais, que continham sacarose e rafinose, foi menor quando comparada com a presença isolada da sacarose.

Brenac et al. (1997), em estudo com sementes inteiras e embriões isolados de milho, observaram que na ausência de rafinose a tolerância à dessecação não foi adquirida, e que nem sempre pequenas quantidades de rafinose foi capaz de conferir a tolerância, concluindo que a gradual aquisição de tolerância à dessecação, ocorreu após o

acúmulo de rafinose e, mais especificamente, na presença de razões sacarose: rafinose inferiores a 20:1.

2.3 Re-indução da tolerância à dessecação em sementes germinadas

Durante a embebição e germinação das sementes, o aumento da disponibilidade de água permite a retomada que dos processos metabólicos, o que leva ao surgimento da raiz primária e a perda progressiva da tolerância à dessecação (BUTINK et al. 2003, 2006; MAIA et al. 2011). No entanto, após a protrusão da raiz, há uma pequena janela de desenvolvimento durante a qual a tolerância à dessecação pode ser restabelecida por meio do tratamento osmótico e/ou ácido abscísico (BUTINK et al. 2003; MAIA et al. 2011, 2014; COSTA et al., 2015).

A compreensão dos eventos relacionados com a tolerância à dessecação tem permitido o desenvolvimento de metodologias para re-induzir a tolerância à dessecação em sementes em estágios avançados de germinação. Uma técnica muito usada para re-induzir a tolerância à dessecação em sementes germinadas é o tratamento em solução osmótica de polietilenoglicol (PEG) com potencial negativo, sob baixas temperaturas (BUTINK et al., 2003, 2006; VIEIRA et al., 2010).

A re-indução da tolerância à dessecação ocorre devido à operação de uma série de mecanismos fisiológicos e estruturais regulados geneticamente (BUTINK et al., 2003). Muitos processos fisiológicos em nível celular e molecular que ocorrem durante a perda da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas germinadas podem ser similares àqueles responsáveis pela sensibilidade à dessecação evidenciada nas sementes recalcitrantes (SUN, 1999; FARIA et al., 2004).

Medidas de proteção contra a dessecação podem ser tanto existentes quanto induzidas por sinalização e ativação de fatores de transcrição (GECHEV et al. 2012). Durante a embebição em solução de polietilenoglicol, as raízes primárias são submetidas a um estresse hídrico moderado (ASHRAF e FOOLAD, 2005), o qual produz uma memória mediada por proteínas, fatores de transcrição e alterações epigenéticas (BRUCE et al., 2007).

O tratamento de sementes germinadas com solução de polietilenoglicol promove aumento da síntese de ácido abscísico (JIA et al., 2001; LU et al., 2007), fitormônio que está relacionado com vários mecanismos de proteção, entre os

quais o relaxamento da membrana celular, permitindo a redução do volume citoplasmático sem a ocorrência de danos ultraestruturais (CREELMAN e MULLET, 1991). Evidências mostram que o relaxamento da membrana plasmática ou encolhimento do volume da célula podem estar relacionados com a biossíntese de ABA induzida por estresse osmótico (CREELMAN e MULLET, 1991; JIA et al., 2001).

O uso de soluções de polietilenoglicol para re-induzir a tolerância à dessecação tem sido utilizada com sucesso (BUITINK et al., 2003; FARIA et al., 2005; MAIA et al., 2014) em sementes germinadas, no entanto requer o desenvolvimento de um protocolo adequado para as diferentes espécies. Entre os principais fatores que afetam a eficiência dessa técnica, observa-se a temperatura e tempo de incubação e o potencial hídrico da solução (BUITINK et al., 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Análise de Sementes da Faculdade de Ciências Agrônomicas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu, no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

3.1 Estudos fisiológicos da re-indução da tolerância à dessecação em sementes germinadas de feijão-caupi

3.1.1 Procedência e caracterização inicial das sementes

Foram utilizadas sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) cultivar BRS Guariba, categoria S1, com 100% de pureza e 89% de germinação (plântulas normais), produzidas na Fazenda Tomazetti em Primavera do Leste – MT, safra 2013/2013.

As sementes foram caracterizadas quanto ao teor de água e porcentagem de protrusão de raiz primária. O teor de água foi determinado pelo método estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 24 horas (BRASIL, 2009). A porcentagem de germinação foi avaliada por meio da semeadura de quatro subamostras de 50 sementes entre papel (RP) umedecido com 2,5 vezes o volume de água, em relação à massa do papel seco, à temperatura de 25°C , com leitura após 72 horas de embebição.

3.1.2 Determinação da curva de embebição

Quatro repetições de 25 sementes, com massa e teor de água inicial conhecido, foram semeadas entre papel (RP) umedecido com 2,5 vezes o volume de água em relação ao peso do papel seco, à temperatura de 25°C . As sementes foram pesadas em balança de precisão (0,0001g) em intervalos de uma hora, durante as primeiras 4 horas de embebição, duas horas, das 6 às 18 horas de embebição e novamente de uma hora das, 19 às 28 horas de embebição. Os valores de massa úmida foram convertidos em teor de água (%) em base úmida, e a curva de embebição foi obtida.

3.1.3 Determinação das curvas de germinação e perda da tolerância à dessecação

Para cada ponto das curvas de germinação e de perda da tolerância à dessecação, quatro repetições independentes de 50 sementes foram semeadas entre papel (RP), conforme Brasil (2009), umedecido com 2,5 vezes o volume de água, em relação à massa do papel seco, à temperatura de 25°C .

A cada período de embebição, previamente determinado com base na curva de embebição, as sementes foram retiradas dos rolos de papel e foi feita a contagem de sementes com protrusão de raiz primária para obtenção da curva de germinação. Em seguida, as sementes foram submetidas à secagem em atmosfera constante de 42% de umidade (BUITINK et al., 2003), obtida por meio da adição de solução saturada de carbonato de potássio (90 g de carbonato de potássio + 27 ml de água) colocada em caixas do tipo gerbox (11x11x3 cm) adaptadas com telas de aço nas quais as sementes foram colocadas livres do contato com o sal. Posteriormente, as caixas foram lacradas e incubadas em câmara com temperatura constante de 25°C , durante 72 horas.

Após a secagem, o teor de água foi determinado e as sementes foram reidratadas em rolo de papel umedecido com 2,5 vezes o volume de água em relação à massa do papel seco, à temperatura de 25°C, durante 72 horas. A porcentagem de tolerância à dessecação, em cada ponto da curva, foi determinada com base na contagem de sementes que retomaram o desenvolvimento normal das raízes primárias.

3.1.4 Re-indução da tolerância à dessecação em sementes germinadas

Para a re-indução da tolerância à dessecação, sementes germinadas com 1, 2, 3 e 4 mm de comprimento de raiz primária foram tratadas em solução osmótica de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico (ψ_w) de -1,7 MPa à temperatura de 10°C (BUITINK et al., 2003, 2006), obtida conforme recomendações de Villela et al. (1991), baseadas na equação proposta por Michel e Kaufmann (1973).

As sementes foram colocadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro e 3 cm de altura) contendo 20 ml de solução de polietilenoglicol. As placas foram lacradas e incubadas na ausência de luz, em câmara regulada à temperatura de 10°C, durante os períodos de 24, 48 e 72 horas. Após a embebição as sementes foram submetidas à secagem, em atmosfera de 42% de umidade relativa à temperatura de 25°C, conforme descrito no item 3.1.3.

Os controles foram estabelecidos por meio de sementes germinadas em água com os comprimentos de raízes primárias de 1, 2, 3 e 4 mm, sem tratamento com solução de polietilenoglicol, secadas nas condições anteriormente descritas.

Após a secagem as sementes foram reidratadas em rolo de papel umedecido com 2,5 vezes o volume de água, em relação à massa do papel seco à temperatura de 25°C, durante 72 horas. A re-indução foi considerada obtida para as sementes que retomaram o crescimento e desenvolvimento normal da raiz primária.

3.1.5 Determinação das curvas de secagem

Curvas de secagem foram estabelecidas para sementes tratadas com solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa a 10°C por 24 horas e para sementes germinadas em água e não submetidas ao tratamento em solução de polietilenoglicol, com 2 mm de raiz primária.

Foram utilizadas 3 repetições de 10 sementes para cada ponto das curvas. Cada repetição foi pesada antes do início da secagem, e com base no teor de água determinado antes da embebição em água, o teor de água ao início da secagem foi conhecido.

As sementes foram secas em atmosfera controlada de 42% de umidade, obtida por meio da adição de solução saturada de carbonato de potássio, conforme descrito no item 3.1.4. O tempo total de secagem foi de 72 horas. A cada 12 horas, a contar do início da secagem, as sementes foram pesadas, e o teor de água para obtenção das curvas de secagem, foi calculado por gravimetria.

3.2 Ciclo celular e índice mitótico em raízes primárias de sementes germinadas de feijão-caupi submetidas à re-indução de tolerância à dessecação.

A análise dos eventos da mitose e determinação do índice mitótico foi realizada seguindo a metodologia descrita por Martins (2009), com modificações. Foram coletadas raízes primárias de sementes germinadas tratadas e não tratadas em solução de polietileno glicol com potencial hídrico de -1,7 MPa à temperatura de 10°C por 24 horas, com comprimentos de raiz primária de 1, 2, 3 e 4 mm.

Foram realizados cortes a 1 mm a partir da extremidade distal das raízes primárias, e os ápices das raízes foram imersos em fixador Carnoy (3 partes de álcool etílico: 1 parte de ácido acético glacial), por 3 horas à temperatura ambiente (25±2°C) e, em seguida, armazenados a 10°C por no mínimo 24 horas.

