



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**Avaliação da integridade genética em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e feijão  
(*Phaseolus vulgaris* L.) armazenadas em bancos de germoplasma**

**ALISSON FERREIRA DANTAS**

Brasília – DF

2018

ALISSON FERREIRA DANTAS

**Avaliação da integridade genética em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenadas em bancos de germoplasma**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para obter o título de Doutor em Biologia Animal.

**Orientador: Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia**

**Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Aparecido Gimenes**

Brasília – DF

2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D192a Dantas, Alisson  
Avaliação da integridade genética em sementes de arroz  
(*Oryza sativa* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)  
armazenadas em bancos de germoplasma / Alisson Dantas;  
orientador Cesar Grisolia; co-orientador Marcos Gimenes. --  
Brasília, 2018.  
127 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Biologia Animal) --  
Universidade de Brasília, 2018.

1. arroz. 2. feijão. 3. integridade genética. 4. bancos  
de germoplasma. 5. teste cometa. I. Grisolia, Cesar,  
orient. II. Gimenes, Marcos, co-orient. III. Título.

**ALISSON FERREIRA DANTAS**

**Avaliação da integridade genética em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenadas em bancos de germoplasma**

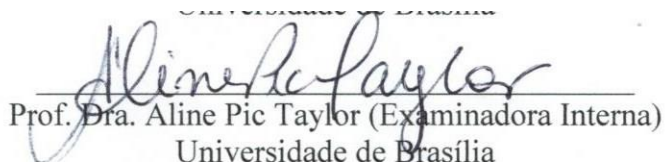
Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para obter o título de Doutor em Biologia Animal.

Aprovado em 10 / 05 / 2018

**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia (Orientador)  
Universidade de Brasília

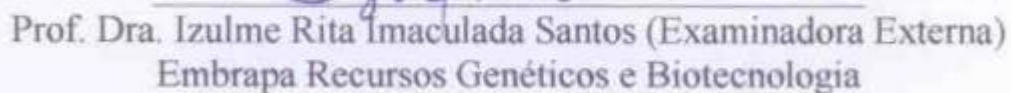


Prof. Dra. Aline Pic Taylor (Examinadora Interna)  
Universidade de Brasília



Prof. Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira (Examinador Externo)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia



Prof. Dra. Izulme Rita Imaculada Santos (Examinadora Externa)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram neste projeto.

## RESUMO

DANTAS, A. F. **Avaliação da integridade genética em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenadas em bancos de germoplasma.** Tese de doutorado. Brasília: Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, Unb. 2018. 127f.

A manutenção da viabilidade de recursos genéticos vegetais em bancos de germoplasma é fundamental para uso dessas amostras (acessos) armazenadas em longo prazo dependendo, em parte, da manutenção da integridade genética. Metodologias para avaliar a integridade genética tem potencial para fornecer informações que auxiliariam no processo de monitoramento das coleções de germoplasma. O monitoramento das coleções é realizado pelo teste de germinação que, apesar de informativo e de baixo custo, não consegue detectar estágios iniciais de deterioração. Este estudo teve como objetivo avaliar a integridade genética em sementes de *Oryza sativa* L. (arroz) e *Phaseolus vulgaris* L. (feijão) envelhecidas artificial e naturalmente. Inicialmente, sementes de arroz e feijão foram expostas a um agente mutagênico, metanossulfonato de metila (MMS), para viabilizar a realização dos testes citogenéticos e cometa. Verificou-se que o MMS induziu efeitos citotóxicos, mutagênicos e/ou genotóxicos em acessos de arroz e feijão, contribuindo para a padronização de metodologias para avaliar citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade nestas espécies. A partir disto, foram analisados os efeitos do envelhecimento acelerado sobre a integridade genética em sementes de arroz e feijão. À medida que houve o aumento do período de envelhecimento, foi observada diminuição na germinação, vigor e índice mitótico, bem como o aumento da frequência de anomalias cromossômicas e quebras do DNA em ambas as espécies avaliadas. Estes resultados evidenciam o potencial uso dos testes citogenéticos e cometa em programas de conservação de sementes, pois eles permitem auxiliar na decisão de quais sementes podem ser armazenadas por períodos prolongados sem comprometer a sua integridade genética e, conseqüentemente, sua viabilidade e vigor. Por fim, foram realizadas análise da integridade genética e da eficácia do sistema de reparo de acessos de arroz e de feijão armazenados em longo prazo em bancos de germoplasma (-20°C). Observou-se que não houve aumento ou decréscimo significativo do índice mitótico e/ou anomalias cromossômicas, e houve similaridade entre os resultados dos testes de qualidade fisiológica e do teste cometa, ou seja, os lotes das duas espécies com sementes menos viáveis e/ou vigorosas apresentaram mais danos ao DNA e menor capacidade de reparo. Esse é o primeiro estudo sobre integridade genética e eficácia do sistema de reparo de germoplasma de semente

conservado em longo prazo indicando que o teste cometa pode ser utilizado para esta finalidade. Adicionalmente, estas técnicas pode permitir o monitoramento de diferentes espécies, principalmente em acessos com pequena quantidade de sementes armazenadas (abaixo de 1.500), pois a quantidade de material utilizada (sementes e DNA) é baixa (10 sementes).

