



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CLARISSA ABREU SANTOS TELES

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E EVENTOS DO CICLO
CELULAR EM SEMENTES DE *Ricinus communis* L.
SOB RESTRIÇÃO HÍDRICA**

Salvador

2013

CLARISSA ABREU SANTOS TELES

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E EVENTOS DO CICLO
CELULAR EM SEMENTES DE *Ricinus communis* L.
SOB RESTRIÇÃO HÍDRICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof.^o Dr. Renato Delmondez de Castro

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Marta Bruno Loureiro

Salvador

2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,
SIBI - UFBA.

T269 Teles, Clarissa Abreu Santos

Aspectos fisiológicos e eventos do ciclo celular em sementes de *Ricinus communis* L. sob restrição hídrica / Clarissa Abreu Santos Teles. – Salvador, 2013.

96 f.

Orientador: Prof. Dr. Renato Delmondez de Castro

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª Marta Bruno Loureiro

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde, 2013.

1. Mamona. 2. Osmocondicionamento. 3. Tubulina. 4. Citoesqueleto. 5. DNA. I. Castro, Renato Delmondez de. II. Loureiro, Marta Bruno. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 576.32


CLARISSA ABREU SANTOS TELES

ASPECTOS FISIOLÓGICOS E EVENTOS DO CICLO CELULAR EM SEMENTES DE *Ricinus communis* L. SOB RESTRIÇÃO HÍDRICA

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 19 de agosto de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Renato Delmondez de Castro – Orientador 
Doutor em Fitotecnia (Fisiologia Molecular Vegetal) pela Wageningen University And Research Center,
WUR, Holanda.
Universidade Federal da Bahia

Edvaldo Aparecido Amaral da Silva 
Doutor em Fisiologia Vegetal pela Wageningen University And Research Center,
WUR, Holanda.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Cimille Gabrielle Cardoso Antunes 
Doutora em Botânica pela Universidade Estadual de Feira de Santana,
UEFS, Brasil.
Universidade Federal da Bahia

À minha querida família,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à minha família, meus pais, em especial a minha querida mãe Marionete Abreu por todo seu amor, minhas irmãs lindas Camila e Ivana por todo o amor, carinho e cumplicidade, assim como todos familiares que ao jeito de cada um sempre deram um grande apoio e incentivo.

Aos meus queridos amigos e amigas, os quais cada um sabe o quanto são importantes para mim.

A Rogério Tiers, por todo amor e carinho, companheirismo e atenção, e importante ajuda em todos os momentos que precisei.

Aos coordenadores do LBBB, Professora Dr.^a Luzimar Gonzaga Fernandez e meu orientador Professor Renato Delmondez de Castro, pelas oportunidades concedidas, e por sempre procurarem propiciar boas condições de trabalho, buscando sempre aprimorar o laboratório para boa execução dos projetos.

À minha co-orientadora Professora Dr.^a Marta Bruno Loureiro, por acompanhar meu trabalho, me incentivar, pelo carinho e um agradecimento especial por me apresentar à pesquisa.

Aos integrantes do LBBB, professores, pesquisadores pós-doutores, doutorandos, mestrandos e estudantes de iniciação científica, aos que passaram uma temporada ou ainda estão presentes no laboratório, mas que de alguma forma me ajudaram e contribuíram para aumentar o meu conhecimento, obrigada: Renato Delmondez, Luzimar Fernandez, Marta Bruno, Leomara França, Daniele Takahashi, Guilherme Lacerda, Mariane Schuck, Leandra Barroso, Hugo Pereira, Silvia Santos, Cinara Sousa, Mara Bittencourt, Aliomar Pacheco, Valdir Gomes, Daniela Amorim, Vanessa Teles, Geórgia Menezes, Larissa Brito, Águeda Lima, Tiago Sousa, Artur Cândia, Núbia Rocha, Ana Carolina Régis, Anderson Batista. E em especial aos meus amigos, Cristiane Brito, Paulo Teixeira, Ivana Virgens, Felipe Souza, Alexandre Marques, Cimille Antunes, Érica Patrícia pela sincera amizade. Cris e Paulo por me acompanharem e ajudarem em muitas etapas de meu trabalho, e Cris, você foi muito importante em todos os momentos e principalmente nesta etapa final,

agradeço também ao Arno Brichta que de alguma forma, sempre ajudou no que pôde. Felipe, com quem executamos parte do trabalho juntos e que sempre esteve disposto a me ajudar. Alexandre, um amigo também sempre disposto a me ajudar, e um obrigada especial por resgatar parte dos reagentes necessários ao meu trabalho em um momento de sufoco devido a um incêndio ocorrido no Instituto. E sem esquecer Artur Cândia que como estudante de iniciação científica sempre me acompanhou diretamente em muitas técnicas, de modo que fico feliz em ter lhe repassado o meu conhecimento.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (FIOCRUZ), à Plataforma de Microscopia Eletrônica, meu agradecimento à Dr.^a Lúcia Moreno, a qual é um prazer trabalhar em sua companhia, a Dr.^a Adriana e ao Dr. Cláudio, por toda paciência e por sempre nos receberem bem.

Ao Laboratório de Imunologia (ICS/UFBA), agradeço em especial a Geraldo Pedral por me ajudar a realizar os experimentos com citometria de fluxo, sem o qual não seria possível obter os resultados por esta técnica.

Aos professores Samira Abdalla e Milton Roque, sempre acessíveis quando precisei de alguma ajuda relacionada ao trabalho.

Aos colegas de mestrado e integrantes do LABEM (ICS/UFBA), Luiz Lázaro, Brena Mota e Aldinéia Damião, sempre dispostos a ajudar no que foi necessário.

À professora Josmara Fregoneze, coordenadora do Laboratório de Neurociências (ICS/UFBA) por nos ter permitido o uso da sala escura para revelação de filmes, e possibilitando-nos obter os resultados do western blotting, assim como ao funcionário “Seu” Zé!

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

À CAPES pela bolsa concedida.

À PETROBRÁS pelo suporte financeiro e à FAPUR (Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica da UFRJ) pela gestão dos recursos financeiros.

“A persistência é o menor caminho do êxito”

Charles Chaplin

TELES, Clarissa Abreu Santos. Aspectos fisiológicos e eventos do ciclo celular em sementes de *Ricinus communis* L. sob restrição hídrica. 96 f. il.2013. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

Resumo

A espécie *Ricinus communis* L. conhecida como mamona, apresenta grande importância econômica e vem se destacando no cenário das plantas oleaginosas utilizadas para produção de biodiesel e na indústria ricinoquímica, sendo uma cultura promissora para a região semiárida do Brasil. Visando conhecer o comportamento das sementes de mamona em condições normais de germinação e sob restrição hídrica, objetivou-se com este trabalho avaliar os aspectos fisiológicos de germinação, resposta ao osmocondicionamento, verificar um tratamento para qualidade fisiológica e sanitária das sementes e caracterizar os eventos do ciclo celular através de técnicas biotecnológicas. Os ensaios fisiológicos foram realizados com sementes de mamona da cultivar EBDA MPA 11. Para simular a restrição hídrica foram utilizadas soluções de PEG 8000 nos potenciais osmóticos -0,2 MPa a -0,4 MPa e para o osmocondicionamento foram testadas soluções de PEG 8000 nos potenciais osmóticos -0,3 MPa a -0,9 MPa. Sementes secas embebidas em água (0,0 MPa) foram utilizadas como controle. Para qualidade fitossanitária, foram testados tratamentos com hipoclorito de sódio e fungicidas. Para análise do ciclo celular, foram testadas as técnicas de Western blotting para verificar o acúmulo da proteína tubulina, Imunocitoquímica para visualizar configurações do citoesqueleto microtubular e Citometria de fluxo para verificar a síntese de DNA. O tratamento com hipoclorito de sódio foi o mais eficaz para desinfestação superficial das sementes, melhorando a qualidade sanitária. As sementes de mamona restringiram completamente a germinação a partir do potencial -0,4 MPa e não apresentaram o efeito de *priming* em resposta ao osmocondicionamento. Os resultados do ciclo celular demonstraram que o acúmulo de tubulina foi proporcional ao aumento do conteúdo de DNA 4C nos núcleos das células e com a organização do citoesqueleto microtubular durante o período de embebição em água. Houve uma inibição deste processo durante a restrição hídrica, inibindo também a reativação do ciclo celular, entretanto houve uma progressão maior do processo em resposta ao tratamento de osmocondicionamento. As divisões celulares na zona meristemática das radículas das sementes de mamona ocorreram antes da protrusão radicular, indicando que o alongamento da radícula acontece por expansão e divisões celulares.

Palavras-chave: mamona, osmocondicionamento, tubulina, citoesqueleto microtubular, DNA.

TELES, Clarissa Abreu Santos. Physiological aspects and cell cycle events in *Ricinus communis* L. seeds under water restriction. 96 f. il.2013. Master Dissertation – Institute of Health Science, Federal University of Bahia, Salvador, 2013.

ABSTRACT

Ricinus communis L., known as castor beans, has an economic importance due its oil several possibilities for commercial use. It is an oilseed used in chemical industry and for biofuel production, where became a promising culture for semiarid region of Brazil. Aiming to know its seeds behavior under normal conditions of germination and drought stress, the objective of the present study was evaluate the physiological aspects of germination, responses to osmopriming, verify a treatment for physiological and sanitary quality of seeds and characterize the events of cell cycle by using biotechnologic techniques. Physiological tests were conducted using castor beans seeds of EBDA MPA 11 cultivar. To simulate water restriction on the seeds were used PEG 8000 solutions at -0.2 MPa to -1.4 MPa and to perform osmopriming experiment, PEG 8000 solutions from -0,3 MPa to -0,9 MPa were tested. Dry seeds imbibition in water were used as control (0,0 MPa). For physiological and sanitary quality treatments, sodium hypochlorite and fungicides were tested. Cell cycle analyses were done by Western blotting to verify the accumulation of the tubulin protein, Immunocytochemistry to view microtubular cytoskeleton configuration and flow cytometry to verify DNA synthesis. The treatment with sodium hypochlorite was the most effective for surface disinfection of seeds, improving sanitary quality. The castor beans seeds showed total restriction to water from -0,4MPa. None of the seeds have responded to osmopriming treatment. The results of the cell cycle showed that tubulin accumulation increased as higher was the 4C DNA content in the nuclei cell and with the microtubular cytoskeleton organization during imbibition period in water. It was detected inhibition of this process during water restriction, which inhibits the reactivation of cell cycle and occurs greater progression in the process in response to treatment of osmopriming. The cell divisions in radicle of meristem axis of castor bean seeds had occurred before radicle protrusion, which indicates that the radicle elongation happens by cell expansion and cell division.

Keywords: castor bean, osmopriming, tubulin, microtubule cytoskeleton, DNA

Lista de Ilustrações

Figura 1	Mamona (<i>Ricinus communis</i> L.).....	22
Figura 2	Semente de mamona (<i>Ricinus communis</i> L.).....	23
Figura 3	Curva de embebição de sementes	27
Figura 4	Curva de embebição de sementes osmocondicionadas.....	31
Figura 5	Diagrama das configurações do citoesqueleto microtubular nos estádios de interfase e mitose do ciclo celular.....	32
Figura 6	Tratamentos para desinfestação de sementes de mamona.....	38
Figura 7	Diagrama metodológico para o osmocondicionamento de sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 a -0,3, -0,6 e -0,9 MPa e subsequente reembebição de sementes osmocondicionadas secas e frescas em água e sob condições de restrição hídrica a -0,3, -0,6 e -0,9 MPa.....	42
Figura 8	Quadro representando os períodos de coleta de radículas embrionárias para cada tratamento.....	43
Figura 9	Coleta de amostras de radículas embrionárias para estudo citológico	44
Figura 10	Esquema ilustrativo da eletrotransferência de proteínas do gel de acrilamida para membrana de PVDF.....	47
Figura 11	Esquema ilustrativo da metodologia de citometria de fluxo.....	50
Figura 12	Curva de embebição das sementes de mamona cv. EBDA MPA 11.....	55
Figura 13	Germinação das sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 submetidas a diferentes tratamentos para desinfestação.....	57

Figura 14	Incidência de fungos em sementes de mamona.....	60
Figura 15	Germinação das sementes de mamona em água (0,0 MPa, controle) após osmocondicionamento por 168h em diferentes potenciais osmóticos (-0,2 a -1,4 MPa).....	61
Figura 16	Germinação (%) das sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 durante osmocondicionamento a -0,3 MPa, durante subsequente reembebição em água e durante subsequente reembebição sob restrição hídrica a -0,3, -0,6 e -0,9 MPa.....	65
Figura 17	Germinação (%) das sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 durante osmocondicionamento a -0,6 MPa, durante subsequente reembebição em água e durante subsequente reembebição sob restrição hídrica a -0,3, -0,6 e -0,9 MPa.....	67
Figura 18	Germinação (%) das sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 durante osmocondicionamento a -0,9 MPa, durante subsequente reembebição em água e durante subsequente reembebição sob restrição hídrica a -0,3, -0,6 e -0,9 MPa.....	69
Figura 19	Acúmulo de β -tubulina em radículas embrionárias durante a embebição e germinação de sementes de mamona cv. EBDA MPA 11.....	73
Figura 20	Conteúdo de DNA nuclear em diferentes fases da interfase no ciclo celular em radículas embrionárias durante a embebição e germinação de sementes de mamona cv. EBDA MPA 11.....	75
Figura 21	Conteúdo de DNA nuclear em interfase no ciclo celular.....	76
Figura 22	Fotomicrografias de fluorescência representativas das configurações e reorganização do citoesqueleto microtubular em radículas embrionárias durante a embebição e germinação de sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 em água.....	80

- Figura 23** Fotomicrografias de fluorescência representativas das configurações e reorganização do citoesqueleto microtubular em radículas embrionárias durante o osmocondicionamento de sementes de mamona cv. EBDA MPA 11..... 81
- Figura 24** Fotomicrografias de fluorescência representativas das configurações e reorganização do citoesqueleto microtubular em radículas embrionárias de mamona cv. EBDA MPA 11 durante a reidratação em água após osmocondicionamento..... 82

Lista de tabelas

Tabela 1	Biometria das sementes de mamona da cv. EBDA MPA 11.....	53
Tabela 2	Germinabilidade das sementes de mamona submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação.....	58
Tabela 3	Germinabilidade das sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 durante reumbebição em água após osmocondicionamento por 168 horas em diferentes potenciais osmóticos.....	62
Tabela 4	Germinabilidade das sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 durante osmocondicionamento a -0,3 MPa, durante subsequente reumbebição em água e durante subsequente reumbebição sob restrição hídrica a -0,3, -0,6 e -0,9 MPa.....	66
Tabela 5	Germinabilidade das sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 durante osmocondicionamento a -0,6 MPa, durante subsequente reumbebição em água e durante subsequente reumbebição sob restrição hídrica a -0,3, -0,6 e -0,9 MPa.....	68
Tabela 6	Germinabilidade das sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 durante osmocondicionamento a -0,9 MPa, durante subsequente reumbebição em água e durante subsequente reumbebição sob restrição hídrica a -0,3, -0,6 e -0,9 MPa.....	70

Lista de abreviaturas e Siglas

APS	Persulfato de amônio
BSA	Albumina sérica bovina
BSAc	Albumina sérica bovina acetilada
BMM	Butil-metilmetacrilato
cm ²	Centímetro quadrado
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CV	Coefficiente de variância
cv.	Cultivar
°C	Graus celsius
DTT	Ditiotreitol
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EBDA	Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
et al.	Expressão latina que significa “e outros” ou “e colaboradores”
F	Fresca
Fig.	Figura
G	germinadas
g	Gramas
G1	Fase I do ciclo celular
G2	Fase II do ciclo celular
h	Hora
IVG	Índice de velocidade de germinação

Kg	Quilograma
KCL	Cloreto de potássio
KDa	Quilodalton
KNO ₃	Nitrato de potássio
M	Molar
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado
MPa	megapascal
MPA 11	Mamona Porte Alto
MSB	Microtubule stabilizing buffer
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Polietilenoglicol
PFA	Paraformaldeído
PNPD	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
PVDF	Difluoreto de polivinilidina
RNase	Ribonuclease

Se	Seca
S	Fase de síntese
SDS	Dodecil sulfato de sódio
T _m	Tempo médio de germinação
TEMED	Tetrametilenodiamina
T ₅₀	Tempo em horas para alcançar 50% de germinação
U ₈₄₁₆	Uniformidade de germinação medindo-se o intervalo de tempo em horas entre 84% e 16% de germinação de sementes
V _m	Velocidade média de germinação
V	Voltagem
ZnSO ₄	Sulfato de zinco
μl	Microlitros
μm	Micrômetros
μg	Microgramas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1. A ESPÉCIE <i>Ricinus communis</i> L.....	21
2.2. GERMINAÇÃO DE SEMENTES: ASPECTOS FISIOLÓGICOS.....	25
2.3. ESTRESSE ABIÓTICO.....	28
2.4. OSMOCONDICIONAMENTO.....	29
2.5. ASPECTOS DO CICLO CELULAR EM PLANTAS.....	31
2.6. QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA DE SEMENTES.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO E CONDUÇÃO DOS ENSAIOS.....	35
3.2. CARACTERIZAÇÃO INICIAL DAS SEMENTES DE MAMONA.....	36
3.2.1. Biometria das sementes.....	36
3.2.2. Peso de 1000 sementes.....	36
3.2.3. Teor de água.....	36
3.2.4. Teste de germinação.....	37
3.3. AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA.....	37
3.3.1. Tratamento para desinfestação de sementes de mamona.....	37
3.3.2. Desinfestação das sementes.....	39
3.3.3. Curva de embebição em sementes de mamona.....	40
3.3.4. Screening osmótico e osmocondicionamento.....	40

3.3.5. Osmocondicionamento e tolerância ao déficit hídrico.....	41
3.4. AVALIAÇÃO CITOLÓGICA.....	43
3.4.1. Coleta das amostras.....	43
3.4.2. Extração de proteínas totais.....	44
3.4.2.2. Determinação da concentração protéica.....	45
3.4.2.3. Eletroforese.....	46
3.4.2.4. Eletrotransferência.....	46
3.4.2.5. Imunodeteção de tubulina.....	47
3.4.3. Citometria de Fluxo.....	47
3.4.4. Análise imunocitoquímica em radículas de sementes de mamona.....	50
3.4.4.1. Emblocamento das amostras para imunodeteção de tubulina.....	50
3.4.4.2. Cortes histológicos.....	51
3.4.4.3. Imunodeteção de tubulina (microtúbulos e citoesqueleto).....	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1. CARACTERIZAÇÃO INICIAL DAS SEMENTES DE MAMONA.....	53
4.2. CURVA DE EMBEBIÇÃO EM SEMENTES DE MAMONA	54
4.3. TRATAMENTO PARA DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES DE MAMONA..	56
4.4. SCREENING OSMÓTICO E OSMOCONDICIONAMENTO.....	60
4.5. OSMOCONDICIONAMENTO E TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO.....	64
4.6. IMUNODETECÇÃO DE β -TUBULINA EM SEMENTES DE MAMONA.....	72
4.7. CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR EM RADÍCULAS DE SEMENTES DE MAMONA.....	75
4.8. ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA DO CITOESQUELETO MICROTUBULAR EM SEMENTES DE MAMONA.....	

5. CONCLUSÕES..... 85

REFERÊNCIAS..... 86

1. INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma espécie que se destaca no cenário nacional e internacional devido à qualidade do óleo extraído de suas sementes, o único na natureza que é solúvel em álcool e que apresenta 90% de ácido graxo ricinoléico em sua composição química e que constitui a base da indústria ricinoquímica (BELTRÃO e OLIVEIRA, 2011; PINHO e SUAREZ, 2013). Ademais, a mamoneira tem se destacado como matéria-prima para a produção de óleo como opção promissora para produção de biocombustível, do que também resulta a torta como coproduto que pode ser utilizado como rico fertilizante, com capacidade de restaurar solos esgotados, além de outros coprodutos e aplicações (BELTRÃO, 2002; SCHMIDT et al., 2008).

A mamoneira é uma cultura com uma série de vantagens agronômicas, desde a ampla faixa de adaptação a diversas condições climáticas, a fácil manejo, tolerância à seca e baixos custos de produção. Estas são vantagens que ao longo dos anos favoreceu o cultivo predominante no semiárido nordestino, contribuindo para a inclusão social de pequenos agricultores na cadeia produtiva, a fixação da mão-de-obra familiar no campo, possibilitando a geração de renda em áreas subdesenvolvidas do meio rural no semiárido, e o fortalecimento da economia local (BELTRÃO et al., 2003; EMBRAPA, 2013). Devido a estes fatores e à crescente demanda por biocombustíveis, criou-se grande perspectiva para a expansão do seu cultivo em escala comercial no semiárido brasileiro, de modo a fortalecer o desenvolvimento socioeconômico regional por meio da agricultura familiar, sendo eleita a principal espécie e matéria-prima do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel no Brasil (BELTRÃO et al., 2005, MME, 2013).

No cenário das espécies oleaginosas utilizadas para a produção de biodiesel, a mamona se destaca principalmente como cultura bem adaptada e domesticada pelo agricultor familiar nordestino, assim como por apresentar precocidade na produção e alto teor de óleo em suas sementes, entre 45% e 50% (BELTRÃO e OLIVEIRA, 2011).

Para aumentar a produtividade é importante haver melhorias no sistema de produção da mamoneira, como controle eficaz das plantas daninhas, otimização da

adubação mineral e orgânica, utilização de sementes de variedades adequadas as diferentes condições edafoclimáticas, uso de espaçamentos e densidades adequados para cada cultivar e um controle de pragas eficiente (CARVALHO, 2005).

Para o estabelecimento das plantas, inicialmente ocorre a germinação das sementes. Nonogaki e Bradford (2007) consideram a germinação como o período em que a radícula do embrião emerge primeiramente, e em seguida os outros órgãos e tecidos. Neste período, alguns processos únicos são associados à germinação, tais como a mobilização de reservas armazenadas.

As plantas são expostas a vários fatores abióticos durante o seu crescimento e desenvolvimento, a depender das condições climáticas tais fatores podem se constituir em estresses abióticos, sendo os principais deles, temperaturas extremas, déficit hídrico ou alta salinidade (JISHA et al., 2013). Em resposta a estes fatores de estresse, muitos genes são regulados positivamente, ocasionando um ajuste do meio celular e tornando as plantas mais tolerantes a tais condições (MAHAJAN e TUTEJA, 2005).

Há várias décadas os melhoristas e tecnólogos de sementes buscam o desenvolvimento de variedades e técnicas para a melhoria da qualidade de sementes de espécies cultivadas, visando aumentar a produtividade e uniformidade dos lotes. Neste contexto, uma técnica utilizada para a melhoria da qualidade e vigor de sementes é o *Priming*. Esta técnica consiste num meio de condicionamento fisiológico em que ocorre uma pré-hidratação das sementes, podendo conduzir a um aprimoramento da tolerância ao estresse (CHEN e ARORA, 2012).

As sementes constituem-se em importantes e eficientes veículos de disseminação de patógenos, podendo afetar a qualidade fisiológica e sanitária das sementes, sendo importante a busca por tratamentos fitossanitários afim de diminuir tais problemas de contaminação (FANAN, 2008).

O avanço de abordagens modernas na pesquisa de células, incluindo genômica, proteômica, genética molecular, e tecnologias novas está na modificação do ponto de vista sobre a forma, função e regulação do citoesqueleto em plantas (WASTENEYS e YANG, 2004). Os microtúbulos do citoesqueleto em plantas

desempenham um papel vital no crescimento e desenvolvimento (GARDINER et al., 2012).

De acordo Barrôco et al. (2005) a germinação das sementes é um modelo excelente para o estudo do ciclo celular em plantas, pois a embebição das sementes consiste na retomada da progressão do ciclo celular nas células meristemáticas representando um controle importante no desenvolvimento inicial das plântulas.

Visando conhecer o comportamento das sementes de mamona em condições normais de germinação e sob restrição hídrica, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar os aspectos fisiológicos de germinação, matéria seca e úmida, vigor, e resposta ao osmondicionamento, verificar um tratamento para qualidade fitossanitária das sementes e caracterizar os eventos do ciclo celular através de técnicas biotecnológicas, como western blotting para avaliar o acúmulo de tubulina, Imunocitoquímica, para visualizar configurações do citoesqueleto microtubular e citometria de fluxo para verificar a síntese de DNA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A ESPÉCIE *Ricinus communis* L.