Para o preparo das lâminas, os ápices das raízes foram retirados do fixador e lavados três vezes em água destilada durante cinco minutos. Em seguida, foram submetidos ao processo de digestão enzimática, utilizando-se uma mistura de 30 µl de pectinase (2%)/celulase (4%) + 20 µl de pectoliase (5%) com pH de 4,8, durante 4 horas, à temperatura de 37°C.

Após a digestão, as pontas das raízes primárias foram dissecadas para o isolamento de 0,5 mm da região do procâmbio, a partir da extremidade distal, que em seguida foram coradas com orceína acética a 5%. As amostras foram observadas em microscópio ótico, com aumento de 100x, contando-se o número de células em interfase e em cada fase da mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase) e de células com alterações citogenéticas na região do procâmbio.

Para cada tratamento foram contadas 2000 células, amostradas em quatro repetições independentes de 500 células, em no mínimo de oito raízes. O índice mitótico (IM) foi obtido pela razão entre o número de células visualizadas em mitose e o número total de células (interfase + mitose), multiplicado por 100.

3.3 Alterações estruturais em células das raízes primárias de sementes germinadas de feijão-caupi submetidas à dessecação e à re-indução da tolerância à dessecação.

As análises foram realizadas nas radículas de sementes não embebidas, raízes primárias de sementes germinadas em água com 2 mm de comprimento sem secagem e submetidas à secagem e em raízes primárias de sementes germinadas em água com 2 mm de protrusão e posteriormente tratadas em solução de polietilenoglicol com potencial hídrico de -1,7 MPa por 24 horas sem secagem e submetidas à secagem.

As raízes primárias foram submetidas à criofratura à 0,5 mm da extremidade distal para expor a região de análise, e fixadas em solução Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2,5%), por um período mínimo de 24 horas e conservadas em geladeira. Após este período, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato a 0,05M por três vezes, 10 minutos cada, e em seguida, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% durante 4 horas, em capela à temperatura ambiente. Em seguida, as raízes foram lavadas em água destilada e desidratadas por 10 minutos em diferentes concentrações de acetona (25, 50, 75, 90 e 100%), sendo que na concentração de 100% as raízes passaram por três lavagens de 10 minutos cada. Após a desidratação, foram submetidas à secagem ao ponto crítico de CO₂, fixados em um porta-amostra e levadas ao aparelho BAL-TEC, SCD-050 para que fossem recobertas com ouro metálico.

As amostras foram observadas e eletromicrografadas em microscópio eletrônico de varredura LEO-EVO 40, XVP, presente no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

3.4 Conteúdos de açúcares em raízes primárias de sementes de feijão-caupi durante a germinação e re-indução da tolerância à dessecação.

As análises dos açúcares consistiram da quantificação dos conteúdos de glicose, sacarose e rafinose em radículas de sementes não embebidas, radículas de sementes embebidas em água por 16 horas, raízes primárias de sementes germinadas em água à temperatura de 25°C com 2 mm de protrusão e raízes primárias de sementes germinadas em água com 2 mm de protrusão submetidas ao tratamento osmótico por 8, 16 e 24 horas em solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa, à temperatura de 10°C.

Para cada ponto de análise, foram coletadas 200 radículas ou raízes primárias (aproximadamente 1,2 g), acondicionadas em tubo plástico, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento das análises. Antes do armazenamento, foi determinado o teor de água das amostras pelo método estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 24 horas (BRASIL, 2009), para ajustar o teor dos açúcares em relação à massa de matéria seca.

A quantificação dos açúcares foi realizada pelo Centro de Análise de Qualidade Analítica Laboratórios – CQA, em Campinas, São Paulo Brasil, laboratório certificado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA/Brasil) e pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro/Brasil). As análises foram realizadas por meio da técnica de cromatografia líquida de alta performance, em HPLC, segundo método AOAC / CR-0093 (AOAC, 2005).

3.5 Análises dos dados

As curvas de embebição, germinação, perda da tolerância à dessecação, secagem, e os gráficos de barra para o teor de água e conteúdos de açúcares foram gerados pelo software SigmaPlot versão 12.0, a partir das médias dos tratamentos.

Os dados de porcentagem de re-indução da tolerância à dessecação e índice mitótico foram submetidos à análise de variância. A análise para re-indução da tolerância à dessecação foi realizada em esquema fatorial de 4x4 (0, 24, 48 e 72 horas de tratamento osmótico em solução de polietilenoglicol 6000 e 1, 2, 3 e 4 mm de comprimento de raiz primária), com 4 repetições por tratamento. Para o índice mitótico a análise foi realizada em esquema fatorial de 2x4 (sementes não tratadas e sementes submetidas ao tratamento em solução de polietileno glicol 6000 durante 24 horas e 1, 2, 3 e

4 mm de comprimento de raiz primária), com 4 repetições por tratamento. As médias dos tratamentos foram comparadas por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos fisiológicos da re-indução da tolerância à dessecação em sementes germinadas de feijão-caupi

O teor de água inicial das sementes do lote de trabalho foi 11,8%, e a porcentagem de protrusão de raiz primária foi de 100%. A curva de embebição de sementes não seguiu exatamente o padrão trifásico proposto por Bewley et al. (2013) (Figura 1), não sendo possível identificar pontualmente a transição entre as fases II e III da embebição.

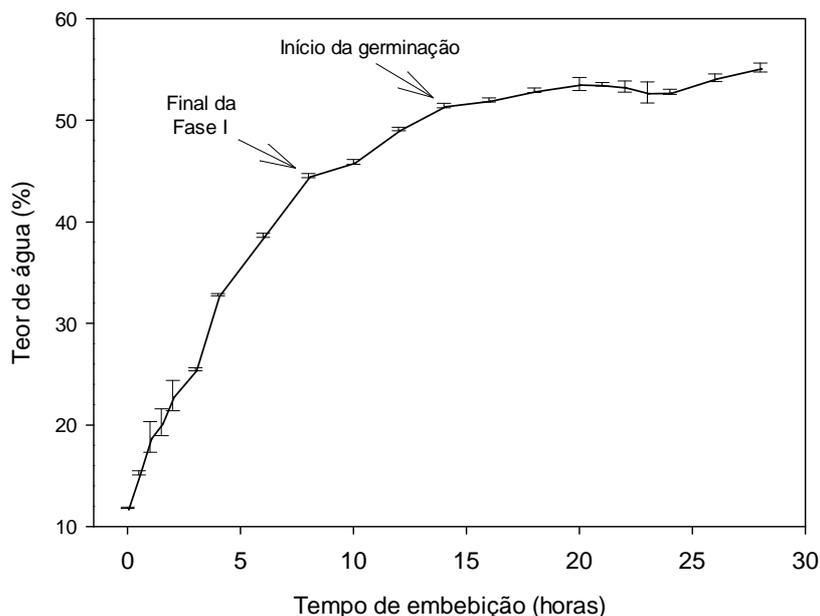


Figura 1. Curva de embebição em água de sementes de feijão-caupi embebidas em água à temperatura de 25°C.

Na fase I foi observada uma rápida absorção de água, onde em apenas 2 horas de embebição o teor de água atingiu o dobro do teor de água inicial. O término da fase I se deu em torno de 8 horas após o início da embebição, quando as sementes atingiram em média 44,56% de teor de água (Figura 1).

Não foi observada a fase de repouso da absorção de água após o término da fase I, mas sim uma embebição lenta entre 8 e 10 horas (com ganho de 1,35% de teor de água no período), tempo muito curto para caracterizar a fase II da embebição, que normalmente é um período longo, podendo ser até dez vezes maior que a fase I (BEWLEY e BLACK,1994).

Após 10 horas de embebição, o teor de água retomou o aumento mais acentuado, e às 15 horas após o início da embebição foi observado o início da fase III da embebição, quando as sementes alcançaram teor de água de aproximadamente 52% e a protrusão de radícula foi iniciada (Figura 1).

A impossibilidade de identificação da transição entre as fases II e III indica que pode haver sobreposição de eventos metabólicos e fisiológicos durante o processo de germinação, como por exemplo, em relação à mobilização de reservas. Embora as fases da embebição estejam relacionadas com os eventos que ocorrem durante a

germinação das sementes, em algumas espécies elas não estão nitidamente delimitadas e não são perceptíveis por meio da curva de embebição (NONOGAKI, BASSEL e BEWLEY, 2010).

A germinação das sementes, avaliada por meio da protrusão da raiz primária, iniciou por volta das 15 horas após o início da embebição, e às 28 horas de embebição 100% das sementes exibiram a protrusão de raiz primária (Figura 2).