Palavras-chave: arroz, feijão, integridade genética, bancos de germoplasma, testes citogenéticos, teste cometa.

## ABSTRACT

DANTAS, A. F. **Evaluation of genetic integrity in seeds of rice (*Oryza sativa* L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) stored in gene banks.** Doctoral Thesis. Brasília: Postgraduate Program in Animal Biology, University of Brasilia. 2018. 127f.

Maintaining the viability of plant genetic resources in germplasm banks is fundamental for the use of these samples (accessions) under long-term storage, and this depends partly on maintaining their genetic integrity. Methodologies to evaluate genetic integrity have the potential to supply information that would help in the process of monitoring germplasm collections. The monitoring of collections is carried out by the germination test, which is informative and inexpensive, but does not manage to detect the initial stages of deterioration. This study had the objective of evaluating genetic integrity in seeds of *Oryza sativa* L. (rice) and *Phaseolus vulgaris* L. (common bean), aged artificially and naturally. Initially, rice and bean seeds were exposed to a mutagenic agent, methyl methane sulfonate (MMS), to make cytogenetic and comet tests viable. It was verified that MMS induced cytotoxic, mutagenic and/or genotoxic effects in rice and bean accessions, contributing to the standardization of methodologies to evaluate the cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity of these species. Leading on from this, the effects of accelerated aging on genomic stability were analyzed in rice and bean seeds. As the aging period increased, a reduction was observed in the germination, vigor and mitotic index, as well as an increase in the frequency of chromosomal aberrations and DNA breaks in both the evaluated species. These results show the potential use of cytogenetic and comet tests in seed conservation programs, because they aid in the decision about which seeds can be stored for prolonged periods without compromising their genetic integrity and, consequently, their viability and vigor. Finally, analysis was made regarding the genetic integrity and the effectiveness of the repair system of rice and bean accessions that were stored long-term in germplasm banks (-20 °C). It was observed that no significant increase or decrease was observed in the mitotic index and/or chromosomal aberrations, and there was a similarity between the results from the physiological quality tests and from the comet test; in other words, the lots of the two species with less viable and/or vigorous seeds presented less damage to the DNA and a lower repair capacity. This is the first study on genetic integrity and the effectiveness of the repair system of seed germplasm in long-term conservation, indicating that the comet test can be used for this purpose. Additionally, these techniques may allow monitoring of different species, especially in



accessions with a small quantity of stored seeds (fewer than 1500), because the quantity of material used (seeds and DNA) is low (10 seeds).

Keywords: rice, common bean, genetic integrity, gene banks, cytogenetics tests, comet test.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Principais estruturas do arroz. ....	19
<b>Figura 2</b> – Principais estruturas do caule e da folha do arroz. ....	20
<b>Figura 3</b> – Estruturas da flor (espiguetas) do arroz. ....	20
<b>Figura 4</b> – Principais estruturas da semente do arroz. ....	21
<b>Figura 5</b> – Principais estruturas das folhas do feijão. ....	22
<b>Figura 6</b> – Estruturas da semente de feijão. ....	23
<b>Figura 7</b> – Fotomicrografias de células meristemáticas de raízes de arroz em diferentes estágios do ciclo celular .....	32
<b>Figura 8</b> – Fotomicrografias de anomalias cromossômicas (setas) encontradas em células meristemáticas de raízes de arroz expostas ao metanossulfonato de metila ..	34
<b>Figura 9</b> – Esquema do teste cometa demonstrando as principais etapas. ....	36
<b>Figura 10</b> – Estrutura química do metanossulfonato de metila. ....	40