Ricinus communis L. é uma planta oleaginosa, conhecida popularmente como rícino, carrapateira, palma-de-cristo, mamoneira, bafureira e figueira-do-inferno, pertencendo à família Euphorbiaceae. Essa planta ocorre espontaneamente e de forma selvagem em várias regiões do Brasil, chegando a ser confundida como uma espécie nativa. Algumas pesquisas apontam que a mamona originou-se no continente africano (Etiópia), enquanto outras mencionam que esta espécie pode ser originária da Ásia (Crescente Fértil). Contudo, o maior número de evidências encontradas sugerem a sua origem para o continente africano, região de clima tropical, possibilitando que a mesma tenha se adaptado bem no Brasil, sendo introduzida no País com a colonização portuguesa (SINGH, 1986; ALONSO, 1998; SCHMIDT et al., 2008; KIIHL, 2006; BELTRÃO e OLIVEIRA, 2011). O gênero

Ricinus é monoespecífico e a espécie *Ricinus communis* é subdividida em quatro subespécies: *persicus*, *chinensis*, *africanus* e *zanzibarinus* (SINGH, 1986).

Figura 1: Mamona (*Ricinus communis* L.)



Fonte: A autora. A) Planta adulta; B) Inflorescência da mamona; C) Frutos amadurecendo; D) detalhe do fruto trilocular; E, F e G) Sementes de diferentes cultivares da mamona.

A mamoneira é considerada perene pelo fato de viver mais de 12 anos e de atingir até 10 m de altura. Sua diversidade morfológica traduz-se em plantas de porte baixo e porte alto, apresentando grande variabilidade genética quanto aos caracteres morfológicos, tais como o hábito de crescimento, cor do caule e das folhas, conteúdo de óleo, frutos com espinhos ou inermes, deiscentes ou indeiscentes, ciclo anual ou semiperene e estatura baixa ou arbórea, a depender do ambiente (BELTRÃO e OLIVEIRA, 2011; NÓBREGA, 2008; AZEVEDO et al., 1997) (Figura 1).

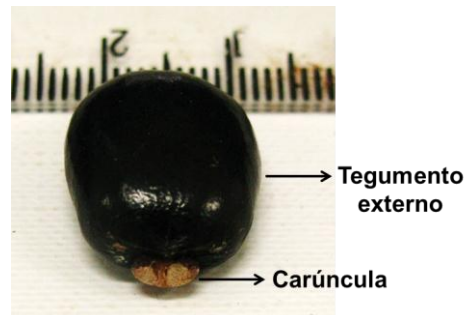
O ciclo da espécie é anual e casualmente bianual. As cultivares anuais apresentam ciclo médio de 150 dias, e as precoces, de 120 a 130 dias, sendo estas

mais adequadas a colheita mecânica por apresentarem homogeneidade na maturação. Já as cultivares de ciclo longo (180-210 dias) são mais ajustadas às regiões tropicais, e apresentam maior tolerância a estresses bióticos e abióticos, sendo, portanto mais recomendadas para produtores que utilizam baixa tecnologia (AZEVEDO e LIMA, 2007).

A mamoneira apresenta diferentes cultivares (Figura 1 E, F, G). Cultivar é o termo utilizado para uma variedade de qualquer espécie vegetal que se distingue devido à introdução ou alteração de uma característica fenotípica da planta, através de métodos de melhoramento convencionais, como reprodução sexual, seleção, hibridação, etc. (GARCIA, 2004).

As sementes de mamona apresentam uma estrutura denominada de carúncula, que é uma porção carnosa situada no hilo de algumas sementes, podendo ser considerada também um tipo mais firme de arilo (GONÇALVES e LORENZI, 2007). A carúncula consiste na proliferação de células do tegumento externo que se forma em torno da micrópila (Figura 2).

Figura 2: Semente de mamona (*Ricinus communis* L.)



Fonte: A autora. Detalhe da semente de mamona, mostrando a carúncula e o tegumento externo.

A mamona é uma das principais oleaginosas cultivadas em regiões semiáridas e áridas, como a Índia, China e Rússia, e é referida por ser uma espécie tolerante à seca (BABITA et al., 2010). Por sua tolerância à seca e exigência em calor e luminosidade, esta espécie encontra-se disseminada por todo o nordeste brasileiro, constituindo-se em grande potencial para a economia do Semiárido, como um fator

fixador de mão-de-obra, gerador de empregos e de matéria-prima, importantes para o progresso da região e do país (TÁVORA, 1988; AMORIM NETO et al., 2001; NETO et al., 2004;).

Alguns estudos relatam que a mamona é utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças associadas ao aparelho digestivo e como vermífugo (ALMEIDA e ALBUQUERQUE, 2002; RITTER et al., 2002; MONTELES e PINHEIRO, 2007). Todavia, muitos autores destacam a toxicidade de suas sementes, sendo registrados alguns casos de intoxicação letal em humanos (WEDIN et al., 1986; FERNANDO e FERNANDO, 1990; JASPEREN-SCHIB et al., 1996; SCHENKEL et al., 2000; RITTER et al., 2002;).

A toxicidade nas sementes de mamona ocorre devido à presença da ricina, que é uma glicoproteína composta por duas cadeias de polipetídeos, sendo considerada como um dos venenos naturais mais tóxicos. A semente de mamona apresenta um teor de ricina que varia de 1% a 5% (COOPMAN et al., 2009; DEMANT et al., 2012).

A mamona apresenta como principal produto o óleo que é extraído de suas sementes, sendo composto quase exclusivamente (90%) por um único ácido graxo, o ácido ricinoléico, que lhe confere importantes características como solubilidade em álcool a baixas temperaturas, viscosidade e propriedades físicas especiais (EMBRAPA, 2013).

Atualmente o governo brasileiro vem apresentando incentivos tecnológicos para melhoria da produção da espécie (SAVY-FILHO, 1999; SCHMIDT et al., 2008). A partir da industrialização da mamona, se obtém como produto principal o óleo e como subproduto, a torta. O óleo apresenta características singulares, possibilitando um variado leque de aplicações desde a indústria de tintas, lubrificantes para maquinarias em geral, passando pela indústria de cosméticos, de drogas farmacêuticas, bem como a fabricação de corantes, anilinas, desinfetantes, germicidas, colas e aderentes, base para fungicidas e inseticidas, além de nylon, matéria plástica e biocombustíveis. Já a torta, é utilizada como fertilizante e possui a capacidade de restaurar solos esgotados (BANZATTO et al., 1976; ROBBERS et al., 1997; SCHMIDT et al., 2008).

No período de 1980 a 2002, a Índia, China e Brasil eram os três principais países produtores, em área e produção de mamona em baga, tendo em 2001 sido responsáveis por 89% da área produtiva e 94% da produção mundial. Hoje os maiores produtores de matéria prima (sementes) são a Índia, a China, o Paquistão, a Tailândia e o Brasil encontra-se em 5º lugar. Já os três maiores produtores mundiais de óleo de mamona são a Índia, a China e o Brasil como segundo maior exportador mundial. Em 2001, estes países contribuíram com 92% da produção mundial, sendo os três maiores importadores a França, os Estados Unidos e a China (BIODIESEL, 2013).

Por possuir diferentes cultivares com características de adaptabilidade e produtividade distintas, a espécie pode ser cultivada em diferentes regiões do país, apresentando, portanto, uma ampla faixa de plantio, fácil manejo, resistência a seca e baixos custos de produção. O PNPD (Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel) é um programa interministerial do Governo Federal, criado em 2004, que objetiva a implementação de forma sustentável, tanto técnica, como econômica, da produção e uso do biodiesel, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional, via geração de emprego e renda (MDA, 2012).

Portanto, a mamona torna-se uma opção promissora e altamente viável para a obtenção de matéria prima a ser empregada na produção de biocombustíveis.

2.2. GERMINAÇÃO DE SEMENTES: ASPECTOS FISIOLÓGICOS

Na abordagem de tecnologia das sementes, a germinação é o fenômeno pelo qual, sob condições apropriadas, o eixo embrionário prossegue o seu desenvolvimento, que tinha sido interrompido, nas sementes ortodoxas, por ocasião da maturidade fisiológica (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

De acordo com Raven et al. (2001), o crescimento do embrião é geralmente retardado enquanto a semente amadurece e é disseminada, e o reinício do crescimento ou germinação da semente depende de fatores externos e internos, sendo que os fatores externos mais importantes são: a água, o oxigênio e a

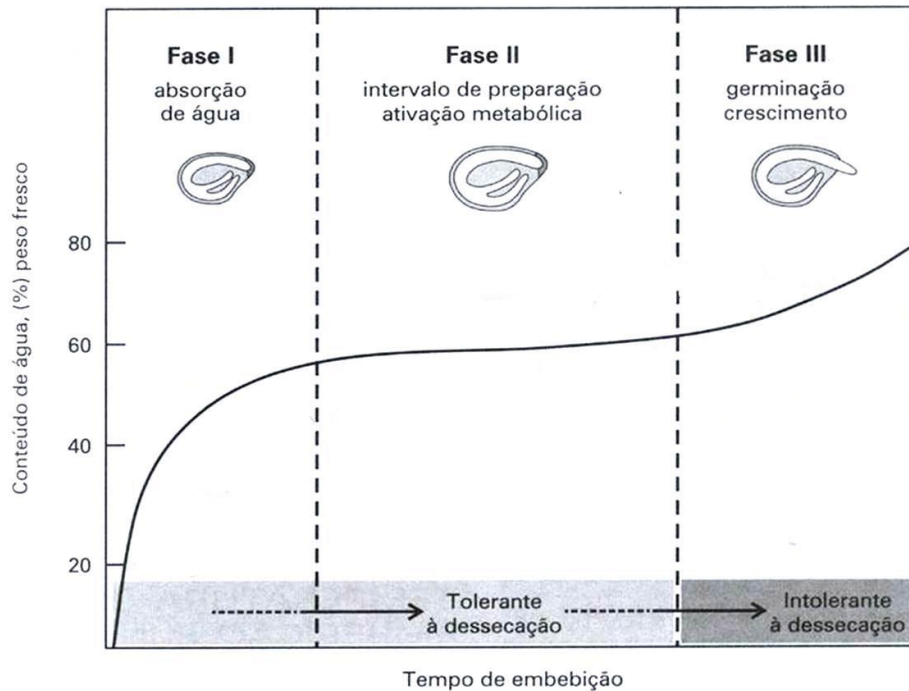
temperatura. Segundo Ferreira e Borghetti (2004) as sementes germinam quando as condições para o crescimento são favoráveis e elas não apresentam nenhum tipo de dormência, exigindo para a germinação a água e determinada faixa de temperatura.

O início da multiplicação celular, o que leva à protrusão da raiz primária, e posteriormente das estruturas da parte aérea, seria parte do processo de crescimento, igual ao que se verifica em um outro órgão qualquer e, portanto, diferente do processo de germinação (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

Segundo Bradford e Nonogaki (2007) primeiramente as sementes embebem água para ativar os processos metabólicos. Essa captação inicial de água é um processo físico impulsionado pelo potencial matricial dos constituintes da semente, que ocorre tanto em sementes vivas como mortas, pois consiste apenas na ligação da água à matriz da semente, contanto que o material apresente sítios de ligação ou afinidade pela água. Na maioria dos casos, as sementes viáveis mostram um padrão de absorção trifásico, caracterizado por uma curva de embebição, dividida em três fases (DE CASTRO e HILHORST, 2004; BRADFORD e NONOGAKI, 2007).

Durante a embebição, a fase I se caracteriza fisiologicamente por um acentuado aumento na intensidade respiratória. Isto resulta na produção de grandes quantidades de energia, que em grande parte será utilizada em uma série de reações bioquímicas, na qual ocorre a degradação de substâncias, como carboidratos, proteínas e lipídios, os quais deverão nutrir o embrião até este adquirir um sistema radicular capaz de retirar do solo os nutrientes que a planta necessita. Na fase II, as substâncias desdobradas na fase anterior, são transportadas do tecido de reserva para o tecido meristemático e a semente praticamente para de absorver água. À medida que o tempo passa o conteúdo de água e a intensidade respiratória da semente cresce de maneira muito lenta. Durante a fase III da curva, a semente volta a absorver água e a respirar intensamente e ocorre o crescimento visível do eixo embrionário (BEWLEY e BLACK, 1994; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000) (Figura 3).

Figura 3: Curva de embebição de sementes.



Fonte: De Castro e Hilhorst, 2004, modificado.

Alguns fatores influenciam a quantidade de água que é absorvida pela semente, como por exemplo, as diferenças entre as espécies, cultivares, fatores ambientais, além de características da própria semente como composição química, teor de água inicial e constituição do tegumento (ZUCHI et al., 2012). O tempo de duração de cada fase durante a embebição varia conforme propriedades inerentes da semente, tais como o nível de hidratação do substrato, permeabilidade do tegumento, tamanho da semente e absorção de oxigênio (PINHO et al., 2004).

A germinação das sementes é regulada por vários fatores ambientais, como por exemplo, a umidade, oxigênio, temperatura, luz e nutrientes (SEO et al., 2009), sendo avaliada por alguns parâmetros que informam sobre a dinâmica do processo germinativo, como por exemplo, a germinabilidade, tempo de germinação, coeficiente de uniformidade de germinação, velocidade da germinação (RANAL e SANTANA, 2006). Outros parâmetros utilizados para interpretar o desempenho da germinação são o tempo em horas para atingir 50% de germinação (T_{50}), percentagem máxima de germinação (G_{max}), uniformidade de germinação e intervalo de tempo em horas, como por exemplo, intervalo entre 84% e 16% de

sementes viáveis para germinar (U_{8416}), Intervalo de tempo entre 80% e 20% de sementes para germinar (U_{8020}), intervalo de tempo entre 75% e 25% de sementes viáveis para germinar (U_{7525}) (JOOSEN et al, 2010).

2.3. ESTRESSE ABIÓTICO

Do ponto de vista fisiológico, estresse é um fator externo que exerce uma influência desvantajosa sobre a planta, alterando seu equilíbrio. Nesse sentido, o conceito de estresse é atribuído àquela condição que ativa o metabolismo celular e incrementa a atividade fisiológica da planta, podendo também ser um fator positivo que impulsiona o crescimento vegetal ou uma condição desfavorável, que afeta negativamente o metabolismo, crescimento e desenvolvimento da planta (NILSEN e ORCUTT, 1996; TAIZ e ZEIGER, 2006).

Em condições naturais e agricultáveis as plantas estão frequentemente expostas a condições ambientais adversas, sendo portanto submetidas a algum tipo de estresse. Condições como déficit hídrico, alta salinidade, temperaturas extremas, submersão em água, etc, são consideradas estresses abióticos e podem afetar negativamente o crescimento e a produtividade (TAIZ e ZEIGER, 2006; JISHA et al, 2013).

O estresse hídrico pode surgir como resultado de duas condições contrastantes devido ao excesso ou déficit de água, sendo a última uma situação mais comum (MAHAJAN e TUTEJA, 2005). A indisponibilidade de água é um dos principais fatores ambientais que influenciam a germinação e o desenvolvimento de plântulas. Em tais condições as relações hídricas em sementes e o subsequente desenvolvimento de plântulas são diretamente afetados, influenciando todas as demais etapas do metabolismo, incluindo (re)ativação do ciclo celular e crescimento (ROCHA, 1996; DE CASTRO et al., 2000). Conseqüentemente ocorrem também alterações no perfil de expressão de genes em resposta ao estresse hídrico por 'seca' (VERSLUES et al., 2006).

A tolerância ao estresse osmótico e iônico induzido pela restrição de água e excesso de sais constitui processos complexos e geralmente interligados, envolvendo a interação de várias propriedades (ZHU, 2002; FOOLAD, 2004; VERSLUES et al., 2006). Sob o ponto de vista molecular, a transdução de sinais dos estresses por seca e por sais consiste em cadeias de sinais vinculadas as homeostases iônica e osmótica, cadeias de resposta a detoxificação (controle de danos e reparos), e cadeias de regulação do crescimento, com efeito, sobre a ativação do ciclo celular e crescimento (ZHU, 2002).

O déficit hídrico afeta em grau variado, vários estádios de desenvolvimento das plantas, podendo comprometer seu crescimento e reduzir o seu rendimento, induzindo a modificações morfológicas, fisiológicas e metabólicas em todos os órgãos. Em ambientes naturais essas alterações são graduais, influenciando primariamente os processos mais sensíveis e levando a alterações metabólicas que comprometem o desenvolvimento da planta. Desta forma, para garantir sua sobrevivência, as plantas necessitam manifestar respostas rápidas para evitar e tolerar a desidratação e maximizar a eficiência do uso de água. A eficiência desse sistema complexo de defesa pode determinar o sucesso da espécie em ambientes estressantes (MULLET e WHITSITT, 1996; TARDIEU, 1996; BELTRÃO e OLIVEIRA, 2011).

O crescimento celular é considerado o processo mais sensível à baixa disponibilidade de água no solo, nestas condições a divisão e expansão celular são diretamente inibidas (KRAMER e BOYER, 1995; ZHU, 2002). Sendo assim, os componentes do estresse hídrico resultam em desequilíbrio da célula e desequilíbrio osmótico, afetando todos os aspectos da fisiologia das plantas, assim como o metabolismo celular (MAHAJAN e TUTEJA, 2005).

2.4. OSMOCONDICIONAMENTO

O condicionamento de sementes, denominado "*Priming*", é um pré-tratamento que consiste na embebição parcial das sementes utilizando várias estratégias, como

hidrocondicionamento, osmocondicionamento, condicionamento químico, condicionamento hormonal, condicionamento biológico, condicionamento de matriz sólida, dentre outros (CHEN e ARORA, 2012; JISHA et al., 2013).

A característica comum entre as técnicas de osmocondicionamento é que todas envolvem a absorção controlada de água. Os processos metabólicos associados ao *priming* são diferentes no que diz respeito a sua dinâmica quando comparados aos que ocorrem durante a germinação, onde a absorção de água não é controlada (VARIER et al., 2010).

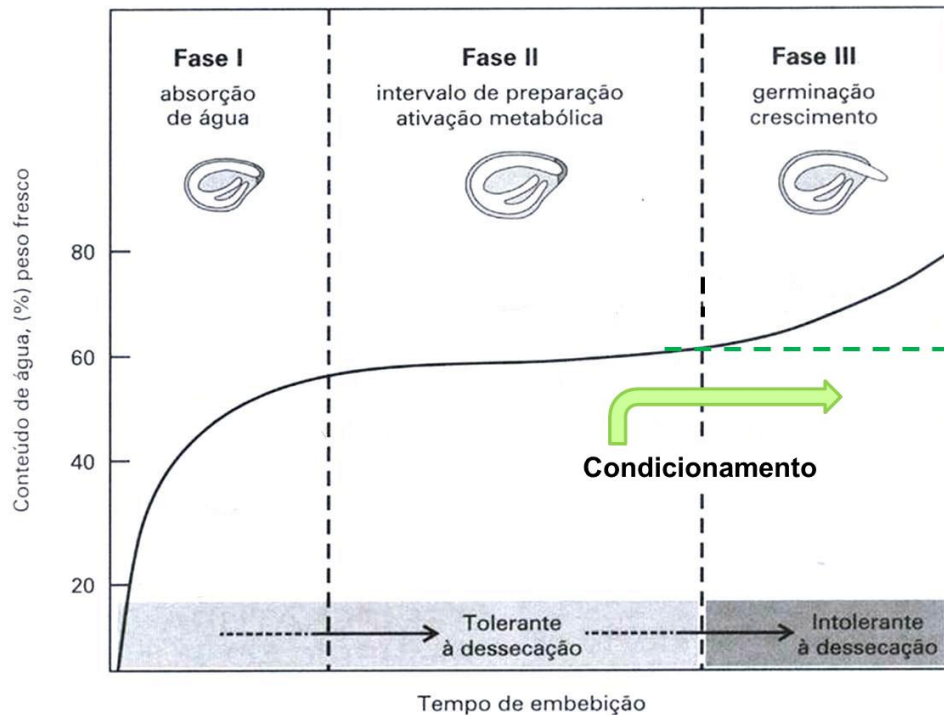
As plantas desenvolvidas a partir de sementes condicionadas apresentam uma defesa celular resistente e rápida resposta contra estresses abióticos (JISHA et al., 2013). Esta característica pode ser comprovada através da ativação de rápidas respostas de defesa à microrganismos, insetos ou estresses abióticos (CONRATH, 2012). O condicionamento melhora também a uniformidade e porcentagem de germinação final, o vigor e crescimento de plântulas, como resultado da pré-exposição a condições de estresse (VARIER et al., 2010; JISHA et al., 2013).

O osmocondicionamento expõe as sementes a um potencial hídrico externo restringindo a taxa e extensão de embebição e gerando uma progressão gradual de várias metabólicas pré-germinativas (JISHA et al., 2013). É um bom modelo para estudar a transição de sementes secas e fisiologicamente quiescentes para uma atividades semente hidratada em estado fisiológico ativo (CHEN e ARORA, 2012).

As fases I e II da curva de embebição são fundamentais para o sucesso do condicionamento de sementes (Figura 4). É nessa etapa que a semente atinge um teor de água em que falta apenas a protrusão da radícula. O padrão de absorção de água durante o condicionamento é semelhante ao da germinação, mas a taxa de absorção é lenta e controlada (VARIER et al., 2010).

Algumas substâncias podem ser utilizadas para a redução do potencial hídrico durante a embebição de sementes, no entanto, o Polietilenoglicol (PEG) tem sido um dos agentes químicos mais utilizados para esta função, pois possui natureza não tóxica e grande tamanho molecular que reduz o potencial da água sem penetrar nas sementes (THOMAS et al., 2000).

Figura 4: Curva de embebição de sementes osmocondicionadas.



Fonte: De Castro e Hilhorst, 2004, modificado. As sementes submetidas a algum pré-tratamento de condicionamento (osmocondicionamento) se mantêm na fase II conforme a linha tracejada contínua, enquanto as sementes embebidas diretamente em água completam o padrão de embebição de água, entrando na fase III, realizando a protrusão da radícula.

2.5. ASPECTOS DO CICLO CELULAR EM PLANTAS

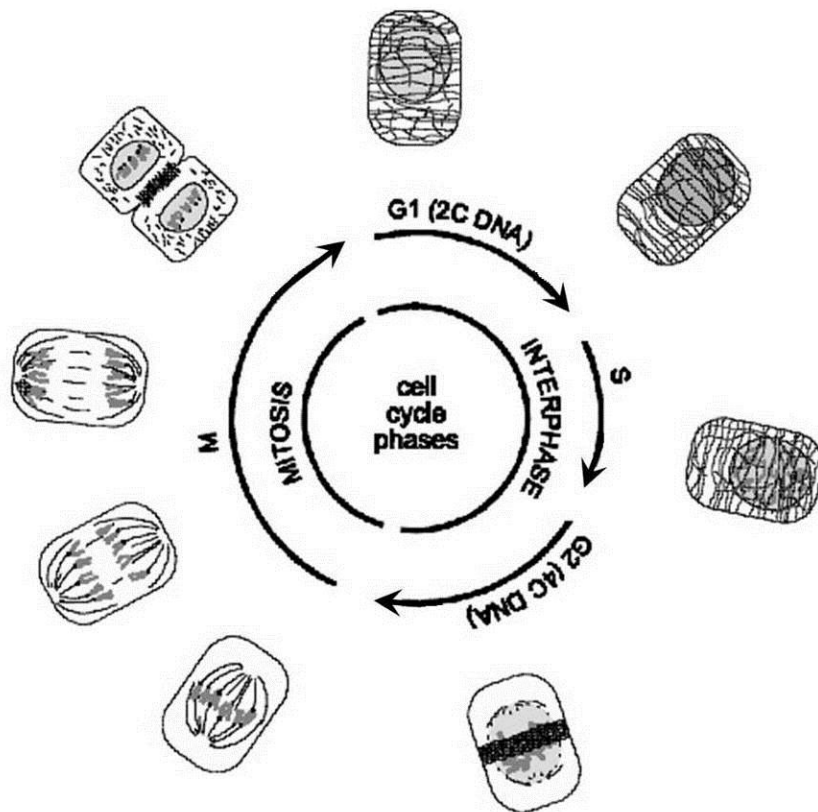
O ciclo celular compreende o período de interfase e mitose. A interfase é caracterizada por uma acentuada atividade celular, sendo dividida em três fases, G1, S e G2. A fase G1 é o período de intensa atividade bioquímica, sendo caracterizada pelo crescimento e replicação das organelas citoplasmáticas. A fase S é o período de síntese do DNA e de diversas proteínas associadas a esta molécula. A fase G2 é o período em que são formadas as estruturas diretamente envolvidas com a mitose, como as fibras do fuso (RAVEN et al., 2001).