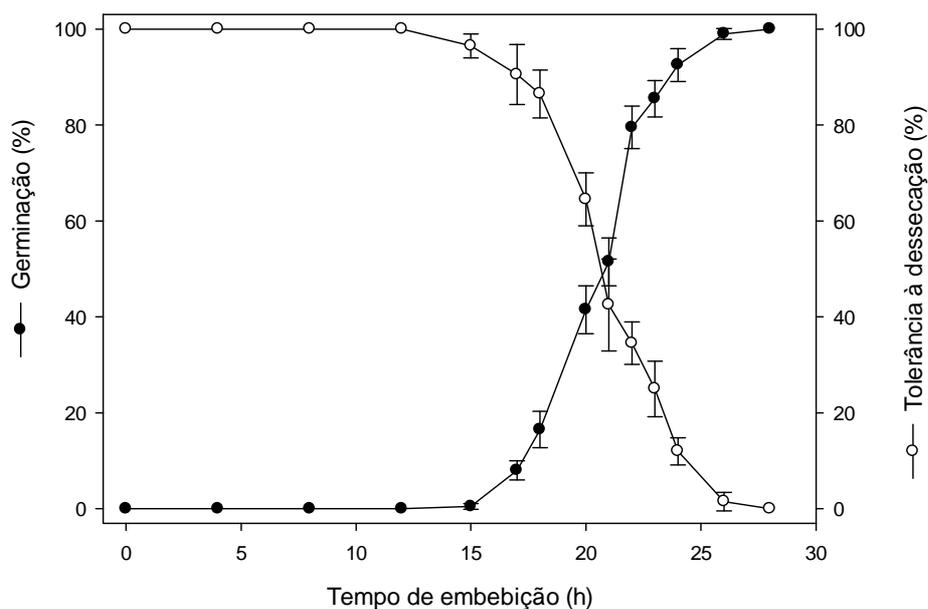


Figura 2. Curvas de germinação e de perda de tolerância à dessecação em sementes de feijão-caupi embebidas em água e posteriormente submetidas à secagem.

A tolerância à dessecação, reduzida de 100% para 96,5% após 15 horas de embebição, teve o início de perda coincidindo com o início da germinação, resultado semelhante ao observado nos trabalhos de Buitink et al., (2003) e Faria et al. (2005), com *Medicago truncatula*. Após 15 horas de embebição, à medida que o tempo avançou, a porcentagem de germinação aumentou e a tolerância à dessecação diminuiu, em uma razão quase proporcional, gerando curvas opostas. Um pouco antes das 21 horas de embebição, quando a porcentagem de germinação atingiu 50%, a tolerância à dessecação foi reduzida para aproximadamente 42% (Figura 2). Esse resultados mostram que a perda da tolerância à dessecação em sementes de feijão-caupi segue um padrão semelhante ao obtido por Buitink et al. (2003) para sementes de *Medicago truncatula*, no qual à medida que o tempo de embebição e o processo de germinação avançam a tolerância à dessecação é perdida.

As curvas de secagem mostram uma velocidade de secagem semelhante para as sementes não tratadas e para as sementes submetidas à embebição em solução de polietilenoglicol 6000 (Figura 3), destacando a intensa perda do teor de água durante as 12 primeiras horas de secagem.

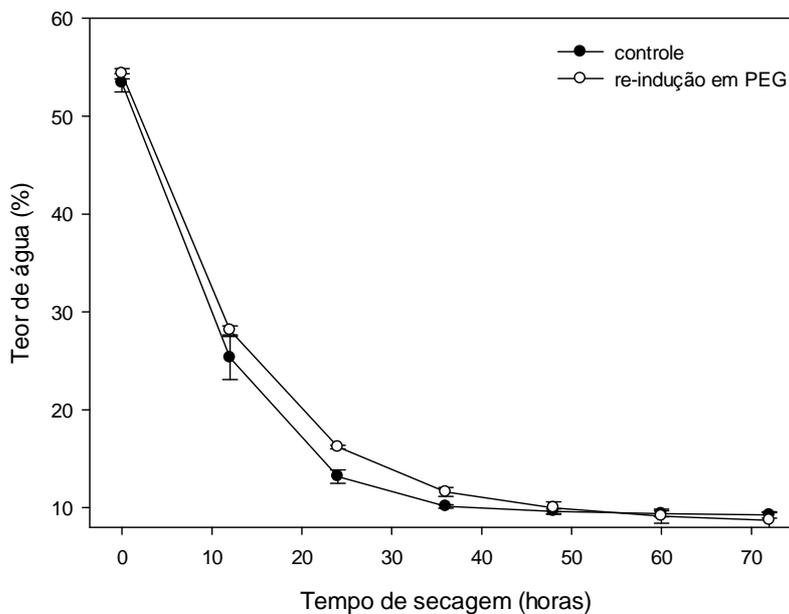


Figura 3. Curvas de secagem de sementes germinadas de feijão-caupi com raiz primária de 2 mm de comprimento, não tratadas (controle) e tratadas com solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa, à temperatura de 10°C, durante 24 horas.

Observa-se que entre os períodos de 12 a 36 horas, as sementes submetidas à embebição em solução de PEG mantiveram teor de água ligeiramente maior em relação às sementes não tratadas (Figura 3). Essa secagem mais lenta pode ser indicativa de benefícios às sementes germinadas quanto à tolerância à dessecação. A secagem lenta promove melhor tolerância à dessecação, presumivelmente devido ao tempo suficiente que é concedido para a indução e a operação dos mecanismos de proteção (Silva et al., 2007). Oliver e Bewley (1997) sugeriram que a secagem rápida impede os processos de recuperação e é necessário mais tempo para os reparos na reidratação.

Ao final das 72 horas de secagem, o teor de água nas sementes foi de 9,2 e 8,7%, respectivamente para sementes germinadas em água não tratadas (controle) e re-induzidas em solução de polietileno glicol (Figura 3), comprovando que a secagem realizada, de fato reduz o teor de água das sementes para níveis abaixo do mínimo

estabelecido ($0,1 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ MS}$) para caracterizar a dessecação em sementes e tecidos de outros organismos, conforme Leprince e Buitink (2010).

A embebição em solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de $-1,7 \text{ MPa}$ à temperatura de 10°C , proporcionou a re-indução da tolerância à dessecação em sementes germinadas de feijão-caupi. Houve efeito significativo do tempo de embebição e do comprimento da raiz primária sobre a porcentagem de re-indução da tolerância à dessecação (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância (Fc) para porcentagem de re-indução de tolerância à dessecação em sementes germinadas de feijão-caupi com 1, 2, 3 e 4 mm de comprimento de raiz primária, não tratadas (0 h) e tratadas com solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de $-1,7 \text{ MPa}$, por 24, 48 e 72 horas, à temperatura de 10°C .

FV	GL	Re-indução da TD (%)
Tratamento	3	48,418*
Comp. de raiz	3	294,089*
Tratamento. x Comp. de raiz	9	10,312*
Resíduo	48	
Total	63	
CV (%)		15,46

*Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Para sementes com raízes primárias de 1 mm, não houve diferença significativa na porcentagem de re-indução da tolerância à dessecação entre sementes embebidas em solução de PEG pelos diferentes períodos, e em relação às sementes não submetidas ao condicionamento osmótico (Figura 4).

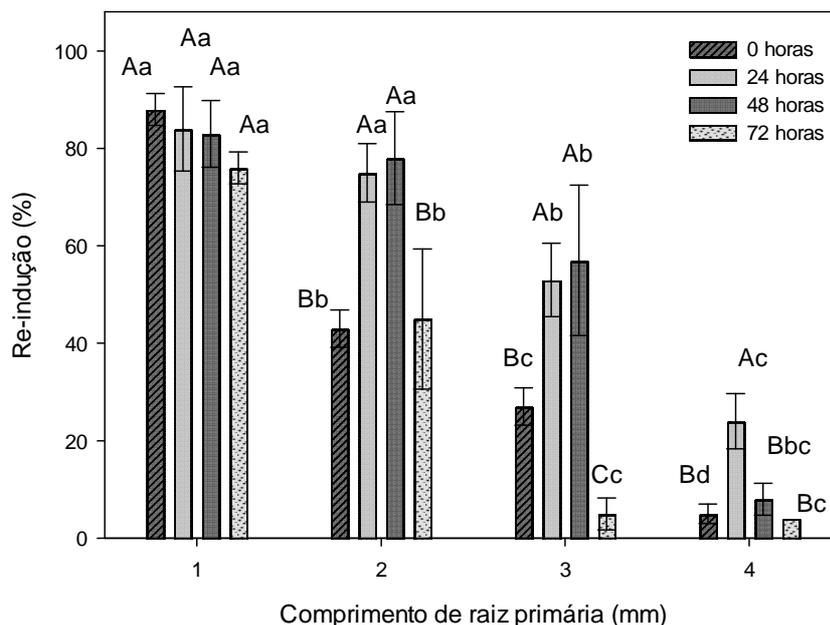


Figura 4. Re-indução da tolerância à dessecação em sementes germinadas de feijão-caupi com raiz primária de 1, 2, 3 e 4 mm, não tratadas (0 horas) e tratadas com solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa, por 24, 48 e 72 horas, à temperatura de 10°C. Letras maiúsculas comparam a re-indução da TD entre sementes com raiz primária de mesmo comprimento, submetidas a diferentes tempos de embebição em solução de polietilenoglicol. Letras minúsculas comparam a re-indução da TD entre sementes com raiz primária de diferentes comprimentos, submetidas a um mesmo tempo de embebição em solução de polietilenoglicol. Barras nas colunas são referentes ao desvio padrão (σ) em relação às médias.

Para sementes de feijão-caupi com raiz primária com 2 mm de comprimento não submetidas ao condicionamento osmótico, a capacidade de tolerar a dessecação foi de 43% (Figura 4), podendo ser considerada bastante elevada, o que evidencia uma capacidade intrínseca das sementes de feijão-caupi para tolerar a dessecação. É possível que tal característica tenha sido obtida ou incrementada por meio da seleção natural, em função do provável centro de origem do feijão-caupi, Centro-Oeste do Continente Africano, onde há predominância altas temperaturas e baixa disponibilidade hídrica, bem como por meio do melhoramento genético da espécie, que para a cultivar BRS Guariba, proporcionou tolerância à seca e altas temperaturas (FREIRE FILHO, 2004)

Buitink et al. (2003), observaram para sementes germinadas de *Medicago truncatula*, com 2 mm de comprimento da raiz primária, que apenas 20% das sementes foram capazes de tolerar a dessecação, enquanto Faria et al. (2005) reportam que a tolerância à dessecação foi totalmente perdida em sementes germinadas com 2 mm de raiz primária dessa mesma espécie. Isso indica que a tolerância à dessecação varia entre diferentes populações da mesma espécie.

