

**Universidade Federal do Piauí**

**Efeito do envelhecimento acelerado sobre a integridade do DNA e o vigor de sementes de feijão-caupi**

**Sérgio Ewerton Menezes dos Santos**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Mestre”.**

**Teresina**

**2014**

**Sérgio Ewerton Menezes dos Santos**

**Biólogo**

**Efeito do envelhecimento acelerado sobre a integridade do DNA e o vigor de sementes de feijão-caupi**

**Orientador:**

**Prof. Dr. Sérgio Emílio dos Santos Valente**

**Co-Orientadores:**

**Dr. Marcos Aparecido Gimenes**

**Dr. José Oscar Lustosa de Oliveira Júnior**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Mestre”.**

**Teresina**

**2014**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias  
Serviço de Processamento Técnico

**S237e** Santos, Sérgio Ewerton Menezes dos  
Efeito do envelhecimento acelerado sobre a integridade do  
DNA e o vigor de sementes de feijão-caupi / Sérgio Ewerton  
Menezes dos Santos - 2017.  
60 f.: il.

Dissertação ( Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Pro-  
grama de Pós-Gaduação em Genética e Melhoramento, Teresina,  
2017.

Orientação: Prof. Dr. Sérgio Emílio dos Santos Valente

1. *Vigna unguiculata* 2. Envelhecimento acelerado 3. Germo-  
plasma 4. Recursos genéticos I. Título

**CDD 635.659 2**

Avaliação da integridade de ácidos nucleicos em sementes envelhecidas de  
feijão-caupi

Sérgio Ewerton Menezes dos Santos  
Bacharel em Ciências Biológicas

Aprovado em 27/06/2014

Comissão Julgadora:



Prof. Dr. Marcos Aparecido Gimenes – Embrapa Cenargen



Profa. Dra. Ângela Celis de Almeida Lopes – UFPI/CCN



Dr. José Oscar Lustosa de Oliveira Júnior – Embrapa Meio Norte  
(Co-orientador)



Prof. Dr. Sérgio Emílio dos Santos Valente – UFPI/CCN  
(Orientador)

“Aos homens e mulheres de bem, que batalharam para subir  
na vida e não se envergonham por isso.”

*Margaret Thatcher*

## AGRADECIMENTOS

Pela Graça de Deus concluo mais uma missão, e a ele mais do que ninguém serei infinitamente grato. A Nosso Senhor Jesus Cristo toda a honra, glória e mérito, bendito seja o Espírito Santo consolador. Grato sou à piedosa intercessão da Santíssima Virgem Maria, minha mãe, aos Santos Arcanjos Miguel e Rafael, a São Bento, Santa Isabel da Hungria e à beata Ana Maria Taigi, meus orientadores espirituais. Agradeço à minha família por todo o amor, carinho, apoio e dedicação, em especial a minha querida mamãe Nelcina de Souza Menezes, meu pai Raimundo Nonato Batista dos Santos (*in memoriam*) e à minha irmã Samara Karoline Menezes dos Santos. Obrigado à minha família de Brasília em especial meu primos Alex Machado e Samuel, bem como à minha grande amiga Taci Gomes, por terem me recebido como um verdadeiro filho. Também devo muito ao programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de expandir minha formação acadêmica e profissional, obrigado a todos os docentes, à prof. Dr<sup>a</sup> Ângela Celis de Almeida Lopes, uma verdadeira mãe dos pós-graduandos e que muito me ajudou desde o início. Obrigado ao meu orientador prof. Dr. Sérgio Emílio dos Santos Valente e aos meus co-orientadores, Dr. Marcos Aparecido Gimenes e Dr. José Oscar Lustosa, por toda a contribuição e apoio sem os quais esse trabalho não poderia ter sido realizado. Obrigado à prof. Dr<sup>a</sup> Regina Lúcia que me auxiliou em uma etapa importante dos experimentos. Obrigado aos amigos da minha turma da pós, Iolly Marques, Rafael Almeida, Joseane Inácio, Polyanna Bacelar, Rosimeire Xavier, Jéssica Lustosa, Larrone Silva, Carolline, Raul, Ueslei, Danieles, Akemi, Massaine, Jaqueline, Caline, Kátia e Leany. Obrigado aos amigos de Brasília pelas experiências compartilhadas na Embrapa Cenargen e pelo acolhimento, em especial a Laíssa Schwingel, a Paula Vasconcelos, o Juliano Pádua, Ana e Antonieta. Obrigado aos amigos da Embrapa Meio Norte e aos do LASO, em especial a Alzeneide Lopes, o Dr. Evando Bezerra, o Vinicius Martins, a Débora, Gisele, Marilha e Fernada.

*“Ilustre o dino ramo dos MENEZES,  
aos quais o prudente e largo Céu  
(que errar não sabe), em dote concedeu  
rompesse os maométicos arneses;  
  
desprezando a Fortuna e seus reveses,  
ide para onde o Fado vos moveu;  
erguei flamas no Mar alto Eritreu,  
e sereis nova luz aos Portugueses!”*

CAMÕES, Luís Vaz de. **Os  
Lusíadas**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Objetivos.....	14
1.1.1 Objetivo Geral.....	14
1.1.2 Objetivos específicos.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Recursos Genéticos.....	16
2.2 Conservação de germoplasma.....	17
2.3 Viabilidade da semente.....	19
2.4 Agentes que induzem danos ao DNA e RNA em sementes.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Obtenção do Material Vegetal.....	25
3.2 Teste de Envelhecimento Acelerado.....	26
3.3 Embebição e Teste de Germinação.....	27
3.4 Extração de DNA genômico.....	29
3.5 Visualização da Integridade do DNA em Gel de Agarose.....	30
3.6 Análise dos dados.....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 Efeitos do E. A. sobre a viabilidade de feijão-caupi.....	32
4.2 Efeitos do E. A. sobre o DNA de feijão-caupi.....	37
5 CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS.....	52



## RESUMO

A conservação de sementes ortodoxas em câmaras frias é a forma mais comum de conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais. Apesar da longevidade, as sementes conservadas sofrem processo de envelhecimento culminando com sua morte. Os mecanismos bioquímicos envolvidos nos processos de morte e envelhecimento de sementes constituem informações valiosas para o monitoramento das mesmas e prevenção da perda de acessos. A deterioração do DNA ocorre durante o envelhecimento e por ser facilmente avaliada pode ser uma ferramenta promissora para o estudo da perda de viabilidade em sementes. No presente trabalho, avaliou-se a integridade do DNA de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) submetidas a diferentes condições de temperatura e tempo durante o envelhecimento acelerado. Submeteu-se sementes das cultivares de feijão-caupi BR 17 Gurgueia, BRS-Marataoã e BRS-Guariba aos testes de envelhecimento acelerado (E.A.) e teste de germinação (T.G). Posteriormente, procedeu-se a avaliação da integridade do DNA de sementes envelhecidas embebidas ou não e plântulas anormais obtidas no T.G. Foi observado, como reflexo da degradação do DNA de sementes envelhecidas de feijão-caupi, uma progressiva queda no vigor das mesmas. As cultivares de feijão-caupi BR 17 Gurgueia, BRS-Marataoã e BRS-Guariba manifestaram respostas moleculares variadas, quanto à integridade do DNA, frente a iguais condições de E.A. A combinação 35°Cx48h foi a melhor para se avaliar o vigor das cultivares de feijão-caupi pelo teste do E.A., porque revelou dois níveis distintos de vigor e os maiores valores de percentual de viabilidade. As cultivares BR 17 Gurgueia e BRS-Guariba exibiram melhor desempenho frente às condições adversas do E.A. no que diz respeito ao vigor. Quanto à integridade do DNA a cultivar BRS-Guariba apresentou o maior valor e a cultivar BRS-Marataoã o menor.

Palavras-chave: envelhecimento acelerado, *Vigna unguiculata*, germoplasma, recursos genéticos.

## ABSTRACT

The conservation of orthodox seeds in cold storage is the most common form of *ex situ* conservation of plant genetic resources. Despite their longevity, the stored seeds undergo aging process culminating in their death. The biochemical mechanisms involved in the processes of aging and death seeds are valuable information for monitoring them and preventing loss of access. The deterioration of DNA occurs during aging and it can be easily analyzed to be a promising tool for the study of the loss of seed viability. In this study, it was evaluated the DNA's integrity of cowpea seeds and seedlings (*Vigna unguiculata*) under different conditions of temperature and time during accelerated aging. Seeds of BR 17 Gurgueia, BRS-Marataoã and BRS-Guariba cowpea cultivars were subjected to accelerated aging test (A.A.) and germination test (G.T.). In another moment, imbibed or not imbibed aged seeds and abnormal seedlings obtained in G.T. were subjected to DNA's integrity evaluation. It was observed a progressive decrease in vigor of the same, reflecting the degradation of aged cowpea seeds' DNA. The BR 17 Gurgueia, BRS-Marataoã and BRS-Guariba cowpea cultivars expressed varying molecular responses for the DNA's integrity, considering to the same A.A. conditions. The 35 °C x 48h association was the best for evaluating the effect of cultivars cowpea by the A.A. test, because it revealed two distinct levels of vigor and major viability percentage values. The BRS-17 Gurgueia and BRS-Guariba cowpea cultivars exhibited better performance across the A.A. adverse conditions as regards vigor. Considering DNA's integrity, BRS-Guariba presented the highest value and BRS-Marataoã the lowest.

Keywords: accelerated aging, *Vigna unguiculata*, germplasm, genetic resources.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Sementes das cultivares de feijão-caupi avaliadas (1. – BR17 Gurgueia; 2. – BRS Marataoã; 3. – BRS Guariba.).....25
- Figura 2: Teste de envelhecimento acelerado: a – Sementes de feijão-caupi em caixas gerbox; b – Caixas gerbox com sementes de feijão-caupi em câmara tipo BOD.....27
- Figura 3: Teste de Germinação: a – sementes de feijão-caupi em papel *germitest* embebido; b – rolos de papel *germitest* contendo sementes de feijão-caupi; c – rolos acondicionados em câmaras de incubação.....28
- Figura 4: Procedimento de avaliação e contagem durante o teste de germinação com sementes de feijão-caupi: a – rolos de papel *germitest* contendo os tratamentos ao final do teste de germinação; b – papel *germitest* desenrolado para contagem; c – plântulas normais; d – plântulas anormais; e – sementes mortas.....29
- Figura 5: Eletroforese em gel de agarose a 1% do DNA (1 µg) de amostras de sementes e plântulas de feijão-caupi (tratamentos 111PA a 311 PA). M = marcador; PA = plântulas anormais; SM = sementes mortas; 0 = sementes não embebidas; 1 = sementes embebidas durante 1 hora; 6 = sementes embebidas durante 6 horas; 10 = sementes embebidas durante 10 horas.....38
- Figura 6: Eletroforese em gel de agarose a 1% do DNA (1 µg) de amostras de sementes e plântulas de feijão-caupi (tratamentos 311 0 ao controle 3 10). M = marcador. Letras e algarismos subscritos: PA = plântulas anormais; SM = sementes mortas; 0 = sementes não embebidas; 1 = sementes embebidas durante 1 hora; 6 = sementes embebidas durante 6 horas; 10 = sementes embebidas durante 10 horas.....39
- Figura 7: Géis de eletroforese de DNA de sementes de feijão-caupi submetidas ao E.A. a – tratamentos da cultivar BR 17 Gurgueia; b – tratamentos da cultivar BRS-Marataoã; c – tratamentos da cultivar BRS-Guariba. Setas indicam “arrastes” de DNA degradado.....42
- Figura 8: Géis de eletroforese de DNA de sementes de feijão-caupi submetidas ao E.A. a – tratamentos da cultivar BRS-Marataoã obtidos à temperatura de 35°C; b –

tratamentos da cultivar BRS-Marataoã obtidos à temperatura de 45°C. Setas indicam “arrastes” de DNA degradado.....44

Figura 9: Gel de eletroforese de DNA de sementes de feijão-caupi da cultivar BR 17 Gurgueia submetidas ao E.A à temperatura de 35°C. 111<sub>PA</sub> a 111<sub>10</sub> – tratamentos obtidos com 48 horas de E.A; 112<sub>PA</sub> a 112<sub>10</sub> - tratamentos obtidos com 72 horas de E.A; 113<sub>PA</sub> a 113<sub>10</sub> - tratamentos obtidos com 96 horas de E.A. Setas indicam “arrastes” de DNA degradado.....45

Figura 10: Gel de eletroforese de DNA de sementes e plântulas de feijão-caupi da cultivar BR 17 Gurgueia submetidas ao E.A. à temperatura de 35°C por 48 horas..45

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Genealogia das cultivares de feijão-caupi avaliadas.....	26
Tabela 2: Percentuais de viabilidade das cultivares de feijão-caupi utilizadas no presente trabalho.....	32
Tabela 3: Análise de variância para o teste de germinação utilizando-se o D.I.C em esquema fatorial 3x2x3.....	33
Tabela 4: Médias obtidas considerando o efeito dos fatores cultivar, temperatura e tempo de E.A separadamente sobre o percentual de viabilidade de sementes de feijão-caupi.....	34
Tabela 5: Médias obtidas considerando o efeito da interação entre os fatores cultivar e temperatura de E.A. sobre o percentual de viabilidade de sementes de feijão-caupi.....	35
Tabela 6: Médias obtidas considerando o efeito da interação entre os fatores cultivar e tempo de E.A sobre o percentual de viabilidade das sementes de feijão-caupi....	36
Tabela 7: Médias obtidas considerando o efeito da interação entre os fatores cultivar e tempo de E.A. sobre o percentual de viabilidade das sementes de feijão-caupi...36	36
Tabela 8: Médias obtidas considerando o efeito da interação tripla entre os fatores cultivar e a interação temperatura x tempo de E.A sobre o percentual de viabilidade de sementes de feijão-caupi.....	37
Tabela 9: Análise de variância (ANOVA) para os dados de integridade do DNA de feijão-caupi utilizando-se o D.I.C em esquema fatorial 3x2x3x6.....	41
Tabela 10: Médias percentuais obtidas considerando o efeito dos fatores cultivar, temperatura e tempo de E.A separadamente sobre a integridade do DNA de sementes de feijão-caupi.....	42
Tabela 11: Médias percentuais obtidas considerando o efeito da interação entre os fatores cultivar e temperatura de E.A sobre a integridade do DNA de sementes de feijão-caupi.....	46
Tabela 12: Médias percentuais obtidas considerando o efeito da interação entre os fatores temperatura e tempo de E.A sobre a integridade do DNA de feijão-caupi..	47
Tabela 13: Médias percentuais obtidas considerando o efeito da interação entre os fatores material vegetal utilizado na extração de DNA e tempo de E.A. sobre a	

intergridade do DNA de feijão  
caupi.....48

Tabela 14: Médias percentuais obtidas considerando o efeito da interação entre os  
fatores tempo de E.A e material vegetal sobre a intergridade do DNA de feijão-  
caupi.....48

## 1 INTRODUÇÃO

Os recursos genéticos vegetais (RGVs) envolvem a variabilidade de espécies de plantas integrantes da biodiversidade, de interesse socioeconômico atual ou potencial para a utilização em programas de melhoramento genético, biotecnologia e outras áreas afins (NASS, 2001). Os RGVs são indispensáveis para o desenvolvimento sustentável da agricultura e da agroindústria, assegurando o desenvolvimento econômico e social, bem como a segurança alimentar no planeta (BARBIERI, 2005; MOELLER, 2013). Apesar disso, tem-se verificado um crescente aumento da erosão dos RGVs, o que se reflete na diminuição ou perda da variabilidade genética de espécies cultivadas e seus parentes silvestres, bem como de variedades locais, gerando o estreitamento da base genética (SILVA et al., 2001).