A mitose é o processo pelo qual os cromossomos previamente replicados são alinhados, separados e distribuídos ordenadamente nas células-filhas. Os microtúbulos apresentam importante função neste processo, pois constituem as configurações do fuso mitótico durante as fases da mitose (prófase, pró-metáfase, metáfase, anáfase e telófase) e da citocinese (TAIZ e ZEIGER, 2006) (Figura 5).

Sendo assim, o ciclo celular consiste em uma série de acontecimentos periódicos coordenados, ocorrendo entre o final de divisões celulares subsequentes, pelo qual o material celular é duplicado e dividido entre as células-filhas (BARROCO et al., 2005).

A replicação do DNA é iniciada após a transição das fases G1/S, e após a duplicação do material genético as estruturas mecânicas permitem a separação dos cromossomos, começando com a reorganização do citoesqueleto na fase G2 (DEWITE e MURRAY, 2003).

Figura 5: Diagrama das configurações do citoesqueleto microtubular nos estádios de interfase e mitose do ciclo celular.



Fonte: De castro e Hilhorst, 2000.

A iniciação do ciclo celular envolve não apenas a síntese de DNA, mas também a regeneração do citoesqueleto microtubular (DE CASTRO e HILHORST, 2004).

Nas células vegetais o citosol está organizado em uma rede tridimensional de proteínas filamentosas, o citoesqueleto. Este é formado também por microtúbulos, que são compostos por polímeros da proteína tubulina. O polipeptídeo β -tubulina em conjunto com a cadeia de α -tubulina é o principal constituinte dos microtúbulos, estruturas intracelulares essenciais envolvidas em mecanismos fundamentais como a divisão celular, transporte vesicular, deposição de parede celular, propagação de sinal, dentre outros (BARDINI et al, 2004; TAIZ e ZEIGER, 2009). Os microtúbulos também apresentam um papel importante nos processos de expansão celular, assim como em orientar os cromossomos na posição correta durante as fases de crescimento G1 e G2 ou durante a subsequente mitose (DE CASTRO e HILHORST, 2004).

No início da mitose em células vegetais, as matrizes de microtúbulos corticais da intérfase se arranjam formando a banda pré-prófase, já no final do processo os microtúbulos se reorganizam novamente para formar o fragmoplasto. Esta estrutura sinaliza a localização da formação da parede celular das células-filhas (DEWITE e MURRAY, 2003). A ocorrência de algumas matrizes como a banda pré-prófase e fragmoplasto podem ser considerados como exclusivos marcadores para o processo da mitose, contudo a visualização de microtúbulos corticais permite a rápida identificação de células em alongamento (BARROCO et al., 2005).

Em órgãos extensíveis de plantas, como a raiz e o hipocótilo, os microtúbulos formam hélices abaixo da membrana plasmática, que regulam a deposição de celulose na parede celular e, portanto a direção da expansão das células em alongamento (GARDINER et al., 2012). De acordo Varier et al (2010), a emergência da radícula envolve a expansão de células e é facilitada por um aumento da pressão de turgescência na semente hidratada, enquanto que a divisão celular ativa só começa depois da protrusão da radícula. Conforme De Castro e Hilhorst (2004), em sementes de algumas espécies como tomate, ocorrem divisões celulares na radícula embrionária antes da protrusão radicular, contudo em outras espécies, a germinação parece independender da ocorrência de mitose.

Segundo Vázquez-Ramos e Sánchez (2003), a germinação das sementes é um excelente modelo para o estudo do ciclo celular em plantas, pois a embebição reativa o ciclo celular em células meristemáticas na preparação para o estabelecimento de plântulas.

A germinação das sementes implica na retomada da progressão do ciclo celular após um período de quiescência. A entrada na fase G1 e a transição da fase G1 para S pode representar um controle importante no desenvolvimento inicial da plântula (BARROCO et al., 2005).

Técnicas como Western blotting e Imunocitoquímica podem ser empregadas como ferramentas para estudar a proteína tubulina através do acúmulo da proteína e da localização e organização do citoesqueleto microtubular (HASEZAWA e KUMAGAI, 2002; DE CASTRO et al., 2000). Através da citometria de fluxo é possível estimar o conteúdo de DNA em diferentes estágios de replicação nos núcleos de diferentes tecidos da planta, sendo possível acompanhar as alterações do estado fisiológico de uma semente (SLIWINSKA et al., 2009).

As respostas das células ao estresse incluem mudanças no ciclo celular e divisões celulares, mudanças no sistema de endomembranas e vacuolização, bem como alterações na arquitetura da parede celular, o que contribui para acentuar a tolerância das células ao estresse (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Contudo, para os estudos em condição de estresse, ainda é necessário uma porção significativa de conhecimento para que se possa entender as relações entre eventos do ciclo celular e contribuição destes para o desenvolvimento e germinação de sementes, e subsequente estabelecimento de plântula (FARIA et al., 2005).

2.6. QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA EM SEMENTES

A qualidade fisiológica de uma semente está relacionada à capacidade de uma semente originar em condições favoráveis, uma planta saudável e vigorosa, enquanto que a qualidade sanitária representa a ausência de patógenos, como por exemplo, fungos, bactérias e vírus, que podem influenciar negativamente a

emergência e o estabelecimento da plântula, assim como ocasionar em doenças epidemiológicas em plantas de diversas culturas (TROPALDI et al., 2010).

Alguns estudos tem sido realizados, no intuito de desenvolver um conjunto de conhecimentos que permitam a obtenção de maior produção, qualidade fisiológica e sanitária e conservação das sementes de mamona (FANAN, 2008).

Muitas sementes, de variadas culturas, apresentam o problema de contaminação por patógenos, e o tratamento com fungicidas tornou-se uma medida indispensável, contudo a eficácia de muitos produtos ainda não é bem conhecida para algumas culturas (TROPALDI et al., 2010).

A cultura de mamona ainda não apresenta produtos químicos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para o tratamento de doenças, o que dificulta a recomendação e aplicação de forma segura e eficaz no controle de doenças (KOBORI, 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico e condução dos ensaios

Como material biológico foram utilizadas sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) da cultivar EBDA MPA 11, provenientes da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA), recebidas em novembro de 2010 e outubro de 2011.

Após o recebimento das sementes, estas foram beneficiadas manualmente e armazenadas em geladeira a 4°C em sacos de papel permeável, até o início dos procedimentos experimentais em laboratório.

Os ensaios fisiológicos foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (LBBB) ICS/UFBA. Já os ensaios citológicos foram conduzidos na Plataforma de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz, no Laboratório de Bioquímica,

Biotecnologia e Bioprodutos (ICS/UFBA), e no Laboratório de Imunologia (LABIMUNO – anexo 3) ICS/UFBA.

3.2. Caracterização inicial das sementes de mamona

3.2.1. Biometria das sementes

Foram selecionadas aleatoriamente 500 sementes (10 repetições de 50 sementes) e analisadas as seguintes dimensões: comprimento (região do hilo ao lado oposto), largura e a espessura (região mediana), com auxílio de um paquímetro digital (Marathon) com precisão de 0,01 mm. Os resultados foram expressos em milímetros.

3.2.2. Peso de 1000 sementes

As sementes foram separadas em oito repetições de 100 sementes e pesadas em balança analítica com precisão de 0,0001 g. O valor da média das repetições foi extrapolado para mil sementes e o cálculo realizado de acordo as Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009).

3.2.3. Teor de água

O teor de água foi determinado utilizando-se 4 repetições de 5 sementes, pelo método de estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas, realizando-se um corte prévio das sementes em quatro partes, antes de coloca-las na estufa. O valor foi expresso em porcentagem de massa fresca das sementes, conforme recomendações das Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009).

3.2.4. Teste de germinação

O teste de germinação foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de vinte sementes (totalizando 100 sementes). Como substrato foi utilizado rolo de papel de germinação, do tipo “germitest” (28 cm x 38 cm), umedecido com água destilada, na proporção de três vezes o peso do papel seco. As sementes foram inicialmente desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio (comercial com 2% de cloro ativo) com concentração final de 0,125%, sendo agitadas constantemente durante 10 minutos e em seguida submetidas a 4 lavagens com água destilada. Posteriormente foram dispostas em 3 folhas de papel de germinação e postas para germinar em germinador do tipo B.O.D (Eletrolab, Mod. EL202) ajustando a temperatura de 25°C, na ausência de luz. Cada rolo foi acondicionado em saco plástico para evitar o ressecamento do substrato. As avaliações da germinação (protrusão da radícula) foram realizadas diariamente. Foram realizadas 2 contagens de plântulas normais após 7 e 14 dias do início do experimento, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os parâmetros avaliados foram: Porcentagem de germinação (G%), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (Tm) e velocidade média de germinação (Vm) (SANTANA e RANAL, 2004).

3.3. Avaliação fisiológica

3.3.1. Tratamento para desinfestação de sementes de mamona

Devido à grande incidência de contaminação das sementes de mamona por fungos, foi realizado um ensaio preliminar para identificar o melhor método de desinfestação das sementes e utilizá-lo como padrão. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco repetições de vinte sementes. Foram realizados os tratamentos com sementes conforme a figura 6.

Figura 6: Tratamentos para desinfestação de sementes de mamona

Tratamento	Solução
Controle	Sem tratamento
Hipoclorito de sódio + Tween 20 (HIPO20)	Foi preparado solução de hipoclorito de sódio 0,5% a partir do comercial (com 2% de cloro ativo) acrescentando uma gota de tween 20 para cada 100 ml de solução. As sementes foram colocadas na solução e agitadas durante 20 minutos, seguida de três lavagens em água destilada (ROCHA et al, 2003).
Hipoclorito de sódio + Tween 20 retirando a carúncula (HIPO20 SC)	Tratamento semelhante ao anterior (hipoclorito de sódio + tween 20 (HIPO20), entretanto após a desinfestação a carúncula das sementes foi retirada.
Captan na semente (CAPSEM)	Foi utilizado 180 µL de captan em cem sementes. O fungicida foi aplicado diretamente sobre todas sementes contidas em um saco plástico na recomendação de 300 mL de captan/100 Kg de sementes (KOBORI, 2011). Posteriormente o saco plástico foi fechado agitando vigorosamente até ser observada uma distribuição homogênea da formulação sobre as sementes.
Captan na solução (CAPSOL)	Foi preparada uma solução contendo 1,250 mL de captan para 500 mL de água destilada seguindo a recomendação do fabricante (250 mL do produto para 100 L de solução).
Captan + Carbomax na semente (CAPCORSEM)	Foi aplicado 120 µL de captan + 42 µL de carbomax em cem sementes. O fungicida foi aplicado diretamente sobre todas as sementes contidas em um saco plástico na recomendação do fabricante (300 mL de captan/100 Kg de sementes e 70 mL de carbomax/100 kg de sementes (KOBORI, 2011)). Posteriormente, o saco plástico foi fechado e agitado vigorosamente até ser observado uma distribuição homogênea da formulação sobre as sementes.
Captan + Carbomax na solução (CAPCORSOL)	Foi preparada solução contendo 1,25 mL de captan + 0,20 mL de carbomax para 500 mL de água destilada, seguindo a recomendação de 150 mL + 20 mL, respectivamente para 100 m de solução (KOBORI, 2011)

Fonte: A autora.

Após os tratamentos acima descritos, as sementes foram colocadas em rolo de papel do tipo “germitest”, umedecido com água destilada (exceto para os tratamentos CAPSOL e CAPCORSOL, cuja água destilada foi substituída pela solução fungicida), na proporção de 3 vezes a massa do papel seco (BRASIL, 2009) e colocados em germinador tipo B.O.D. (Eletrolab, Mod. EL202) com a temperatura constante de 25°C na ausência de luz.

As avaliações fisiológicas foram diárias e de acordo com os parâmetros do teste de germinação no item 3.2.4.

A partir dos dados obtidos neste teste, foram analisados os seguintes parâmetros fisiológicos: Porcentagem de germinação (G%), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (Tm) e velocidade média de germinação (Vm) (SANTANA e RANAL, 2004). Também foram avaliados o tempo para alcançar 50% de germinação (T_{50}) e Uniformidade de germinação (U_{8416} : intervalo de tempo entre 84% e 16% de sementes viáveis para germinar) de acordo Joonsen et al (2010).

As análises estatísticas foram realizadas através do programa estatístico Sisvar[®] 5,0 desenvolvido pela Universidade Federal de Lavras. Os dados de porcentagem de germinação foram transformados para raiz de $(x+0,5)$ e submetidos a análise de variância. A diferença entre as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2000).

3.3.2. Desinfestação de sementes

A partir dos resultados do teste para identificar o melhor tratamento para desinfestação das sementes de mamona, ficou estabelecido o tratamento Hipoclorito + tween 20 com a retirada da carúncula (HIPO20 SC) como padrão para desinfestar as sementes de mamona antes de qualquer ensaio fisiológico.

Sendo assim, as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio com concentração de 0,5%, adicionando uma gota de Tween 20 para cada 100 mL de solução, agitadas constantemente durante 20 minutos e em seguida passam por

4 lavagens com água destilada. No momento de montar o teste foi realizada a retirada da carúncula.

3.3.3. Curva de embebição em sementes de mamona

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com dez repetições de dez sementes. As sementes foram colocadas para embeber em substrato de papel do tipo “germitest” em caixas gerbox, umedecida com água destilada, na proporção de 3 vezes a massa do papel seco (BRASIL, 2009) e colocados em germinador tipo B.O.D. (Eletrolab, Mod. EL202) com a temperatura de 25°C em ausência de luz. Após os períodos pré-determinados (0 a 58 horas), as sementes foram retiradas das caixas e secas superficialmente com papel toalha, pesadas em balança de precisão a cada duas horas e recolocadas para embeber até que fossem observadas mudanças significativas no peso das sementes. Ao mesmo tempo, foi avaliado o potencial germinativo da semente, considerando sementes germinadas as que apresentaram emissão de radícula com 1 mm de comprimento.

As análises dos resultados foram realizadas em programa Excel, com a geração de um gráfico para identificação de uma curva de padrão trifásico (BEWLEY e BLACK, 1994).

3.3.4. Screening osmótico e osmocondicionamento

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições de vinte e cinco sementes. Os potenciais osmóticos testados foram: 0,0 (controle), -0,2, -0,4, -0,6, -0,8, -1,0, -1,2 e -1,4 MPa. As soluções osmóticas foram preparadas com polietilenoglicol 8000 (PEG 8000) de acordo as recomendações de Villela e Beckert (2001).

Após passarem por desinfestação as sementes foram submetidas à restrição hídrica, através da embebição das mesmas em solução osmótica nos diferentes potenciais durante sete dias. Após este período, o excesso da solução osmótica foi removido lavando-se as sementes com água destilada. Em seguida, estas foram reidratadas em água destilada na proporção de três vezes a massa do papel.

O ensaio foi conduzido em caixas de plástico transparentes, com substrato de papel do tipo “germitest”. As sementes foram umedecidas com solução de PEG 8000 na proporção de três vezes a massa do papel seco. Para o controle, as sementes foram embebidas apenas com água destilada. Todas as caixas com sementes foram colocadas em germinador tipo B.O.D. (Eletrolab, Mod. EL202) com temperatura de 25°C na ausência de luz.

As avaliações fisiológicas foram realizadas diariamente, considerando sementes germinadas aquelas que apresentavam a radícula protruída com cerca 1 mm de comprimento após o rompimento do tegumento.

Foram analisados os seguintes parâmetros fisiológicos: Porcentagem de germinação, (G%), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), tempo médio de germinação (Tm) e velocidade média de germinação (Vm) de acordo com Santana e Ranal (2004) e Tempo para alcançar 50% de germinação (T₅₀) e Uniformidade de germinação (U₈₄₁₆: intervalo de tempo entre 84% e 16% de sementes viáveis para germinar) de acordo Joosen et al (2010).

A análise estatística foi realizada através do programa estatístico Sisvar[®] 5,0 desenvolvido pela Universidade Federal de Lavras. Os dados de porcentagem de germinação foram transformados por raiz de $(x+0,5)$ e submetidos a análise de variância, as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2000).

3.3.5. Osmocondicionamento e tolerância ao déficit hídrico

A partir do ensaio anterior de screening osmótico, foi realizado um novo delineamento, definindo potenciais osmóticos intermediários para avaliar a resposta

ao osmocondicionamento das sementes, através do efeito da secagem das sementes e através da reumbebição das sementes em água e sob restrição hídrica.

As sementes de mamona foram inicialmente osmocondicionadas em solução de PEG 8000, nos potenciais de -0,3, -0,6 e -0,9 MPa, preparadas de acordo com Villela e Beckert (2001), durante sete dias.

Para cada um destes três potenciais foram utilizadas oitocentas sementes. As sementes foram postas para embeber em caixas de plástico transparentes com substrato de papel tipo germitest, umedecido com solução teste em volume equivalente a três vezes o peso da massa do papel seco (BRASIL, 2009), em seguida, as mesmas foram colocadas em germinador tipo B.O.D. (Eletrolab, Mod. EL202) ajustado a temperatura de 25°C, na ausência de luz.

Após sete dias, as sementes de cada potencial foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de PEG 8000. Uma amostra de quatrocentas sementes foi posta para secar em temperatura ambiente, até atingir seu peso inicial, em seguida a amostra foi posta para germinar em soluções osmóticas nos potenciais de -0,3, -0,6 e -0,9 MPa e água. A outra amostra de quatrocentas sementes (frescas) foi posta diretamente para germinar nas soluções osmóticas de acordo descrição acima e água, conforme esquema abaixo (Figura 7).

Figura 7: Diagrama metodológico para o osmocondicionamento de sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 a -0,3, -0,6 e -0,9 MPa e subsequente reumbebição de sementes osmocondicionadas secas e frescas em água e sob condições de restrição hídrica a -0,3, -0,6 e -0,9 MPa.



Fonte: SOUZA (2012).

3.4. Avaliação Citológica

3.4.1. Coleta das amostras

As sementes foram colocadas para embeber seguindo três tratamentos: 1) em água, 2) em solução de PEG 8000 (potencial $-1,0$ MPa) para restringir completamente a entrada de água na semente ocasionando uma condição de estresse, 3) embebidas inicialmente em solução de PEG 8000 (potencial $-1,0$ MPa), realizando o pré-tratamento de osmocondicionamento, sendo mantidas durante sete dias em solução de PEG e em seguida lavadas e reidratadas em água destilada. Para cada tratamento as radículas do eixo embrionário foram coletadas em diferentes períodos de embebição, conforme apresenta a figura 8.

Figura 8: Quadro representando os períodos de coleta de radículas para cada tratamento.

Material biológico	Tratamentos	Períodos de coleta da radícula
Sementes de mamona cv. EBDA MPA 11	Controle	Radículas coletadas de sementes secas 0 h
	Água	Radículas coletadas após 24 horas de embebição
		Radículas coletadas após 48 horas de embebição, germinadas
		Radículas coletadas após 72 horas de embebição, germinadas
	PEG 8000 -1,0 MPa	Radículas coletadas após 48 horas de embebição
		Radículas coletadas após 96 horas de embebição
		Radículas coletadas após 168 horas de embebição
	PEG 8000 -1,0 MPa e reidratação em água	Radículas coletadas após reidratação com 24 horas de embebição, germinadas
		Radículas coletadas após reidratação com 48 horas de embebição, germinadas

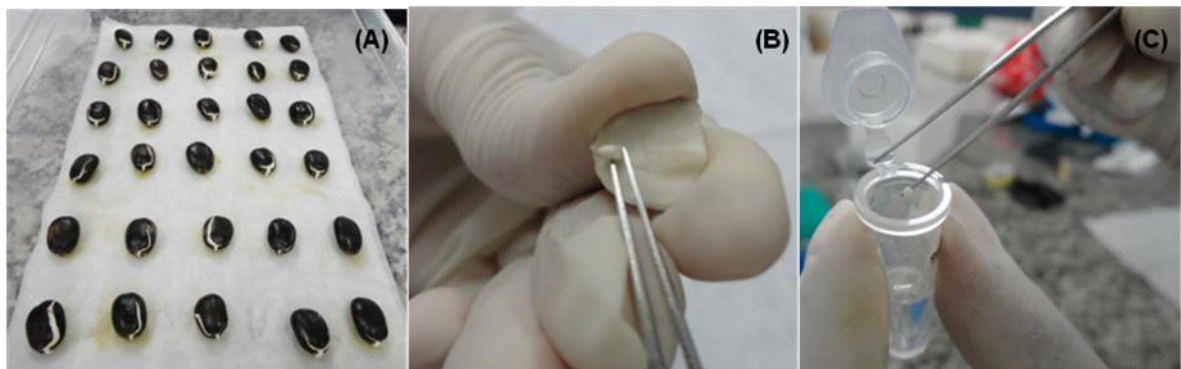
		Radículas coletadas após reidratação com 72 horas de embebição, germinadas
--	--	--

Fonte: A autora.

As radículas foram extraídas com auxílio de pinça (Figura 9 B) e colocadas em microtubos (Figura 9 C) sendo logo congeladas e armazenadas em freezer - 80°C ou colocadas em tampão.

A quantidade de água e de solução de PEG 8000 utilizada para embeber as sementes foi na proporção de 3 vezes a massa do papel seco (BRASIL, 2009). As sementes foram colocadas em germinador tipo B.O.D. (Eletrolab, Mod. EL202) ajustado à temperatura constante de 25°C na ausência de luz.

Figura 9: Coleta de amostras de radículas para estudo citológico



Fonte: A autora. A) sementes embebidas, B) excisão das radículas, C) armazenamento das radículas.

3.4.2. Extração de proteínas totais

Foram utilizadas 3 repetições de 20 radículas. Estas foram isoladas dos embriões de sementes de mamona e coletadas conforme os tratamentos especificados na figura 9. Logo após a excisão, as radículas foram congeladas em

nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C (Sanyo, mod. MDF U53VC) até o início dos experimentos.

A extração de proteínas totais foi realizada conforme o protocolo estabelecido por Laemmli (1970) modificado com ajuste do pH da solução tampão de extração para 9.0 (DE CASTRO et al., 1998). As radículas congeladas foram maceradas com auxílio do aparelho Dismembrator (Mikro-Dismembrator S, Sartorius).

A solução tampão de Laemmli (1970) modificada (62.5 mM de Tris-HCL, SDS 2% (p/v), 15 mg/mL de DTT, glicerol 87% (w/v), em pH 9.0) foi adicionada na proporção de 10:1 ($\mu\text{L}/\text{mg}$). O extrato pronto foi homogeneizado em agitador tipo vortex (Ika, mod. MS 3) e aquecido em banho-maria (Polyscience, mod.POL00010) à 100°C durante 10 minutos, para ocorrer a desnaturação das proteínas. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 4°C durante 15 minutos a 14.000 rpm em centrífuga refrigerada (HETTICH, mod.320 R). Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -80°C .

3.4.2.2. Determinação da concentração protéica

Para medir a concentração das proteínas no sobrenadante, utilizou-se os procedimentos do kit “Bio-Rad Protein Assay Kit II” modificado a partir dos métodos descritos por Lowry et al. (1951) e Bradford (1976).

A curva analítica foi preparada utilizando-se solução estoque de Albumina sérica bovina (BSA) ($1440 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, Molecular Probes, cod. n° T-7451) como padrão. Para a análise das amostras foi utilizada uma alíquota de $1 \mu\text{L}$ do extrato bruto diluído em $799 \mu\text{L}$ de água ultrapura (Milli-Q, Millipore) totalizando $800 \mu\text{L}$, acrescentando $200 \mu\text{L}$ do reagente de Bradford, contido no Kit BIO-RAD Protein Assay. A leitura das amostras foi realizada em triplicatas, em espectrofotômetro (Ultrospec 7000), no comprimento de onda de 595 nm . A concentração das proteínas nas amostras foi calculada usando-se a equação obtida no cálculo de regressão linear da curva analítica com BSA padrão.