O tratamento de sementes de feijão-caupi com 2 e 3 mm de comprimento, durante os períodos de 24 e 48 horas, proporcionou maiores porcentagens de re-indução em relação às sementes não submetidas ao condicionamento osmótico e às sementes tratadas por 72 horas, com esses mesmos comprimentos de raiz primária. A maior porcentagem de re-indução da tolerância à dessecação nas sementes com 4 mm de raiz primária foi obtida com a embebição em solução de polietilenoglicol 6000 durante 24 horas (Figura 4).

O tempo de tratamento em solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa mais favorável à re-indução da tolerância à dessecação foi o de 24 horas, considerando que para sementes de 4 mm foi o único que induziu maior porcentagem de re-indução em relação às sementes não submetidas ao condicionamento osmótico (Figura 4).

4.2 Ciclo celular e índice mitótico em raízes primárias de sementes germinadas de feijão-caupi submetidas à re-indução da tolerância à dessecação.

A análise de variância para o índice mitótico em raízes primárias de sementes germinadas de feijão-caupi com 1, 2, 3 e 4 mm de comprimento, não tratadas e tratadas com solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa, por 24 horas, à temperatura de 10°C, mostra que durante o tratamento com em solução de polietilenoglicol não houve progressão do ciclo celular, o que é favorável à re-indução da tolerância à dessecação. Diferenças no índice mitótico foram observadas apenas em relação ao comprimento de raiz primária, tanto em sementes não tratadas como em sementes tratadas na solução de polietilenoglicol 6000 (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo da análise de variância (Fc) para o índice mitótico (IM) em sementes germinadas de feijão-caupi com raiz primária nos comprimentos de 1, 2, 3 e 4 mm, não tratadas (0 h) e tratadas com solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa, por 24 horas, à temperatura de 10°C.

FV	GL	IM
Tratamento	1	1,923
Comp. de raiz	3	29,947*
Tratamento x Comp. de raiz	3	0,546
Erro	24	
TOTAL	31	
CV (%)		12,89

*Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

A maioria das células em divisão, em todos os comprimentos de raiz, tanto em sementes não tratadas como em sementes embebidas em solução de PEG, estavam em prófase. Foi observado também que à medida que o crescimento da raiz primária progrediu, o número de células em prófase aumentou (Tabela 3).

Tabela 3. Contagem de células em diferentes fases de divisão, em sementes germinadas de feijão-caupi com raiz primária nos comprimentos de 1, 2, 3 e 4 mm, não tratadas (Fc) e tratadas solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa à temperatura de 10°C, por 24 horas.

Comp. de raiz	Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	Total
Sementes não tratadas						
1 mm	1919	80	1	0	0	2000
2 mm	1884	116	0	0	0	2000
3 mm	1876	122	1	0	1	2000
4 mm	1846	147	2	3	2	2000
Sementes tratadas com PEG						
1 mm	1906	94	0	0	0	2000
2 mm	1880	120	0	0	0	2000
3 mm	1878	119	1	1	1	2000
4 mm	1830	166	3	1	0	2000

O número de células em metáfase, anáfase e telófase, quando presentes, foi muito baixo (Tabela 3), não permitindo comparação estatística. Não foram

observadas anomalias nas divisões celulares, tais como formação de micronúcleos ou núcleos condensados.

Não houve diferenças entre o índice mitótico das raízes primárias obtidas de sementes germinadas não tratadas (controle) e tratadas com solução de polietileno glicol, com comprimentos iguais (Figura 5).

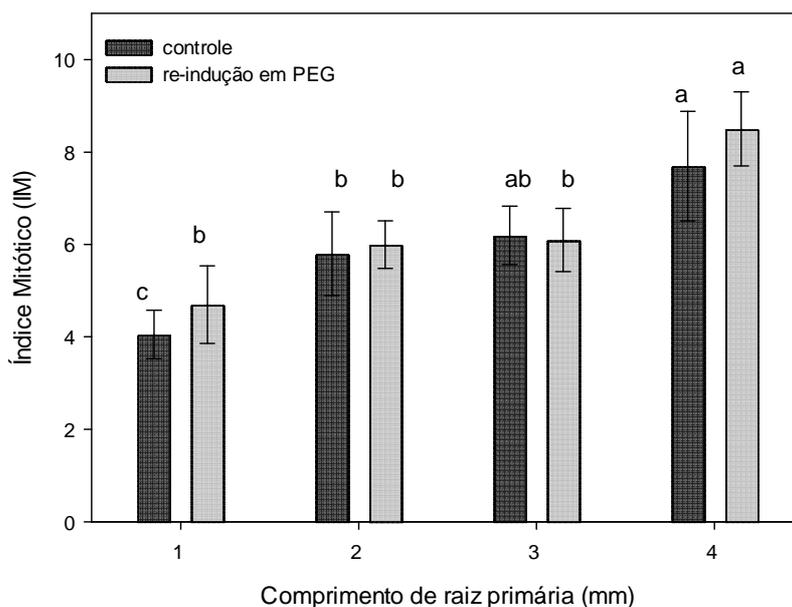


Figura 5. Índice mitótico (IM) em raízes primárias de sementes germinadas de feijão-caupi com raiz primária nos comprimentos de 1, 2, 3 e 4 mm, não tratadas (controle) e tratadas com solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa à temperatura de 10°C, por 24 horas.

O índice mitótico aumentou com o desenvolvimento das raízes primárias, tanto para sementes germinadas não tratadas quanto para as sementes embebidas em solução de PEG (Figura 5). Analisando a porcentagem de re-indução de tolerância à dessecação (Figura 4) e o índice mitótico (Figura 5), é possível relacionar a redução da tolerância à dessecação ao longo do crescimento da raiz primária com o aumento no índice mitótico nas raízes primárias de sementes não tratadas (0 horas), porém essa relação não se sustenta para raízes primárias de sementes tratadas com solução de polietilenoglicol por 24 horas. Sendo assim, é mais provável que o aumento do IM esteja mais relacionado à germinação e ao desenvolvimento de plântula.

Segundo Faria et al. (2005), a razão para o decréscimo da capacidade de re-indução da tolerância à dessecação com crescimento da raiz primária em sementes germinadas de *Medicago truncatula* está relacionada à reativação do ciclo celular.

4.3 Análises ultraestruturais em raízes primárias de sementes germinadas de feijão-caupi em diferentes estágios do processo de re-indução de tolerância à dessecação.

Na Figura 6 observa-se a imagem do corte transversal a 0,5 mm da extremidade do ápice da raiz primária da semente germinada de feijão-caupi com 2 mm de protrusão, identificando a região do procâmbio.

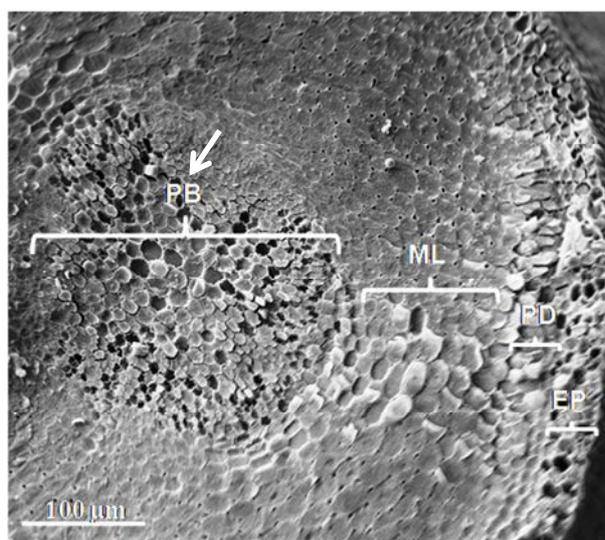


Figura 6. Eletromicrografia de varredura (MEV) do corte transversal a 0,5 mm da extremidade do ápice da raiz primária da semente germinada de feijão-caupi com 2 mm de protrusão. Legenda: PB – Procâmbio; ML - Meristema fundamental; PD: Protoderme; EP: Epiderme.

As células do ápice das raízes primárias de sementes não embebidas exibiram parede celular com formato irregular e contração do conteúdo celular, que levou ao distanciamento entre o protoplasto e a parede celular, caracterizando o aspecto de células vegetais murchas. A perda do conteúdo celular observada em algumas células, provavelmente foi provocada pela criofatura (Figura 7A.).

Após a embebição em água, ocorreu o aumento do conteúdo celular que preencheu totalmente o espaço que havia entre o conteúdo celular e a parede celular, observado nas células das sementes não embebidas. Essas células, agora túrgidas, adquiriram formato arredondado e surgiram espaços intercelulares bem definidos. É observada também a presença de uma grande quantidade de grãos de amido (Figura 7B.)

Em raízes primárias de sementes germinadas e submetidas posteriormente à secagem (Figura 7C), parte das células manteve o formato arredondado adquirido com a embebição (Figura 7B), enquanto outras células retornaram ao formato irregular observado antes da embebição (Figura 7A).

Ainda nas células de raízes primárias de sementes germinadas e submetidas posteriormente à secagem, os espaços intercelulares foram reduzidos, sendo visíveis apenas entre as células de maior volume. Apesar da secagem, o conteúdo celular não foi retraído, mas em algumas células foram observadas irregularidades no formato (Figura 7C). Embora tenha havido uma aparente redução da quantidade e tamanho dos grãos de amido em relação às células de sementes germinadas (Figura 7B), observa-se a persistência dos grãos de amido após a secagem (Figura 7C).