A preservação de sementes em condições de baixa temperatura e umidade (-20°C, 5% de teor de umidade) é a forma mais comum de conservação *ex situ* dos RGVs, já que a semente é a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores (SANTOS; SALOMÃO, 2001). As sementes de numerosas espécies de plantas, a exemplo do trigo, cevada, milho, feijão comum e feijão-caupi, mantêm alta viabilidade após sua preservação nessas condições e são classificadas como ortodoxas. Nesse tipo de semente, a preservação da viabilidade celular no embrião durante a manutenção em condições de baixa umidade pode estender-se por séculos (RAJJOU et al., 2012).

As taxas de envelhecimento características das sementes de diferentes espécies de plantas constituem um parâmetro essencial na avaliação das condições de armazenamento e monitoramento inerentes a um banco de germoplasma (WALTERS et al., 2005). Por outro lado, a deterioração e consequente perda de viabilidade em sementes são intrínsecas ao processo de conservação das mesmas, pois, apesar de possuírem alta longevidade, as sementes de um dado lote sofrem processo de envelhecimento culminando com sua morte. Entretanto, os mecanismos bioquímicos envolvidos nos processos de morte e envelhecimento de sementes, tais como a degradação de DNA e RNA, não são tão bem conhecidos como as descrições empíricas da longevidade de sementes em função do teor de água intracelular e temperatura de armazenamento (KRANNER et al., 2011).

Dentre as espécies de importância agrícola possuidoras de sementes ortodoxas e, portanto, conservadas em câmaras frias está o feijão-caupi. É

conhecido no Brasil por vários nomes populares, dentre eles: feijão-de-corda e feijão macassar na região Nordeste, feijão de praia e feijão de estrada na região Norte e feijão-miúdo na região Sul (MAIA, 2008). É uma planta dicotiledônea, pertencente à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolineae, gênero *Vigna* e espécie *Vigna unguiculata* (NEVES JÚNIOR; XAVIER, 2011).

O feijão-caupi constitui um dos principais componentes da dieta alimentar nas regiões Nordeste e Norte do Brasil, especialmente na zona rural, e atualmente já se dispõe de um vasto acervo de informações tecnológicas para essa cultura. Por meio do melhoramento genético foram desenvolvidas várias cultivares comerciais, ampliando o mercado e as formas de uso do produto (ANDRADE JÚNIOR et al., 2003).

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo Geral**

- Avaliar e estudar o efeito do envelhecimento acelerado (E.A.) sobre o material genético (DNA) de sementes de feijão-caupi (*V. unguiculata*), a fim de compará-lo aos dados obtidos para o teste de germinação.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o grau de integridade do DNA de germoplasma pertencente à planta *V. unguiculata* (feijão-caupi), submetido a processos de E.A., através da investigação da presença de DNA “*laddering*” e “arrastes” de DNA degradado;
- Avaliar o uso potencial desses procedimentos como marcadores para perda de viabilidade em sementes conservadas de feijão-caupi;
- Determinar a melhor temperatura e o melhor tempo de E.A. para discriminar diferenças nas respostas ao envelhecimento acelerado em face da distinção genotípica própria das diferentes cultivares de feijão-caupi;
- Estabelecer as condições adequadas de tempo e temperatura para se obter a menor taxa de deterioração nas sementes das cultivares de feijão-caupi analisadas;



- Determinar qual das cultivares de feijão-caupi apresenta melhor desempenho frente às condições de E.A.;
- Trazer novo conhecimento sobre os efeitos do E.A. no material genético de sementes de feijão-caupi e seus reflexos na viabilidade e vigor dessas sementes.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Recursos Genéticos

Os recursos genéticos vegetais (RGVs) compreendem a diversidade biológica de espécies de plantas e seus parentes, englobando tanto a variação genotípica quanto a fenotípica. Incluem, pois, as variedades reconhecidas como agromorfológicamente distintas por agricultores ou as cultivares, as quais são consideradas geneticamente distintas pelos melhoristas (RAO, 2012). Seu conceito está intimamente relacionado ao de germoplasma, que constitui a fonte de variabilidade genética disponível para o melhoramento genético (NASS, 2001).

Os RGVs são indispensáveis para o desenvolvimento sustentável da agricultura e da agroindústria, assegurando o desenvolvimento econômico e social, bem como a segurança alimentar no planeta (BARBIERI, 2005; MOELLER, 2013).

A variabilidade encerrada nos RGVs é essencial ao melhoramento genético, pois viabiliza a identificação de genes potencialmente úteis na obtenção de genótipos superiores relacionados a caracteres qualitativos, tais como resistência a pragas, tolerância a estresses abióticos e qualidade nutricional para espécies cultivadas (NASS; PATERNIANI, 2000). Com o crescente aumento da erosão dos RGVs, em vista da uniformidade genética advinda da prevalência das cultivares modernas às variedades locais das espécies cultivadas, a preocupação principal por parte do melhorista refere-se à diminuição ou perda da variabilidade genética de espécies cultivadas e seus parentes silvestres, bem como de variedades locais, gerando o estreitamento da base genética (SILVA et al., 2001).

Devido à importância dos RGVs, a FAO (*Food Agriculture Organization*) criou em 1983 a *Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture* (CGRFA), um fórum permanente onde os governos discutem e negociam assuntos relevantes relacionados à biodiversidade para alimentação e agricultura (CGRFA, 2011). Logo no início, a CGRFA elaborou normas para utilização de bancos de germoplasma e criou o Código Internacional de Conduta para Coleta e Transferência de Germoplasma Vegetal, iniciativas que contribuíram para minimizar a perda de diversidade genética em coleções de sementes e para orientar expedições de coleta de RGVs (CGRFA, 2010).

Outro marco importante no estudo dos RGVs foi a criação da *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR) em 1974, que a partir de 1991 tornou-se

*International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI) e desde 2006 *Bioversity International*, instituído em resposta à crescente conscientização da erosão genética e rápida perda de biodiversidade nas culturas (BIOVERSITY INTERNATIONAL, 2012).

Verificou-se, portanto, um grande estímulo ao estudo dos RGVs em vários países, inclusive no Brasil, que em 1974, criou o Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN, atualmente Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (QUEIRÓZ, 2010). Essa instituição consolidou as bases conceituais do enriquecimento e conservação a longo prazo da variabilidade genética. Isso graças à possibilidade de se estabelecer uma vasta parceria entre bancos ativos de germoplasma, bem como à conservação viável de acessos em infraestrutura apropriada localizada na cidade de Brasília - DF (NASS, 2012).

A conservação da variabilidade genética é atividade primordial no Brasil, dentre outros motivos, pela grande dependência histórica de germoplasma exótico para o desenvolvimento de programas de melhoramento. Tal argumento justifica a existência de bancos nacionais de germoplasma de culturas agrícolas exóticas detentores de notável infraestrutura (BUSTAMANTE; FERREIRA, 2011).

Dentre os benefícios auferidos com a conservação e utilização dos RGVs no Brasil, destacam-se a expansão e o desenvolvimento da agricultura nacional impulsionados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) nos últimos 40 anos; que foi possível graças ao estabelecimento, nessa instituição, de programas de melhoramento onde fazia-se uso dos RGVs (LOPES et al., 2012). Isso é estendido às mais diversas culturas agrícolas. Por exemplo, para a triticultura brasileira, a utilização de germoplasma conservado no programa de melhoramento genético da Embrapa deu origem a mais de 100 novas cultivares para as diferentes regiões do país (CAIERÃO et al., 2014).

## **2.2 Conservação de germoplasma**

De uma maneira geral a conservação de germoplasma está inserida nas seguintes atividades: a) prospecção e coleta; b) introdução, por intercâmbio e quarentena e coleta c) conservação *in situ* e *ex situ*; d) caracterização e avaliação; e) documentação e informação (VALOIS, 1996). Segundo esse autor, tais atividades visam à utilização de germoplasma em programas de melhoramento genético, biotecnologia e áreas afins.

Segundo o Tratado Internacional sobre Recursos Filogenéticos para a Alimentação e Agricultura (TIRFAA, 2001), as estratégias de conservação de germoplasma podem ser classificadas em:

- Conservação *in situ*, que representa a conservação dos ecossistemas e habitats naturais e a manutenção e reconstituição de populações viáveis de espécies em condições naturais; Uma grande vantagem dessa modalidade de conservação é o fato de ser a metodologia mais adequada a um considerável número de espécies silvestres, além do custo da infraestrutura necessária ser inferior e de possibilitar a eventual ocorrência de processos evolutivos nas espécies conservadas em seu ambiente natural (GEPTS, 2006);
- Conservação *ex situ*, que corresponde à manutenção de recursos filogenéticos para a alimentação e a agricultura fora do seu ambiente natural. Trata-se da manutenção de recursos genéticos em câmaras de conservação de sementes a - 20°C; cultura de tecidos, conservação *in vitro*; criogenia a - 196°C, para o caso de sementes recalcitrantes; laboratórios, quando se trabalha com microrganismos; a campo, conservação *in vivo*; bancos de germoplasma para espécies vegetais ou em núcleos de conservação quando se lida com espécies animais (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2012).

A conservação *ex situ* de germoplasma vegetal aumentou muito, nas últimas três a quatro décadas, como resultado dos esforços globais para a conservação dos RGVs, para alimentação e agricultura (ODONG et al., 2013). Uma grande vantagem da conservação *ex situ* em relação à *in situ* é o fato de os bancos de germoplasma manterem a diversidade obtida no campo protegida de ameaças potenciais, tais como uso indiscriminado do solo ou alterações climáticas, além de constituírem a principal fonte da qual melhoristas e pesquisadores obtêm características específicas para utilização no desenvolvimento futuro de variedades agrícolas (THORMANN et al., 2012).

Sendo as sementes unidades de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores, sua conservação é a forma mais comum de conservação *ex situ* (SANTOS; SALOMÃO, 2001). O conceito de banco de sementes foi criado entre as décadas de 1920 e 1930 pelo botânico russo Nikolai Ivanovich Vavilov, que coletou sementes de aproximadamente 200.000 plantas cultivadas ao redor de todo o mundo (CHIN; QUEK; SINNIH, 2013).

A metodologia convencional de conservação de sementes utilizada em bancos de germoplasma compreende a desidratação, para teores de umidade extremamente baixos (5%) e manutenção em câmaras com temperaturas aproximadamente a - 20°C (CARVALHO et al., 2008). As sementes de numerosas espécies de plantas mantêm alta viabilidade após o armazenamento nessas condições e são classificadas como ortodoxas. Nesse tipo de semente, a preservação da viabilidade celular no embrião durante a conservação em condições de baixa umidade pode estender-se por séculos (RAJJOU et al., 2012). Entretanto, existem sementes muito sensíveis, recalcitrantes, ou moderadamente sensíveis, intermediárias, à desidratação e ao congelamento, que não sobrevivem ao armazenamento nessas condições (SANTOS; SALOMÃO, 2001).

### **2.3 Viabilidade da semente**

Segundo Popinigis (1985) a qualidade fisiológica da semente corresponde à sua capacidade de desempenhar funções vitais, caracterizada pela sua germinação, vigor e longevidade. A semente atinge sua maturidade fisiológica, máximo vigor e máxima germinação quando alcança máximo teor de matéria seca. Estudos genéticos em arroz (*Oryza sativa*) e *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) revelaram que a longevidade da semente é controlada por muitos componentes genéticos, o que permitiu a detecção de locos relacionados a características quantitativas (QTLs) (RAJJOU; DEBEAUJON, 2008).

A germinação é um processo complexo durante o qual a semente madura embebida deve passar rapidamente de um processo de maturação para uma etapa de desenvolvimento programado, preparando-se ao final, para o crescimento de uma plântula (NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010). A germinação de sementes viáveis é a base para o crescimento e desenvolvimento de novas plantas. Por outro lado, a tolerância à dissecação em sementes ortodoxas constitui a base de sua longevidade, bem como da manutenção dos RGVs por séculos ou mesmo milênios (KRANNER et al., 2011).

Durante o período que vai da fertilização do óvulo até o ponto de maturação fisiológica, as adversidades sofridas pela semente podem predispor-la a uma rápida deterioração. A deterioração de sementes inclui toda e qualquer transformação degenerativa e irreversível, após a semente ter atingido seu nível de máxima qualidade. A temperatura e a umidade relativa do ar em que as sementes são

mantidas são os principais fatores que afetam a qualidade fisiológica da semente. A deterioração é mínima na maturação e apresenta progresso variável entre as espécies, entre lotes de sementes da mesma espécie e entre sementes do mesmo lote (POPINIGIS, 1985).

A deterioração e perda de viabilidade em sementes são intrínsecas ao processo de armazenamento das mesmas, pois, a despeito de sua longevidade, as sementes sofrem processo de envelhecimento culminando com sua morte. Entretanto os mecanismos bioquímicos envolvidos nos processos de morte e envelhecimento de sementes não são tão bem conhecidos como as descrições empíricas da longevidade de sementes como uma função do teor de água intracelular e temperatura de armazenamento (KRANNER et al., 2010).

As taxas de envelhecimento características das sementes de espécies individuais constituem um parâmetro essencial na avaliação das condições de armazenamento, monitoramento e regeneração inerentes a um banco de germoplasma (WALTERS et al., 2005). Uma abordagem útil para o estudo dos efeitos do envelhecimento sobre a viabilidade de sementes ortodoxas é a indução artificial do mesmo nas sementes em questão, através de elevados teor de umidade e temperatura.

O teste de envelhecimento acelerado é um dos métodos para avaliação de vigor de sementes mais utilizados atualmente, por fornecer uma boa correlação com as condições de emergência de plântulas verificadas em campo (VUJAKOVIC et al., 2011). Em girassol, por exemplo, sementes conservadas à temperatura de 45°C e a uma umidade relativa de 100% apresentaram progressiva redução em sua germinação e indução de anormalidades do crescimento em plântulas, o que culminou na morte das mesmas (EL-MAAROUF-BOUTEAU et al., 2011).