3.4.2.3. Eletroforese

A eletroforese das proteínas foi conduzida utilizando-se géis de poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) na concentração de 7,5% de acrilamida (Sigma-Aldrich, A3553), conforme procedimento descrito por Laemmli (1970) e De Castro (1998). O gel separador contendo 7,5% e o gel empilhador 4% de solução estoque de acrilamida (Tris-HCL 1,5M pH 8,8, Tris-HCL 0,5M pH 6,8, SDS 10%, água bidestilada, TEMED (tetrametilenodiamina), APS 10% (persulfato de amônio)).

Após a polimerização do gel, nos poços foram colocados o padrão de tubulina pura de bovino na concentração de 30 ng (Molecular probes cod n° T-7451), o marcador molecular pré-corado (Pagemark – Gbiosciences, cod.786-415) para identificar as bandas com diferentes pesos moleculares das proteínas entre 7 kDa e 210 kDa, e as amostras diluídas em solução tampão Laemmli contendo azul-de-bromofenol, conforme a concentração total de proteínas (30 µg).

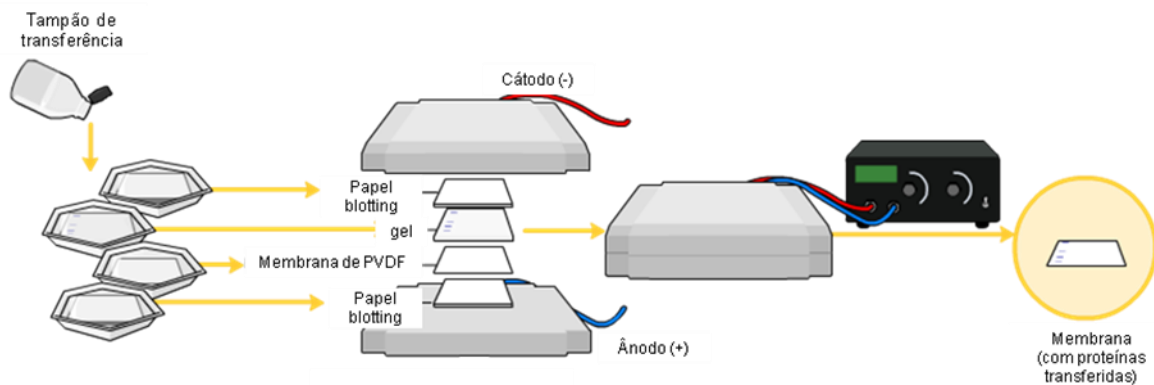
Para a corrida foi utilizado aparelho de eletroforese vertical (Amersham Biosciences) e fonte (GE EPS 601) programada em 300 V, 30 mA por aproximadamente 2 h.

3.4.2.4. Eletrotransferência

Após a corrida eletroforética, foram identificadas as bandas com o peso molecular da proteína de interesse, tubulina (55 KDa), sendo realizado um corte no gel e juntamente com os papéis paper blotting (GE - Amersham) cortados nas mesmas dimensões, estes foram mergulhados em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM Glicina e metanol 10% (v/v) em pH 8.7) (DE CASTRO et al, 2000). Em seguida, uma membrana de difluoreto de polivinilidina (PVDF) de 0,45 µm de espessura (GE – Amersham) foi mergulhada em metanol, depois lavada com água deionizada para retirar o excesso do metanol e posteriormente colocada em tampão de eletrotransferência por aproximadamente 5 minutos.

As proteínas foram transferidas do gel de acrilamida para a membrana através de um equipamento de eletrotransferência (GE TE 77 PWR, nº11-0013-42), conforme ilustra a figura 10, sendo colocados em ordem, 3 folhas do papel para blotting, o gel, a membrana de PVDF, e mais três folhas do papel para blotting, todos com as mesmas medidas, sendo embebidos pelo tampão de eletrotransferência. A eletrotransferência foi realizada durante 2 horas a 200 mA, e voltagem em aberto.

Figura 10: Esquema ilustrativo representando a eletrotransferência das proteínas do gel de acrilamida para membrana de PVDF.



Fonte: http://it.wikipedia.org/wiki/Western_blot, modificado, 2013.

3.4.2.5. Imunodeteção de tubulina

Após a transferência das proteínas, a membrana de PVDF passou por duas lavagens com solução salina de Tris contendo Tween-20 (TBST) e em seguida foi incubada em solução bloqueadora 1% (p/v) (ROCHE, cod.11096176001) mantida girando vagarosamente em forno hibridizador durante 3 horas. Posteriormente, a membrana foi colocada em 1 µg/ml de anticorpo primário (anti-β-tubulina/ anticorpo monoclonal de rato contra a β-tubulina, cod. MAB3408) diluído em solução bloqueadora 0,5% (p/v) e mantida nestas condições em overnight.

Após esta etapa, a membrana foi lavada duas vezes em TBST 1x durante quinze minutos cada, seguida de duas lavagens de 15 minutos em solução bloqueadora 0,5% (p/v).

Posteriormente, a membrana foi incubada durante uma hora em 40 mU/mL de anticorpo secundário (anticorpo secundário de caprino contra rato conjugado com peroxidase) diluído em solução bloqueadora 0,5% (p/v), sob agitação constante. Em seguida, as membranas foram lavadas em TBST 1x, em cinco lavagens de 15 minutos cada, agitando constantemente.

Em etapa final, a membrana foi submetida à detecção das bandas de tubulina por meio da reação da peroxidase com as soluções de detecção A + B, contidas no Kit de quimiluminescência (ROCHE, cod. 11500708001), sendo incubadas por um minuto em solução de detecção (125 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$).

Para a visualização das bandas, a membrana foi transferida para um cassete de revelação e posicionado entre duas transparências dentro do cassete, sendo umedecidos com a solução de detecção. O cassete foi então levado para uma sala completamente escura, e filmes específicos para western blotting (Amersham Hyperfilm-ECL, GE, cod. 28.9068.36) foram expostos à membrana no escuro durante 5 minutos, fazendo-se a captação da quimiluminescência das bandas referentes à proteína tubulina.

A revelação dos filmes foi feita no ambiente escuro, colocando-se os filmes imersos em solução reveladora (Kodak, cod. 8610248) durante 5 minutos, em seguida foram lavados em água destilada e imersos em solução fixadora (Kodak, cod. 1562826) durante 5 minutos, sendo depois lavados e postos para secar.

Esta metodologia foi realizada de acordo De Castro et al (2000) e Leying et al (1994).

3.4.3. Citometria de Fluxo

As radículas congeladas de todos os tratamentos da figura 8, foram colocadas em placas de Petri contendo 1 mL da solução tampão de isolamento de núcleos (10 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mM KCL, 5 mM Hepes, 1 mg mL^{-1} DTT, 2,5 mg mL^{-1} PVP 40 e Triton x-100 1% (w/v) em pH 8.0) conforme descrições de Faria et al (2005) e Arumuganthan (1991).

Para a calibração do citômetro foram utilizadas folhas de mamona (50 mg). Estas foram trituradas com o auxílio de uma lâmina em placa de Petri contendo três gotas do tampão de isolamento de núcleos. Em seguida foi acrescido 500 μL de tampão de isolamento sobre as folhas e o sobrenadante foi pipetado e filtrado em um microtubo utilizando-se uma malha de nylon de 25 μm .

As radículas do eixo embrionário de mamona, nos diferentes períodos de embebição em água e em PEG 8000, conforme mostrados na figura 8, foram colocadas separadamente em placas de petri e fragmentadas com o auxílio de uma lâmina, adicionado-se três gotas do tampão de isolamento de núcleos. Posteriormente, adicionou-se 500 μL de tampão sobre as radículas, a suspensão foi pipetada e filtrada em um tubo através de uma malha de nylon de 25 μm , para a eliminação de fragmentos celulares não desejáveis, obtendo-se apenas os núcleos celulares.

Foi adicionado à suspensão filtrada 5 μL de RNase (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), aguardou-se um tempo de 5 minutos e depois foi adicionado 80 μL de uma solução estoque de iodeto de propídio (1 mg/mL), mantidos por aproximadamente 10 minutos até o momento da realização da leitura em citômetro.

Após estes procedimentos as análises foram realizadas em um aparelho de fluxo citométrico (FACSCalibur BD) em comprimento de onda de 488 nm. Foram avaliados 30.000 núcleos.

A metodologia foi realizada conforme mostra a ilustração da figura 11.

Figura 11: Esquema ilustrativo da metodologia para análise da citometria de fluxo.



Fonte: <http://cfe.uc.pt/files/Artigo.pdf>, 2013.

Foi utilizado o software Summit 4.2 DakoCytomation para processamento dos histogramas e a análise dos dados obtidos. Os resultados foram expressos baseados na porcentagem da quantidade total de núcleos nos picos do histograma.

3.4.4. Análise Imunocitoquímica em radículas de sementes de mamona

3.4.4.1. Emblocamento das amostras para imunodeteção de tubulina

Para estas análises foram utilizadas radículas coletadas de acordo com a figura 8. O emblocamento do material em resina de BMM (Butil e metilmetacrilato) seguiu as seguintes etapas descritas abaixo:

Fixação: Após serem coletadas, as radículas foram colocadas em microtubos (2 mL) contendo solução fixadora de Paraformaldeído (PFA) a 4% (MSB 5x (Microtubule

Stabilizing Buffer) com 10mM DTT, PFA 8%, Triton stock 10%, DMSO, H₂O), sendo agitadas constantemente em temperatura ambiente durante 4 horas em forno hibridizador (BELLCO GLASS INC - AUTOBLOT), seguida posteriormente de quatro lavagens em tampão MSB (50mM PIPES, 5 mM EGTA, 5mM MgSO₄.7H₂O) durante trinta minutos cada.

Desidratação: As amostras foram desidratadas com trocas de solução de etanol com DTT (ditiotreitól) em concentrações gradativas de 10%, 30%, 50%, 70%, 96% e 100%, sendo agitados nas concentrações de 10 % a 50% durante trinta minutos cada, mantido em overnight na concentração de 70% e nas concentrações de 96% e 100% em geladeira.

Infiltração: Consistiu em trocas da solução de etanol com BMM (butil e metilmetacrilato) nas proporções (3:1/ 1:1/ 1:3), por duas horas cada, e BMM 100% em overnight.

Emblocamento: As amostras foram colocadas em cápsulas contendo BMM 100%, mantidas por 1 hora no freezer -20°C (CARRIER - Modelo F550) em um recipiente escuro e em seguida expostas à luz ultravioleta para a polimerização da resina, sob a temperatura de -20°C durante um período de 12 horas, conforme metodologia proposta por Baskin (1992), modificada por De Castro et al (2000) e Faria et al (2005).

3.4.4.2. Cortes histológicos

Os cortes histológicos de 1µm de espessura foram realizados em ultramicrótomo (Leica EM UC7) e colocados em lâminas pré-tratadas. Em seguida, os cortes foram estirados com o vapor de clorofórmio para evitar o enrugamento. Posteriormente, as lâminas foram postas em placa aquecedora à 60°C até evaporar toda água, promovendo a completa aderência dos cortes nas lâminas.

3.4.4.3. Imunodeteção de tubulina (microtúbulos e citoesqueleto)

Esta etapa consistiu em sequências alternadas de lavagens e incubações em anticorpos primários e secundários.

As lâminas foram inicialmente lavadas em acetona (2 x 10 min) para remoção completa da resina de BMM, seguida de lavagens em solução tampão salina de fosfato (PBS – *Phosphate buffered saline*) (2 x 10 min) e bloqueamento das secções com cloreto de hidroxilamônio (HAH, 0,1M) (1 x 5 min) (Sigma-Aldrich, cod. nº 5470-11-1), BSA fração-V 1% (BSA-V - Aurion, cod. nº 900.011) (1 x 30 min) e BSA acetilado 0,01% (BSAc - Aurion, cod. nº 900.099) (3 x 5 min). As secções foram então incubadas em anticorpo primário monoclonal anti- α -tubulina produzido em camundongos (Clone DM 1A, Sigma-Aldrich, cod. nº T9026) diluído em 1:100 (v/v) em PBS com BSAc, seguida de lavagens em PBS com BSAc 0,01% (4 X 15 min), e nova incubação em anticorpo secundário contra camundongo produzido em caprino e conjugado com Alexa Fluor® 488 (Clone B-5-1-2, Invitrogen – Molecular Probes, cod. nº 32-2588) diluído em 1:70 (v/v) em PBS com BSAc.

Por fim as secções foram cobertas com glicerol (CITIFLOUR AF-3, Electron Microscopy, cod. nº 17972-25) e lamínula para a detecção e visualização de tubulina e/ou microtúbulos.

Esta metodologia foi seguida conforme instruções de De Castro et al (2000) e Faria et al (2005) com modificações.

As fotomicrografias das secções foram obtidas através de câmera digital acoplada ao microscópio de fluorescência Olympus QC Collor 3.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização inicial das sementes de mamona

A análise biométrica do lote de sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 revelou medidas morfométricas de 15,11 mm em altura, 11,97 mm em largura e 6,97 mm em espessura, além do teor de umidade inicial de 5,09%, peso de mil sementes de 600,74 g e percentual de germinação de 81% (tabela 1).

Tabela 1. Biometria das sementes de mamona cv. EBDA MPA 11. Dados morfométricos de altura, largura e espessura (mm), teor de umidade (%), peso de mil sementes (g) e germinação (%).

Cultivar	Morfometria (mm)			Teor de água (%)	Peso de mil sementes (g)	Germinação (%)
	Altura	Largura	Espessura			
MPA 11 (Lote 2011)	15,11	11,97	6,97	5,09	600,74	81

A mamoneira apresenta grande variabilidade em relação à biometria de suas sementes, apresentando sementes com diferentes formas, cores, tamanho e peso (LUZ, 2012).

Em um trabalho sobre variação na qualidade e tamanho das sementes de mamona de diferentes variedades, Zuchi et al. (2010) verificaram que a época de semeadura e a ordem floral influenciaram tanto na qualidade como no tamanho das sementes avaliadas.

Neto et al. (2004) no estudo de caracterização de 49 acessos de mamona da cultivar BRA, verificaram que as sementes apresentaram comprimento médio de 1,47 cm, largura média de 1,04 cm e espessura média de 1,41 cm.

O conteúdo de água observado nas sementes de mamona, sugere que as mesmas são sementes ortodoxas que geralmente sofrem uma secagem natural, apresentando ao final do processo de desenvolvimento e maturação um baixo conteúdo de água, em torno de 5 a 10% de seu peso fresco (DE CASTRO e HILHORST, 2004).

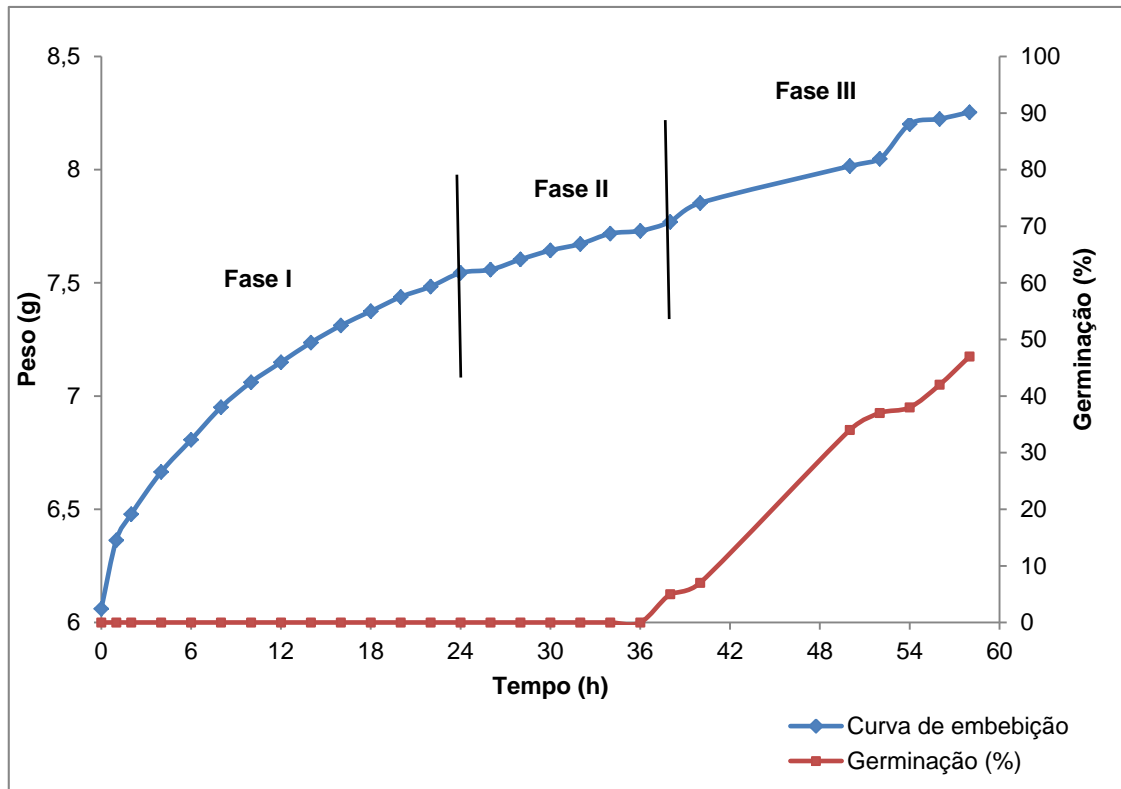
O teor de água das sementes de mamona da cultivar EBDA MPA 11 avaliadas neste trabalho encontram-se próximos ao de outras cultivares da mesma espécie. Junior (2009) observou que as sementes de mamona da cultivar BRS-Nordestina apresentaram um valor do teor de água de 5,6%. Machado et al (2010) verificaram o teor de água nas sementes de mamona da cultivar Al Guarany 2002 entre 5,6% e 6%, a partir de sementes coletadas de diferentes racemos e diferentes posições neste. Luz (2012) encontrou o teor de umidade de 6,7% para as sementes das doze cultivares da EBDA estudadas.

4.2. Curva de embebição em sementes de mamona

De acordo com os dados obtidos na curva de embebição (Figura 10), entre os períodos de 0 a 24 horas ocorreu aumento na intensidade do peso fresco das sementes, caracterizando rápida embebição de água nas sementes, indicando que as sementes encontravam-se na Fase I do padrão de embebição de água descrito por Bewley e Black (1994).

Entre os períodos de 24 a 36 horas, observou-se menor aumento no peso fresco das sementes, caracterizando uma fase estacionária e de menor intensidade de embebição, indicando que as sementes neste período estavam na fase II do processo de embebição. Verificou-se a partir das 38h de embebição um novo aumento no peso fresco (Fig. 12), representativo de uma embebição mais intensa, quando também se deu início à protrusão da radícula de algumas sementes, caracterizando a Fase III do processo de embebição de água das sementes (BEWLEY e BLACK, 1994).

Figura 12: Curva de embebição de sementes de mamona cv. EBDA MPA 11.



Fonte: A autora. Fase I – 0h a 24h; Fase II – 24h a 38h; Fase III – a partir de 38 horas.

Comparando-se o padrão de absorção de água de quatro cultivares de mamona, IAC 80, IAC 226, BRS 188 Paraguaçu e Al Guarany 2002 observou-se diferenças, sendo que a IAC 80 e BRS 188 Paraguaçu entraram na Fase II com aproximadamente 40 horas de embebição e a IAC 226 após 28 horas de embebição (ZUCHI et al, 2012). Enquanto que a cultivar EBDA MPA 11 entrou na Fase II a partir de 24 horas de embebição em água. Estes dados mostram que ocorrem diferenças no padrão de absorção de água de diferentes cultivares da mesma espécie.

Esta diferença pode se dar em função do teor de água inicial dos tecidos, pois todas as células dos tecidos embrionários e demais tecidos da semente apresentam um potencial hídrico que pode ser específico a cada tecido, célula ou até mesmo cada compartimento celular (DE CASTRO e HILHORST, 2004). A variabilidade nos padrões de embebição pode depender da qualidade inicial dos lotes de sementes,

assim como das características inerentes ao genótipo, uma vez que há grande variabilidade fenotípica para parâmetros biométricos de sementes e plantas de diferentes variedades e cultivares de mamona, que por sua vez são influenciados também por variáveis ambientais (RODRIGUES et al., 2011; LUZ, 2012).

O estudo da embebição de água nas sementes de diferentes espécies é importante em pesquisas, pois seu conhecimento permite o entendimento das etapas iniciais do processo germinativo e possibilita o desenvolvimento de técnicas que visam melhorar a qualidade das sementes, utilizando tratamentos como condicionamento osmótico, pré-hidratação e uso de biorreguladores (PINHO et al, 2004).

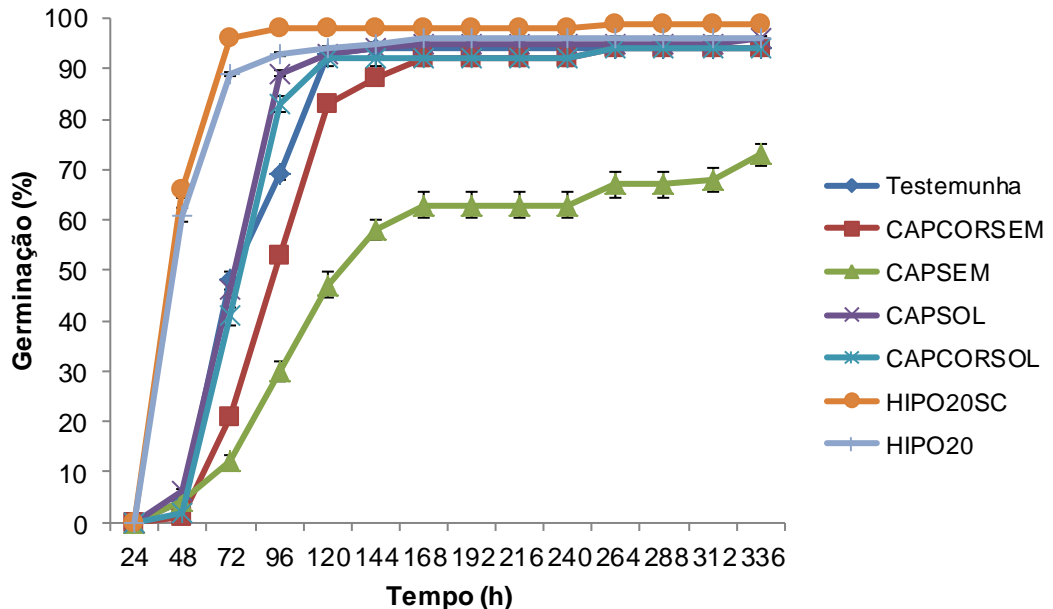
4.3. Tratamento para desinfestação de sementes de mamona

Testes preliminares mostraram que o lote das sementes de mamona (cultivar EBDA MPA 11), em estudo apresentaram problemas de contaminação por fungos durante a germinação influenciando nos resultados de germinabilidade e estabelecimento de plântulas em experimentos realizados em laboratório.

Dentre os diferentes tratamentos de desinfestação aplicados para diminuir a contaminação das sementes de mamona, verificou-se que o tratamento com hipoclorito de sódio + tween 20 com a retirada da carúncula (HIPO20SC) foi o mais eficiente por resultar em percentual de germinação superior à testemunha (Figura 13).

Conforme os dados apresentados na tabela 2 pode-se observar que houve diferença significativa no potencial germinativo das sementes apenas para o tratamento CAPSEM, que teve germinação baixa (73%) quando comparado ao controle e demais tratamentos, diferindo estatisticamente.

Figura 13: Germinação das sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação.



Fonte: A autora.

O controle químico de fungos em sementes pode culminar em fitotoxicidade, reduzindo o potencial germinativo das mesmas. Entretanto, a maioria dos tratamentos analisados não influenciou na porcentagem de germinação, visto que as sementes tratadas com diferentes combinações de fungicidas apresentaram germinabilidade similar ao controle. Todavia, a aplicação direta do fungicida Captan na semente (CAPSEM) acabou gerando redução na porcentagem de germinação, observada na tabela 2. Este resultado pode ser um indicio que este tratamento, aplicando-se um único fungicida diretamente na semente causa fitotoxicidade já que a combinação de dois produtos, tanto em solução (CAPCORSOL) como aplicado diretamente na semente (CAPCORSEM) não apresentou redução no potencial germinativo.

Pôde-se verificar que as sementes tratadas com CAPSEM apresentaram menor vigor, corroborando com os dados de germinação. Estes resultados deixam claro que este tratamento afetou com maior intensidade a qualidade fisiológica das sementes de mamona (Tabela 2).