Embora as células de sementes não embebidas exibam características ultraestruturais que sugerem danos adquiridos durante a dessecação pós-maturação, após a embebição as células adquirem boa conformação e não há sinais de danos nas estruturas celulares avaliadas (Figura 7B), mesmo após a dessecação artificial (Figura 7C). Esses resultados evidenciam que sementes de feijão-caupi são dotadas de mecanismos eficientes de proteção contra danos estruturais que possam ser causados durante a dessecação. Isso explica, em parte, a capacidade intrínseca que as sementes dessa espécie têm para tolerar a dessecação após a germinação.

As células das raízes primárias de sementes germinadas embebidas em solução de PEG (Figura 7D) apresentam formato e estrutura semelhantes ao observado nas células das raízes de sementes germinadas em água (Figura 7B). No entanto, observa-se uma aparente redução no tamanho dos grãos de amido após o tratamento com solução de polietilenoglicol, o que indica que o metabolismo de degradação de reservas continua ativo durante o tratamento com solução de polietilenoglicol.

Após a secagem, as células de raízes primárias de sementes germinadas submetidas à embebição em PEG (Figura 7E) mantiveram sua conformação e integridade da parede celular. Os grãos de amidos quase não estão mais presentes, sendo

observadas pequenas depressões que provavelmente são marcas deixadas após a degradação dos grãos amido (RODRIGUES, 2010).

A degradação do amido concorre para a formação e aumento na concentração de açúcares solúveis na célula, entre os quais a sacarose, açúcar não redutor que tem função protetora das células durante a secagem (HOEKSTRA et al., 2001). Buitink et al. (2003) postularam que o aumento no teor de sacarose durante a embebição de sementes germinadas de *Medicago truncatula* em solução de polietilenoglicol pode ter sido resultado da hidrólise do amido.

A degradação do amido em moléculas menores possivelmente está também associada ao metabolismo de regulação osmótica da célula, conferindo proteção às estruturas celulares contra as tensões provocadas durante a dessecação. Segundo Leslie et al. (1995), os carboidratos podem ser acumulados em resposta a estresses ambientais, como o frio e a seca, e atuar como crioprotetores ou osmoprotetores celulares.

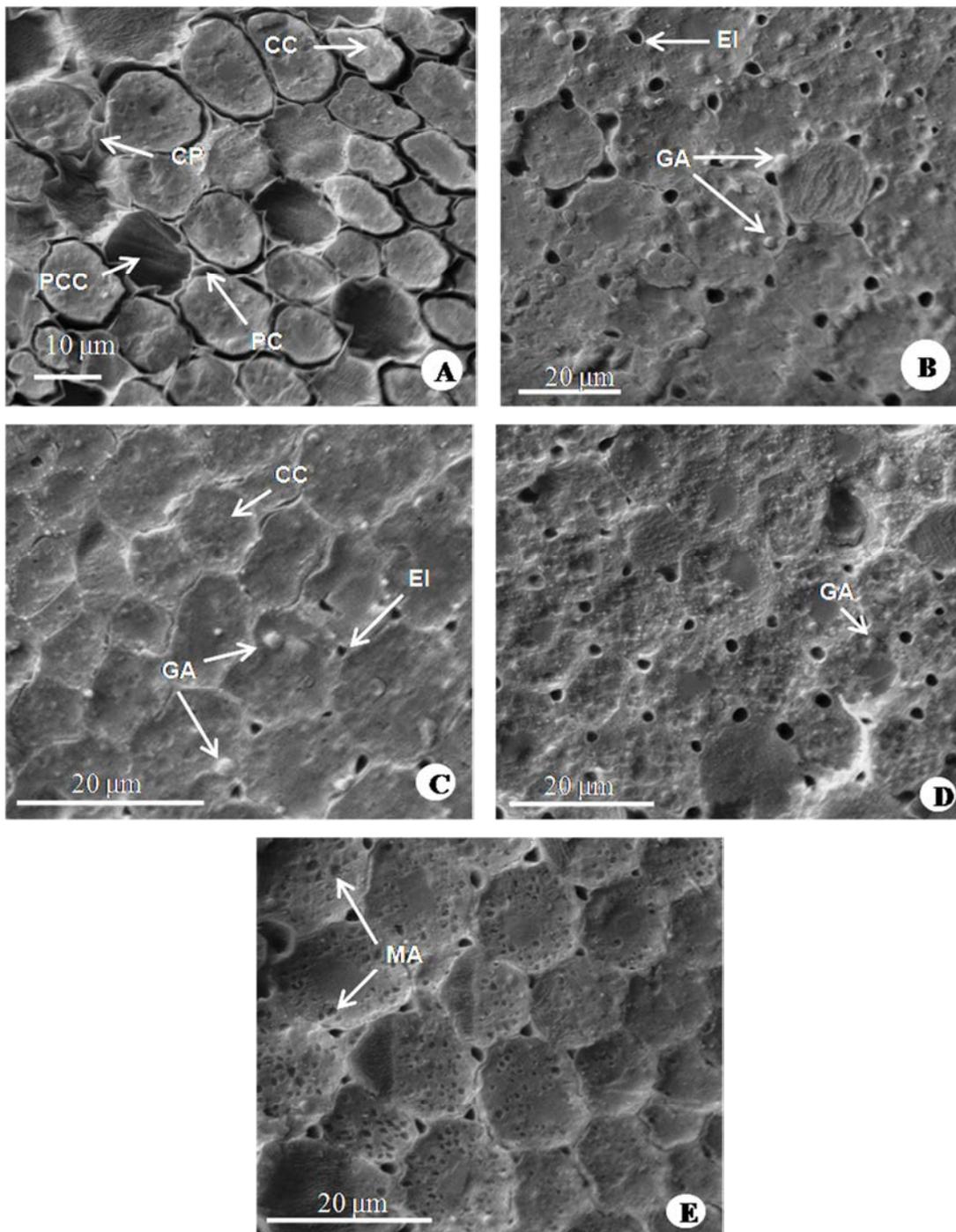


Figura 7. Eletromicrografias de varredura (MEV), da região do procâmbio a 0,5 mm da extremidade do ápice de raízes primárias de sementes germinadas de feijão-caupi com 2 mm de protrusão. A – Semente não embebida; B - Semente germinada em água; C – Semente germinada em água e submetidas à secagem; D – Semente germinada em água e posteriormente tratada com solução de polietilenoglicol; E - Semente germinada em água e posteriormente tratada com solução de polietilenoglicol e submetida à secagem. Legenda:

CC - Conteúdo celular; PCC - Perda de conteúdo celular; PC - Parede celular; CP- Curvatura da parede celular; EI – Espaço intercelular; GA- Grão de amido; MA - Marca de grão de amido.

4.4 Análises dos conteúdos de açúcares em raízes primárias de sementes de feijão-caupi durante a germinação e re-indução da tolerância à dessecação.

O teor de água em sementes germinadas com 2 mm de raiz primária foi em média de 66,1% (Figura 8), superior àquele de 53,4% observado para sementes inteiras (Figura 3), demonstrando que em sementes germinadas o teor de água pode variar em relação aos diferentes tecidos. O maior teor de água nas raízes primárias em relação à sementes inteira pode explicar, pelo menos em parte, a maior sensibilidade das raízes primárias à dessecação em relação a outras partes das sementes, conforme Buitink et al. (2003). A secagem de tecidos muito hidratados pode resultar em dano mecânico associado com a redução do volume celular (PAMMENTER e BERJAK 1999).

Observam-se variações muito pequenas no teor de água durante os períodos de tratamento com solução de polietilenoglicol (Figura 8). Esse movimento de perda e ganho de água provavelmente está relacionado ao ajustamento osmótico das células para equilibrar o seu potencial osmótico com o da solução de polietilenoglicol, e manter o nível de hidratação.

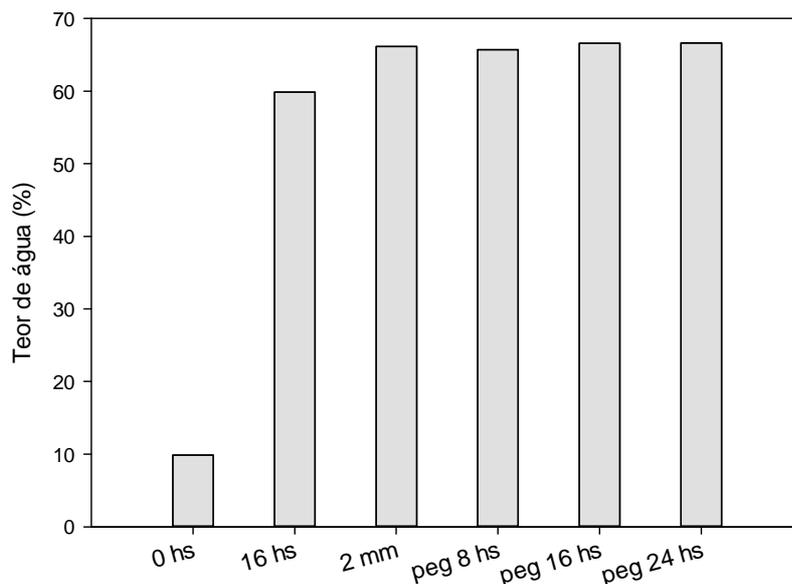


Figura 8. Teor de água em radículas de sementes de feijão-caupi não embebidas (0 h) e embebidas em água por 16 horas, em raiz primária de sementes germinada em água com 2 mm de protrusão, e em raiz primária de sementes germinadas em água com 2 mm de protrusão submetidas ao tratamento osmótico por 8, 16 e 24 horas, em solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa à temperatura de 10°C.