Teófilo e Dutra (2007) observaram, utilizando o teste de envelhecimento acelerado em feijão-caupi, que a menor taxa de deterioração (redução menos drástica da germinação) foi obtida quando as sementes foram expostas aos períodos de 24 e 48 horas nas temperaturas de 40, 42 e 45°C e 100% de umidade relativa do ar, sendo a combinação 42°C/48 horas a mais adequada para avaliação do potencial fisiológico de sementes dessa espécie. Guissem et al. (2010) utilizaram para o teste de envelhecimento acelerado as temperaturas e tempos de exposição: 41°C, 42°C, 43°C e 45°C durante 48 horas e 42°C durante 72 horas, verificando a

combinação 43°C/48 horas como a melhor para avaliar o vigor de sementes de feijão-caupi.

Os testes de viabilidade visam determinar se uma semente é ou não capaz de germinar e podem ser diretos ou indiretos. Os testes diretos avaliam diretamente a germinação, promovendo a emergência e avaliação de plântulas das sementes em questão, enquanto que os testes indiretos estimam a capacidade germinativa das sementes medindo outros parâmetros, como por exemplo, atividades metabólicas e enzimáticas (POPINIGIS, 1985).

O teste de germinação (teste direto) determina em uma amostra a proporção de sementes vivas e capazes de produzir plantas normais sob condições favoráveis e foi desenvolvido e aperfeiçoado para avaliar o valor da semente para plantio, bem como para comparar as sementes de diferentes lotes, servindo assim como base para o comércio de sementes (PINTO et al., 2013). Esse teste é executado oferecendo as condições mais favoráveis possíveis para as sementes, como por exemplo, umidade, temperatura, níveis de oxigênio e de substrato apropriados (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000). Assim sendo, a umidade relativa (U.R.) deve ser igual ou superior a 90% e, para feijão-caupi, a temperatura ideal corresponde aos valores entre 20 e 30°C (BRASIL, 2009).

Os resultados obtidos com o teste de germinação, em especial, são importantes indicadores do estado conservacional de sementes. Atenta-se assim para a realização de procedimentos de regeneração como prevenção da perda do material em questão e conseqüentemente da ocorrência de erosão genética (WETZEL; RAMOS; PEREIRA, 2006). Entretanto, o teste de germinação por si só apresenta limitações quando o objetivo em questão é regenerar sementes degradadas (MELLO; SPINOLA; MINAMI, 1999). Isso ocorre porque uma semente que não germina, como detectado pelo teste de germinação, é um material perdido da coleção considerada.

Assim sendo, são necessárias novas metodologias de baixo custo complementares ao teste de germinação, que produzam resultados igualmente confiáveis e propiciem uma análise rápida da viabilidade de sementes, como por exemplo marcadores moleculares e bioquímicos de envelhecimento em sementes (DONÀ et al., 2013).

Seguindo esse raciocínio, faz-se necessária, uma melhor compreensão dos mecanismos celulares, moleculares e bioquímicos relacionados à aquisição de vigor

pelas sementes durante seu desenvolvimento, à continuidade da germinação e à deterioração advinda do envelhecimento das mesmas. Desse modo poderiam ser desenvolvidos novos marcadores de viabilidade em sementes que complementaríamos os testes fisiológicos clássicos (CORBINEAU, 2012).

#### **2.4 Agentes que induzem danos ao DNA em sementes**

Em nível celular, o envelhecimento de sementes está associado ao surgimento de várias alterações, incluindo perda de integridade das membranas celulares, redução nos níveis de metabolismo energético, comprometimento da síntese de RNA e proteínas e degradação do DNA (LEE, 2012). Durante o processo de envelhecimento da semente ocorrem danos ao DNA provavelmente devido à degradação seguida de oxidação do DNA ou à formação de DNA fragmentado, conhecido tipicamente como DNA *laddering*. Esse DNA fragmentado está frequentemente associado ao processo de morte celular programada (EL-MAAROUF-BOUATEAU et al., 2011).

Também conhecido por apoptose, o processo de morte celular programada é um evento complexo de autodestruição regulada de células consideradas redundantes ou desnecessárias em muitos organismos multicelulares (KRANNER et al., 2011). Segundo o referido autor, a morte celular programada caracteriza-se por uma sequência em cascata de eventos bioquímicos responsáveis pela ativação de enzimas especializadas na degradação de macromoléculas, incluindo ácidos nucleicos, proteínas e lipídios.

É sabido que as plantas geram espécimes reativos de oxigênio ou ROS ( $O_2$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^\cdot$ ), em resposta a estresses abióticos (salinidade, déficit hídrico, temperatura, poluição) ou bióticos, como por exemplo, infecção por patógenos (LESHEM; KUIPER, 1996). Contudo, esses organismos dispõem de um sistema de defesa que atua para manter os ROS em níveis homeostáticos. Distúrbios no balanço-redox resultam em produção excessiva desses compostos e estresse oxidativo. Desse modo, os ROS constituem um dos principais agentes causadores de danos ao DNA (PATNAIK et al., 2010). Além disso, os ROS são as principais causas de envelhecimento em sementes durante o armazenamento prolongado (EL-MAAROUF-BOUATEAU et al., 2011).

A ocorrência de desidratação e reidratação durante o desenvolvimento e germinação da semente estão associadas a altos níveis de estresse oxidativo,



resultando em danos ao DNA. Danos ao genoma também ocorrem durante a conservação das sementes, levando à perda de viabilidade e vigor. Tais danos ao DNA precisam ser reparados durante a germinação (RAJJOU, 2012).

Verifica-se que todos os componentes primários do DNA, resíduos de açúcar, ligações fosfodiéster, bases púricas e pirimídicas, os quais constituem os atributos estruturais e funcionais do genoma, podem sofrer danos. As lesões resultantes no DNA podem variar desde danos moleculares pontuais até graves alterações mutagênicas ou genotóxicas no genoma (PATNAIK et al., 2010). Entende-se por alterações genotóxicas, aquelas induzidas no material genético dos organismos por exposição a determinadas substâncias ou mesmo radiação, enquanto a porção dessas alterações que é permanente e transmissível ao longo das gerações corresponde às alterações mutagênicas (OLIVEIRA, 2012).

Outro fator determinante da qualidade fisiológica de sementes é o RNA. Estudos em sementes de *Arabidopsis* demonstraram a importância de se ter um alto percentual de RNA mensageiro (mRNA) previamente sintetizado durante a maturação da semente, para se ter uma germinação bem sucedida e posterior desenvolvimento da plântula (RAJJOU et al., 2004). Por outro lado, as células submetidas a condições de estresse poderiam ter comprometida a utilização dos mRNAs na síntese proteica requeridos para a germinação da semente (RAJJOU et al., 2012).

Existe um número considerável de parâmetros ou marcadores úteis para a detecção de genotoxicidade em plantas. Entre eles estão o estudo das aberrações cromossômicas, detecção de micronúcleos, permuta entre cromátides homólogas, além da eletroforese em gel de células individuais (ensaio cometa) e eletroforese em gel de DNA genômico para verificar a presença de DNA fragmentado ou *laddering* (PATNAIK et al., 2010).

Atualmente, as abordagens moleculares ao nível de DNA, RNA e proteínas estão sendo utilizadas para caracterizar o vigor de sementes, que se relaciona diretamente com sua longevidade, tolerância a estresses ambientais durante a germinação, bem como a uniformidade e velocidade de germinação das sementes e estabelecimento de plântulas (RAJJOU et al., 2012). Segundo os referidos autores, através desses estudos se espera desenvolver novos marcadores de qualidade fisiológica de sementes, que poderiam ser utilizados em programas de

melhoramento, bem como constituir ferramentas biotecnológicas para incremento do rendimento em culturas agrícolas.

Como mencionado anteriormente, em sementes ortodoxas a germinação é seguida pela perda da tolerância à dissecação. Após esse evento, essas sementes podem sofrer danos irreversíveis ao DNA se sujeitas à desidratação. Quando as células são confrontadas com estresses ambientais, correm o risco de morrer passivamente (morte celular acidental) ou se autodestruírem (morte celular programada), dependendo do tipo e intensidade do estresse considerado (DANON et al., 2000).

Segundo Faria et al., (2005) essa autodestruição é operada pelo mecanismo ativo de morte celular programada ou apoptose, cujo “marcador” bioquímico é a clivagem do DNA, por endonucleases, em sítios internucleossômicos (FARIA et al., 2005). Esse DNA fragmentado passa a constituir fragmentos oligonucleossômicos detectados como DNA *laddering* através da eletroforese em gel de agarose. Ainda segundo os referidos autores, a morte celular provocada por outros processos (a exemplo da peroxidação lipídica, hidrólise de açúcares e reações de Maillard), que não a autodestruição ou apoptose, não se verifica na eletroforese em gel o padrão de DNA *laddering*, mas sim uma mancha ou “arraste” de DNA degradado.

Em adição à fragmentação do DNA genômico foi relatada, em sementes envelhecidas ou mortas, a degradação de RNA ribossômico (KRANNER et al., 2011). Segundo os autores considerados, a detecção de DNA degradado pode ser uma ferramenta promissora para o estudo da viabilidade em sementes. Isso pode ser alcançado mediante correlação entre a presença do mesmo e os efeitos do envelhecimento acelerado (E.A.) no vigor de sementes.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Sementes e Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-Caupi da Embrapa Meio Norte e no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (UFPI), ambos situados em Teresina, PI.

#### 3.1 Obtenção do Material Vegetal

Utilizou-se em todos os experimentos sementes das cultivares de feijão-caupi BR 17 Gurgueia, BRS-Marataoã e BRS-Guariba, (Figura 1), pertencentes a um mesmo lote para cada cultivar, oriundos de plantio irrigado sem adubação. As mesmas foram colhidas em junho de 2012 e conservadas em câmaras de sementes do Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-caupi da Embrapa Meio-Norte, Teresina - PI. As três cultivares de feijão-caupi avaliadas são amplamente recomendadas para cultivo nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (TEIXEIRA et al., 2010); sua genealogia encontra-se discriminada na tabela 1.



Figura 1: Sementes das cultivares de feijão-caupi avaliadas (1. – BR17 Gurgueia; 2. – BRS-Marataoã; 3. – BRS-Guariba.); Fonte: SANTOS, S. E. M.

Tabela 1: Genealogia das cultivares de feijão-caupi avaliadas.

Cultivar	Genealogia
BR 17-Gurgueia	BR 10-Piauí x CE-315*
BRS-Marataoã	Seridó x (TV x 1836-013J)*
BRS-Guariba	IT85F-2687 x TE87-98-8G*

\*Fontes: EMBRAPA MEIO-NORTE, 2004a, 2004b, 2004c.

Convencionou-se representar cada tratamento por um conjunto de três Algarismos superiores, juntamente com outro Algarismo ou conjunto de duas letras subscrito. De modo que o primeiro Algarismo superior representava uma cultivar de feijão-caupi, sendo 1 para BR 17 Gurgueia, 2 para BRS-Marataoã e 3 para BRS-Guariba, o segundo Algarismo superior se referiu à temperatura de envelhecimento acelerado, as quais foram de 35°C, correspondente ao Algarismo 1, e 45°C correspondente ao Algarismo 2, o terceiro Algarismo superior representa o tempo de envelhecimento, sendo 1 para 48 horas, 2 para 72 horas e 3 para 96 horas. Os caracteres subscritos identificaram o tipo de material ou tempo de embebição das sementes. Assim sendo, PA representou plântulas anormais, SM sementes mortas, 0 sementes não embebidas, 1 sementes embebidas por uma hora, 6 embebidas por seis horas e 10 para sementes embebidas por dez horas.

### 3.2 Teste de Envelhecimento Acelerado

Inicialmente as sementes foram submetidas ao teste de envelhecimento acelerado (E.A.), o qual foi realizado adotando-se o método de caixas plásticas de germinação, tipo gerbox, com tela suspensa segundo Silva, Lazarini e Sá, (2010). Amostras de aproximadamente 250 sementes de cada cultivar de feijão-caupi foram acondicionadas, em camada única sobre tela, em caixas plásticas de germinação contendo 40 mL de água destilada, formando uma câmara úmida. As caixas foram lacradas com plástico filme e mantidas em câmaras tipo BOD a 35 e 45 ± 0,5°C, respectivamente, pelos períodos pré-determinados de 48, 72 e 96 horas (Figura 2).



Figura 2: Teste de envelhecimento acelerado: a – Sementes de feijão-caupi em caixas gerbox; b – Caixas gerbox com sementes de feijão-caupi em câmara tipo BOD; Fonte: SANTOS, S. E. M.

### 3.3 Embebição e Teste de Germinação

Subamostras de sementes de feijão-caupi submetidas aos testes de envelhecimento acelerado foram embebidas em placas de petri contendo 5 mL de água destilada à temperatura ambiente pelos intervalos de tempo de 1, 6 e 10 horas. Após a embebição nos referidos intervalos, as sementes foram conservadas à temperatura de - 20°C para que, posteriormente, através da extração de DNA, fosse avaliada a integridade do mesmo em eletroforese e conseqüentemente a presença ou não de eventuais indícios de reparo.

Em outras subamostras de sementes foi realizado o teste de germinação (T.G.), conforme as recomendações das Regras para Análise de Sementes, (2009). Para tanto, utilizou-se quatro repetições de 50 sementes que foram distribuídas uniformemente sobre duas folhas de papel de germinação, tamanho 44 x 34 cm, umedecidas com água destilada, cobertas com uma terceira folha umedecida. Após o enrolamento dos conjuntos, acondicionaram-se os rolos contendo as sementes em Câmaras de Incubação a 25°C (Figura 3).

Em outra etapa foi procedida a contagem e separação de plântulas normais (aquelas intactas ou com pequenos defeitos), plântulas anormais (danificadas, deformadas ou deterioradas – Figura 4) e sementes mortas, após 4 e 7 dias de

incubação. Com o número de sementes que originaram plântulas normais, dentre as 50 sementes de cada repetição, calculou-se o percentual de germinação da respectiva repetição, sendo que para cada tratamento, o percentual de germinação correspondeu à média aritmética simples dos percentuais obtidos nas quatro repetições de 50 sementes. De modo semelhante a Garcia, Nogueira e Abreu (2004), adotou-se como parâmetro de germinação a emissão da radícula com, no mínimo, 0,5 cm de comprimento. Foi considerada plântula normal aquela que apresentou as estruturas primordiais, radícula, caulículo e plúmula. A quantidade de plântulas normais compôs o percentual de viabilidade (Figura 4).

Durante as avaliações, procedeu-se a separação de plântulas anormais e sementes mortas para posterior realização da extração de DNA.