Analisando os parâmetros de vigor, os tratamentos HIPO20 e HIPO20SC foram mais eficientes, não havendo diferença estatística entre os parâmetros Tm, Vm, IVG e T₅₀. Houve uma pequena diferença apenas no parâmetro U₈₄₁₆. Contudo, o tratamento HIPO20SC foi o que apresentou melhor germinabilidade dentre todos os tratamentos testados, apresentando também melhor resposta em todos os parâmetros de vigor testados, sendo considerado o melhor tratamento para ser aplicado para a desinfestação das sementes de mamona (Tabela 2)

Tabela 2. Germinabilidade de sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação. G%: percentual de germinação, Tm: tempo médio de germinação, Vm: velocidade média de germinação, IVG: índice de velocidade de germinação, T₅₀: tempo para alcançar 50% de germinação, U₈₄₁₆: uniformidade de germinação medindo-se o intervalo de tempo entre 16% e 84% de germinação de sementes viáveis. CAPCORSEM: captan + carbomax na semente, CAPSEM: captan na semente, CAPSOL: captan na solução, CAPCORSOL: captan + carbomax na solução, HIPO20SC: hipoclorito de sódio + tween 20 retirando a carúncula, HIPO20: hipoclorito de sódio + tween 20.

TRATAMENTOS	G (%)	Tm (dias)	Vm (dias ⁻¹)	IVG	T50	U8416
Controle	94 ab	3,71 ab	0,26 b	5,37 b	74,10 bc	39,12 a
CAPCORSEM	94 ab	4,44 bc	0,22 bc	4,55 bc	90,48 cd	51,94 bc
CAPSEM	73 b	5,85 c	0,18 c	3,18 c	105,62 d	79,04 c
CAPSOL	96 ab	3,66 ab	0,27 b	5,65 b	71,80 b	29,22 ab
CAPCORSOL	94 ab	3,84 ab	0,25 b	5,29 b	74,56 bc	29,64 ab
HIPO20SC	99 a	2,44 a	0,41 a	8,71 a	45,86 a	13,66 a
HIPO20	96 ab	2,50 a	0,39 a	8,27 a	43,66 a	20,64 ab
CV (%)	16,62	18,39	12,26	15,94	11,68	41,65

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

A redução na qualidade fisiológica das sementes tratadas com fungicida pode ter ocorrido em decorrência da influência do substrato. De acordo Silva (1989) e Kobori (2011), alguns tratamentos com fungicidas em substrato de papel, pode causar na semente um efeito fitotóxico provocando uma redução no potencial fisiológico, o que não ocorre em condições de campo.

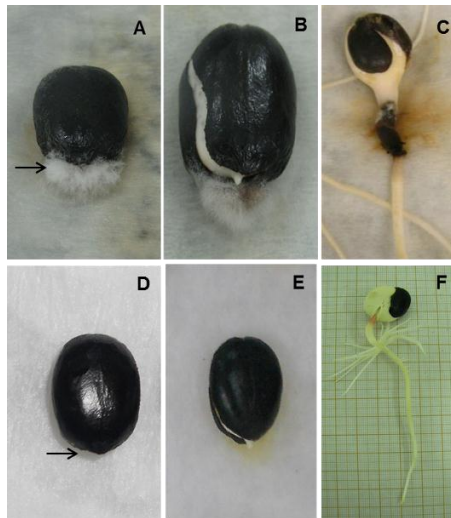
Marroni et al (2012), estudando o efeito de tratamentos químicos e biológicos em sementes de mamona, concluíram que o tratamento químico com fungicidas (carbendazim e thiram) foi 100% eficaz no controle de fungos, produzindo plântulas com maior matéria seca, sendo utilizado solo como substrato.

Araújo et al (2004), verificaram que em sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), o tratamento de desinfestação superficial com hipoclorito de sódio a 2% foi o mais eficiente na diminuição da ocorrência da contaminação por fungos, utilizando como substrato papel germitest.

Carvalho et al (2002) testando um meio para desinfestação das sementes de mamona das cultivares BRS 149, BRS 188 e SIPEAL 28, verificaram que o melhor método foi a desinfestação utilizando hipoclorito de sódio a 2% com tween 20, fazendo a retirada da carúncula e de todo o tegumento, resultando em menor contaminação por fungos e em germinação mais rápida, assim como foi verificado neste trabalho.

Através de uma análise geral dos resultados alcançados, a qualidade fisiológica de sementes de mamona não foi afetada pelos tratamentos HIPO20 e HIPO20sc. No entanto, se levada em conta a análise visual, as sementes sem a carúncula apresentaram uma menor incidência de fungos, sendo este o método mais eficiente e indicado para desinfestação de sementes de mamona, uma vez que a incidência de fungos foi observada principalmente na região da carúncula (Figura 14).

Figura 14: Incidência de fungos em sementes de mamona.



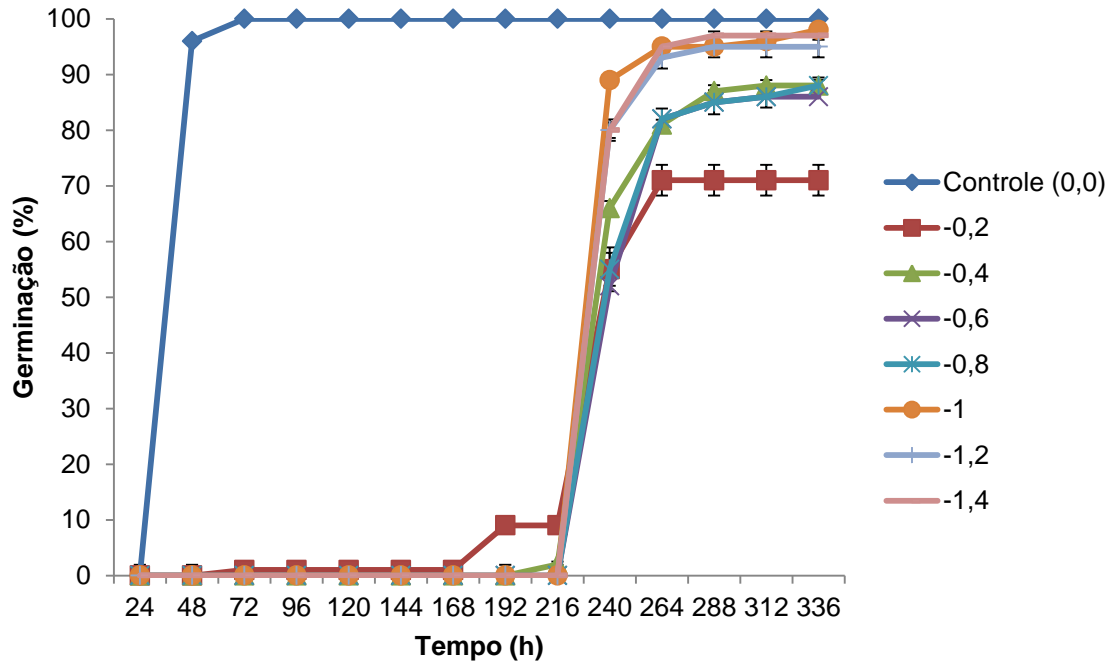
Fonte: A autora. A – C: sementes sem tratamento. A: semente com fungos na região da carúncula; B: semente germinada com fungos na carúncula; C: semente com deterioração na raiz principal devido à contaminação por fungos; D – F: sementes tratadas com HIPO20sc; D – E: semente com retirada da carúncula; F: semente sem deterioração da raiz; As setas indicam a região da carúncula. Os fungos não foram identificados.

4.4. Screening osmótico e osmocondicionamento

As sementes embebidas em água (controle) apresentaram 100% de germinação, sendo que as sementes embebidas nas soluções de PEG a -1,0, -1,2 e -1,4 MPa, durante sete dias e posteriormente submetidas a reembebição em água tiveram percentual de germinação total próximo ao controle. Logo, os tratamentos aplicados não conferiram melhoria na germinação (Fig. 15).

Analisando os potenciais de restrição hídrica em sementes durante o condicionamento em soluções de PEG 8000, pôde-se verificar que o potencial -0,2 MPa foi suficiente para permitir a germinação de apenas 3% das sementes sendo que a partir de -0,4 MPa a germinação foi totalmente inibida (dados não mostrados), indicando grande sensibilidade das sementes de mamona à restrição hídrica.

Figura 15: Germinação das sementes de mamona em água (0,0 MPa, Controle) após condicionamento por 168 horas em diferentes potenciais osmóticos (-0,2 a -1,4 MPa).



Fonte: A autora.

Loureiro et al (2009), estudando sementes de *Jatropha curcas* L., espécie pertencente à mesma família da *Ricinus communis* L., Euphorbiaceae, verificaram que os potenciais osmóticos acima de -0,2 MPa já causaram restrição hídrica nas sementes, sendo o limite de germinação verificado no potencial de -0,6 MPa.

Tabela 3. Germinabilidade das sementes de mamona (cv. EBDA MPA11) durante reidratação em água após 168 horas de embebição em solução de PEG 8000 em diferentes potenciais osmóticos. G%: percentual de germinação, Tm: tempo médio de germinação, Vm: velocidade média de germinação, IVG: índice de velocidade de germinação, T₅₀: tempo para alcançar 50 % de germinação, U₈₄₁₆: uniformidade de germinação medindo-se o intervalo de tempo entre 84% e 16% de germinação de

Tratamentos						
Potenciais osmóticos MPa	G (%)	Tm (dias)	Vm (dias⁻¹)	IVG	T₅₀	U₈₄₁₆
Controle (0,0)	100 a	1,0 a	1,0 a	12,30 a	39,30 a	6,84 a
-0,2	71 b	1,25 a	0,80 ab	9,33 a	63,30 b	18,77 a
-0,4	88 ab	1,34 a	0,74 ab	10,17 a	65,62 b	18,22 a
-0,6	86 ab	1,46 a	0,70 b	9,24 a	69,33 b	15,22 a
-0,8	88 ab	1,54 a	0,69 b	9,44 a	70,62 b	15,57 a
-1	98 a	1,17 a	0,87 ab	11,76 a	63,32 b	7,52 a
-1,2	95 ab	1,18 a	0,85 ab	11,21 a	66,23 b	11,00 a
-1,4	97 a	1,20 a	0,84 ab	11,37 a	65,81 b	12,25 a
CV (%)	12,79	20,31	15,21	17,39	7,96	40,81

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Os resultados de germinabilidade após a reidratação das sementes em água demonstraram que o tratamento onde as sementes foram previamente embebidas em PEG -0,2 MPa foi o que apresentou menor percentual de germinação, diferindo estatisticamente de todos os outros tratamentos (Tab.3). Possivelmente este efeito se deve a quantidade de água disponível para o processo germinativo, insuficiente para dar continuidade a este processo e também para impedir que a semente iniciasse os eventos da fase 3 da curva de embebição. Portanto, neste tratamento foi verificada alta porcentagem de sementes deterioradas (dados não mostrados).

Em relação aos outros tratamentos, pôde-se constatar que os potenciais -1,0 MPa e -1,4 MPa não diferiram estatisticamente do controle, quando analisados a % de germinação e outros parâmetros como Tm, IVG e U₈₄₁₆. Entretanto, mesmo não apresentado diferença estatística, os dados brutos mostram que nenhum dos

potenciais estudados, foram iguais ou superiores ao controle (água). Já em relação a V_m e T_{50} os tratamentos diferiram estatisticamente do controle.

Silva et al. (2009) estudando o estresse hídrico em sementes selvagens de plantas ruderais de mamona, verificaram que o potencial osmótico -0,5 MPa se mostrou benéfico para germinação sendo superior ao controle, entretanto este resultado foi observado apenas em sementes que passaram por uma embebição prévia. No mesmo estudo os autores verificaram que o potencial -1,0 MPa foi prejudicial à germinação e para todos os outros parâmetros analisados, havendo completa restrição hídrica neste potencial.

Cheema et al. (2010) examinando o comportamento das sementes de mamona de diferentes cultivares submetidas a diferentes níveis de estresse hídrico, concluíram que os tratamentos investigados responderam de formas diversificadas, mas que o estresse aplicado foi um fator limitante durante a germinação.

Sementes de Crambe (*Crambe abyssinica* – Brassicaceae), uma oleaginosa também recomendada para produção de biodiesel, quando submetidas a diferentes potenciais osmóticos apresentaram redução na germinação, contudo os autores concluíram que estas sementes são tolerantes as condições de estresse hídrico testadas (MASSETO et al., 2011).

AA e Al-Namo (2011) pesquisando três espécies de diferentes famílias, *Acacia tortilis* (Fabaceae), *Salvadora pérsica* (Salvadoraceae) e *Leptadenia pyrotechnica* (Apocinaceae) observaram que o estresse hídrico aplicado sobre mudas dessas espécies condicionou o aparecimento de características adaptativas, tornando-se uma estratégia para melhoria da sobrevivência, ou seja, o estresse aplicado condicionou características adaptativas para esta espécie.

Beltrão et al. (2003) concluíram que a mamoneira da cultivar BRS 149 Nordeste apresentou uma resposta de sensibilidade ao estresse hídrico na sua fase inicial do crescimento e desenvolvimento. Todavia, após estabelecida no ambiente, esta cultivar apresenta boa produtividade em condições de sequeiro no Nordeste brasileiro.

Na cultivar EBDA MPA 11 também foi constatada uma sensibilidade ao estresse hídrico, uma vez que o potencial $-0,2$ MPa já causou restrição hídrica nas sementes. Sendo assim, é possível considerar que na fase inicial de germinação e estabelecimento de plântulas, as sementes de mamona são bastante sensíveis à falta de água, se mostrando pouco tolerantes à condição de seca. De acordo Nejad (2013) em muitas espécies, a germinação de sementes e crescimento de plântulas são as fases mais sensíveis ao estresse.

A mamoneira na fase de planta estabelecida é mais tolerante à falta de água, sobrevivendo por grandes períodos de estiagem, entretanto é uma planta com maior sensibilidade na fase de crescimento inicial. Conforme Beltrão et al (2005) para uma produção satisfatória, a mamona necessita de 500 a 1000 mm de chuva bem distribuídos, pois a maior exigência por água ocorre na fase inicial do seu desenvolvimento.

De acordo Queiroga et al. (2011), as cultivares mais adequadas para região semiárida do nordeste devido ao aspecto de irregularidades da chuva são a BRS Nordestina ou BRS Paraguaçu. A maior adaptação dessas duas cultivares se deve ao fato de suas plantas apresentarem um sistema radicular mais profundo e desenvolvido que lhes confere maior tolerância aos efeitos da estiagem.

Os resultados obtidos indicam que as sementes de mamona da cultivar EBDA MPA 11 são sensíveis à restrição hídrica a partir do potencial $-0,2$ MPa, sendo a germinação nula a $-0,4$ MPa, o que demonstra que esta cultivar é dependente de disponibilidade hídrica para a germinação e estabelecimento de plântulas.

E em resposta ao osmocondicionamento, o estresse osmótico aplicado nas sementes de mamona não induziu uma melhoria, em relação à uniformidade, tempo e velocidade de germinação. Dessa forma não foi observado efeito de *priming* para os tratamentos testados.

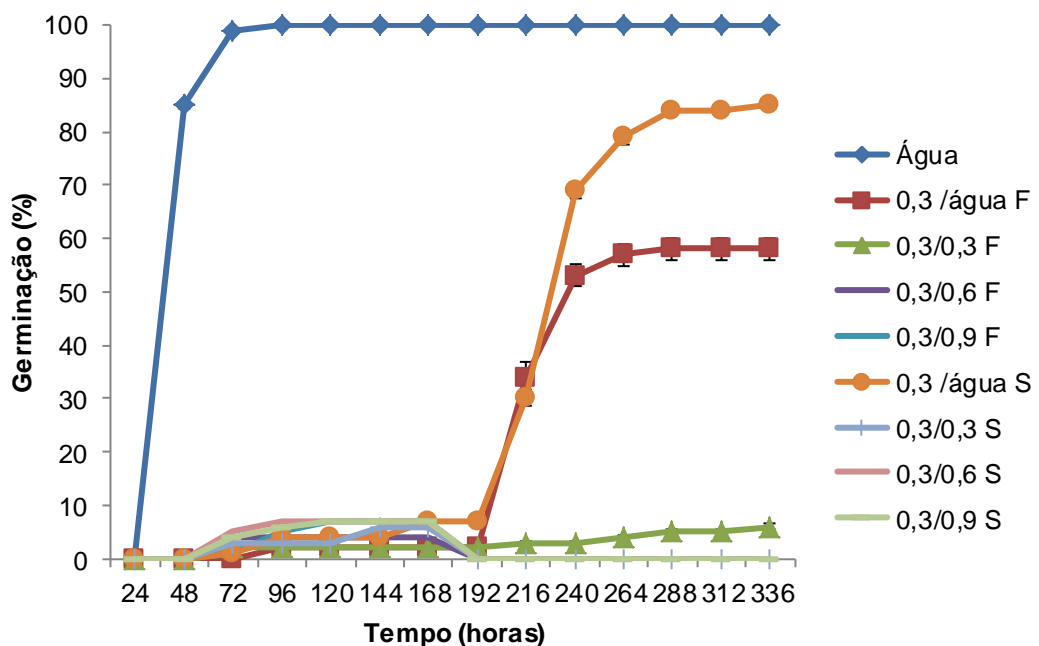
4.5. Osmocondicionamento e tolerância ao déficit hídrico

O osmocondicionamento em sementes de mamona não tornou a germinação mais rápida e uniforme, ou seja, não houve efeito de *priming* nas sementes avaliadas.

No potencial $-0,3$ MPa, houve um baixo percentual de germinação durante a embebição das sementes na solução osmótica. As sementes secas (até atingir o peso inicial) e reumbebidadas em água apresentaram um incremento no percentual de germinação em comparação com as sementes frescas (logo reumbebidadas em água) (Figura 16).

A diminuição da porcentagem de germinação no potencial $-0,3$ MPa após a reidratação em comparação ao controle (água) foi esperada, quando comparado ao resultado do experimento anterior do efeito da restrição hídrica, por apresentar pouca diferença em relação ao potencial osmótico $-0,2$ MPa.

Figura 16: Germinação das sementes de mamona durante e após osmocondicionamento.



Fonte: A autora. Percentual de germinação das sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 durante osmocondicionamento a $-0,3$ MPa, durante subsequente reumbebição em água e subsequente reumbebição sob restrição hídrica a $-0,3$, $-0,6$ e $-0,9$ MPa.

De acordo os resultados apresentados na tabela 4, as sementes reembebidas em água que passaram por secagem não apresentaram diferença estatística em relação ao controle nos parâmetros de G%, IVG e Tm, diferindo apenas no Vm. Já as sementes que não passaram por secagem (frescas), apresentaram diferença estatística em relação aos parâmetros de G% e IVG, não diferindo apenas no Tm e Vm.

Tabela 4. Germinabilidade das sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 durante osmocondicionamento a -0,3 MPa, durante subsequente reembebição em água e durante subsequente reembebição sob restrição hídrica a -0,3, -0,6 e -0,9 MPa. G%: percentual de germinação, IVG: índice de velocidade de germinação, Tm: tempo médio de germinação e Vm: velocidade média de germinação.

Tratamento	Tratamento inicial				Após reembebição			
	G (%)	IVG	Tm (dias)	Vm (dias-1)	G (%)	IVG	Tm (dias)	Vm (dias -1)
Água	100 a	11,9 a	1 a	1 a	100 a	11,9 a	1 ab	1 a
0,3 /água F	2 b	0 b	1 a	0 a	58 b	6,13 b	1,11 ab	0,91 a
0,3/0,3 F	2 b	0,2 b	0,5 a	0,5 a	5 c	0,4 c	1,2 ab	0,2 ab
0,3/0,6 F	4 b	0,3 b	0,8 a	0,8 a	0 c	0 c	0 c	0 c
0,3/0,9 F	7 b	0,3 b	1 a	0,3 a	1 c	1,3 c	0,1 c	0 ab
0,3 /água S	7 b	0,38 b	1,7 a	0,44 a	85 a	7,91 a	1,29 a	0,8 b
0,3/0,3 S	7 b	0,4 b	1,7 a	0,4 a	0 c	0 c	0 c	0 c
0,3/0,6 S	7 b	0,5 b	1,3 a	0,8 a	0 c	0 c	0 c	0 c
0,3/0,9 S	7 b	0,5 b	1,2 a	0,5 a	0 c	0 c	0 c	0 c
CV (%)	24,59	23,37	75,84	51,26	21,29	37,08	91,94	29,09

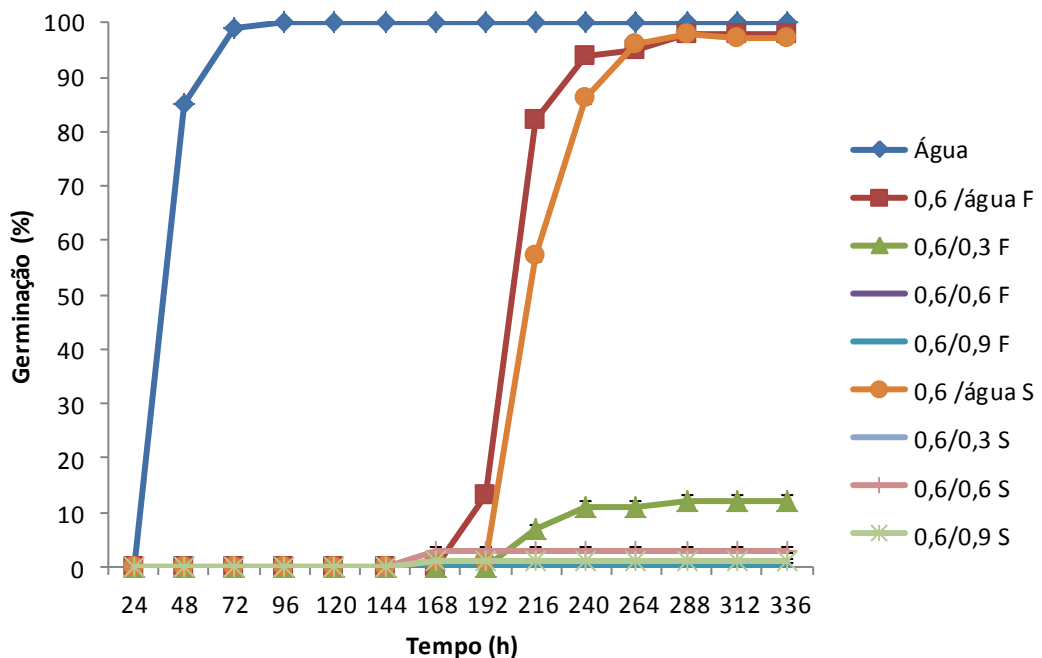
Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

As sementes osmocondicionadas no potencial -0,6 MPa e reembebidas em água apresentaram maior percentual de germinação, chegando próximo ao controle (100%), sendo que as sementes secas apresentaram 97% de germinação e as sementes frescas 98% de germinação (Figura 17).

Tanto para os dados de germinação quanto para os outros parâmetros como tempo médio de germinação (T_m), velocidade média de germinação (V_m) e índice de velocidade de germinação (IVG), não houve diferença estatística em relação ao controle (água) (Tabela 5), contudo os dados brutos mostram que os valores apesar de muito próximos não foram superiores e nem similares ao controle (água), com exceção do IVG que foi superior nas sementes frescas quando reidratadas em água.

As sementes que foram osmocondicionadas a $-0,6$ MPa e reembebidas sob restrição hídrica a $-0,3$ MPa, sem realizar a secagem (sementes frescas) apresentaram um baixo percentual de germinação (12%). Contudo, a germinação foi nula para as sementes que foram reembebidas sob restrição hídrica nos outros potenciais osmóticos. As que foram sementes osmocondicionadas com subsequente reembebição sob restrição hídrica após a secagem, não germinaram em nenhum dos potenciais testados ($-0,3$ MPa, $-0,6$ MPa e $-0,9$ MPa).

Figura 17: Germinação das sementes de mamona durante osmocondicionamento.



Fonte: A autora. Germinação (%) das sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 durante osmocondicionamento a $-0,6$ MPa, durante subsequente reembebição em água e subsequente reembebição sob restrição hídrica a $-0,3$, $-0,6$ e $-0,9$ MPa.