Não foi detectada a presença de glicose nas raízes primária de sementes de feijão-caupi durante a embebição em água, bem como nas sementes germinadas submetidas ou não à embebição em solução de PEG. Já a sacarose e rafinose estavam presentes em todos os estágios analisados, sendo os conteúdos de sacarose sempre mais elevados que os conteúdos de rafinose (Figura 9).

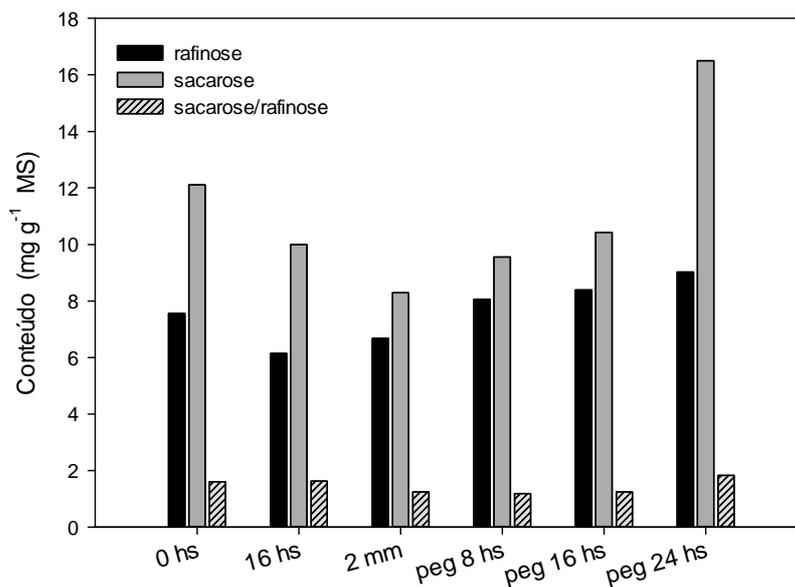


Figura 9. Conteúdos de sacarose e rafinose em radículas de sementes de feijão-caupi não embebidas (0 h) e embebidas em água por 16 horas, em raiz primária de sementes germinada em água com 2 mm de protrusão, e em raiz primária de sementes germinadas em água com 2 mm de protrusão submetidas ao tratamento osmótico por 8, 16 e 24 horas, em solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa à temperatura de 10°C.

A presença de sacarose e de oligossacarídeos como a rafinose tem sido relatada em grandes quantidades em tecidos tolerantes à dessecação, por outro lado a presença de monossacarídeos redutores como a glicose, frutose, galactose e manose é reduzida ou até mesmo ausente (CHEN e BURRIS, 1990; LEPRINCE et al., 1995; KUO et al, 1998).

Após 16 horas de embebição em água, quando as sementes estavam em fase avançada do processo de germinação (com aproximadamente 2 % de protrusão radicular), os conteúdos de sacarose e rafinose nas radículas foram reduzidos em relação aos conteúdos observados nas radículas de sementes não embebidas (0 hs). A redução nos conteúdos de sacarose e rafinose tornou-se mais acentuada em raízes primárias de sementes germinadas com 2 mm de protrusão, em relação aos conteúdos nas radículas de sementes não embebidas (Figura 9).

Segundo Buckeridge et al., 2004, a rafinose e a sacarose estão presentes como reservas no embrião para produção de energia utilizada no início da

germinação e embebição para o reparo das estruturas que podem ter sido danificadas durante a dessecação pós-maturação. Os conteúdos de oligossacarídeos da família rafinose são reduzidos durante a germinação, com função sugestionada para fornecer energia e carbono para os estágios iniciais de germinação das sementes (revisado por DOWNIE et al., 2000).

Os decréscimos dos conteúdos de sacarose e rafinose nas radículas de sementes embebidas em água por 16 horas (Figura 9) coincidem com a fase inicial da perda da tolerância á dessecação, quando a capacidade de tolerar a dessecação foi de aproximadamente 93% (Figura 2). Em germinadas com 2 mm de protrusão de raiz primária, a tolerância á dessecação foi acentuadamente reduzida para 43% (Figura 4). Esses resultados evidenciam que a perda de tolerância à dessecação em sementes de feijão-caupi durante a germinação pode estar relacionada com a redução dos conteúdos de sacarose e rafinose.

O tratamento com solução de polietilenoglicol induziu o acúmulo de sacarose e rafinose nas raízes primárias das sementes. O conteúdo de sacarose nas raízes primárias de sementes germinadas com 2 mm de protrusão foi de 16,5 mg g⁻¹ MS após 24 horas de tratamento com solução de polietilenoglicol, relativamente superior aos conteúdos aos conteúdos observados em radículas de sementes não embebidas (0 hs) e nas raízes primárias de sementes germinadas com 2 mm de protrusão não tratadas com solução de polietilenoglicol, respectivamente de 12,1 e 8,29 mg g⁻¹ MS (Figura 9).

O conteúdo de rafinose nas radículas de sementes não embebidas reduzido de 7,55 mg g⁻¹ MS para 6,68 mg g⁻¹ MS após germinação com 2 mm de protrusão de raiz primária, seguido do acúmulo progressivo ao longo do tempo de tratamento com solução de polietilenoglicol, com conteúdo de 9,02 mg g⁻¹ MS após 24 horas de tratamento (Figura 9).

O tratamento de sementes germinadas com solução de polietilenoglicol tem como efeitos fisiológicos iniciais a redução do metabolismo e parada do crescimento da raiz primária, enquanto eventos tardios (tais como acúmulo de rafinose e sacarose) promovem adaptação ao estresse e contribui para a sobrevivência, no estado seco (COSTA et al., 2015). O acúmulo de sacarose de raízes primárias de sementes germinadas de *Medicago truncatula* em resposta ao tratamento com solução de polietilenoglicol foi

observado por Buitink et al. (2003). Pluskota et al. (2015), observaram aumento no conteúdo de sacarose e rafinose em raízes de plântulas de ervilha após tratamento em solução de polietilenoglicol.

Em sementes germinadas com 2 mm de protrusão a capacidade de tolerar a dessecação antes do tratamento foi elevada de 43% para 75% após 24 horas de tratamento com solução de polietilenoglicol (Figura 5), coincidindo com o maior acúmulo de rafinose e sacarose (Figura 9). Isto indica que possivelmente o acúmulo de rafinose e sacarose é uma resposta fisiológica ao tratamento osmótico em solução de polietilenoglicol sob baixa temperatura, que está relacionado à re-indução da tolerância à dessecação em sementes germinadas de feijão-caupi.

A relação sacarose/rafinose, que era de 1,6:1 em radículas de sementes não embebidas, foi reduzida durante a germinação, sendo de 1,2:1 nas raízes primárias de sementes germinadas com 2 mm de protrusão. Durante o tratamento em solução de polietilenoglicol a relação sacarose/rafinose nas raízes primárias aumentou, alcançando a proporção de 1,8:1 após 24 de tratamento (Figura 9).

A relação sacarose/rafinose nas raízes primárias de sementes germinadas não tratadas com 2 mm de protrusão foi muito próxima daquela observada após 24 horas de tratamento em solução de polietilenoglicol, não sendo possível relacionar a relação sacarose/rafinose com a re-indução da tolerância à dessecação. Segundo Kigel e Galili (1995), a tolerância à dessecação em sementes parece não estar relacionada a uma combinação específica de sacarose e rafinose, ou algum outro açúcar. Assim, a diferença de tolerância à dessecação entre sementes germinadas de feijão-caupi não tratadas e tratadas com solução de polietilenoglicol (Figura 4) é provavelmente mais influenciada pelo maior acúmulo de sacarose e rafinose, do que pela relação sacarose/rafinose.

5 CONCLUSÕES

O tratamento em solução osmótica de polietilenoglicol com potencial hídrico de -1,7 MPa à temperatura de 10°C durante 24 horas foi eficiente para re-induzir a tolerância à dessecação em sementes germinadas de feijão-caupi.

O tratamento em solução osmótica proporcionou a manutenção das estruturas celulares durante a dessecação e inibiu o avanço do progresso do ciclo celular durante o desenvolvimento da raiz primária das sementes germinadas de feijão-caupi, contribuindo para a re-indução da tolerância à dessecação.

O acúmulo de sacarose e rafinose são mecanismos de resposta de sementes germinadas de feijão-caupi ao tratamento em solução de polietilenoglicol, que estão relacionados com re-indução da tolerância á dessecação.

REFERÊNCIAS

AKANDE, S. R.. Genotype by environment interaction for cowpea seed yield and disease reactions in the forest and derived savanna agro-ecologies of south-west Nigeria. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science**, v.2, n. 2, p. 163-168, 2007.

ALPERT, PETER. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, n. 5, p. 685-695, 2005.

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

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**, 18th Edition. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA; 2005.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Pre-sowing seed treatment—A shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions. **Advances in Agronomy**, v. 88, p. 223-271, 2005.

BASTOS, E. A.; RAMOS, H. M. M.; ANDRADE JÚNIOR, A. D.; NASCIMENTO, F. D.; CARDOSO, M. J. Parâmetros fisiológicos e produtividade de grãos verdes do feijão-caupi sob déficit hídrico. **Water Resources and Irrigation Management**, vol.1, n. 1, p. 31-37, 2012.