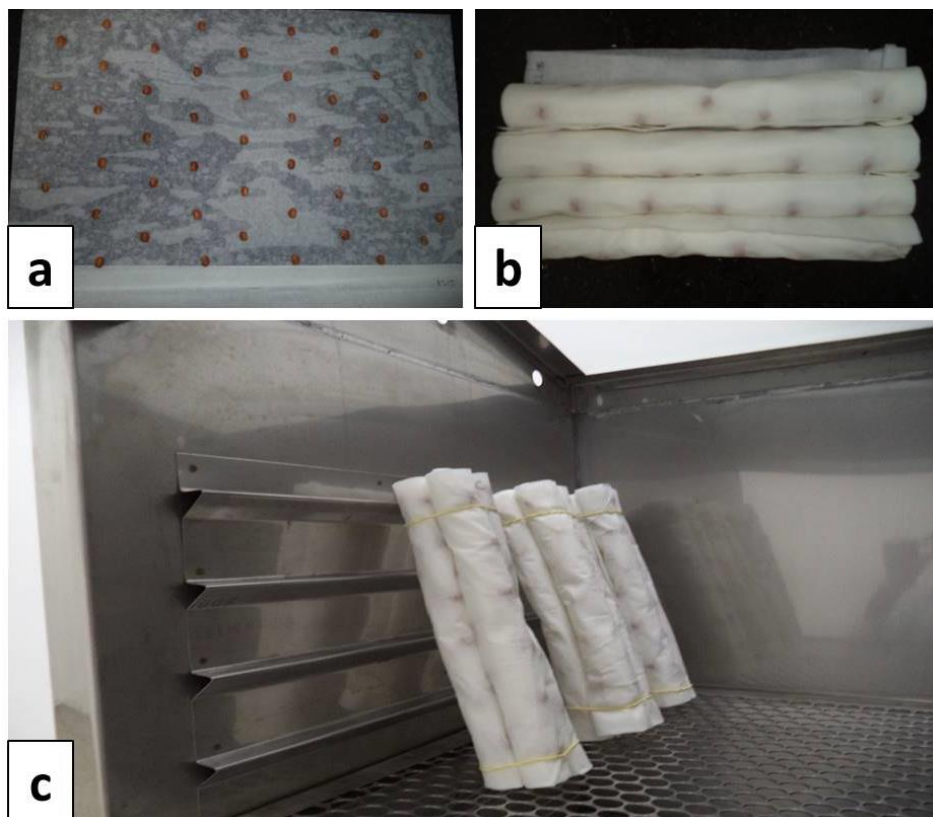


Figura 3: Teste de Germinação: a – sementes de feijão-caupi em papel *germitest* embebido; b – rolos de papel *germitest* contendo sementes de feijão-caupi; c – rolos acondicionados em câmaras de incubação; Fonte: SANTOS, S. E. M.



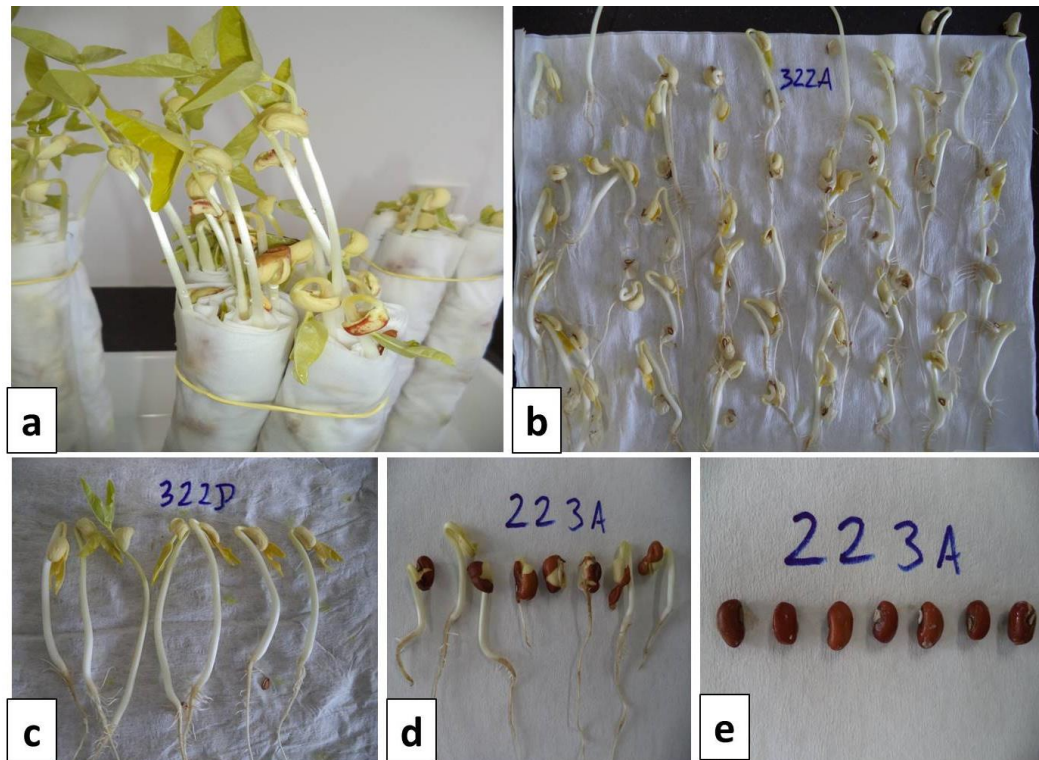


Figura 4: Procedimento de avaliação e contagem durante o teste de germinação com sementes de feijão-caupi: a – rolos de papel *germitest* contendo os tratamentos ao final do teste de germinação; b – papel *germitest* desenrolado para contagem; c – plântulas normais; d – plântulas anormais; e – sementes mortas; Fonte: SANTOS, S. E. M.

### 3.4 Extração de DNA genômico

Utilizou-se o protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998) com modificações. Inicialmente, foi procedida a maceração de 160 mg de cada tipo de tecido dos tratamentos considerados (sementes não embebidas, sementes embebidas, plântulas anormais e sementes mortas) em nitrogênio líquido, utilizando-se almofariz e pistilo até a obtenção de um pó homogêneo. Em seguida, 80 mg desse material foi colocado em microtubos de 2,0 mL e incubado por 60 minutos em banho-maria a 65°C com 1000 µL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl; 2% CTAB (*cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*); 1% PVP (*polyvinylpyrrolidone*), contendo 2 µL de β-mercaptoetanol por mL de tampão. Durante a incubação, os tubos foram agitados a cada dez minutos para homogeneização. Após esse tempo, os tubos foram retirados do banho-maria e resfriados à temperatura ambiente.

Posteriormente, em uma capela de exaustão, acrescentou-se 600 µL do solvente composto por 24 partes de clorofórmio para 1 de álcool isoamílico (CIA). Os

tubos foram então agitados durante cinco minutos e centrifugados a 15.000 rotações por minuto (rpm) durante dez minutos. Os tubos foram retirados cuidadosamente e, com uma pipeta, a fase superior (aquosa) foi retirada e transferida para novos tubos. Para a precipitação do DNA, acrescentou-se 2/3 do volume da solução aquosa de isopropanol a -20°C e centrifugou-se os tubos novamente a 7.000 rpm durante cinco minutos. Após o descarte do sobrenadante, lavou-se o *pellet* duas vezes em 1,0 mL de etanol a 70%, e uma vez em 1,0 mL de etanol absoluto durante dez minutos. Os *pellets* foram secos à temperatura ambiente por 15 minutos, ressuspensos com 50 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl; pH 8,0; 0,1 mM EDTA) contendo 10µg/mL de RNase A Sigma-Aldrich® e incubados a 37°C por 120 minutos, para a digestão do RNA. Posteriormente, quantificou-se as amostras de DNA em espectrofotômetro Pico 200® a uma razão de comprimentos de onda  $A_{260/280}$ . Ao final, as amostras foram armazenadas em freezer a - 20°C.

### 3.5 Visualização da Integridade do DNA em Gel de Agarose

Visualizou-se 1 µg de cada amostra de DNA obtida, em gel de agarose a 1%, diluído em tampão TBE (90 mM Tris-Borato e 2 mM *ethylenediamine tetraacetic acid* / EDTA; pH 8,0), mediante eletroforese a 90 V (*volts*) por 60 minutos. Durante o carregamento do gel foram utilizados 5 µL da solução de extração à concentração de 0,20 µg/µL de DNA , 5 µL de água ultrapura e 2 µL de tampão de carregamento (0,02% azul de bromofenol; 0,02% xileno cianol; 60% sacarose), para um volume total de 12 µL. Os géis foram corados com brometo de etídio por 20 minutos, visualizados pela exposição à luz UV e fotografados em um fotodocumentador.

### 3.6 Análise dos dados

O delineamento experimental utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado (D.I.C). Os tratamentos para o teste de germinação foram arranjados mediante esquema fatorial 3x2x3, três cultivares de feijão-caupi, três tempos de E.A. combinados a duas temperaturas de E.A. Com os dados percentuais de viabilidade foi procedida a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o *software* estatístico Assistat, versão 7.6 beta. Aplicou-se o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade nas médias obtidas dos tratamentos (BANZATTO; KRONKA, 2006).

Os tratamentos dos experimentos de avaliação da integridade de DNA foram obtidos do esquema fatorial 6x3x3x2, sementes embebidas em quatro tempos de



embebição junto de plântulas anormais e sementes mortas, três cultivares de feijão-caupi, três tempos de E.A. e duas temperaturas de envelhecimento acelerado. Além dos tratamentos, observou-se o comportamento de testemunhas (controles negativos). Para a avaliação da integridade de ácidos nucleicos, cinco sementes ou plântulas foram escolhidas aleatoriamente de cada tratamento.

A integridade do DNA de cada tratamento foi avaliada mediante a atribuição de notas percentuais que variaram de 0%, para DNA altamente íntegro, a 100%, para DNA totalmente degradado. Como critérios de avaliação considerou-se a intensidade da banda de DNA de alto peso molecular, bem como a presença de “arraste” de DNA degradado. Com os dados percentuais de viabilidade foi procedida a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o *software* estatístico Assistat, versão 7.6 beta. Aplicou-se o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade nas médias obtidas dos tratamentos (BANZATTO; KRONKA, 2006).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Efeitos do E.A. sobre a viabilidade de feijão-caupi

Seguem, na tabela 2, os percentuais de viabilidade das sementes de feijão-caupi pertencentes às cultivares avaliadas no presente trabalho antes de serem submetidas ao E. A.. A manutenção da viabilidade de sementes ortodoxas, como as de feijão-caupi deve-se ao fato de a dissecação das mesmas, ao final da maturação fisiológica, induzir vários mecanismos de proteção para a sobrevivência na ausência de umidade. Entre esses mecanismos estão a síntese de compostos osmoprotetores, carboidratos e proteínas LEA (*late embryogenesis abundant proteins*), os quais contribuem para a conversão do material da semente em um estado cristalizado que limita a mobilidade molecular e conseqüentemente as reações bioquímicas degradativas (KRANNER et al., 2010).

Tabela 2: Percentuais de viabilidade das cultivares de feijão-caupi utilizadas no presente trabalho.

Cultivar de Feijão-caupi	Percentual de viabilidade
BR 17 Gurgueia	91,00*
BRS-Marataoã	96,00*
BRS-Guariba	94,00*

\*Fontes: EMBRAPA MEIO-NORTE, 2004a, 2004b, 2004c.

Por sua vez, o E. A. de sementes está associado com a perda de viabilidade e vigor (habilidade de germinar rapidamente sob uma gama de condições ambientais) (EL-MAAROUF-BOTEAU et al., 2011). Com os dados de percentual de viabilidade das sementes de feijão-caupi submetidas ao E. A., obtidos através do T.G., procedeu-se a análise de variância (ANOVA). Tal análise indicou a existência de diferenças significativas entre os tratamentos submetidos ao T.G., considerando os valores obtidos para o teste F aos níveis de 1 e 5% de probabilidade (tabela 3).

Ocorreram diferenças significativas no percentual de viabilidade entre as três cultivares de feijão-caupi considerando a existência de diferentes cultivares, diferentes temperaturas e diferentes tempos de E.A., como também, observou-se sobre a viabilidade de sementes, o efeito da interação entre os fatores cultivar e

temperatura de E.A., cultivar e tempo de E.A., tempo e temperatura de E.A., além do efeito da interação tripla dos fatores cultivar, temperatura de E.A. e tempo de E.A.

Tabela 3: Análise de variância (ANOVA) para o teste de germinação utilizando-se o D.I.C em esquema fatorial 3x2x3.

FV	GL	SQ	QM	F
Cultivar	2	1167,44	583,72	10,76**
Temperatura	1	16380,50	16380,50	301,99**
Tempo	2	30664,78	15332,39	282,67**
Int. Cult.xTemper.	2	949,00	474,50	8,75**
Int. Cult.xTempo	4	1321,22	330,31	6,09**
Int. Temper.xTempo	2	500,33	250,17	4,61*
Int. Cult.xTemper.xTempo	4	1015,67	253,92	4,68**
Tratamentos	17	51998,94	3058,76	56,39**
Resíduo	54	2929,00	54,24	
Total	71	54927,94	CV = 23,78%	

FV = fonte de variação; Cult. e Temper = cultivar e temperatura; GL = graus de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrados médios; F = teste F; \*\* = significância ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \* = significância ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ); CV = coeficiente de variação.

Considerando as cultivares de feijão-caupi, independentemente das temperaturas e intervalos utilizados no E.A., a média de viabilidade percentual de BRS-Marataoã foi significativamente inferior às médias de BR 17 Gurgueia e BRS-Guariba que, no entanto, não diferiram entre si (tabela 4), apresentando o maior vigor. Em relação ao efeito da temperatura de E.A., independentemente das cultivares ou intervalos avaliados, a média de viabilidade das cultivares de feijão-caupi foi significativamente inferior quando à temperatura de 45°C (tabela 4). Em relação aos intervalos de tempo de E.A., independentemente das cultivares ou temperaturas avaliadas, verificou-se uma diminuição do percentual de viabilidade inversamente proporcional ao tempo de E.A., sendo o menor valor obtido após 96 horas e o maior valor após 48 horas (tabela 4).

Tabela 4: Médias obtidas considerando o efeito dos fatores cultivar, temperatura e tempo de E.A. separadamente sobre o percentual de viabilidade de sementes de feijão-caupi.

Médias das Cultivares		Médias das Temperaturas		Médias dos Tempos	
BR 17 Gurgueia	31,42 a	35°C	46,06 a	48 horas	60,00 a
BRS-Marataoã	25,83 b	45°C	15,89 b	72 horas	19,08 b
BRS-Guariba	35,67 a			96 horas	13,83 c

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De modo similar ao verificado no presente trabalho, Aveling e Powell (2005) obtiveram um decréscimo em percentual de viabilidade para quatro diferentes cultivares de feijão-caupi submetidas ao E.A. à temperatura de 45°C em 100% de umidade, entre 48 horas (95, 93, 59 e 88%) e 96 horas (83, 92, 45 e 59%). Curiosamente, as cultivares cujos tegumentos apresentavam coloração mais escura (atribuída a metabólitos secundários importantes na manutenção da viabilidade das sementes) apresentaram desempenho superior às cultivares de tegumento claro (AVELING; POWELL, 2005).