Tabela 5. Germinabilidade das sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 durante osmocondicionamento a 0,6 MPa, durante subsequente reumbebição em água e subsequente reumbebição sob restrição hídrica a -0,3, -0,6 e -0,9 MPa. G%: percentual de germinação, IVG: índice de velocidade de germinação, Tm: tempo médio de germinação, Vm: velocidade média de germinação.

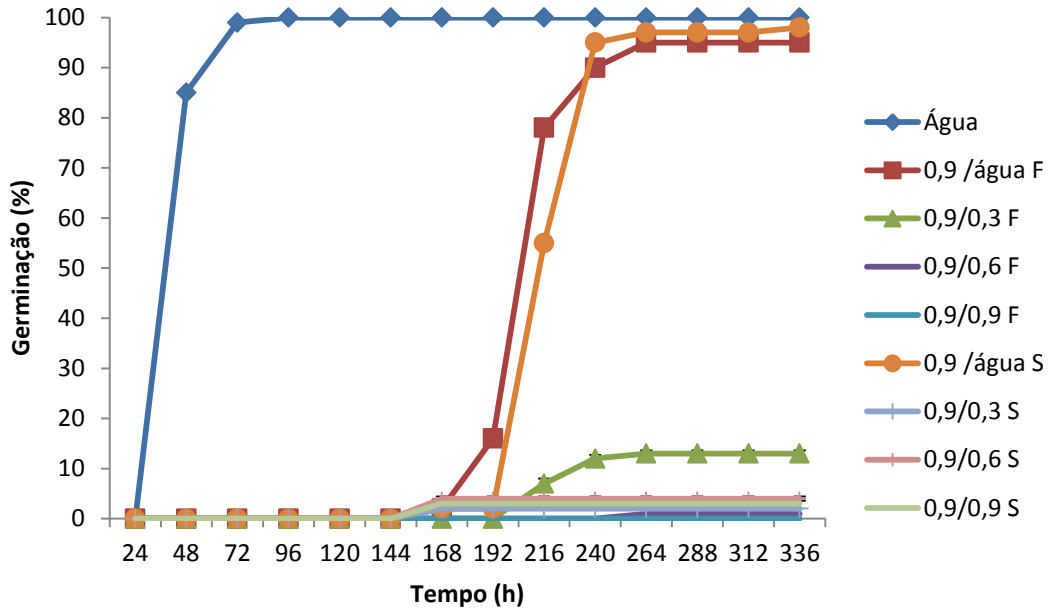
Tratamento	Tratamento inicial				Após reumbebição			
	G (%)	IVG	Tm (dias)	Vm (dias -1)	G (%)	IVG	Tm (dias)	Vm (dias -1)
Água	100 a	11,9 a	1 a	1 a	100 a	11,9 a	1 a	1 a
0,6 /água F	0 b	0 b	0 b	0 b	98 a	13,09 a	1,07 a	0,94 a
0,6/0,3 F	0 b	0 b	0 b	0 b	12 b	1,26 c	0,85 a	0,68 a
0,6/0,6 F	0 b	0 b	0 b	0 b	0 c	0 c	0 b	0 b
0,6/0,9 F	0 b	0 b	0 b	0 b	0 c	0 c	0 b	0 b
0,6 /água S	1 b	1,25 b	0,05 b	0,04 b	97 a	10,23 b	1,11 a	0,9 a
0,6/0,3 S	1 b	1,25 b	0,05 b	0,04 b	0 c	0 c	0 b	0 b
0,6/0,6 S	3 b	2,5 b	0,1 b	0,1 b	0 c	0 c	0 b	0 b
0,6/0,9 S	1 b	1,3 b	0,1 b	0 b	0 c	0 c	0 b	0 b
CV (%)	38,77	90,26	52,2	48,55	16,52	13,51	46,01	41,05

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

As sementes que foram osmocondicionadas e posteriormente reumbebidas em água, tanto as que passaram por secagem como as frescas apresentaram valores brutos de germinação próximos ao controle, 95% e 98% respectivamente (Figura 18). Estes dois tratamentos, não apresentaram diferença estatística em relação ao controle, apenas o tratamento das sementes que passaram por secagem, diferiu estatisticamente do controle em relação ao parâmetro do IVG.

No entanto, se considerado os dados brutos, em todos os parâmetros, apesar de não apresentar diferença estatística, os dados não foram superiores ou similares ao controle, com exceção do IVG das sementes frescas, o qual foi superior ao controle. O que demonstra que para nenhum dos potenciais testados, houve um efeito de *priming* demonstrando envigoroamento das sementes em resposta ao osmocondicionamento.

Figura 18: Germinação das sementes de mamona durante osmocondicionamento.



Fonte: A autora. Germinação (%) das sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 durante osmocondicionamento no potencial -0,9 MPa, durante subsequente reumbebição em água, e durante subsequente reumbebição sob restrição hídrica a -0,3, -0,6 e -0,9 MPa.

Tabela 6. Germinabilidade das sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 durante osmocondicionamento a -0,9 MPa, durante subsequente reumbebição em água e subsequente reumbebição sob restrição hídrica a -0,3, -0,6 e -0,9 MPa. G%: percentual de germinação, IVG: índice de velocidade de germinação, Tm: tempo médio de germinação, Vm: velocidade média de germinação.

Tratamento	Tratamento inicial				Após reumbebição			
	G (%)	IVG	Tm (dias)	Vm (dias-1)	G (%)	IVG	Tm (dias)	Vm (dias-1)
Água	100 a	11,9 a	1 ab	1 ab	100 a	11,9 a	1 a	1 a
0,9 /água F	2 b	2,5 b	0,1 b	0,07 b	95 a	13,1 a	1,1 a	1 a
0,9/0,3 F	0 b	0 b	0 b	0 b	13 b	1,4 c	1,1 a	0,9 a
0,9/0,6 F	0 b	0 b	0 b	0 b	1 c	0,1 c	0,5 b	0,1 b
0,9/0,9 F	0 b	0 b	0 b	0 b	0 c	0 c	0 b	0 b
0,9 /água S	2 b	2,5 b	0,1 b	0,07 b	98 a	10,37 b	1,06 a	0,95 a
0,9/0,3 S	2 b	2,5 b	0,1 ab	0,07 ab	0 c	0 c	0 b	0 b
0,9/0,6 S	4 b	3,75 b	0,14 a	0,15 b	0 c	0 c	0 b	0 b
0,9/0,9 S	3 b	2,5 b	0,1 ab	0,1 ab	0 c	0 c	0 b	0 b
CV (%)	34,87	71,4	129,87	40,35	13,91	14,98	63,97	23,34

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

O *priming* consiste na hidratação controlada das sementes, iniciando os processos metabólicos pré-germinativos, sem, contudo, promover a protrusão radicular. É considerado um tipo especial de tratamento pré-germinativo que causa um prolongamento da fase II. Devido a este padrão de absorção limitada de água (em que há quebra das moléculas de reserva e síntese de novos compostos para a germinação) sem ocorrer a emissão da raiz primária, após a reidratação é possível ocorrer uma melhora no desempenho germinativo, aumentando o percentual, velocidade e uniformidade de germinação (CHEN e ARORA., 2012).

Em um estudo sobre a resposta ao osmocondicionamento em sementes de trigo (*Triticum aestivum* – Poaceae) os resultados mostraram que a utilização de PEG 8000 melhorou a germinação das sementes e o estabelecimento das plântulas em comparação ao controle (sem tratamento) (GHIYASI et al., 2008).

O osmocondicionamento com a utilização de solução salina em *Calendula officinalis* (Asteraceae) e *Foeniculum vulgare* (Apiaceae) demonstrou que o tratamento com NaCl e GA₃ pode resultar em uma reação metabólica adequada e melhorar o desempenho da germinação e estabelecimento de plântulas (SEDGHI et al., 2010). Em sementes de *Oryza sativa* L. (Poaceae) o osmocondicionamento utilizando CaCl₂ e NaCl resultou em melhorias na germinação, velocidade de germinação e índice de velocidade de germinação (ISLAM et al., 2012).

O efeito do *priming* em sementes de *Oryza sativa* L. (Poaceae) de várias cultivares sob estresse hídrico, causou em intensidade moderada, uma melhoria no metabolismo das sementes, nos índices de germinação, na qualidade e tolerância à seca das mudas. Contudo estes efeitos variaram conforme os níveis do estresse aos quais as sementes foram submetidas, pois condições mais severas inibiram a germinação e causaram danos as mudas (SUN et al, 2010).

Em sementes de *Helianthus annuus* L. (Asteraceae) uma planta oleaginosa, foram testados métodos de hidrocondicionamento e osmoscondicionamento com KNO₃, sendo que o hidrocondicionamento se mostrou mais eficiente devido aos melhores resultados de porcentagem de germinação, índice de germinação e vigor das plântulas (POHAJA et al., 2013).

Sementes de *Cuminum cyminum* L. (Apiaceae) foram tratadas através do hidrocondicionamento e osmocondicionamento com NaCl, Na₂SO₄ e ZnSO₄ para verificar a tolerância a condições salinas, resultando em um aumento da germinação e crescimento das plântulas sob estresse salino em resposta ao hidrocondicionamento (NEAMATOLLAHI et al., 2009).

O osmocondicionamento aplicado em sementes de *Brassica napus* L. (Brassicaceae) melhorou a maioria dos parâmetros analisados entre as cultivares testadas, como taxa de germinação e estabelecimento de mudas. Este pré-tratamento foi recomendando pelos autores como benéfico, utilizando o osmoncondicionamento com KNO₃ por 12 horas (SABER et al., 2012).

Foi observado que sementes condicionadas de *Glycine max* L. (Fabaceae) apresentaram melhor resposta aos parâmetros de germinação em relação ao controle (sem tratamento) (SADEGHI et al., 2011).

No estudo das sementes de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae), o pré-condicionamento osmótico com PEG 8000 no potencial -0,8 MPa não foi eficaz para a melhoria da qualidade e vigor das sementes, não obtendo-se um efeito de *priming* (BRITO, 2010).

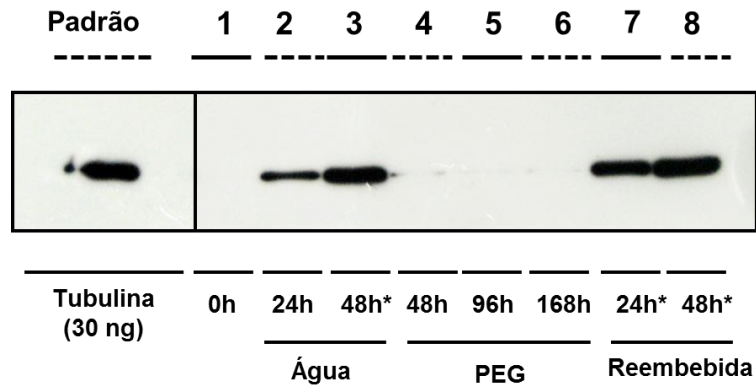
No presente estudo, as sementes de *Ricinus communis* L. também da família Euphorbiaceae não apresentaram resposta positiva ao efeito de envigoração nos diferentes tratamentos testados.

4.6. Imunodeteção de β -tubulina em sementes de mamona

A análise por western blotting possibilitou verificar que não houve acúmulo detectável da proteína β -tubulina em radículas de sementes secas, ao passo que houve acúmulo crescente da β -tubulina em radículas de sementes de mamona embebidas em água, sendo que o conteúdo acumulado de β -tubulina foi menor em 24h de embebição, e maior em 48h quando comparado ao conteúdo de 30 ng do padrão controle de tubulina bovina (55 kDa) (Figura 19, linhas padrão, 1, 2 e 3). Não houve acúmulo detectável de β -tubulina em radículas das sementes submetidas ao osmocondicionamento nos períodos de 48, 96 e 168 horas, mantendo-se o padrão observado em sementes secas (Figura 19, linhas 4, 5 e 6). Ao passo, que houve acúmulo de β -tubulina em radículas das sementes que foram osmocondicionadas e subsequentemente reembebidas, sendo o acúmulo de β -tubulina maior após 24 e 48 horas de reidratação quando comparado a estes mesmos períodos de embebição em sementes não osmocondicionadas, embebidas diretamente em água (Figura 19, linhas 7 e 8 respectivamente).

Estes resultados indicam que o condicionamento em PEG 8000 (-1,0 MPa) induz aumento no nível de β -tubulina, o que representa um nível de reativação mais intenso do ciclo celular durante a reidratação de sementes osmocondicionadas em água quando comparado às sementes não osmocondicionadas.

Figura 19: Acúmulo de β -tubulina em radículas embrionárias durante a embebição e germinação de sementes de mamona cv. EBDA MPA 11.



Fonte: A autora. Linha Padrão: tubulina pura de cérebro bovino (30ng) massa molecular de 55 KDa. Linha 1: semente seca (0h); Linha 2: semente embebida em água por 24h; Linha 3: semente embebida em água por 48h*; Linha 4: semente embebida em solução de PEG 8000 (-1,0 MPa) por 48h; Linha 5: semente embebida em solução de PEG 8000 (-1,0 MPa) por 96h; Linha 6: semente embebida em solução de PEG 8000 (-1,0 MPa) por 168h; Linha 7: semente osmocondicionada em solução de PEG 8000 (-1,0 MPa) por sete dias e reembecida em água durante 24h*; Linha 8: semente osmocondicionada em solução de PEG 8000 (-1,0 MPa) por sete dias e reembecida em água durante 48h*. * indica sementes germinadas.

O estudo da proteína tubulina tem sido utilizado como marcador molecular com a finalidade de se detectar níveis de atividade do ciclo celular, com pesquisas relacionadas ao desenvolvimento, germinação e dormência, envigoroamento (*'priming'*) e tolerância à dessecação em sementes (DE CASTRO et al., 1995,1998, 2000, 2001; SACANDÉ et al., 1997; GORNIK et al., 1997; JING et al., 1999; PAWLOWSKI et al, 2004; SILVA et al., 2008; CARVALHO et al., 2013).

Silva et al (2008) no estudo com embriões de sementes de *Coffea arabica* (Rubiaceae) verificou que o acúmulo de β -tubulina aumentou conforme o tempo de embebição em água a partir de 72 horas, sendo que houve aumento acentuado nos níveis de β -tubulina após a protrusão da radícula.

Em *Acer platanoides* L. (Aceraceae) durante um estudo sobre quebra de dormência, foi detectado acúmulo de β -tubulina nas sementes secas dessa espécie. Após embebição em água houve um aumento simultâneo do conteúdo de β -tubulina, sendo que nas sementes germinadas o nível da tubulina foi o mais elevado (PAWLOWSKI et al., 2004).

Embriões das sementes secas de *Cucumis sativus* L. (Cucurbitaceae) as sementes secas apresentaram um pequeno acúmulo de β -tubulina, sendo observado um aumento nos níveis dessa proteína após 12 horas de embebição. Um sinal bastante intenso foi detectado em sementes germinadas, evidenciando um alto conteúdo de β -tubulina nessa fase (JING et al., 1999).

No estudo com embriões de sementes de dois acessos de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae), uma espécie nativa do semiárido, Brito (2010) verificou ausência de sinal detectável de tubulina em radículas de sementes secas de um dos acessos, e um sinal baixo, porém significativo de conteúdo de tubulina em radículas de sementes secas de outro acesso, sendo que houve acúmulo crescente dos níveis de tubulina conforme o tempo de embebição até a germinação. O conteúdo de tubulina detectado em sementes secas de um dos acessos foi considerado normal, uma vez que essa proteína faz parte da estrutura celular, resultando de uma variação possível dentre acessos. Foi verificado também um acúmulo crescente, porém reduzido de tubulina nas radículas embrionárias durante osmocondicionamento (PEG 8000 a -0,8 MPa) de sementes dos dois acessos de sementes de pinhão manso analisados (BRITO, 2010).

De Castro et al (2000) estudando sementes de *Lycopersicon esculentum* Mill. (Solanaceae) não detectou acúmulo da β -tubulina nas sementes secas (0h), sendo detectado este acúmulo crescente em sementes submetidas à embebição a partir de 12h, sendo o conteúdo máximo detectado em sementes germinadas. Sendo que em sementes de tomate osmocondicionadas e posteriormente reembebidas em água os níveis de β -tubulina revelaram-se significativamente maiores.

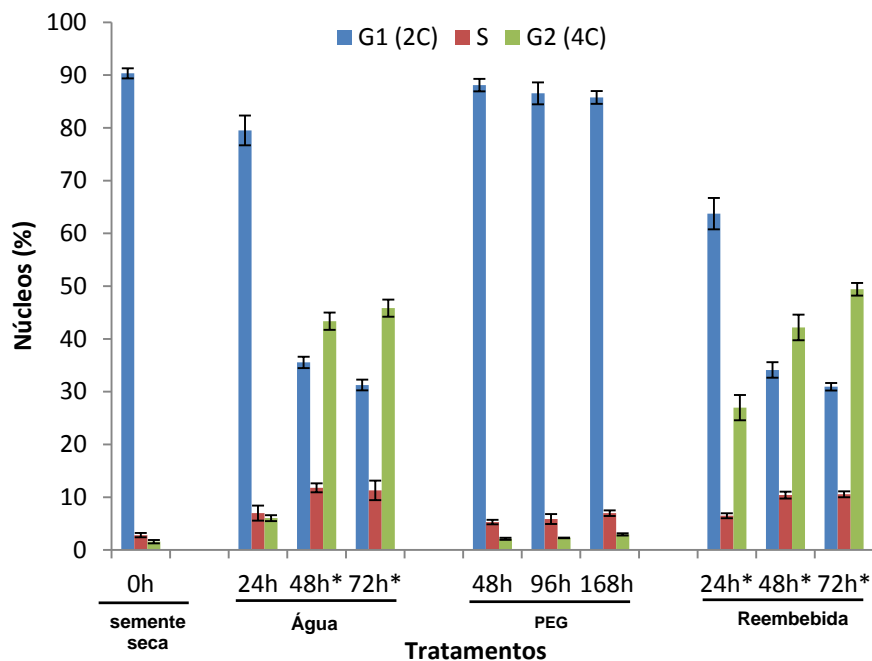
Os perfis de acúmulo de β -tubulina encontrados no presente estudo para sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 nos diferentes tratamentos seguiram em geral os padrões reportados para outras espécies (DE CASTRO et al., 1995, 1998,

2000, 2001; JING et al., 1999; PAWLOWSKI et al., 2004; SILVA et al., 2008; BRITO, 2010).

4.7. Conteúdo de DNA nuclear em radículas de sementes de mamona

Os resultados obtidos através das análises de citometria de fluxo a partir de núcleos celulares extraídos de células das radículas de embriões de sementes de mamona revelaram que nas sementes secas (0h) o percentual de células na fase G0/G1 foi de 90%, demonstrando que o conteúdo nuclear foi predominante de DNA 2C (Figura 20).

Figura 20: Conteúdo de DNA nuclear em diferentes fases da interfase no ciclo celular em radículas embrionárias durante a embebição e germinação de sementes de mamona cv. EBDA MPA 11.

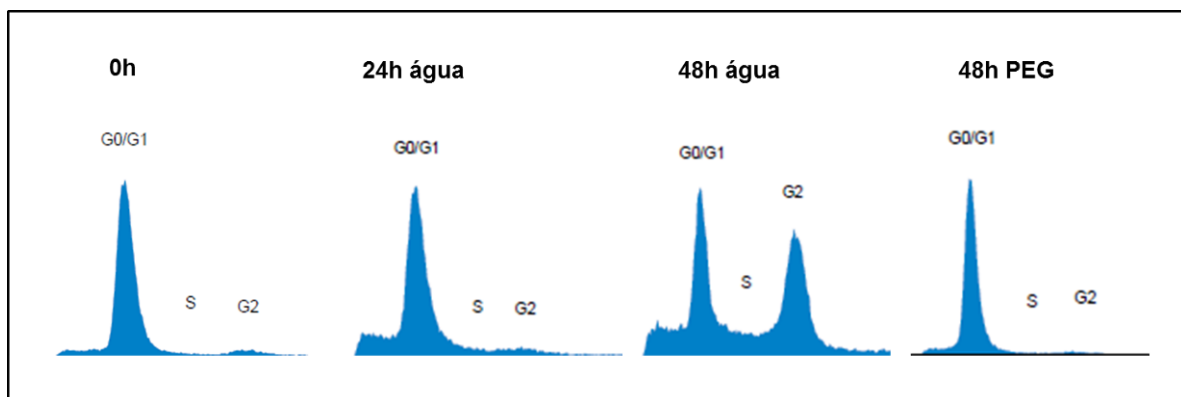


Fonte: A autora. Sementes secas (0h), sementes embebidas em água (24h, 48h*, 72h*), sementes embebidas em solução de PEG 8000 (potencial -1,0 MPa) durante 48h, 96h e 168h, e sementes embebidas em solução de PEG 8000 (potencial -1,0 Mpa) durante sete dias e depois reembebidas em água por 24h*, 48h*, 72h*. * Indicam sementes germinadas.

Após 24h de embebição das sementes em água foi observada uma pequena diminuição na frequência de núcleos com DNA 2C nas fases G0/G1. Tanto na fase G2 como na fase S foi detectado um pequeno aumento na proporção de núcleos com DNA 4C. Em sementes embebidas em água nos períodos de 48h e 72h, com radículas protruídas, a porção relativa de núcleos com DNA 4C aumentou bastante, indicando grande atividade de replicação de DNA na fase G2, associada a reativação do ciclo celular (Figura 20).

Durante o processo de embebição das sementes, na fase II, que consiste em um intervalo de preparação e ativação metabólica, ocorre a síntese e duplicação de DNA (2C a 4C) (DE CASTRO e HILHORST, 2004). No presente estudo foi verificado que as sementes de mamona entraram na fase II do processo de embebição com 24 horas.

Figura 21: Conteúdo de DNA nuclear em diferentes fases da interfase no ciclo celular.



Fonte: A autora. Histogramas identificando fases da interfase: G0/G1 (DNA: 2C), S (síntese), G2 (DNA: 4C). Semente seca (0h); semente embebida em água por 24 h e 48h (germinada); semente embebida em solução de PEG 8000 (-1,0 MPa) por 48h.

Nas sementes submetidas à restrição hídrica com solução de PEG 8000 no potencial -1,0 MPa, embebidas nos períodos de 48h, 96h e 168h observou-se grande percentual dos núcleos na fase G0/G1 com conteúdo de DNA 2C (Figura 20). Estes dados indicam que em condição de restrição hídrica, a maioria dos núcleos encontra-se retidos na fase G1, impedindo a progressão do ciclo celular e

consequentemente do processo germinativo. Este padrão equivale àquele encontrado nos núcleos das células das sementes secas (0h) (Figura 20).

Nas radículas de sementes que foram osmocondicionadas e posteriormente reidratadas em água durante 24h, 48h e 72h foi observado que o conteúdo de DNA 4C (fase G2) aumentou concomitantemente com o tempo de embebição em água, indicando reativação do ciclo celular (Figura 20).

Os núcleos extraídos das radículas de sementes reidratadas por um período de 24h (24h reid) e que foram inicialmente osmocondicionadas, apresentaram um aumento significativo do conteúdo de DNA 4C. Este resultado mostrou-se superior quando comparado aos dados apresentados pelos núcleos das radículas de sementes não osmocondicionadas embebidas por 24h em água (Figura 20).

As radículas de sementes de mamona embebidas diretamente em água nos períodos de 48h e 72h apresentaram o mesmo padrão percentual (30 a 35%) de núcleos com conteúdo de DNA 4C (fase G2) em comparação com as sementes osmocondicionadas e reidratadas em água por um mesmo período. A amostra de núcleos referente ao período de 72h reid apresentou uma maior porcentagem de DNA 4C (49%) em relação ao período de 72h água (45%), porém esses valores não foram significativos (Figura 20).

O conteúdo de DNA 4C em radículas de sementes secas (0h) de *Medicago truncatula* (Fabaceae) revelou-se elevado (45%), se mantendo neste nível durante a germinação e crescimento radicular até 2 mm (FARIA et al., 2005). Já em radículas de sementes secas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. Solanaceae) foi encontrada uma maior parcela de núcleos com DNA 2C (fase G1) em relação ao conteúdo de DNA 4C (fase G2), sendo que durante a embebição em água a quantidade de DNA 4C aumentou significativamente (DE CASTRO et al., 2000). Em sementes de tomate osmocondicionadas e germinadas com 24h de reembebição em água foi observado um aumento significativo no conteúdo de DNA 4C em relação às sementes não osmocondicionadas e que germinaram com 48h quando embebidas diretamente em água (DE CASTRO et al., 2000). Por outro lado, Gurusinghe et al. (1999), não detectaram um aumento do conteúdo de DNA nuclear 4C durante o

envigoramento de sementes de tomate, concluindo que o aumento de núcleos com DNA 4C não é essencial para o progresso da germinação.