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

BEWLEY JD, BRADFORD KJ, HILHORST HWM, NONOGAKI H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. Springer, New York, 2013.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.

BEZERRA, A. A. C.; NETO, F. A.; DAS NEVES, A. C.; MAGGIONI, K. Comportamento morfoagronômico de feijão-caupi, cv. BRS Guariba, sob diferentes densidades de plantas. **Revista Ciências Agrárias**, Belém, v. 55, n. 3, p. 184-189, 2012.

BOUBRIAK, I.; DINI, M.; BERJAK, P.; OSBORNE, D. J. Desiccation and survival in the recalcitrant seeds of *Avicennia marina*: DNA replication, DNA repair and protein synthesis. **Seed Science Research**, v. 10, n. 03, p. 307-315, 2000.

BOUCHER, V.; BUITINK, J.; LIN, X.; BOUDET, J.; HOEKSTRA, F. A.; UNDERTMARK, M.; LEPRINCE, O. MtPM25 is an atypical hydrophobic late embryogenesis-abundant protein that dissociates cold and desiccation-aggregated proteins. **Plant cell & environment**, v.33, n. 3, p. 418-430, 2010.

BOUDET, J.; BUITINK, J.; HOEKSTRA, F. A.; ROGNIAUX, H.; LARRÉ, C.; SATOUR, P.; LEPRINCE, O. Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. **Plant physiology**, v.140, n.4, p. 1418-1436, 2006.

BOYER, J. S. Water deficits and photosynthesis. In: KOZLOWSKI, T.T. (ed.) *Water deficits and plant growth*. New York: Academic Press, v.4, p.154-191, 1978.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 25/2005, de 16 de dezembro de 2005, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (Anexo XIV - Padrões para produção e comercialização de sementes de feijão caupi). Brasília: SNAD/DNDN/CLAV: Diário Oficial da União, 20 dez. 2005, p. 18, Seção 1.

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

BRENAC, P.; HORBOWICZ, M.; DOWNER, S. M.; DICKERMAN, A. M.; SMITH, M. E.; OBENDORF, R. L. Raffinose accumulation related to desiccation tolerance during maize (*Zea mays* L.) seed developing and maturation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 150, n. 4, p. 481-488, 1997.

BRUCE, T. J.; MATTHES, M. C.; NAPIER, J. A.; PICKETT, J. A. Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, v. 173, n. 6, p. 603-608, 2007.

- BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. D.; TINÉ, M. A. S.; AIDAR, M. P. M. Mobilização de reservas. IN: FERREIRA, AG; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**.(Ed.). Porto Alegre: Artmed, 2004.
- BUITINK, J.; LEGER, J.J.; GUISE, I.; VU, B.L.; WUILLE, S.; LAMIRAULT, G.; BARS, A. L.; MEUR, N. L.; BECKER, A.; KUSTER, H.; LEPRINCE, O. Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. **The Plant journal**, v. 47, p. 735–750, 2006.
- BUITINK, J.; LY VU, B.; SATOUR, P.; LEPRINCE, O. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. **Seed Science Research**, v.13, n.4, p. 273-286, 2003.
- BURKE, M. J. The glassy state and survival of anhydrous biological systems. In: LEOPOLD, A. C. (Ed.). **Membranes, metabolism and dry organisms**. Ithaca: Cornell University Press, 1986. p. 358-363.
- CAFFREY, M.; FONSECA, V.; LEOPOLD, A.C. Lipid-sugar interactions: relevance to anhydrous biology. **Plant Physiology**, Rockville, v.86, n.3, p.754-758, 1988.
- CASTILHO, E.M.; LUMEN B.O.D.; REYERS, P.S.; LUMEN, H.Z.D. 1990. Raffinose synthase and galactinol synthase in developing seeds and leaves of legumes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 351-355, 1990.
- CASTRO, R.D.; HILHORST, RH.W.M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: Do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed. 2004, p.149-162.
- CHEN, K.; ARORA, R. Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). **Plant Science**, v. 180, n. 2, p. 212-220, 2011.
- CHEN, Y.; BURRIS, S. Role of carbohydrates in desiccation tolerance and membrane behavior in maturing maize seed. **Crop Science**, v. 30, n. 5, p. 971-975, 1990.
- COLVILLE, L.; KRANNER, I. Desiccation tolerant plants as model systems to study redox regulation of protein thiols. **Plant Growth Regulation**, v. 62, n. 3, p. 241-255, 2010.
- COSTA, M. C. D.; RIGHETTI, K.; NIJVEEN, H.; YAZDANPANA, F.; LIGTERINK, W.; BUITINK, J.; HILHORST, H. W. A gene co-expression network predicts functional genes controlling the re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds. **Planta**, v. 242, n. 2, p. 435-449, 2015.
- COSTA, M. M. M. N DA.; TÁVORA, F. J. A. F.; DE PINHO, J. L. N.; MELO, F. I. O. Produção, componentes de produção, crescimento e distribuição das raízes de caupi submetido à deficiência hídrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, n.1, p. 43-50, 1997.

- CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Abscisic acid accumulates at positive turgor potential in excised soybean seedling growing zones. **Plant physiology**, v. 95, n. 4, p. 1209-1213, 1991.
- DEKKERS, B. J.; COSTA, M. C. D.; MAIA, J., BENTSINK, L.; LIGTERINK, W.; HILHORST, H. W. Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. **Planta**, v. 241, n. 3, p. 563-577, 2015.
- DELTOUR, R.; BARSY, T. Nuclear activation during early germination of the higher plant embryo. **Journal of Cell Science**, v.75, n.1, p.43-83, 1985.
- DOWNIE, B.; BEWLEY, J. D. Soluble sugar content of white spruce (*Picea glauca*) seeds during and after germination. **Physiologia Plantarum**, v.110, n.1, p.1-12, 2000.
- FARIA, J.M.R.; BUITINK, J.; LAMMEREN, A.A.M.V.; HILHORST, H.W.M. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation-tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of Experimental Botany**, v.56, n.418, p.2119-2130, 2005.
- FARIA, J.M.R.; LAMMEREN, A.A.M.V.; HILHORST, H.W.M. Desiccation sensitivity and cell cycle aspects in seeds of *Inga vera* subsp. affinis. **Seed Science Research**, v.14, n.2, p.165-178, 2004.
- FARRANT, J. M.; MOORE, J. P. Programming desiccation-tolerance: from plants to seeds to resurrection plants. **Current opinion in plant biology**, v. 14, n. 3, p. 340-345, 2011.
- FARRANT, J. M.; LEHNER, A.; COOPER, K.; WISWEDEL, S. Desiccation tolerance in the vegetative tissues of the fern *Mohria caffrorum* is seasonally regulated. **The Plant Journal**, v. 57, n. 1, p. 65-79, 2009.
- FENNER, M; THOMPSON, K **The ecology of seeds**. Cambridge University Press, 2005.
- FREIRE FILHO, F. R. **BRS Guariba nova cultivar de feijão-caupi para a Região Meio-Norte**. Embrapa Meio-Norte, 2004.
- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ALCÂNTARA, J. P.; BELARMINO FILHO, J.; ROCHA, M. M. BRS Marataoã: nova cultivar de feijão-caupi com grão tipo sempre-verde. **Revista Ceres**, v.52, p.771-777, 2006.
- FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; ROCHA, SILVA, K.J.D.; NOGUEIRA, M.S.R.; RODRIGUES, E.V. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84p.
- GAFF, DONALD F.; OLIVER, MELVIN. The evolution of desiccation tolerance in angiosperm plants: a rare yet common phenomenon. **Functional Plant Biology**, v. 40, n. 4, p. 315-328, 2013.

GECHEV, T. S.; DINAKAR, C.; BENINA, M., TONEVA, V.; BARTELS, D. Molecular mechanisms of desiccation tolerance in resurrection plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 19, p. 3175-3186, 2012.

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

HALL, A.E. Phenotyping cowpeas for adaptation to drought. Phenotyping cowpeas for adaptation to drought. **Frontiers in physiology**, v. 3, 2012.

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

HONG, T.D.; ELLIS, R.H. **A protocol to determine seed storage behavior**. In: ENGELS, J.M.M; TOLL, J. Rome: IPGRI, 1996. 62p. (IPGRI Technical Bulletin n.1).

ILLING, N.; DENBY, K. J.; COLLETT, H.; SHEN, A.; FARRANT, J. M. 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, n. 5, p. 771-787, 2005.

JIA, WENSUO; ZHANG, JIANHUA; LIANG, JIANSHEG. Initiation and regulation of water deficit-induced abscisic acid accumulation in maize leaves and roots: cellular volume and water relations. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 355, p. 295-300, 2001.

KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. 853p.

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

KUO, T. M.; VANMIDDLESWORTH, J. F.; WOLF, W. J. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Amsterdam, v. 36, p. 32-36, 1998

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

LEPRINCE, O.; BUITINK, J. Introduction to desiccation biology: from old borders to new frontiers. **Planta**, v. 242, n. 2, p. 369-378, 2015.

LEPRINCE, O.; VERTUCCI, C. W.; HENDRY, G. A.; ATHERTON, N. M. The expression of desiccation-induced damage in orthodox seeds is a function of oxygen and temperature. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 94, n. 2, p. 233-240, 1995.