Teófilo e Dutra (2007) avaliaram lotes das cultivares de feijão-caupi Setentão e Epace 10 pelo teste de E.A. nas temperaturas de 40, 42 e 45°C, após 24, 48, 72 e 96 horas em 100% de UR e, em concordância com os resultados do trabalho em questão, verificaram um decréscimo em viabilidade proporcional ao tempo nos lotes envelhecidos à temperatura de 45°C. Em outro estudo que incluiu as três cultivares avaliadas no presente trabalho, Guiscem et al. (2010) obtiveram os percentuais de viabilidade de 89, 89, 97, 82 e 97% para as cultivares de feijão-caupi, BR 17 Gurgueia, BRS-Guariba, BRS-Marataoã, Quarentão e Vinagre submetidas ao teste de envelhecimento acelerado por 48 horas, à temperatura de 45°C em 100% de UR.

A temperatura e o teor de umidade são fatores determinantes da longevidade das sementes (SCHWEMBER; BRADFORD, 2011). O aumento da temperatura ou do teor de água da semente durante o processo de E.A. culmina na transição do conteúdo da semente de um estado cristalizado para um estado viscoso ou fundido. O estado fundido favorece a ocorrência de reações degradativas de modo mais

rápido e como consequência o decréscimo em viabilidade das sementes (MURTHY; KUMAR; SUN, 2003).

Considerando a interação entre o fator cultivar de feijão-caupi e o fator temperatura de E.A. (Tabela 5), observou-se que a cultivar BRS-Marataoã exibiu o menor percentual de viabilidade dentre as cultivares à temperatura de 35°C, permanecendo significativamente idênticos nessa temperatura os percentuais de viabilidade das cultivares BR 17 Gurgueia e BRS-Guariba. Já à temperatura de 45°C, o percentual de viabilidade da cultivar BRS-Guariba foi superior ao percentual da cultivar BR 17 Gurgueia. Entretanto o percentual de viabilidade da cultivar BRS-Marataoã não diferiu significativamente dos percentuais das demais cultivares.

Tabela 5: Médias obtidas considerando o efeito da interação entre os fatores cultivar de feijão-caupi e temperatura de E.A sobre o percentual de viabilidade de sementes de feijão-caupi.

	35°C	45°C
BR 17 Gurgueia	51,33 aA	11,50 bB
BRS-Marataoã	37,00 bA	14,67 abB
BRS-Guariba	49,83 aA	21,50 aB

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas classificam colunas; Letras maiúsculas classificam linhas.

Em relação à interação entre o fator cultivar de feijão-caupi e o fator tempo de E.A. (Tabela 6), independentemente da temperatura de E.A. considerada, foi observado que após 48 horas de E.A. a média do percentual de viabilidade da cultivar BRS-Guariba foi significativamente superior às médias das cultivares BR 17 Gurgueia e BRS-Marataoã que, no entanto, permaneceram iguais entre si. Após 72 horas de E.A. as médias dos percentuais de viabilidade permaneceram idênticas nas três cultivares de feijão-caupi. Passadas 96 horas de E.A. as médias dos percentuais de viabilidade das cultivares BR 17 Gurgueia e BRS-Guariba foram idênticas e significativamente superiores à média do percentual de viabilidade da cultivar BRS-Marataoã. Para as cultivares BR 17 Gurgueia e BRS-Guariba, as médias do percentual de viabilidade apresentaram uma única variação estatisticamente significativa a partir de 72 horas de E.A. Para a cultivar BRS-

Marataoã as médias do percentual de viabilidade apresentaram duas variações estatisticamente significativas após 72 e 96 horas de E.A.

Tabela 6: Médias obtidas considerando o efeito da interação entre os fatores cultivar e tempo de E.A sobre o percentual de viabilidade das sementes de feijão-caupi

	48 horas	72 horas	96 horas
BR 17 Gurgueia	58,0000 bA	19,5000 aB	16,7500 aB
BRS-Marataoã	50,0000 bA	20,0000 aB	7,5000 bC
BRS-Guariba	72,0000 aA	17,7500 aB	17,2500 aB

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas classificam colunas; Letras maiúsculas classificam linhas.

Considerando a interação entre os fatores, temperatura e tempo de E.A. (Tabela 7) é importante destacar que a temperatura de 35°C de E.A. possibilitou a ocorrência de três níveis distintos de vigor em cada tempo de E.A. Já a temperatura de 45°C possibilitou apenas dois níveis distintos de vigor, isso pois a perda de vigor foi total após 72 horas de E.A. nessa temperatura.

Tabela 7: Médias obtidas considerando o efeito da interação entre os fatores cultivar e tempo de E.A. sobre o percentual de viabilidade das sementes de feijão-caupi.

	48 horas	72 horas	96 horas
35°C	72,67 aA	37,83 aB	27,67 aC
45°C	47,33 bA	0,33 bB	0.00 bB

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas classificam colunas; Letras maiúsculas classificam linhas.

Em relação à interação tripla verificada entre os fatores tipo de cultivar de feijão-caupi, temperatura e tempo de E.A. (Tabela 8), verificou-se que as combinações 35°Cx72h, 45°Cx72h e 45°Cx96h não conseguiram revelar diferenças de vigor entre as cultivares de feijão-caupi. Já as combinações 35°Cx48h, 35°Cx96h e 45°Cx48h diferenciaram as cultivares avaliadas em dois níveis distintos de vigor. Nas combinações 35°Cx48h e 35°Cx96h as cultivares BR 17 Gurgueia e BRS-

Guariba apresentaram vigor igual entre si, os qual foi superior ao vigor da cultivar BRS-Marataoã. Na combinação 45°Cx48h as cultivares BR 17 Gurgueia e BRS-Marataoã exibiram o mesmo vigor, o qual foi inferior ao vigor da cultivar BRS-Guariba. Nas combinações 45°Cx72h e 45°Cx96h houve perda total de viabilidade.

Tabela 8: Médias obtidas considerando o efeito da interação tripla entre os fatores cultivar e a interação temperatura x tempo de E.A. sobre o percentual de viabilidade de sementes de feijão-caupi.

	35°Cx48h	35°Cx72h	35°Cx96h	45°Cx48h	45°Cx72h	45°Cx96h
BR 17 Gurgueia	81,50 aA	39,00 aB	33,50 aB	34,50 bB	0,00 aC	0,00 aC
BRS- Marataoã	56,00 bA	40,00 aB	15,00 bC	44,0 bAB	0,00 aC	0,00 aC
BRS-Guariba	80,50 aA	34,50 aC	34,50 aC	63,50 aB	1,00 aD	0,00 aD

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas classificam colunas; Letras maiúsculas classificam linhas.

As cultivares BRS-Marataoã e BR 17 Gurgueia apresentaram três variações estatisticamente significativas de vigor considerando todas as combinações de temperatura e tempo. Já a cultivar BRS-Guariba apresentou quatro variações significativas de vigor. A combinação 35°Cx48h foi a melhor para se avaliar o vigor das cultivares de feijão-caupi pelo teste do E.A., porque revelou dois níveis distintos de vigor e os maiores valores de percentual de viabilidade. As combinações 45°Cx72h e 45°Cx96h foram as piores para se avaliar o vigor de feijão-caupi por causa da perda total de viabilidade verificada. No presente trabalho, as cultivares BR 17 Gurgueia e BRS-Guariba apresentaram maior vigor que a cultivar BRS-Marataoã. Teófilo & Dutra (2007) obtiveram a combinação 42°Cx48h como a melhor para avaliar o vigor de cultivares de feijão-caupi pelo teste de E.A. Já Guissem et al., (2010) observaram a combinação 43°Cx48h como a mais adequada.

#### 4.2 Efeito do E. A. sobre o DNA de feijão-caupi

A embebição de sementes quiescentes durante a germinação e consequente passagem dessas sementes de um estado cristalizado para um estado viscoso, está associada à produção de espécimes reativas de oxigênio (ROS - óxido nítrico,

radicais hidroxila e radicais superóxido) em diversas espécies de plantas (GOMES; GARCIA, 2013). O desequilíbrio entre a produção de ROS e de mecanismos antioxidantes de defesa é denominado estresse oxidativo e culmina no aumento de macromoléculas oxidadas e consequentes danos oxidativos a componentes celulares (KIBINZA et al., 2011). Ainda segundo os referidos autores, observações em diferentes espécies demonstram que tais danos oxidativos aumentam com o envelhecimento em sementes, o qual seria responsável pelo decréscimo, em eficiência, dos mecanismos antioxidantes de defesa celular.

Assim sendo, os ROS são apontados como os principais responsáveis pela deterioração de sementes envelhecidas. Essa deterioração inclui a perda de integridade das membranas celulares, a redução no metabolismo energético, o comprometimento dos processos de transcrição e tradução, bem como a degradação do DNA (CORBINEAU, 2012).

Seguem adiante as fotografias dos géis de eletroforese de DNA genômico dos tratamentos de E.A. envolvendo sementes e plântulas de feijão-caupi, bem como o DNA das sementes não envelhecidas do controle avaliados no presente trabalho (figuras 5 e 6).

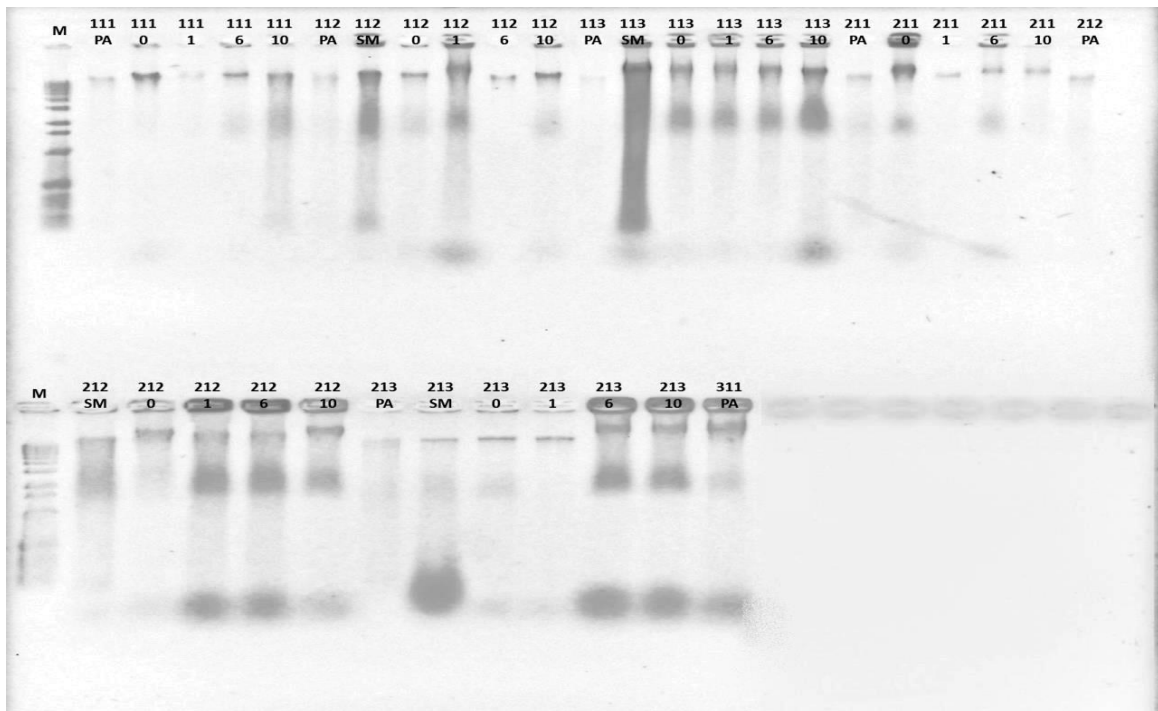


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose a 1% do DNA (1 µg) de amostras de sementes e plântulas de feijão-caupi (tratamentos 111<sub>PA</sub> a 311<sub>PA</sub>). M = marcador; PA = plântulas anormais; SM = sementes mortas; 0 = sementes não embebidas; 1 = sementes embebidas durante 1 hora; 6 = sementes embebidas durante 6 horas; 10 = sementes embebidas durante 10 horas; Fonte: SANTOS, S. E. M.



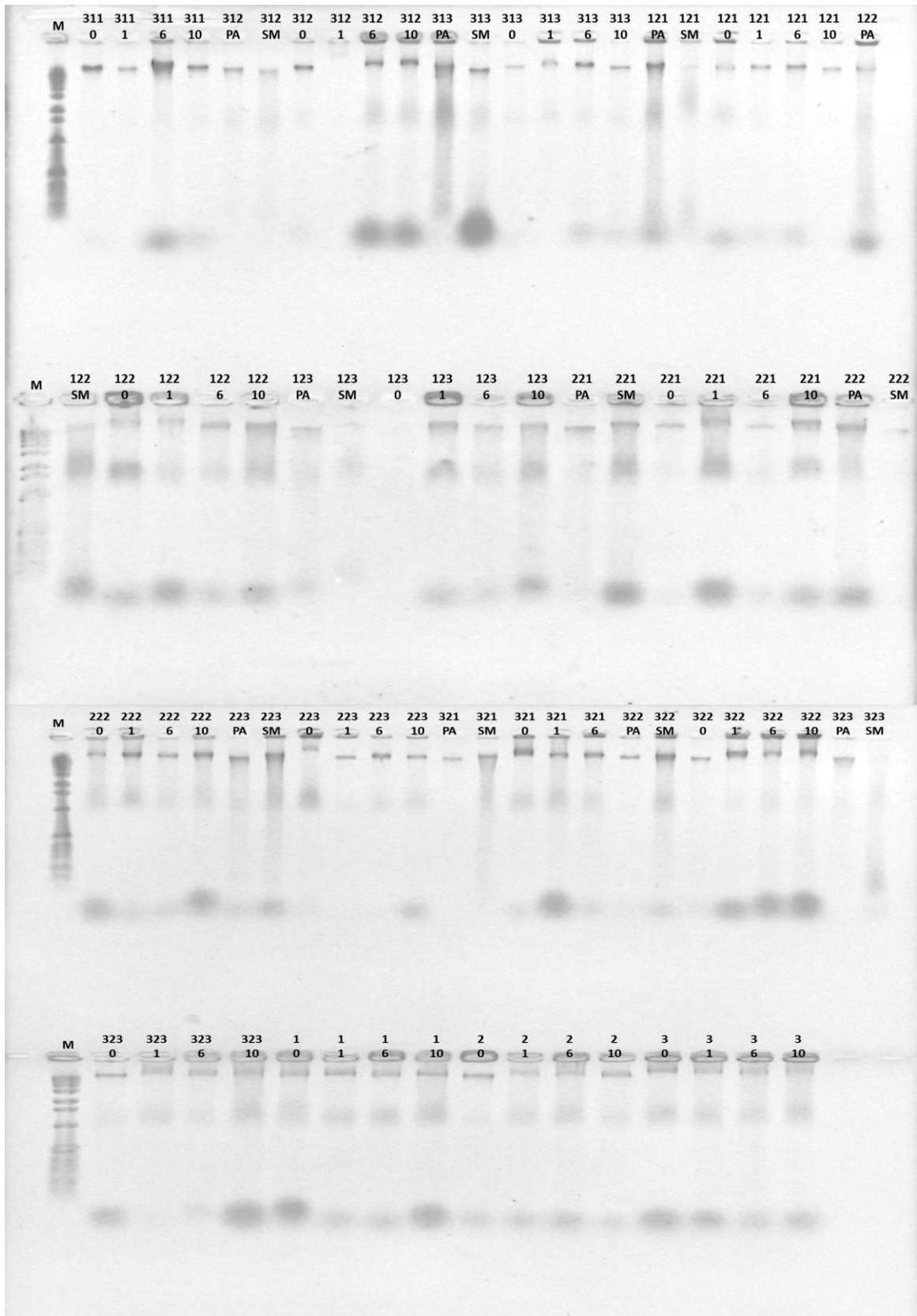


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose a 1% do DNA (1  $\mu$ g) de amostras de sementes e plântulas de feijão-caupi (tratamentos 311<sub>0</sub> ao controle 3<sub>10</sub>). M = marcador. Letras e algarismos subscritos: PA = plântulas anormais; SM = sementes mortas; 0 = sementes não embebidas; 1 = sementes embebidas durante 1 hora; 6 = sementes embebidas durante 6 horas; 10 = sementes embebidas durante 10 horas; Fonte: SANTOS, S. E. M.