Sementes secas de *Coffea arábica* (Rubiaceae) demonstraram um baixo conteúdo de DNA 4C indicando que a maioria das células estavam na fase G1 do ciclo celular. Até o período de 9 dias de embebição em água, houve um aumento contínuo no conteúdo de DNA 4C, contudo, após a protrusão radicular houve um aumento significativo, dobrando o conteúdo de DNA 4C no núcleo das células (SILVA et al., 2008).

De acordo Soares (2012), a explicação para os baixos níveis de DNA 4C em sementes secas pode ser devido ao efeito da dessecação ao final do processo de maturação de sementes ortodoxas, pois conforme Deltour (1985), quando as sementes sofrem desidratação, o conteúdo de água nas células embrionárias decai rapidamente, reduzindo o metabolismo e aumentando a viscosidade citoplasmática, tornando inviável a formação de estruturas essenciais para a atividade do ciclo celular.

Em embriões extraídos de sementes secas de *Acer platanoides* L. (Aceraceae), foram detectados núcleos com conteúdo de DNA 2C (fase G1), DNA 4C e DNA 8C (fase G2), sendo essas alterações consequências do efeito de endorreduplicação (PAWLOWSKI et al., 2004). Em núcleos isolados de sementes secas de *Arabidopsis* foi detectado um elevado conteúdo de DNA 2C. Após 8 horas de embebição estes níveis foram alterados para DNA 4C, sendo a maior frequência observada com 40 horas de embebição em água, pouco antes ou coincidindo com a protrusão da raiz (BARROCO et al., 2005).

Células isoladas de embriões de sementes secas de diferentes espécies apresentam maior conteúdo de DNA nuclear de DNA 2C na fase G1, implicando que durante a formação do embrião, o controle do desenvolvimento impõe uma parada da proliferação celular no final da mitose ou início da fase G1. Esta característica não é um requisito para todas as células, pois algumas param na fase G2 ou até mesmo na fase S (VAZQUEZ-RAMOS e SÁNCHEZ, 2003), ao passo que a embebição e germinação das sementes envolve a síntese e a ativação de um número reduzido de proteínas no núcleo durante o ciclo celular. Isto é suficiente para

desencadear a replicação do DNA, mas não para acionar células em mitose (BARROCO et al., 2005).

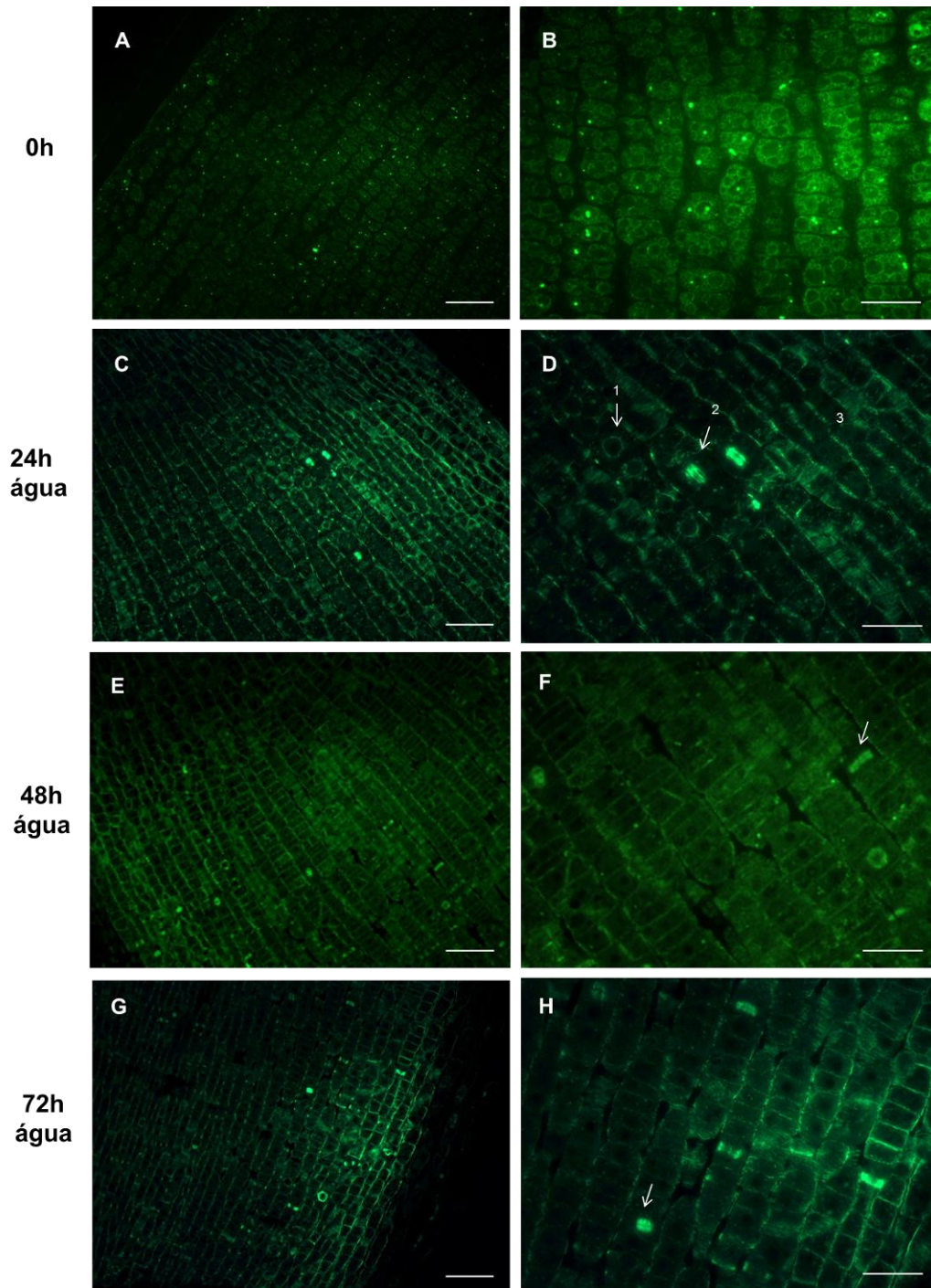
O osmocondicionamento, mesmo quando aplicado por um período prolongado de tempo, impede a germinação por processos associados à restrição do alongamento e protrusão da radícula, mas não à replicação do DNA. A taxa de replicação do DNA durante o condicionamento depende do teor de água das sementes, bem como da temperatura e disponibilidade de oxigênio (SLIWINSKA et al., 2009).

O aumento da frequência de núcleos com conteúdo de DNA 4C na fase G2, extraídos de sementes reidratadas em água por 24h e 48h após o tratamento de osmocondicionamento corroboram com o aumento verificado no acúmulo da proteína tubulina nestes mesmos períodos. Estes resultados demonstram que o osmocondicionamento melhorou neste aspecto o desempenho das atividades celulares nas sementes avaliadas.

4.8. Análise Imunocitoquímica do citoesqueleto microtubular em sementes de mamona

Na região meristemática das radículas de sementes secas de mamona cv. EBDA MPA 11, verificou-se apenas a presença de poucos grânulos fluorescentes da proteína α -tubulina dispersos no citoplasma das células (Figura 22 A-B). Ao passo que foi possível verificar em radículas de sementes com 24h de embebição em água acúmulo em abundância de citoesqueleto microtubular em configurações corticais, assim como foi possível verificar ocorrência de algumas células com configurações mitóticas, sendo que as sementes neste período ainda não estavam germinadas (Figura 22 C-D). A quantidade de células em configurações mitóticas diversas foi maior à medida que avançou o período de embebição culminando com a protrusão da radícula em sementes germinadas a partir 48h de embebição (Figura 22 E-H).

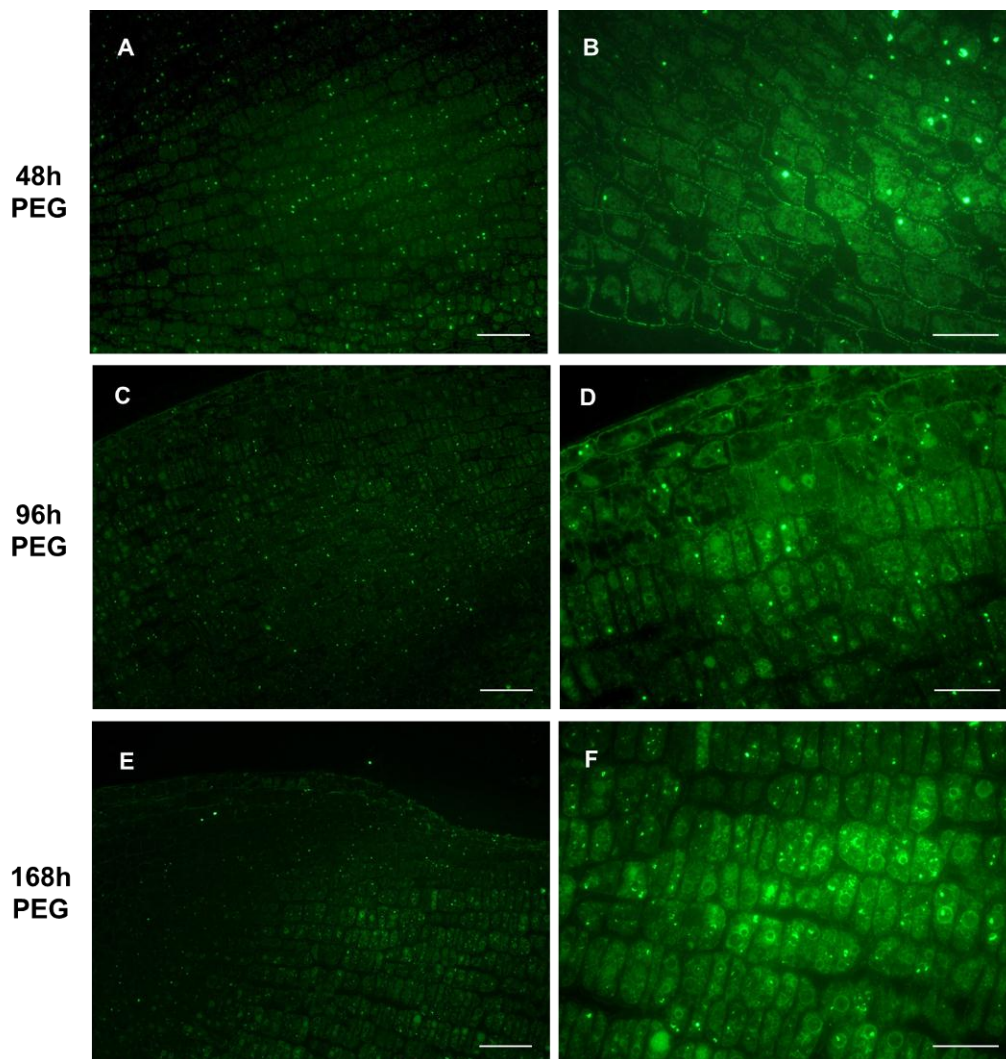
Figura 22: Fotomicrografias de fluorescência representativas das configurações e reorganização do citoesqueleto microtubular em radículas embrionárias durante a embebição e germinação de sementes de mamona cv. EBDA MPA 11 em água.



Fonte: A autora. Seções longitudinais. A – B: Semente seca 0h; C – H: sementes embebidas em água; C – D: sementes embebidas por 24h (não germinadas); E – F: sementes embebidas por 48h (germinadas). G – H: sementes embebidas por 72h (germinadas). As setas indicam configurações mitóticas durante a divisão celular (D1: banda pré-prófase; D2: prófase; D3: citoesqueleto cortical; F: fragmoplasto; H- prófase). Barras indicam 50 μm (A, C, E, G) e 25 μm (B, D, F, H).

Não foi visualizado acúmulo de microtúbulos durante todo o período de 168h de osmocondicionamento em PEG 8000 (-1,0 MPa), para condições de restrição hídrica, sendo detectado apenas alguns grânulos da proteína tubulina, sendo este padrão similar ao encontrado nas células de sementes secas (0h) sem osmocondicionamento (Figura 23 A-F).

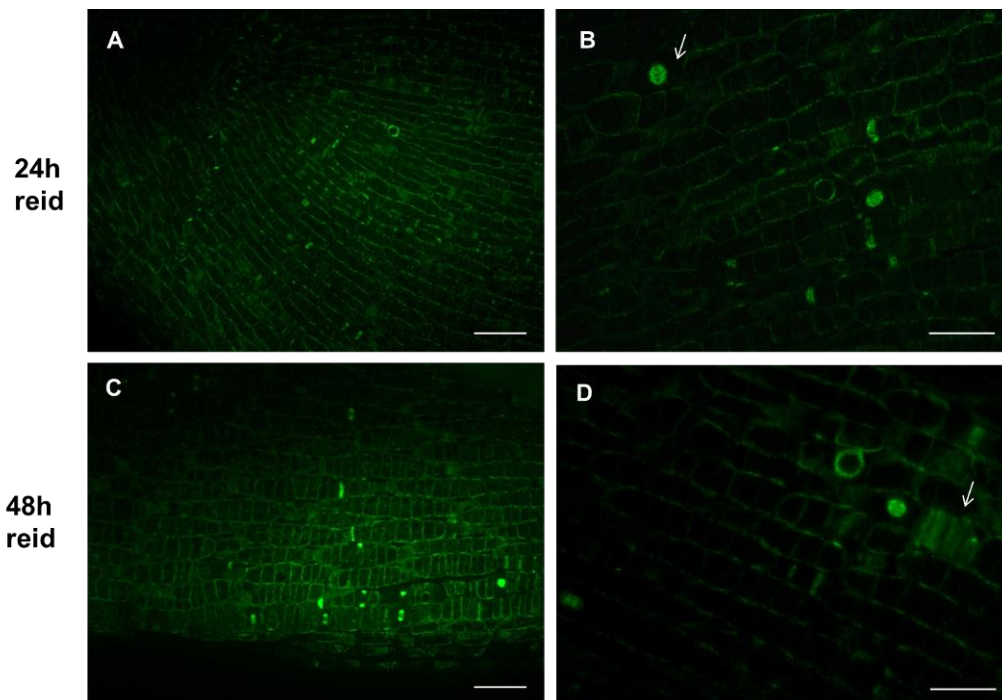
Figura 23: Fotomicrografias de fluorescência representativas das configurações e reorganização do citoesqueleto microtubular em radículas embrionárias durante o osmocondicionamento de sementes de mamona cv. EBDA MPA 11.



Fonte: A autora. Seções longitudinais de sementes embebidas em solução de PEG 8000 (-1,0 MPa) simulando a restrição hídrica. A – B: sementes embebidas por 48h; C – D: sementes embebidas por 96h. E – F: sementes embebidas por 72 h. Barras indicam 50 μ m (A, C, E, G) e 25 μ m (B, D, F, H).

Foi observado intenso acúmulo de microtúbulos em sementes osmocondicionadas, e que em seguida, foram reembebidas em água por 24h e 48h de embebição, sendo que foi possível verificar intensa ocorrência de configurações corticais assim como grande número de células com configurações mitóticas superior ao verificado nas sementes não osmocondicionadas nos mesmos períodos de embebição em água (Figura 24 A-D).

Figura 24: Fotomicrografias de fluorescência representativas das configurações e reorganização do citoesqueleto microtubular em radículas embrionárias de mamona cv. EBDA MPA 11 durante a reidratação em água após osmocondicionamento.



Fonte: A autora. Seções longitudinais de sementes embebidas em solução de PEG 8000 (-1,0 MPa) durante 168h e subsequentemente reidratadas em água. A – B: sementes reidratadas por 24h (germinadas); C – D: sementes reidratadas por 48h (germinadas). Setas indicam configurações mitóticas durante a divisão celular (B - prófase; D – citoesqueleto cortical). Barras indicam 50 μ m (A, C, E, G) e 25 μ m (B, D, F, H).

Microtúbulos podem ser utilizados para demonstrar a dinâmica das mudanças estruturais durante a progressão do ciclo celular em células vegetais superiores,

onde desempenham importantes papéis na morfogênese celular, podendo variar na formação das matrizes de microtúbulos tanto em configurações corticais, como configurações mitóticas dentre as quais, bandas pré-prófase e o fragmoplasto são estruturas encontradas somente em plantas (HASEZAWA e KUMAGAI, 2002).

A ocorrência de matrizes específicas como as bandas pré-prófase e o fragmoplasto, podem ser consideradas como marcadores exclusivos para a mitose, contudo, a visualização das matrizes de microtúbulos corticais permite a identificação do alongamento das células (BARRÔCO et al, 2005).

Em um estudo com sementes de *Arabidopsis thaliana* L. (Brassicaceae), Barrôco et al (2005) verificaram que as sementes secas não apresentaram microtúbulos organizados dispersos no citoplasma, apresentando uma organização apenas após a embebição. De Castro et al (2000) também não detectou a proteína tubulina em embriões de sementes secas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.- Solanaceae), somente após a embebição. Em sementes secas de *Coffea arábica* L. (Rubiaceae) observou-se grânulos de tubulina presente em sementes secas e também o seu acúmulo durante a embebição e germinação (SILVA, et al 2008). Nas sementes secas de *Medicago truncatula* (Fabaceae) e *Inga vera* (Fabaceae) foi verificada a presença de grânulos de tubulina e este aspecto foi associado à despolimerização de microtúbulos (FARIA et al, 2005; FARIA et al, 2006).

De Castro et al. (2000), observou que em sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) matrizes microtubulares mitóticas apareceram na região do ápice radicular antes mesmo de ocorrer sua protrusão. Em sementes de mamona também foram observadas configurações mitóticas antes da protrusão da radícula, com 24 horas de embebição em água (Fig. 20 C-D). Outros estudos, no entanto, demonstram que durante a embebição de sementes, o crescimento inicial ocorre por expansão celular, mas a mitose só ocorre após a protrusão da raiz, ou seja, no início de crescimento das plântulas (FARIA et al, 2005; SLIWINSKA et al, 2009; BRITO, 2010; VARIER et al, 2010).

Nas sementes de *Jatropha curcas* L. (Pinhão-mansão), pertencente à mesma família da mamona, Euphorbiaceae, as divisões celulares só ocorreram após a protrusão radicular (BRITO, 2010). Nas sementes de *Medicago truncatula*

microtúbulos mitóticos indicando divisão celular também só foram encontrados após a protrusão da radícula (FARIA et al., 2005).

O estresse abiótico aplicado em plantas pode resultar em alterações no citoesqueleto microtubular modificando o crescimento das plantas. Em um estudo com células das raízes de *Triticum turgidum* (Poaceae) foi verificado que o estresse hiperosmótico causou destruição dos microtúbulos ocasionando uma substituição por macrotúbulos e paracristais de tubulina, sendo uma característica comumente associada ao mecanismo de regulação do volume de protoplastos (KOMIS et al, 2002).

Xu et al. (2009) detectaram que a presença do cádmio afetou o citoesqueleto microtubular das células da raiz de *Allium sativum* L. (Alliaceae), interferindo drasticamente nos mecanismos que controlam a organização do citoesqueleto microtubular, bem como os processos de polimerização e despolimerização da tubulina e induziu a formação de matrizes anormais, inibindo o crescimento das raízes.

Cádmio, metil-viologênio e peróxido de hidrogênio causam modificações pós-traducionais de proteínas relacionadas com o ciclo celular que podem estar envolvidas na redução do crescimento pós-germinativo da raiz em plântulas de trigo. O estresse oxidativo acelerou o deslocamento da zona de divisão celular para a zona de alongamento e diferenciação resultando em um meristema encurtado (PENA et al., 2002).

O déficit hídrico aplicado nas sementes de mamona não causou alterações no citoesqueleto microtubular, contudo também não foi observada acúmulo de microtúbulos, o que implica não ter ocorrido progressão do ciclo celular nas sementes embebidas na solução osmótica. No entanto, foi possível verificar melhoria no desempenho das sementes submetidas ao osmocondicionamento, uma vez que a protrusão radicular ocorreu em um período mais curto com 24 horas de embebição em água quando comparado às sementes não osmocondicionadas que iniciaram a protrusão radicular e germinação somente a partir de 48h de embebição em água (Figura 24 A-B).

Os dados referentes à organização do citoesqueleto microtubular corroboram com os resultados do acúmulo de tubulina obtidos por western blotting e da síntese de DNA analisada por citometria de fluxo. Esses elementos de certo modo expressam um maior desempenho das atividades celulares relacionadas ao ciclo celular nas sementes que passaram por um pré-tratamento de osmocondicionamento.

5. CONCLUSÕES

- O tratamento HIPO20sc é o mais eficaz para desinfestação superficial das sementes de mamona (cv. EBDA MPA 11), melhorando assim a qualidade sanitária das sementes;
- As sementes de mamona (cv. EBDA MPA 11) são sensíveis à restrição hídrica a partir do potencial -0,4 MPa, não demonstrando tolerância ao déficit hídrico durante a fase inicial do seu ciclo de vida;
- As sementes de mamona (cv. EBDA MPA 11) não apresentam efeito de “priming” em resposta ao osmocondicionamento para nenhum dos potenciais testados, pois não foram eficazes na melhoria do vigor das sementes, contudo influenciou positivamente aspectos relacionados ao ciclo celular;
- Nas sementes de mamona (cv. EBDA MPA 11) o acúmulo de tubulina ocorreu de acordo o aumento do conteúdo de DNA 4C nos núcleos das células e com a organização do citoesqueleto microtubular durante o período de embebição nos diferentes tratamentos;
- A restrição hídrica (tratamento por osmocondicionamento) impediu a reativação do ciclo celular, inibindo o progresso do processo germinativo;
- As divisões celulares nas radículas embrionárias das sementes de mamona ocorreram antes da protrusão radicular, indicando que o alongamento da radícula acontece por expansão e divisão celulares;

REFERÊNCIAS

- AA, E.; AL-NAMO, M. L. Effect of imposed drought on seedlings growth, water use efficiency and survival of three arid zone species (*Acacia tortilis* subsp raddiana, *Salvadora persica* and *Leptadenia pyrotechnica*). **Agric. Biol. J. N. Am.**, v.2, n°3, p. 493-498, 2011.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R.; ALBUQUERQUE, U. P. Uso e conservação de plantas e animais medicinais no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil): Um estudo de caso. **Interciência**, v.27, n°6, p.276-285, 2002.
- ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina**: bases clínicas e farmacológicas. Buenos Aires: Isis, 1998, 1039 p.
- AMORIM NETO, M. da S.; ARAÚJO, A. E. de; BELTRÃO, N. E. de M. Clima e solo. In: AZEVEDO, D. M. P de; LIMA, E. F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Informação Tecnológica, 2001. p.63-76.
- ARAÚJO, A. E. S.; CASTRO, A. P. G.; ROSSETO, C. A. V. Avaliação de metodologia para detecção de fungos em sementes de amendoim. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n°2, p.45-54, 2004.
- ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E. D. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.9, n°3, 1991.
- AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. S. **Recomendações técnicas para o cultivo da mamoneira (*Ricinus communis* L.) no Brasil**. Campina Grande: CNPA, 1997. 52p.
- AZEVEDO, D. M .P.; LIMA, E. F. (Ed.). **O Agronegócio da mamona no Brasil. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica**, 2007. 380 p.
- BABITA, M.; MAHESWARI, M.; RAO, L. M.; SHANKER, A. K.; RAO, D. G. Osmotic adjustment, drought tolerance and yield in Castor (*Ricinus communis* L.) hybrids. **Environmental and Experimental Botany**, v.69, p.243-249, 2010.
- BANZATTO, N.V.; CANÉCHIO FILHO, V.; SICHMANN, W. **Melhoramento da mamoneira (*Ricinus communis* L.)**. Campinas –São Paulo, Instituto Agrônômico de Campinas – IAC(Circular técnica 61), 1976, 17p.
- BARDINI, M.; LEE, D.; DONINI, P.; MARIANI, A.; GIANI, S.; TOSCHI, M.; LOWE, C.; BREVIARIO, D. Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. **Genome**, v.47, p.281-291, 2004.
- BARRÔCO, R. M.; POUCKE, K. V.; BERGERVOET, J. H. W.; DE VEYLDER, L.; GROOT, S. P. C.; INZE, D.; ENGLER, G. The Role of the Cell Cycle Machinery in Resumption of Postembryonic Development. **Plant Physiology**. V.137, p.127–140, 2005.
- BASKIN, T. I; BUSBY, C. H.; FOWKE, L. C.; SAMMUT, M.; GUBLER, F. Improvements in immunostaining samples embedded in metacrylate: localization of microtubules and

other antigens throughout developing organs in plants of diverse taxa. **Planta**, v.187, p.405-413, 1992.