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

- LESLIE, S. B.; ISRAELI, E.; LIGHRHART, B.; CROWE, J. H.; CROWE, L. M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3592-3597, 1995.
- LÜ, B.; GONG, Z.; WANG, J.; ZHANG, J.; LIANG, J. Microtubule dynamics in relation to osmotic stress-induced ABA accumulation in *Zea mays* roots. **Journal of experimental botany**, v. 58, n. 10, p. 2565-2572, 2007.
- MAIA, J.; DEKKERS, B. J.; DOLLE, M. J.; LIGTERINK, W.; HILHORST, H. W. Abscisic acid (ABA) sensitivity regulates desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis* seeds. **New Phytologist**, v. 203, n. 1, p. 81-93, 2014.
- MAIA, J.; DEKKERS, B. J.; PROVART, N. J.; LIGTERINK, W.; HILHORST, H. W. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds and its associated transcriptome. **PloS one**, v.6, n.12, e29123, 2011.
- MARTINS, J. R. Estudos ecofisiológicos da germinação e de reindução da tolerância à dessecação em plântulas de Ipê-Roxo. 2009. 87 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2009.
- MENDES, R. M. S.; TÁVORA, F. J. A. F.; PINHO, J. L. N.; PITOMBEIRA, J. B. Relações fonte-dreno em feijão-de-corda submetido à deficiência hídrica. **Ciência Agrônômica**, v.38, p.95-103, 2007.
- MICHEL, B. E.; KAUFMANN, M. R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 51, p. 914-916, 1973.
- MOORE, J. P.; VICRÉ-GIBOUIN, M.; FARRANT, J. M.; DRIOUICH, A. Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. **Physiologia Plantarum**, v. 134, n. 2, p. 237-245, 2008.
- NASCIMENTO, J. T.; PEDROSA, M. B.; TAVARES SOBRINHO, J. Efeito da variação de níveis de água disponível no solo sobre o crescimento e produção de feijão-caupi, vagens e grãos verdes. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.02, p.174-177, 2004.
- NASCIMENTO, S. P DO.; BASTOS, E. A.; ARAÚJO, E. C.; FILHO, F. R. F.; SILVA, E. M DA. Tolerância ao déficit hídrico em genótipos de feijão-caupi. R. Bras. **Eng. Agríc. Ambiental**, v.15, n.8, p. 853-860, 2011.
- NISHIZAWA, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. **Plant physiology**, v. 147, n. 3, p. 1251-1263, 2008.
- NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination—still a mystery. **Plant Science**, v. 179, n. 6, p. 574-581, 2010.

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

OLIVER, M. J.; VELTEN, J.; MISHLER, B. D. Desiccation tolerance in bryophytes: a reflection of the primitive strategy for plant survival in dehydrating habitats?. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, n. 5, p. 788-799, 2005.

OLIVER, M. J.; BEWLEY, J. D. Desiccation tolerance of plant tissues: a mechanistic overview. **Horticultural Reviews**, New York, v. 18, p. 171-213, 1997.

OSBORNE, D.J.; BOUBRIAK, I.; LEPRINCE, O. **Rehydration of dried systems: membranes and nuclear genome**. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H.W. (Ed.). Desiccation and survival in plants: drying without dying. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p.343-364.

OSBORNE, D. J. Biochemical control systems operating in the early hours of germination. **Canadian Journal of Botany**, v. 61, n. 12, p. 3568-3577, 1983.

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

PLUSKOTA, W. E.; SZABLIŃSKA, J.; OBENDORF, R. L.; GÓRECKI, R. J.; LAHUTA, L. B. Osmotic stress induces genes, enzymes and accumulation of galactinol, raffinose and stachyose in seedlings of pea (*Pisum sativum* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 8, p. 1-13, 2015.

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

ROCHA, M. DE M.; CARVALHO, K.L.M.; FREIRE FILHO, F.R.; LOPES, A.C. DE A.; GOMES, R.L.F.; SOUSA, I.S. - Controle genético do comprimento do pedúnculo em feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol.44, n. 3, p. 270-275, 2009.

RODRIGUES, A. C. Germinação e reindução da tolerância à dessecação em sementes de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). 2010. 53 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SARACCO, F.; BINO, R. J.; BERGERVOET, J. H. W.; LANTERI, S. Influence of priming-induced nuclear replication activity on storability of pepper (*Capsicum annuum* L.) seed. **Seed Science Research**, v. 5, n. 01, p. 25-29, 1995.

SARGENT, J. A.; MANDI, S. S.; OSBORNE, D. J. The loss of desiccation tolerance during germination: an ultrastructural and biochemical approach. **Protoplasma**, v. 105, n. 3-4, p. 225-239, 1981.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K., The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 10-19, 2007.

SILVA, A. C.; MORAIS, O. M.; SANTOS, J. L.; D'ARÊDE, L. O.; SILVA, P. B. (2014). Componentes de produção, produtividade e qualidade de sementes de feijão-caupi em Vitória da Conquista, Bahia. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 8, n. 3, p. 327-335, 2014.

SILVA, H. A. P DA.; SOUZA GALISA, P DE.; SILVA OLIVEIRA, R. S DA.; VIDAL, M. S.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L. Expressão gênica induzida por estresses abióticos em nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 47, n. 6, p. 797-807, 2012.

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

SINGH BB (2005) Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. In: Singh RJ, Jauhar PP (eds) **Genetic resources, chromosomal engineering and crop improvement**, vol 1. CRC Press, Boca Raton, pp 117–162.

SINGH, B. B.; EHLERS, J. D.; SHARMA, B.; FREIRE FILHO, F. R. **Recent progress in cowpea breeding**. In: FATOKUN, C. A.; TARAWALI, S. A.; SINGH, B. B.; KORMAWA, P. M.; TAMÒ, M. (Ed.) Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production. Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture, p.22-40, 2002.

STEADMAN, K. J.; PRITCHARD, H. W.; DEY, P. M. Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. **Annals of Botany**, v. 77, n. 6, p. 667-674, 1996.

SUN, W. Q. Desiccation sensitivity of recalcitrant seeds and germinated orthodox seeds: can germinated orthodox seeds serve as a model system for studies of recalcitrant seeds. In: IUFRO SEED SYMPOSIUM, 1., 1998, Kuala Lumpur. Proceedings... Kuala Lumpur: FRIM, 1999. p. 29-42.

TIMKO, M. P.; EHLERS, J. D.; ROBERTS, P. A. Cowpea. In:**Pulses, sugar and tuber crops**. Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 49-67.

TORRES, F. E.; TEODORO, P. E.; SAGRILO, E.; CECCON, G.; CORREA, A. M. Genotype x environment interaction in semiprostrate cowpea genotypes via mixed models. **Bragantia**, v. 74, n. 3, p. 255-260, 2015.

UEMURA, M.; STEPONKUS, P.L. 2003. Modification of the intracellular sugar content alters the incidence of freeze-induced membrane lesions of protoplasts isolated from *Arabidopsis thaliana* leaves. **Plant, Cell and Environment** 26: 1083-1096.

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

VIEIRA, C. V.; SILVA, E. A. A DA.; DE ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M DE.; TOOROP, P. E. Stress-associated factors increase after desiccation of germinated seeds of *Tabebuia impetiginosa* Mart. **Plant growth regulation**, v. 62, n.3, p. 257-263, 2010.

VILLELA, F. A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietilenoglicol 6.000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 11/12, p. 1957-1968, 1991.

VILLETH, G. R.; CARMO, L. S.; SILVA, L. P.; FONTES, W.; GRYNBERG, P.; SARAIVA, M.; BRASILEIRO, A.C. M.; CARNEIRO, R. M. D.; OLIVEIRA, J. T. A.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; MEHTA, A. Cowpea–*Meloidogyne incognita* interaction: Root proteomic analysis during early stages of nematode infection. **Proteomics**, v. 15, n. 10, p. 1746-1759, 2015.

WALTERS, C. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. **Planta**, v. 242, n. 2, p 397-406. 2015.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Médias e desvio padrão (σ) para porcentagem de re-indução de tolerância à dessecação em sementes germinadas de feijão-caupi com comprimento de 1, 2, 3 e 4 mm de raiz primária, embebidas em solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa, por 24, 48 e 72 horas, à temperatura de 10°C.

Tratamento	Comprimento de raiz primária								Médias
	1mm	Σ	2mm	Σ	3mm	σ	4mm	σ	
Test	88,0 Aa	3,27	43,0 Bb	3,8	27,0 Bc	3,83	5,0 Bd	2	40,75 b
24h	84,0 Aa	8,64	75,0 Aa	6	53,0 Ab	7,57	24,0 Ac	5,66	59,00 a
48h	83,0 Aa	6,83	78,0 Aa	9,52	57,0 Ab	15,4	8,0 Bbc	3,27	56,50 a
72h	76,0 Aa	3,27	45,0 Bb	14,4	5,0 Cc	3,27	4,0 Bc	0	32,50 c
Médias	82,75 A		60,25 B		35,50 C		10,25 D		

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na coluna, e letras minúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Apêndice 2 – Médias e desvio padrão (σ) para o índice mitótico (IM) em sementes germinadas de feijão-caupi com raiz primária nos comprimentos de 1, 2, 3 e 4 mm, embebidas em solução de polietilenoglicol 6000 com potencial hídrico de -1,7 MPa, por 24 horas, à temperatura de 10°C.

Tratamento	Comprimento de raiz primária								Média
	1 mm	σ	2 mm	Σ	3 mm	Σ	4 mm	σ	
Sem PEG	4,05 c	$\pm 0,45$	5,80 b	$\pm 0,90$	6,20 ab	$\pm 0,63$	7,70 a	$\pm 1,18$	5,93 a
Com PEG	4,70 b	$\pm 0,84$	6,00 b	$\pm 0,51$	6,10 b	$\pm 0,68$	8,50 a	$\pm 0,80$	6,32 a
Média	4,37 C		5,90 B		6,15 B		8,10 A		

Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.b