Os controles de sementes de feijão-caupi não envelhecidas (não submetidos à avaliação quantitativa de integridade do DNA) exibiram para todas as cultivares, pequenos “arrastes” de degradação de DNA (figura 6). Isso, contudo, já foi verificado por Kranner et al., (2011) em DNA de sementes controle de ervilha *Pisum sativum*. Em conformidade com os referidos autores, pode-se afirmar que é normal a ocorrência desses pequenos indícios de degradação de DNA em sementes ortodoxas viáveis que experimentaram maturação seca, a qual inevitavelmente causa danos ao DNA advindos do processo de dissecação.

Os valores da análise quantitativa da integridade do DNA de cada tratamento foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Essa análise indicou a existência de diferenças significativas entre os valores de integridade do DNA dos respectivos tratamentos de E.A., considerando os valores obtidos para o teste F aos níveis de 1 e 5% de probabilidade (Tabela 9).

Ocorreram diferenças significativas na integridade do DNA de sementes e plântulas entre as três cultivares de feijão-caupi considerando a existência de diferentes cultivares, diferentes temperaturas, diferentes tempos de E.A. e diferentes materiais vegetais (sementes e plântulas). Observou-se também, sobre a integridade do DNA das sementes de feijão-caupi, o efeito da interação entre os fatores cultivar e temperatura de E.A., cultivar e tempo de E.A., cultivar e material vegetal, temperatura e tempo de E.A., temperatura e material vegetal, bem como tempo e material vegetal. Verificou-se também a ocorrência das seguintes interações triplas: entre os fatores cultivar, temperatura de E.A. e tempo de E.A.; entre cultivar, temperatura de E.A. e material vegetal; entre cultivar, tempo de E.A. e material vegetal. Verificou-se ainda a ocorrência da interação entre os quatro fatores componentes dos tratamentos: cultivar de feijão-caupi, temperatura de E.A., tempo de E.A. e material vegetal.

Verificou-se, pois, a presença de degradação de DNA entre os tratamentos envolvendo todas as três cultivares de feijão-caupi avaliadas. A degradação de DNA é evidenciada visualmente pelo aspecto das amostras submetidas à eletroforese em gel de agarose, as quais quando degradadas tendem a apresentar uma mancha ou “arraste” característicos (Figuras 5 e 6).

Tabela 9: Análise de variância (ANOVA) para os dados de integridade do DNA de feijão-caupi utilizando-se o D.I.C em esquema fatorial 3x2x3x6.

FV	GL	SQ	QM	F
Cultivar	2	32034,14	16017,07	50,17**
Temperatura	1	8802,08	8802,08	27,57**
Tempo	2	29256,36	14628,18	45,82**
Material vegetal	5	121956,02	24391,20	76,40**
Int. Cult.xTemper.	2	7265,62	3632,81	11,38**
Int. Cult.xTempo	4	14641,20	3660,30	11,46**
Int. CultxMaterial	10	16837,38	1683,74	5,27**
Int. Temper.xTempo	2	16831,60	8415,80	26,36**
Int. Temper.xMaterial	5	4045,14	809,03	2,53*
Int. TempoxMaterial	10	13156,83	1315,68	4,12**
Int. Cult.xTemper.xTempo	4	5798,61	1449,65	4,54**
Int. Cult.xTemper.xMaterial	10	14314,24	1431,42	4,48**
Int. Cult.xTempoxMaterial	20	15966,43	798,32	2,50**
Int. Temp.xTempoxMaterial	10	4644,10	464,41	1,45ns
I.Cult.xTemper.xTempoxMaterial	20	21267,36	1063,37	3,33**
Tratamentos	107	326817,13	3054,36	9,57**
Resíduo	324	103437,50	319,25	
Total	431	430254,63	CV = 39,99%	

FV = fonte de variação; Cult. e Temper = cultivar e temperatura; GL = graus de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrados médios; F = teste F; \*\* = significância ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \* = significância ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ); CV = coeficiente de variação.

Considerando as cultivares de feijão-caupi, independentemente das temperaturas, intervalos utilizados no E.A. ou material vegetal utilizado, a maior degradação média de DNA aparentemente teria sido exibida pela cultivar BR 17 Gurgueia, seguida pela BRS-Marataoã e a cultivar BRS-Guariba, com a menor degradação média de DNA entre seus tratamentos (Tabela 10, figura 7).

Curiosamente, as cultivares com maior e menor grau de degradação de DNA (BR 17 Gurgueia e BRS-Guariba, respectivamente) apresentariam os mesmos valores de vigor pelo T.G. (tabela 3), os quais seriam superiores ao vigor da cultivar BRS-Marataoã.

Tabela 10: Médias percentuais obtidas considerando o efeito dos fatores cultivar, temperatura e tempo de E.A separadamente sobre a intensidade do “arraste” de degradação do DNA de feijão-caupi.

	Médias das Cultivares	Médias das Temperaturas		Médias dos Tempos	
BR 17 Gurgueia	55,73 a	35°C	49,19 a	48 horas	33,33 b
BRS-Marataoã	43,58 b	45°C	40,16 b	72 horas	48,09 a
BRS-Guariba	34,72 c			96 horas	52,60 a

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

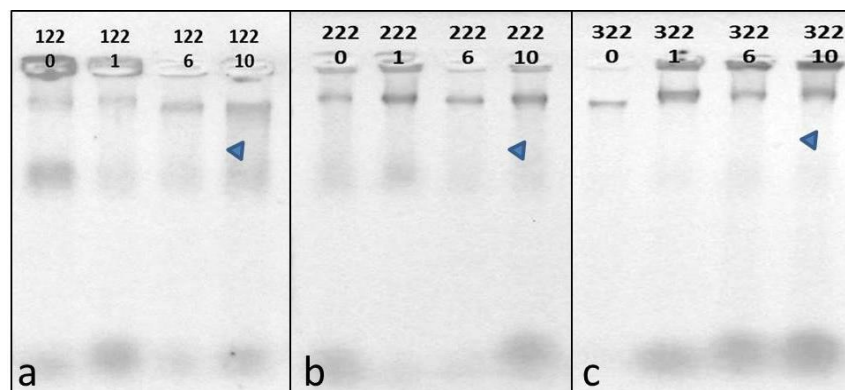


Figura 7: Géis de eletroforese de DNA de sementes de feijão-caupi submetidas ao E.A. a – tratamentos da cultivar BR 17 Gurgueia; b – tratamentos da cultivar BRS-Marataoã; c – tratamentos da cultivar BRS-Guariba. Setas indicam “arrastes” de DNA degradado; Fonte: SANTOS, S. E. M.

Sabe-se que a manutenção da informação genética contida no DNA é essencial à sobrevivência após a desidratação e durante a reidratação em sementes. A estabilidade do DNA durante a desidratação e a habilidade dos mecanismos de reparo por ocasião da reidratação é um aspecto importante exibido por sementes ortodoxas (FARIA et al., 2005). Apesar da existência de mecanismos de reparo, já foi verificado, em sementes envelhecidas, um acúmulo de danos em fitas simples e duplas de DNA. Ainda se verificou nessas sementes eventos

nucleolíticos, tais como a formação de DNA *laddering* e a degradação total de RNA ribossômico (rRNA) (KRANNER et al., 2011).

Do exposto e em face do melhor vigor exibido pela cultivar BR 17 Gurgueia no T.G, a despeito da maior degradação de DNA em relação às outras cultivares avaliadas, se poderia concluir que os mecanismos de reparo de DNA dessa cultivar teriam sido eficientes o bastante para permitir que sua viabilidade se equiparasse à da cultivar com menores danos ao material genético (BRS-Guariba) e fosse superior à viabilidade da outra cultivar que também exibiu menores danos ao seu DNA (BRS-Marataoã). Entretanto, como será visto adiante e em concordância com Kranner et al., (2011), no presente trabalho a provável ocorrência de degradação adicional do DNA do “arraste”, ocorrida em tratamentos das cultivares BRS-Marataoã e BRS Guariba subestima a análise de degradação de DNA baseada na intensidade do “arraste” de DNA degradado. Assim sendo, e frente ao melhor valor de vigor das cultivares BR 17 Gurgueia e BRS-Guariba, se pode considerar as mesmas como as que manifestaram percentuais de integridade equiparáveis e superiores aos da cultivar BRS-Marataoã no experimento como um todo.

Em relação ao efeito da temperatura de E.A. sobre a integridade do DNA (Tabela 10 – Figura 8), independentemente das cultivares, intervalos avaliados ou material vegetal utilizado, a análise do DNA aparentemente revelou menor degradação em sementes quando envelhecidas à temperatura de 45°C do que quando envelhecidas à temperatura de 35°C. Tal resultado seria paradoxal, em primeiro lugar porque o aumento da temperatura tende a potencializar os danos do E.A., em segundo lugar porque o vigor das sementes avaliado pelo T.G. diminuiu com o incremento da temperatura (Tabela 3). Como já foi mencionado com menos detalhes, é digno de nota que Kranner et al., (2011) também observaram aparente diminuição da degradação do DNA em sementes de ervilha *Pisum sativum* submetidas ao E.A. durante a embebição das mesmas. Todavia, frente aos baixos valores de vigor que refletiam danos irreversíveis ao DNA, os autores concluíram que a diminuição do DNA fragmentado de sementes envelhecidas no gel de eletroforese seria resultado de degradação adicional dos nucleossomos componentes dos fragmentos de DNA que poderia ser confundida com reversão de danos ou aumento de integridade.

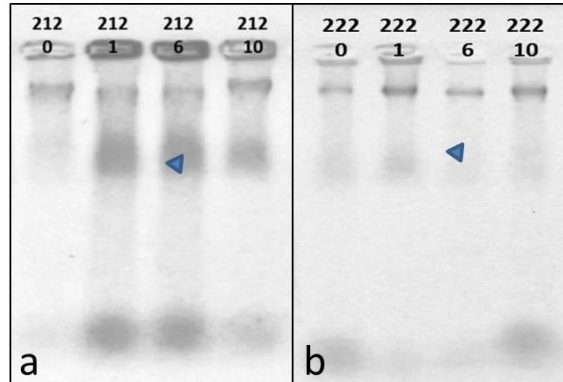


Figura 8: Géis de eletroforese de DNA de sementes de feijão-caupi submetidas ao E.A. a – tratamentos da cultivar BRS-Marataoã obtidos à temperatura de 35°C; b – tratamentos da cultivar BRS-Marataoã obtidos à temperatura de 45°C. Setas indicam “arrastes” de DNA degradado. Fonte: SANTOS, S. E. M.

Em conformidade com Kranner et al., (2011), conclui-se que a degradação adicional ocorrida e, portanto a diminuição do “arraste” de DNA fragmentado em tratamentos das cultivares BRS-Marataoã e BRS-Guariba obtidos à temperatura de 45°C (os quais serão discriminados adiante), poderia subestimar a análise da integridade do DNA, resultando em aparente diminuição dos danos do E.A. em sementes de feijão-caupi envelhecidas a 45°C. Tal conclusão é respaldada pelos resultados de vigor obtidos pelo T.G, que demonstram diminuição do mesmo com o incremento da temperatura no E.A. (Tabela 3) e, portanto agravamento dos danos celulares, incluindo os danos ao DNA, em sementes de feijão-caupi.

Em relação aos intervalos de tempo de E.A., independentemente das cultivares, temperaturas avaliadas ou materiais vegetais utilizados, observou-se uma diminuição da integridade do DNA proporcional ao tempo. Verificou-se, pois um aumento da degradação do DNA entre 48 e 72 horas de E.A., a qual se manteve constante após 96 horas de E.A. (Tabela 8 – figura 9). Tal aumento da degradação do DNA com o incremento do tempo de E.A. refletiu-se na queda de vigor das sementes de feijão-caupi (tabela 3).

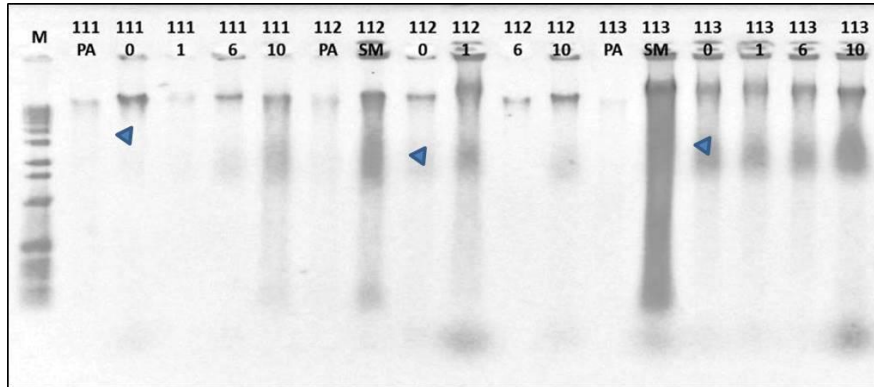


Figura 9: Gel de eletroforese de DNA de feijão-caupi da cultivar BR 17 Gurgueia submetidas ao E.A. à temperatura de 35°C. 111<sub>PA</sub> a 111<sub>10</sub> – tratamentos obtidos com 48 horas de E.A.; 112<sub>PA</sub> a 112<sub>10</sub> - tratamentos obtidos com 72 horas de E.A.; 113<sub>PA</sub> a 113<sub>10</sub> - tratamentos obtidos com 96 horas de E.A. Setas indicam “arrastes” de DNA degradado. Fonte: SANTOS, S. E. M.

Considerando o tipo de material do qual foi extraído o DNA (sementes, mortas, plântulas anormais, sementes envelhecidas não embebidas e sementes embebidas, por 1, 6 ou 10 horas), independentemente do tipo de cultivar, temperatura ou tempo de E.A., como esperado as sementes mortas foram as que apresentaram mais DNA degradado (evidenciado por manchas ou “arrastes” muito intensos), seguido pelas plântulas anormais e sementes envelhecidas, respectivamente (Tabela 11 - figura 10). Ainda não foi verificada diferença significativa na integridade do DNA (reparo), entre sementes não embebidas e sementes embebidas em quaisquer dos intervalos de embebição utilizados.