BELTRÃO, N. E. M. **Torta de Mamona (*Ricinus communis* L.): Fertilizante e alimento**. Comunicado Técnico 171, p.1-6, Campina Grande, PB, Dezembro, 2002.

BELTRÃO, N. E. M.; SOUZA, J. G.; SANTOS, J. W.; COSTA, F. X.; LUCENA, A. M. A.; QUEIROZ, U. C. Modificações na bioquímica da planta da mamoneira, cultivar BRS 149 nordestina, na fase inicial de crescimento, submetida a estresse hídrico. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 7, n. 1, p.653-658, 2003.

BELTRÃO, N. E. de M.; CARTAXO, W. V.; PEREIRA, S. R. P.; SOARES, J. J.; SILVA, O. R. R. F.; **O cultivo sustentável da mamona no semiárido brasileiro**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Campina Grande: Embrapa CNPA, 23p. Circular técnica, 84, 2005.

BELTRÃO, N. E. M.; OLIVEIRA, M. I. P. **Ecofisiologia das culturas de algodão, amendoim, gergelim, mamona, pinhão-manso e sisal**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011, 322 p.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. Second Edition. Plenum Press, New York, 1994.

BIODIESEL. **Produção mundial de mamona**. Disponível em <http://www.biodieselbr.com/plantas/mamona/producao-mundial-mamona.htm> Acesso em: 30/03/2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding. **Anal Biochem**. v.72, p.248-254, 1976.

BRADFORD, K.; NONOGAKI, H. **Seed development, dormancy, and germination**. Annual Plant Reviews, V.27, 2007, 389 p.

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

BRITO, Cristiane Dantas de. **Germinabilidade de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Sob restrição hídrica: aspectos fisiológicos, moleculares e citológicos**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, 2010.

CARVALHO, B. C. L. **Manual do cultivo da mamona**. Salvador: EBDA, 2005. 65 P. il.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes, Ciência, Tecnologia e Produção**. 4º Ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000, 588p.

CARVALHO, J. M. F. C.; PIO, K. B.; SANTOS, J. W.; ALMEIDA, F. A. C. Germinação e contaminação de sementes de mamoneira in vitro mediante quebra de dormência e desinfecção. **Rev. Bras. Ol. Fibros.**, v.6, nº1, p.483-490, 2002.

CARVALHO, M. L. M.; VIEIRA, M. G. G. C.; PINHO, E. R. V. Técnicas moleculares em sementes. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, UFLA. Disponível em < http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio17/17_tmtes.pdf>, Acesso em: 20.07.2013.

- DE CASTRO, R. D.; ZHENG, X.; BERGERVOET, J. H. W.; RIC DE VOS, C. H.; BINO, R. J. β -Tubulin accumulation and DNA replication in imbibing tomato seeds. **Plant Physiology**, v.109, p.499–504, 1995.
- DE CASTRO, R. D.; HILHORST, H. W. M.; BERGERVOET, J. H. W.; GROOT, S. S. P. C.; BINO, R. J. Detection of β -tubulin in tomato seeds: optimization of extraction and immunodetection. **Phytochemistry**, v.47, n°5, p.689-694, 1998.
- DE CASTRO, R. D.; VAN LAMMEREN, A. A. M.; GROOT, S. P. C.; BINO, R. J.; HILHORST, H. W. M. Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. **Plant Physiology**, v.122, p.327–335, 2000.
- DE CASTRO, R. D.; HILHORST, H. W. M. Dormancy, germination, and the cycle cell in developing and imbibing tomato seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12 (Edição especial), p.105-136, 2000.
- DE CASTRO, R. D.; BINO, R. J.; JING, H. C.; KIEFT, H.; HILHORST, H. W. M. Depth of dormancy in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds is related to the progression of the cell cycle prior to the induction of dormancy. **Seed Science Research**, v. 11, p. 45-54, 2001.
- DE CASTRO, R. D.; HILHORST, H. W. M. **Embebição e reativação do metabolismo**. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). Germinação, do básico ao aplicado. Ed: Porto Alegre: Artmed, 2004, capítulo 9, v.1, p.149-162.
- CHEN, K.; ARORA, R. Priming memory invokes seed stress-tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, p.1-13, 2012.
- CHEEMA, N. M.; MALIK, M. A.; QADIR, G.; RAFIQUE, M. Z.; NAWAZ, N. Influence of temperature and osmotic stress on germination induction of different Castor bean cultivars. **Pak. J. Bot.** v.42, n°6, p.4035-4041, 2010.
- CONRATH, U. Molecular aspects of defence priming. **Trends in Plant Science**, v. 16, n°10, 2011.
- COOPMAN, V.; LEEUW, M. D.; CORDONNIER, J.; JACOBS, W. Suicidal death after injection of a Castor bean extract (*Ricinus communis* L.). **Forensic Science International**, v.189, p.13-20, 2009.
- DEMANT, C. A. R.; AULD, D.; DEMANT, A. R. M. Development of a bioassay to quantify the ricin toxin content of castor bean (*Ricinus communis* L.) seeds. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.34, n°4, p.397-402, 2012.
- DELTOUR, R. Nuclear activation during early germination of the higher plant embryo. **Journal of Cell Science**, v.75, p.43-83, 1985.
- DEWITTE, W.; MURRAY, J. A. H. The plant cell cycle. **Annu. Rev. Plant. Biol.** v.54, p.235-264, 2003.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA –**EMBRAPA**. Centro Nacional de Pesquisa em Algodão, CNPA -(Campina Grande, PB). Disponível em:<http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/apresentacao.html>. Acessado em 28/05/2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – **EMBRAPA**. Centro Nacional de Pesquisa em Algodão. Disponível em:<
http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/cadeia_produtiva_biodiesel.html>
Acessado em: 10/06/2013.

FANAN, Sheila. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de mamona em função das condições climáticas e da colheita**. 2008, 75 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical). Instituto Agrônomo (IAC), Campinas, São Paulo, 2008.

FARIA, J.R.B.; NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A.L.; MARIN, F. Modelagem para estimativa de perdas de rendimento de grãos de soja em função da disponibilidade hídrica. In: **Simpósio Internacional de Agricultura de Precisão**, 3. Sete Lagoas, 2005. Artigos. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, CD-rom, 2005.

FARIA, J. M. R.; BUITINK, J.; LAMMEREN, A. A. M. V.; HILHORST, H. W. M. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of Experimental Botany**, V. 56, nº. 418, p. 2119–2130, 2005.

FARIA, J. M. R.; DAVIDE, L. C.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C.; PEREIRA, R. C.; LAMMEREN, A. A. M. V.; HILHORST, H. W. M. Physiological and cytological aspects of *Inga vera* subsp. *affinis* embryos during storage. **Braz. J. Plant Physiol.** v.18, nº4, p.503-513, 2006.

FERNANDO, R.; FERNANDO, D. N. Poisoning with plants and mushrooms in Sri Lanka: a retrospective hospital based study. **Veterinary and human toxicology**, v.32, n.6, p. 579-581, 1990.

FERREIRA, D. F. **Sistema SISVAR para análises estatísticas: manual de orientação**. Lavras: Universidade Federal de Lavras/Departamento de Ciências Exatas, 2000, 66p.

FOOLAD, M.R. Recent advances in genetic of salt tolerance in tomato. **Plant cell Tiss. Org. Cult.**, v.76. p.101-119, 2004.

GARDINER, J.; OVERALL, R.; MARC, J. Plant microtubule cytoskeleton complexity: microtubule arrays as fractals. **Journal of Experimental Botany**, v.63, nº2, p.635-642, 2012.

GARCIA, S. B. F. Proteção das cultivares e das plantas transgênicas. **Revista Faz Ciência**, v.6, nº1, p.275-295, 2004.

GHIYASI, M.; SEYAHJANI, A. A.; TAJBAKSHS, M.; AMIRNIA, R.; SALEHZADEH, H. Effect of osmopriming with polyethylene glycol (8000) on germination and seedling growth of Wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds under salt stress. **Research Journal of Biological Science**, v.3, nº10, p.1249-1251, 2008.

GONÇALVES, E. G.; LORENZI, H. **Morfologia vegetal: organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2007, 416p.

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

- GURUSINGHE, S. N.; CHENG, Z.; BRADFORD, K. J. Cell cycle activity during seed priming is not essential for germination advancement in tomato. **Journal of Experimental Botany**, v.50, n°30, p.101-106, 1999.
- HASEZAWA, S.; KUMAGAI, F. Dynamic Changes and the Role of the Cytoskeleton during the Cell Cycle in Higher Plant Cells. **International Review of Cytology**. V.214, p.161-191, 2002.
- ISLAM, R.; MUKHERJEE, A.; HOSSIN, M. Effect of osmopriming on rice seed germination and seedling growth. **J. Bangladesh Agril. Univ.** v.10, n°1, p.15-20, 2012.
- JASPEREN-SCHIB, R.; GUIRGUIS-OESCHGER, M.; GOSSWEILER, B.; MEIER-ABT, P. J. Wichtige Pflanzenvergiftungen in der Schweiz 1966-1994. Eine Fallanalyse aus dem schweizerischen toxikologischen Informationszentrum. **Schweizerischen Medizinische Wochenschrift**, v.126, n.25, p.1085-1098, 1996.
- JING, H. C.; LAMMEREN, A. A. M. V.; CASTRO, R. D.; BINO, R. J.; HILHORST, H. W. M.; GROOT, S. P. C. β -tubulina accumulation and DNA synthesis are sequentially resumed in embryo organs of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds during germination. **Protoplasma**, v.208, p.230-239, 1999.
- JISHA, K. C.; VIJAYAKUMARI, K.; PUTHUR, J. T. Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. **Acta Physiol Plant**, v.35, p.1381-1396, 2013.
- JOOSEN, R. V. L.; KODDE, J.; WILLEMS, L. A. J.; LIGTERINK, W.; PLAS, L. H. W. V. D.; HILHORST, H. W. M. Germinator: a software package for high-throughput scoring and curve fitting of Arabidopsis seed germination. **The Plant Journal**, v.62, p.148-159, 2010.
- JUNIOR, Joel Martins Braga. **Maturação, qualidade fisiológica e testes de vigor em sementes de mamona**. 2009. 135 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, 2009.
- KIIHL, T. A. M. **Doenças em mamona (*Ricinus communis* L.)** APTA – Agência Paulista de de tecnologia das agronegócios, 2006. Disponível em: <http://www.aptaregional.sp.gov.br/artigo.php?id_artigo=215>, Acesso em: 20.05.2013.
- KERMODE, A. R. Approaches to elucidate the basis of desiccation-tolerance in seeds. **Seed Science Research**, v.7, p.75-95, 1997.
- KOBORI, N. N. **Tratamento fungicida e qualidade de sementes de mamona**. Tese apresentada ao Doutorado em Ciências, Área Fitotecnia, Piracicaba, 2011.
- KOMIS, G.; APOSTOLAKOS, P.; GALATIS, B. Hyperosmotic stress induces formation of tubulin microtubules in root-tip cells of *Triticum turgidum*: Their probable involvement in protoplast volume control. **Plant Cell Physiol**. v.43, n°8, p.911-922, 2002.
- KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic Press, 1995. 641 p.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

- LEYING, H. J.; HUBER, L.; HINZPETER, M. Detection of proteins with BM chemiluminescence western blotting system. **Biochemica**, v.1, p.10-12, 1994.
- LOUREIRO, M. B.; VIRGENS, I. O.; NUNEZ, I. A.; VILLAS-BOAS, A. C.; TELES, C. A. S.; PALMIERI, D. A.; DRUMOND, M. A.; CASTRO, R. D.; FERNANDEZ, L. G. **Efeito do estresse hídrico sobre a germinação de sementes de pinhão manso** (*Jatropha curcas* L.). In: II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2007, Brasília. Anais do II Congresso da Rede Brasileira de tecnologia de Biodiesel, 2007. v. único.
- LOUREIRO, J.; SANTOS, C. **Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal**. Métodos em Biotecnologia, Citometria de fluxo. Disponível em: <<http://cfe.uc.pt/files/Artigo.pdf>>, acesso em: 24.02.2013.
- LOWRI, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265-275, 1951.
- LUZ, Renata Pereira. **Caracterização morfofisiológica, molecular e agrônômica de cultivares de mamona**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2012.
- MACHADO, C. G.; MARTINS, C.C.; CRUZ, S. C. S.; NAKAGAWA, J.; PEREIRA, F. R. S. Posição do racemo e do fruto na qualidade fisiológica de sementes de mamona durante o armazenamento. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n.2, p.301-312, 2010.
- MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.444, p.139-158, 2005.
- MASSETO, T. E.; QUADROS, J. B.; RIBEIRO, D. M.; REZENDE, R. K. S.; SCALON, S. P. Q. Potencial hídrico do substrato de e teor de água das sementes na germinação do Crambe. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, nº3, p.511-519, 2011.
- MARRONI, I. V.; MOURA, A. B.; UENO, B. Chemical and biological treatments of Castor bean seeds: effects on germination, emergence and associated microorganisms. **Revista Brasileira de Sementes**, v.34, nº1, p.021-028, 2012.
- MONTELES, R.; PINHEIRO, C. U. B. Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica. **Rev.de Biologia e Ciências da Terra**, v.7, nº2, p.38-48, 2007
- MULLET, J. E.; WHITSITT, M. S. **Plant cellular responses to water deficit**. Journal of Plant Growth Regulation, v.20, nº.2, p.119-124, 1996.
- MDA, **SECRETARIA DA AGRICULTURA FAMILIAR**. Disponível em:<<http://www.mda.gov.br/portal/saf/programas/biodiesel/2286217>>, acesso em: 29/03/2012.
- MME, BODIESEL, **Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel**. Disponível em:<http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/programa/objetivos_diretrizes.html>, Acesso em: 09/08/2013.

- NEAMATOLLAHI, E.; BANNAYAN, M.; DARBAN, A. S.; GHANBARI, A. Hydropriming and osmopriming effects on Cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds germination. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v.57, p.526-529, 2009.
- NEJAD, H. A. The effects of seed priming techniques in improving germination and early seedling growth of *Aeluropus macrostachys*. **International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research**, v.1, n°2, p.86-95, 2013.
- NETO, A. F.; ALMEIDA, F. A. C.; GOUVEIA, J. P. G.; NÓBREGA, M. B. M.; CARNEIRO, R. M.; PEDROZA, J. P. Divergência genética em acessos de mamona (*Ricinus communis* L.) baseada nas características das sementes. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.4, n°2, p.1- 8, 2004.
- NILSEN, E.; ORCUTT, D. **The physiology of plants under stress**. New York,: John Wiley & Sons, 1996, 704p.
- NÓBREGA, M.B. de M. **Avaliação de genótipos de mamona (*Ricinus communis* L.) em cruzamentos dialélicos parciais**. 2008. 77f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, SP, 2008.
- PAWLOWSKI, T. A.; BERGERVOET, J. H. W.; BINO, R. J.; GROOT, S. P. C. Cell cycle activity and β -tubulin accumulation during dormancy breaking of *Acer platanoides* L. seeds. **Biologia Plantarum**, v.48, n°2, p.211-218, 2004.
- PENA, L. B.; BARCIA, R. A.; AZPILICUETA, C. E.; MÉNDEZ, A. A. E.; GALLEGRO, S. M. Oxidative post translational modifications of proteins related to cell cycle are involved in cadmium toxicity in Wheat seedlings. **Plant Science**, v. 196, p.1-7, 2012.
- PINHO, S. Z.; CARVALHO, L. R.; DELACHIAVE, M. E. A. Limit between stages I and II of a seed imbibition curve. **Scientia Agricola**, v.61, n°1, p.17-20, 2004.
- PINHO, D. M. M.; SUAREZ, P. A. Z. A hidrogenação de óleos e gorduras e suas aplicações industriais. **Rev. Virtual Quim.** V.5, n°1, p.47-62, 2013.
- PAHOJA, V. M.; SIDDIQUI, S. H.; NAREJO, M. U. N.; UMRANI, J. H. Response hydropriming and osmopriming on germination and seedling growth of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) under salt stress. **International Journal of Agriculture Science**, v.3, n°2, p.71-80, 2013.
- QUEIROGA, V. P.; SANTOS, R. F.; QUEIROGA, D. A. N. Levantamento da produção de mamona (*Ricinus communis* L.) em uma amostra de produtores em cinco municípios do Estado da Bahia. **Revista Agro ambiente on-line**, v.5, n°2, p.148-157, 2011.
- RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasil. Bot.** v.29, n°1, p.1-11, 2006.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Editora Guanabara Koogan, 6ª edição. 2001, 906 p.
- RITTER, M. R.; SOBIERAJSKI, G. R.; SCHENKEL, E. P.; MENTZ, L. A. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Rev. Brasileira de Farmacognosia**, v.12, n.2, p.51-62, 2002.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997.

ROCHA, G. R. **Efeito da temperatura e do potencial hídrico na germinação de sementes de doze cultivares de Feijão-Mungo-Verde (*Vigna radiata* L.)**. Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias/ Agronomia UNESP- Jaboticabal-SP, 1996.

ROCHA, M. S.; OLIVEIRA, K. C.; COSTA, M. N.; CUNHA, A. O.; CARVALHO, J. M. F. C.; SANTOS, J. W. Métodos de regeneração in vitro de mamoneira a partir de diferentes de explantes. **Revista Brasileira de Oleaginosas Fibrosas**, v.7, n°1, p.647-652, 2003.

RODRIGUES, H. C. H.; CARVALHO, S. P.; CARVALHO, A. V.; SANTOS, C. E. M.; FILHO, J. L. S. C. Correlações genotípicas, fenotípicas e ambientais entre caracteres de mamoneira. **Ciênc. Agrotec.** v.34, n°6, p.1390-1395, 2010.

SABER, Z.; PIRDASHTI, H.; HEIDARZADE, A. Osmopriming and hydropriming effects on seed and seedling parameters of two Rapeseed (*Brassica napus* L.) cultivars. **International Journal of Agriculture: Research and Review**, v.2, n°5, p.547-554, 2012.

SACANDÉ, M.; DE CASTRO, R. D.; GROOT, S. P. C.; HOEKSTRA, F. A.; BINO, R. J. Cell cycle events in developing neen (*Azadirachta indica*) seeds: are they related to intermediate storage behavior?. **Seed Science Research**, v.7, p.161-168, 1997.

SADEGHI, H.; KHAZAEI, F.; YARI, L.; SHEIDAEI, S. Effect of seed osmopriming on seed germination behavior and vigor of soybean (*Glycine max* L.). **Journal of Agriculture and Biological Science**, v.6, n°1, 39-43, 2011.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. **Análise da germinação: um enfoque estatístico**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2004, 248p.

SAVY FILHO, A. **Melhoramento da mamona**. In: **BORÉM, A. Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora: Universidade Federal de Viçosa, 1999. p. 383-407.

SCHENKEL, E. P.; ZANNIN, M.; MENTZ, L. A.; BORDIGNON, S. A. L.; IRGANG, B. Plantas tóxicas In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS; Florianópolis, Editora da UFSC, p.755-788, 2000.

SCHMIDT, D. A. M.; MAIA, L. C.; SILVA, J. A. G. Mamona. In: BARBIERE, R. L.; STUMPF, E. R. T. **Origem e Evolução de Plantas Cultivadas**, Embrapa, 2008, 909p.

SEDGHI, M.; NEMATI, A.; ESMAIELPOUR, B. Effect of seed priming on germination and seedling growth of two medicinal plants under salinity. **Emir. J. Food Agric**, v.22, n°2, p.10-139, 2010.

SEO, M.; NAMBARA, E.; CHOI, G.; YAMAGUSHI, S. Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. **Plant Mol Bio**, v.69, p.463-472, 2009.

SINGH, D. Castor. In. SIMMONDS, N. W. **Evolution of crop plants**. Edinburgh: Longman, p.84-86, 1986.

SILVA, W. R.; **Relações entre disponibilidade de água, tratamento com fungicida e germinação de sementes de milho (Zea Mays L.)**. 1989, 113p. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 1989.

SILVA, E. A. A.; TOOROP, P. E.; LAMMEREN, A. A. M. V.; HILHORST, H. W. M. ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* "Rubi") seed germination, **Annals of Botany**, v. 102, p.425-433, 2008.

SILVA, F. F.; POLO, M.; RODRIGUES, A. C. Efeitos do estresse hídrico induzido durante a germinação da mamona, *Ricinus communis* (Euphorbiaceae). **Bol. Mus. Biol. Mello Leitão**, v.25, p.31-41, 2009.

SLIWINSKA, E.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination of *Arabidopsis thaliana* seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n°12, p.3587-3594, 2009.

SOARES, G. C. M. **Perda da tolerância à dessecação em sementes de Tenticarolina (Adenantha pavonina L.) durante a germinação**. 2012, 49p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2012.

SUN, Y. Y.; SUN, Y. J.; WANG, M. T.; LI, X.Y.; GUO, X.; HU, R.; MA, J. Effects of seed priming on germination and seedling growth under water stress in Rice. **Acta Agronomica Sinica**, v.36, n°11, p.1931-940, 2010.

TARDIEU, F. Drought perception by plants: Do cells of droughted plants experience water stress? **Journal of Plant Growth Regulation**, V.20, n°2, p. 93-104, 1996.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Editora Artmed, 3ª edição, 2006, 722 p.

TÁVORA, F. J. A. F.; MELO, F. I. O.; SILVA, F. P. da.; BARBOSA FILHO, M.; Consorciação da mamona com culturas anuais de ciclo curto. **Ciência Agrônômica**, v.19, n.2, p.85–94, 1988.

THOMAS, U.C.; VARUGHESE, K.; THOMAS, A.; SADANANDAN, S. Seed priming – for increased vigour, viability and productivity of upland rice. *Leisa India*, v.4, n°14, 2000.

TROPALDI, L.; CAMARGO, J. A.; SMARSI, R. C.; KULCZYNSKI, S. M.; MENDONÇA, C. G.; BARBOSA, M. M. M. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de mamona submetidas a diferentes tratamentos químicos. **Pesq. Agropec. Trop.** v.40, n°1, p.89-95, 2010.

VARIER, A.; VARI, A. K.; DADLANI, M. The subcellular basis of seed priming. **Current Science**, v.99, n°4, p.450-456, 2010.

VÁSQUEZ-RAMOS, J. M.; SÁNCHEZ, M. D. L. P. The cell cycle and seed germination. **Seed Science Research**, v.13, p.113-130, 2003.

VILLELA, F. A.; BECKERT, O.P. **Potencial osmótico de soluções aquosas de polietileno glicol 8000**. Revista Brasileira de Sementes, vol. 23, nº 1, p.267-275, 2001.

VERSLUES, P.E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J.K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stress that affect plant water status. **The Plant Journal**, v.45, n.4, p.523-539, 2006.

XU, P.; LIU, D.; JIANG, W. Cadmium effects on the organization of microtubular cytoskeleton in interphase and mitotic cells of *Allium sativum*. **Biologia Plantarum**, v.53, nº2, p.387-390, 2009.

WASTENEYS, G. O.; YANG, Z. New views on the plant cytoskeleton. **Plant Physiology**, v.136, p.3884-3891, 2004.

WEDIN, G. P.; NEAL, J. S.; EVERSON, G. W.; KRENZELOK, E. P.; Castor bean poisoning. **American Journal of Emergency Medicine**, v.4, n.3, p.259-261, 1986.

ZUCHI, J.; BEVILAQUA, G. A. P.; SEDIYAMA, C. S.; ZANUNCIO, J. C. Variações na qualidade e tamanho de sementes de mamona pela época de semeadura e ordem floral. **Revista Ciência Agronômica**, v.41, nº3, p.403-408, 2010.

ZUCHI, J.; PANOZZO, L. E.; HEBERLE, E.; ARAUJO, E. F. Curva de embebição e condutividade elétrica em sementes de mamona classificadas por tamanho. **Revista Brasileira de Sementes**, Nota científica, v.34, nº3, p.504-509, 2012.

ZHU, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.53, p.247-273, 2002.