Tabela 11: Médias percentuais obtidas considerando o efeito da interação entre os fatores material vegetal utilizado na extração de DNA e temperatura de E.A. sobre a intensidade do “arraste” de degradação do DNA de feijão-caupi.

Plântulas anormais	Sementes mortas	Não embebidas	Embebidas 1 hora	Embebidas 6 horas	Embebidas 10 horas
71,88 b	84,38 a	39,58 c	46,88 c	34,38 c	57,29 c

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

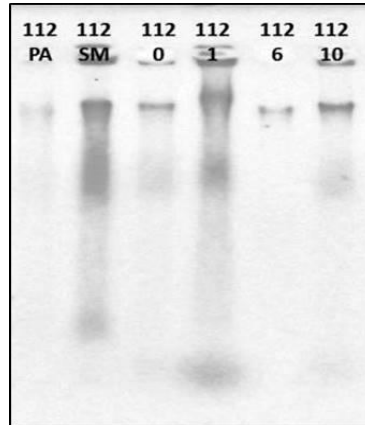


Figura 10: Gel de eletroforese de DNA de sementes e plântulas de feijão-caupi da cultivar BR 17 Gurgueia submetidas ao E.A. à temperatura de 35°C por 48 horas. Fonte: SANTOS, S. E. M.

Em relação à interação entre o tipo de cultivar de feijão-caupi e a temperatura de E.A., independentemente do tempo de E.A. ou do material vegetal utilizado na extração do DNA, verificou-se para as cultivares BRS-Marataoã e BRS-Guariba, dois níveis de degradação nas duas temperaturas de E.A. (Tabela 12). Para essas duas cultivares, conforme já discutido anteriormente, foi verificada diminuição do “arraste” de DNA degradado na temperatura de 45°C em relação à de 35°C, o que, recordando o proposto por Kranner et al., (2011), subestimaria a análise se não fosse levada em conta a queda dos valores de vigor, na medida em que a degradação adicional do “arraste” de DNA poderia ser confundida com reparo e portanto ganho em integridade de DNA com o aumento da temperatura.

Tabela 12: Médias percentuais obtidas considerando o efeito da interação entre os fatores cultivar e temperatura de E.A. sobre a intensidade do “arraste” de degradação do DNA de feijão-caupi.

	35°C	45°C
BR 17 Gurgueia	54,51 aA	56,94 aA
BRS-Marataoã	51,74 aA	35,42 bB
BRS-Guariba	41,32 bA	28,12 cB

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas classificam colunas; Letras maiúsculas classificam linhas.



A confirmação dessas evidências está, portanto refletida na diminuição de vigor, para as duas cultivares consideradas, quando à temperatura de 45°C (Tabela 4). Essa perda de vigor resultou da potencialização das condições de E.A. e consequente incremento dos danos celulares, incluindo os danos ao DNA. A diminuição do vigor para a cultivar BR 17 Gurgueia resultante do aumento da temperatura não foi refletida na intensidade do “arraste” de DNA degradado, que apresentou-se idêntico nas duas temperaturas de E.A.

Em relação à interação entre os fatores cultivar de feijão-caupi e tempo de E.A., destaca-se que as cultivares BR 17 Gurgueia e BRS-Guariba apresentaram, após 48 horas de E.A, a maior e a menor intensidade do “arraste” de DNA degradado respectivamente (Tabela 13). Isso se refletiu nos valores de vigor, pois as cultivares em questão apresentaram o maior e o menor valor de vigor, respectivamente.

Tabela 13: Médias percentuais obtidas considerando o efeito da interação entre os fatores temperatura e tempo de E.A. sobre a intensidade do “arraste” de degradação do DNA de feijão-caupi.

	48 horas	72 horas	96 horas
BR 17 Gurgueia	38,54 aC	54,17 bB	74,48 aA
BRS-Marataoã	32,81 abB	53,13 aA	44,79 bA
BRS-Guariba	28,65 bB	36,98 bAB	38,54 bA

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas classificam colunas; Letras maiúsculas classificam linhas.

Considerando a interação entre os fatores cultivar de feijão-caupi e material vegetal utilizado na extração de DNA (Tabela 14) verificou-se que as plântulas anormais da cultivar BR 17 Gurgueia exibiram “arraste” de degradação de DNA superior aos “arrastes” de degradação de DNA das plântulas anormais das cultivares BRS-Marataoã e BRS-Guariba, as quais apresentaram intensidades de “arraste” iguais entre si. Essa menor intensidade do “arraste” de degradação de DNA nas duas últimas cultivares citadas pode ser efeito do mecanismo de degradação nucleossômica adicional dos fragmentos de DNA verificada também nos tratamentos envolvendo sementes envelhecidas embebidas das duas cultivares em questão.

Tabela 14 Médias percentuais obtidas considerando o efeito da interação entre os fatores material vegetal utilizado na extração de DNA e temperatura de E.A. sobre a intensidade do “arraste” de degradação do DNA de feijão-caupi.

	Plântulas anormais	Sementes mortas	Não embebidas	Embebidas 1 hora	Embebidas 6 horas	Embebidas 10 horas
GUR	71,88aAB	84,38 aA	39,58 aD	46,88aCD	34,38 aD	57,29aBC
MAR	44,79 bB	70,83 bA	40,63aBC	27,08 bC	36,46aBC	41,67bBC
GUA	48,96 bB	77,08abA	19,79 bC	18,75 bC	25,00 aC	18,75 cC

GUR: BR 17 Gurgueia; MAR: BRS-Marataoã; GUA: BRS-Guariba. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas classificam colunas; Letras maiúsculas classificam linhas.

Considerando a interação entre os fatores temperatura e tempo de E.A., merece destaque o fato de o “arraste” de DNA degradado ter intensidade menor após 72 horas de E.A. a 45°C, quando comparados aos tratamentos obtidos após 72 horas à temperatura de 35°C (Tabela 15). Isso foi efeito da degradação adicional experimentada pelo DNA que é evidenciada pela diminuição do vigor após 72 e 96 horas de E.A a 45°C (Tabela 5), bem como pelos valores de vigor inferiores aos dos tratamentos obtidos com a temperatura de 35°C, onde não se verificou essa degradação adicional do DNA. Ressalta-se que a total perda de vigor das sementes dos tratamentos obtidos com 72 e 96 horas de E.A à temperatura de 45°C condiz com a degradação adicional de DNA e não ocorrência de ganho em integridade verificada nesses tratamentos, o que poderia ser subestimado em uma análise que se baseasse apenas na intensidade do “arraste” de DNA para se inferir danos ao material genético.

Tabela 15: Médias percentuais obtidas considerando o efeito da interação entre os fatores temperatura e tempo de E.A. sobre a intensidade do “arraste” de degradação do DNA de feijão-caupi.

	48 horas	72 horas	96 horas
35°C	29,17 bC	55,56 aB	62,85 aA
45°C	37,50 aA	40,63 bA	42,36 bA

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas classificam colunas; Letras maiúsculas classificam linhas.

Em relação à interação entre os fatores material vegetal utilizado na extração de DNA e temperatura de E.A. destaca-se que as sementes mortas obtidas nas duas temperaturas de E.A. apresentaram a mesma degradação de DNA (Tabela 16). Percebeu-se também que todos os tratamentos envolvendo sementes embebidas e plântulas anormais exibiram “arraste” de DNA degradado reduzido à temperatura de 45°C em relação à temperatura de 35°C, sendo, portanto os tratamentos responsáveis pela subestimação dos danos ao DNA considerando-se a temperatura de 45°C no experimento como um todo. Esses resultados também são coerentes com Kranner, et al., 2011, cuja redução dos indícios de degradação de DNA causada pela degradação adicional foi verificada em tratamentos envolvendo sementes de ervilha embebidas, mas não naqueles envolvendo sementes envelhecidas não embebidas. Assim sendo, a embebição marcaria o reinício da atividade metabólica nas células das sementes. Para sementes drasticamente danificadas pelo envelhecimento isso significa a intensificação de reações degradativas de macromoléculas, incluindo o DNA (KRANNER et al., 2011).

Tabela 16: Médias percentuais obtidas considerando o efeito da interação entre os fatores material vegetal utilizado na extração de DNA e temperatura de E.A. sobre a intensidade do “arraste” de degradação do DNA de feijão-caupi.

	Plântulas anormais	Sementes mortas	Não embebidas	Embebidas 1 hora	Embebidas 6 horas	Embebidas 10 horas
35°C	61,11 aB	75,69 aA	36,81 aC	36,11 aC	38,89 aC	46,53 aC
45°C	49,31 bB	79,17 aA	29,86 aC	25,69 bC	25,00 bC	31,94 bC

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas classificam colunas; Letras maiúsculas classificam linhas.

Considerando-se a interação entre os fatores tempo de E.A. e material vegetal utilizado na extração de DNA destaca-se que as sementes mortas exibiram os mesmos danos nos três tempos de E.A. (tabela 14). Já as sementes vivas, embebidas ou não apresentaram degradação do DNA incrementada após 72 horas de E.A., os quais se mantiveram no mesmo nível após 96 horas de E.A. Tais resultados refletem o papel preponderante do tempo de exposição às condições adversas do E.A. no incremento dos danos ao DNA em sementes.

Tabela 14: Médias percentuais obtidas considerando o efeito da interação entre os fatores tempo de E.A e material vegetal sobre a intergridade do DNA de feijão-caupi.

	Plântulas anormais	Sementes mortas	Não embebidas	Embebidas 1 hora	Embebidas 6 horas	Embebidas 10 horas
48 h	54,17abB	70,83 aA	16,67 bC	13,54 bC	16,67 bC	28,13 bC
72 h	45,83 bB	79,17 aA	40,63 aB	44,79 aB	36,46 aB	41,67 aB
96 h	65,63 aB	82,29 aA	42,71 aC	34,38 aC	42,71 aC	47,92 aC

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas classificam colunas; Letras maiúsculas classificam linhas.

No presente trabalho, se verificou uma influência considerável da integridade do DNA sobre a viabilidade e vigor de sementes de feijão-caupi das cultivares BR 17 Gurgueia, BRS-Marataoã e BRS-Guariba submetidas ao E.A. O incremento do tempo de E.A. e da temperatura refletiram-se em perda de viabilidade e vigor, bem como, subsequente degradação do DNA nas sementes consideradas. Por outro lado, a degradação observada no DNA das sementes de feijão-caupi envelhecidas, incluindo sementes mortas, bem como nas plântulas anormais, não apresentou o padrão de DNA *laddering*. Isso sugere que a degradação e morte nessas sementes de feijão-caupi ocorreram por outras vias, que não pelo processo de apoptose.

Segundo Murthy, Kumar e Sun, (2003), os processos bioquímicos não programados relacionados ao envelhecimento natural ou artificial e morte de sementes ortodoxas, bem como causadores de danos ao DNA consistem na peroxidação lipídica, glicosilação e reações de Maillard. A peroxidação lipídica envolve a oxidação não enzimática de polissacarídeos e ácidos oléicos poli-insaturados, bem como sua oxidação enzimática por lipoxigenases e  $\alpha$ -dioxigenases, resultando em hidroperóxidos lipídicos, ácidos oléicos oxigenados e ROS, os quais propagam essa reação em cadeia (KRANNER et al., 2010).

As reações de Maillard, são uma série de reações complexas em série que se iniciam com um simples ataque inicial e não enzimático de grupos amino de proteínas e complexos proteína/ácido nucléico por açúcares redutores e aldeídos (glicosilação) (MURTHY; KUMAR; SUN, 2003). Segundo os referidos autores a peroxidação lipídica e a hidrólise de açúcares (formação de açúcares redutores) estão acopladas às reações de Maillard durante o envelhecimento de sementes.

O ataque de grupos amino das bases do DNA por açúcares redutores formam adutos que inibem as funções da molécula de DNA. Com o passar do tempo

esses adutos sofrem rearranjo químico e podem marcar as ligações glicosídicas entre bases púricas e desoxirriboses, o que leva à depurinação,  $\beta$ - eliminação e quebra das fitas de DNA (BUCALA; MODEL; CERAMI, 1984). As consequências de repetidos e prolongados danos ao DNA oriundos de sua glicosilação não enzimática, explicam alterações verificadas em sua estrutura e função, o que resulta no decréscimo nos processos de reparo, replicação e transcrição, bem como o aumento de aberrações cromossômicas e quebras nas fitas de DNA com o transcorrer do processo de envelhecimento (LEE, 1987).

Conforme já mencionado, os danos ao DNA adquiridos por sementes ortodoxas durante o desenvolvimento e no armazenamento necessitam ser reparados durante a germinação (FARIA et al., 2005). A ocorrência de reparo durante a germinação é sustentada pela observação de comprometimento desse processo quando se inativa a enzima DNA ligase VI em *Arabidopsis*. A DNA ligase é responsável pelo reparo de quebras em fitas simples e duplas de DNA (RAJJOU et al., 2012). Ainda segundo os referidos autores, foi observada a regulação de um conjunto de enzimas envolvidas no reparo de danos oxidativos ao DNA (formamidopirimidina-DNA glicosilase e 8-oxoguanina) nos estágios iniciais da germinação em sementes de *Medicago truncatula*.

## 5 CONCLUSÕES

- As condições de temperatura, umidade e tempo empregadas no E.A. tiveram efeito direto sobre a integridade do DNA de sementes e plântulas anormais das cultivares de feijão-caupi avaliadas no presente trabalho. Tal efeito consistiu na degradação do mesmo e se refletiu em progressiva queda no vigor das sementes;
- Os efeitos do E.A. na integridade do DNA de sementes e plântulas anormais de feijão-caupi foram identificados através da presença de “arraste” de DNA degradado, o qual intensificou-se com o agravamento da degradação do DNA e impactou em diminuição do vigor das sementes de feijão-caupi. Ressalva-se, contudo, que alguns tratamentos (45°Cx72horas, 45°Cx96 horas) envolvendo sementes embebidas e plântulas anormais das cultivares BRS-Marataoã e BR 17 Guariba tenderam a apresentar degradação adicional do DNA do “arraste” a qual poderia ser erroneamente interpretada como integridade superior do DNA em relação aos tratamentos envolvendo os mesmos tempos e cultivares à temperatura de 35°C; Tal incremento da degradação do DNA nos tratamentos obtidos à temperatura de 45°C em relação aos obtidos à temperatura de 35°C é confirmado pela perda de vigor observada;
- O incremento do tempo e da temperatura no processo de E.A. de sementes de feijão-caupi refletiram-se em aumento proporcional da degradação do DNA das mesmas e conseqüente diminuição do vigor;
- Não se verificou o padrão “*laddering*” de degradação do DNA nos tratamentos de E.A. envolvendo sementes ou plântulas de feijão-caupi. Esse fato é indício de que os danos ao DNA e conseqüente deterioração e/ou morte de sementes e plântulas anormais de feijão-caupi ocorreram não por apoptose, mas por processos não programados relacionados ao envelhecimento de sementes como a peroxidação lipídica, reações de Maillard e glicosilação;
- A avaliação da integridade do DNA poderá se constituir em promissora ferramenta para investigação da qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi e sementes ortodoxas de outras espécies. Isso, pois a degradação do

mesmo consiste em um marcador preciso da qualidade fisiológica e vigor de sementes de feijão-caupi;

- As combinações 35°Cx48h, 35°Cx96h e 45°Cx48h empregadas no E.A. diferenciaram as cultivares avaliadas em dois níveis distintos de vigor. Nas combinações 35°Cx48h e 35°Cx96h as cultivares BR 17 Gurgueia e BRS-Guariba apresentaram vigor igual entre si, o qual foi superior ao vigor da cultivar BRS-Marataoã. Na combinação 45°Cx48h as cultivares BR 17 Gurgueia e BRS-Marataoã exibiram o mesmo vigor, o qual foi inferior ao vigor da cultivar BRS-Guariba.
- A combinação 35°Cx48h foi a melhor para se avaliar o vigor das cultivares de feijão-caupi pelo teste do E.A., porque revelou dois níveis distintos de vigor e os maiores valores de percentual de viabilidade.
- As cultivares BR 17 Gurgueia e BRS-Guariba exibiram melhor desempenho frente às condições adversas do E.A. no que diz respeito ao vigor. Quanto à integridade do DNA as cultivares BR 17 Gurgueia e BRS-Guariba também apresentaram os maiores valores e a cultivar BRS-Marataoã o menor. Isso, pois a degradação adicional ocorrida em tratamentos das cultivares BRS-Marataoã e BRS-Guariba que resultou em menor intensidade do “arraste” de DNA degradado subestimou a análise da integridade do DNA da cultivar BR 17 Gurgueia, colocando as sementes da mesma como as mais danificadas, a despeito de seu bom desempenho em vigor;
- Não foram verificados indícios da ocorrência de reparo do DNA das sementes envelhecidas de feijão-caupi nos intervalos de embebição de 1, 6 e 10 horas avaliados no trabalho em questão;
- O presente trabalho contribuirá com novos conhecimentos sobre o efeito do E.A. sobre a integridade do DNA de sementes de feijão-caupi e demais espécies que possuem sementes ortodoxas, bem como seus reflexos sobre o vigor das sementes.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE JUNIOR, A. S.; SANTOS, A. A.; SOBRINHOS, C. A.; BASTOS, E. A.; MELO, F. B.; VIANA, F. M. P.; FREIRE FILHO, F. R.; CARNEIRO, J. S.; ROCHA, M. M.; CARDOSO, M. J.; SILVA, P. H. S.; RIBEIRO, V. Q. **Cultivo de Feijão-Caupi**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, jan. de 2003.
- ASSUNÇÃO FILHO, J. R.; MEDEIROS, A. M.; DAMASCENO E SILVA, K. J.; ROCHA, M. M.; FREIRE FILHO, F. R. Divergência multicategórica entre acessos de feijão-caupi da sub-classe fradinho. In: II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2008, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.
- AVELING, T. A. S.; POWELL, A. A. Effect of seed storage and seed coat pigmentation on susceptibility of cowpeas to pre-emergence damping-off. **Seed Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 461-470, 2005.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. Ed. Jaboticabal : FUNEP, 247p.2006.
- BARBIERI, R. L. Conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais na Embrapa Clima Temperado. **Embrapa Clima Temperado. Documentos**, 2005.
- BIOVERSITY INTERNATIONAL. **History of Biodiversity**. 2012.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/ ACS, 399p., 2009.
- BUSTAMANTE, P. G.; FERREIRA, F. R. Accessibility and exchange of plant germplasm by Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 11, n. SPE, p. 95-98, 2011.
- CAIERÃO, E.; SCHEEREN, P. L.; SILVA, M. S.; CASTRO, R. L.; CARGNIN, A. Uso do germoplasma da Embrapa nos programas de melhoramento de trigo no Brasil. **Ciência Rural**, v. 44, n. 1, 2014.
- CARVALHO, L. R.; DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A.; CARVALHO, M. L. M. Classificação de sementes de espécies florestais dos gêneros *Nectandra* e *Ocotea* (Lauraceae) quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, 2008.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção**. 4ª Ed. Jaboticabal: FUNEP, 424p., 2000.
- CHIN, H. F.; QUEK, P.; SINNIH, U. R. Seed Banks for Future Generation. In: **Conservation of Tropical Plant Species**. Springer New York, p. 43-63, 2013.
- COMMISSION ON GENETIC RESOURCES FOR FOOD AND AGRICULTURE. **Biodiversity for a world without hunger**. Food Agriculture Organization, 2011.



COMMISSION ON GENETIC RESOURCES FOR FOOD AND AGRICULTURE. **Plant genetic resources: use them or lose them.** Food Agriculture Organization, 2010.

CORBINEAU, F. Markers of seed quality: from present to future. **Seed Science Research**, v. 22, n. S1, p. S61-S68, 2012.

DANON, A.; DELORME, V.; MAILHAC, N.; GALLOIS, P. Plant programmed cell death: a common way to die. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p.647-655, 2000.

DONÀ, M.; BALESTRAZZI, A.; MONDONI, A.; ROSSI, G.; VENTURA, L.; BUTTAFAVA, A.; MACOVEI, A.; SABATINI, M. E.; VALASSI, A.; CARBONERA, D. DNA profiling, telomere analysis and antioxidant properties as tools for monitoring ex situ seed longevity. **Annals of botany**, v. 111, n. 5, p. 987-998, 2013.

EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; MAZUY, C.; CORBINEAU, F.; BAILLY, C. DNA alteration and programmed cell death during ageing of sunflower seed. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 14, p. 5003-5011, 2011.

FARIA, J. M. R.; BUITINK, J.; LAMMEREN, A. M.; 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.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Brasília: Embrapa – Cenargen, 220p., 1998.

GARCIA, L. C.; NOGUEIRA, A. C.; ABREU, D. C. A. Influência do envelhecimento acelerado no vigor de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan – Mimosaceae. **Ciência Florestal**. Santa Maria, v.14, n.1, p.85-90, 2004.

GEPTS, P. Plant genetic resources conservation and utilization. **Crop Science**, v. 46, n. 5, p. 2278-2292, 2006.

GOGILE, A.; ANDARGIE, M.; MUTHUSWAMY, M. Screening Selected Genotypes of Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] for Salt Tolerance During Seedling Growth Stage. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 14, p. 671-679, 2013.

GOMES, M. P.; GARCIA, Q. S. Reactive oxygen species and seed germination. **Biologia**, v. 68, n. 3, p. 351-357, 2013.

GUISCHEM, J. M.; FARIAS, A. S.; FIGUEIREDO, R. T.; CHAVES, A. M. S.; FIGUEIREDO, B. T.; PEREIRA, C. F.; ARAÚJO, J. R. G.; MARTINS, M. R. Teste de frio e envelhecimento acelerado na avaliação de vigor de sementes de feijão-frade. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 182-191, 2010.

HAUSSMANN, B. I. G.; PARZIES, H. K.; PRESTERL, T.; SUSIC, Z.; MIEDANER, T. Plant genetic resources in crop improvement. **Plant Genetic Resources**, v. 2, p. 3-21, 2004.

KIBINZA, S.; BAZIN, J.; BAILLY, C.; FARRANT, J. M.; CORBINEAU, F.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant Science**, v. 181, n. 3, p. 309-315, 2011.

KRANNER, I.; CHEN, H.; PRITCHARD, H. W.; PEARCE, S. R.; BIRTIC, S. Inter-nucleosomal DNA fragmentation and loss of RNA integrity during seed ageing. **Plant growth regulation**, v. 63, n. 1, p. 63-72, 2011.

KRANNER, I.; MINIBAYEVA, F. V.; BECKETT, R. P.; SEAL, C. E. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, v. 188, n. 3, p. 655-673, 2010.

LEE, J. Enhanced seed viability and lipid compositional changes during natural ageing by suppressing phospholipase D $\alpha$  in soybean seed. **Plant biotechnology journal**, v. 10, n. 2, p. 164-173, 2012.

LESHEM, Y. Y.; KUIPER, P. J. C. Is there a gas (general adaptation syndrome) response to various types of environmental stress? **Biologia Plantarum**, v.38, p.1-18, 1996.

LOPES, M. A.; FALEIRO, F. G.; FERREIRA, M. E.; LOPES, D. B.; VIVIAN, R.; BOITEUX, L. S. Embrapa's contribution to the development of new plant varieties and their impact on Brazilian agriculture. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, n. SPE, p. 31-46, 2012.

MAIA, M. B. **Caracterização citogenética de feijão miúdo (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) e sua aplicação em programas de melhoramento genético e produção de sementes**. In: XVII Congresso de Iniciação Científica, X Encontro de Pós-Graduação, 2008, Pelotas. Departamento de Fitotecnia – Programa de Pós graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes. Pelotas: FAEM /UFPel, nov, 2008.

MELLO, S. C.; SPINOLA, M. C. M.; MINAMI, K. Métodos de avaliação da qualidade fisiológica de brócolos. **Scientia Agricola**. v.56, n.4, p.1151-1155, 1999.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Conservação *in situ*, *ex situ* e *on farm***. Brasília, 2012.

MOELLER, N. Identifying benefit flows: studies on the potential monetary and non-monetary benefits arising from the International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. **Identifying benefit flows: studies on the potential monetary and non-monetary benefits arising from the International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture**, 2013.

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

NASS, L. L.. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. **NASS, LL; VALOIS, ACC; MELO, IS de; VALADARES-INGLIS, MC (Ed.). Recursos**

**genéticos e melhoramento de plantas. Rondonópolis: Fundação MT, p. 30-55, 2001.**

NASS, L. L. Genetic resources: the basis for sustainable and competitive plant breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, n. SPE, p. 75-86, 2012.

NASS, L. L.; PATERNIANI, E. Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 3, p. 581-587, 2000.

NEVES JÚNIOR, E. S.; XAVIER, F. L. **Avaliação do desenvolvimento do feijão (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) cultivado em três texturas de solo na região de Imperatriz no estado do Maranhão.** Monografia (Curso de Ciências Biológicas). Instituto de Ensino Superior do Sul do Maranhão, 2011.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination—still a mystery. **Plant Science**, v. 179, n. 6, p. 574-581, 2010.

ODONG, T. L.; JANSEN, J.; EEUWIJK, F. A. V.; HINTUM, T. J. L. V. Quality of core collections for effective utilisation of genetic resources review, discussion and interpretation. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 2, p. 289-305, 2013.

OLIVEIRA, R. C. S. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em célula tumoral HepG2.** (Tese de Doutorado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP, 2012.

PATNAIK, A. R.; ACHARY, V. M. M.; PANDA, B. B. Comet assay to assess DNA damage and genotoxic stress in plants. In\_: ROY, B. K.; CHAUDHARY, R. **Plant Genome: Biodiversity, Conservation and Manipulation.** New Delhi: Narosa Publications, C.12 p.1-12, 2010.

PINTO, A. S. R.; FREITAS, G. A.; GONÇALVES, N. J. M.; RAMOS, H. F. F.; SILVA, I. T. Test germination of corn seeds in different environments. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 5, n. 3, p. 17-26, 2013.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente.** (2ed.) Brasília, 1985.

QUEIRÓZ, M. A. Apresentação. In\_: PEREIRA, T. N. S. **Germoplasma: conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas.** (22ed.) Viçosa: Editora Arka, 250p., p.13-16, 2010.

RAJJOU, L.; DEBEAUJON, I. Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **Comptes rendus biologiques**, v. 331, n. 10, p. 796-805, 2008.

RAJJOU, L.; DUVAL, M.; CATUSSE, J.; GALLARDO, K.; BALLY, J.; JOB, C.; JOB, D. Seed germination and vigor. **Annual review of plant biology**, v. 63, p. 507-533, 2012.

RAJJOU, L.; GALLARDO, K.; DEBEAUJON, I.; VANDEKERCKHOVE, J.; JOB, C.; JOB, D. The effect of  $\alpha$ -amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the

distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. **Plant Physiology**, v. 134, n. 4, p. 1598-1613, 2004.

RAO, V. R. Valuation of Plant Genetic Resources. **Indian Journal of Plant Genetic Resources**, v. 25, n. 1, p. 63-74, 2012.

SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 4, n. 20, p. 60-65, 2001.

SCHWEMBER, A. R.; BRADFORD, K. J. Oxygen interacts with priming, moisture content and temperature to affect the longevity of lettuce and onion seeds. **Seed Science Research**, v. 21, n. 03, p. 175-185, 2011.

SILVA, D. J. H.; MOURA, M. C. C. L.; CASALI, V. W. D. Recursos genéticos do banco de germoplasma de hortaliças da UFV: histórico e expedições de coleta. **Horticultura Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 108-114, 2001.

SILVA, J. B.; LAZARINI, E.; SÁ, M. E. Comportamento de sementes de cultivares de soja, submetidos a diferentes períodos de envelhecimento acelerado. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v.26, n.5, 2010.

TAN, H. TIE, M.; LUO, Q.; ZHU, Y.; LAI, J.; LI, H. A review of molecular markers applied in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) breeding J. **Life Science**, v. 6, p. 1190-1199, 2012.

TEÓFILO, E. M.; DUTRA, A. S. Envelhecimento acelerado para avaliar o vigor de sementes de feijão caupi. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.1, p.193-297, 2007.

THORMANN, I; GAISBERGER, H.; MATTEI, F.; SNOOK, L.; ARNAUD, E. Digitization and online availability of original collecting mission data to improve data quality and enhance the conservation and use of plant genetic resources. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, n. 5, p. 635-644, 2012.

TRATADO INTERNACIONAL SOBRE OS RECURSOS FITOGENÉTICOS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA (TIRFAA), 2002.

VALOIS, A. C. C. Conservação de Germoplasma Vegetal “ex situ”. In\_: PUIGNAU, J. P. **Conservación de germoplasma vegetal**. Diálogo IICA-Procisur, 4. Montevideo, 166p. p.7-10., 1996.

VUJAKOVIĆ, M.; BALESEVIC-TUBIC, S.; JOVICIC, D.; TASKI-AJDUKOVIC, K.; RETROVIC, D.; NIOLIC, Z.; DORDEVIC, V. Viability of soybean seed produced under different agro-meteorological conditions in Vojvodina. **Genetika**, v. 43, n. 3, p. 625-638, 2011.

WALTERS, C.; WHEELER, L. M.; GROTENHUIS, J. M. Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. **Seed Science Research**, v. 15, n. 1, p. 1-20, 2005.

WETZEL, M. M. V. S.; RAMOS, S. R. R.; PEREIRA NETO, L. G. Comportamento das sementes de feijão-caupi no armazenamento a longo prazo. In: Congresso

Nacional de Feijão-Caupi/ VI Região Nacional de Feijão-Caupi. Teresina, 2006.  
**Resumos.** Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2006.