### Capítulo 1

<b>Figura 1</b> – Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides submetidos a diferentes voltagens no teste de eletroforese em gel de célula única. <b>A)</b> Nucleoides de embriões de sementes de <i>O. sativa</i> . <b>B)</b> Nucleoides de embriões de sementes de <i>P. vulgaris</i> . Os dados estão representados pelas médias $\pm$ SEM. ....	61
<b>Figura 2</b> – Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides de <i>Oryza sativa</i> L. expostos a diferentes concentrações de metanossulfonato de metila (MMS). <b>A)</b> acesso BGA012099 “Ferrinho”. <b>B)</b> acesso BGA008070 “Primavera”. Os dados estão representados pelas médias $\pm$ SEM. Controle = sementes não expostas ao MMS ou a água destilada. <sup>a</sup> Significante em relação ao controle. <sup>b</sup> Significante em relação ao grupo água destilada. One-way ANOVA seguido Teste de Tukey. (* $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,001$ ). ....	62
<b>Figura 3</b> – Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. expostos a diferentes concentrações de metanossulfonato de metila (MMS). <b>A)</b> acesso GF004. <b>B)</b> acesso GF007. Os dados estão representados pelas médias $\pm$ SEM. Controle = sementes não expostas ao MMS ou a água destilada. <sup>a</sup> Significante em relação ao controle. <sup>b</sup> Significante em relação ao grupo água destilada. <sup>c</sup> Significante em relação ao grupo MMS 5 mg/L. One-way	

ANOVA seguido Teste de Tukey. (* $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,001$ ). .....	63
<b>Figura 4</b> – Perfis dos nucleoides observados no teste cometa em arroz e feijão comum. <b>A</b> e <b>C</b> ) Nucleoides de embriões de controle de <i>O. sativa</i> e <i>P. vulgaris</i> , respectivamente. <b>B</b> e <b>D</b> ) nucleoides de embriões <i>O. sativa</i> e <i>P. vulgaris</i> expostas ao MMS, respectivamente. ....	63

## Capítulo 2

<b>Figura 1</b> - Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides do acesso de <i>Oryza sativa</i> L. Formoso submetido a controles e ao teste de envelhecimento acelerado. ....	83
<b>Figura 2</b> - Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides do acesso de <i>Oryza sativa</i> L. Primavera submetida a controles e ao teste de envelhecimento acelerado. ....	84
<b>Figura 3</b> - Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides do acesso de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. GF003 submetidos a controles e ao teste de envelhecimento acelerado. ....	85
<b>Figura 4</b> - Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides do acesso de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. GF007 submetidos a controles e ao teste de envelhecimento acelerado. ....	97

## Capítulo 3

<b>Figura 1</b> – Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides do acesso CNA 2020 de <i>Oryza sativa</i> L. armazenadas em câmaras frias. ....	105
<b>Figura 2</b> - Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides do acesso CNA 4008 de <i>Oryza sativa</i> L. armazenadas em câmaras frias. ....	106
<b>Figura 3</b> - Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides do acesso CNF 2035 de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. armazenadas em câmaras frias. ....	107
<b>Figura 4</b> - Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides do acesso CF 810527 de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. armazenadas em câmaras frias. ....	108

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

- Tabela 1** – Índice mitótico, frequência de anomalias cromossômicas e de micronúcleos obtidos nos testes citogenéticos de células da região meristemática (n = 4.000) de raízes de *Oryza sativa* L. acesso BGA012099 “Ferrinho” expostas ao metanossulfonato de metila (MMS). ..... 54
- Tabela 2** – Índice mitótico, frequência de anomalias cromossômicas e de micronúcleos obtidos nos testes citogenéticos de células da região meristemática (n = 4.000) de raízes de *Oryza sativa* L. BGA008070 “Primavera” expostas ao metanossulfonato de metila (MMS). ..... 55
- Tabela 3** – Índice mitótico, frequência de anomalias cromossômicas e de micronúcleos obtidos nos testes citogenéticos de células da região meristemática (n = 4.000) de raízes de *Phaseolus vulgaris* L. acesso GF004 expostas ao metanossulfonato de metila (MMS). ..... 56
- Tabela 4** – Índice mitótico, frequência de anomalias cromossômicas e de micronúcleos obtidos nos testes citogenéticos de células da região meristemática (n = 4.000) de raízes de *Phaseolus vulgaris* L. acesso GF007 expostas ao metanossulfonato de metila (MMS). ..... 57

### Capítulo 2

- Tabela 1** – Porcentagem de plântulas normais obtida na primeira contagem e final do teste de germinação, plântulas anormais, sementes duras, sementes mortas, e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de arroz e feijão submetidas a envelhecimento acelerado. .... 78
- Tabela 2** – Índice mitótico e porcentagem das anomalias cromossômicas avaliadas em células meristemática de raízes dos acessos de *Oryza sativa* L. Formoso e Primavera submetidos a controles e ao teste de envelhecimento acelerado. .... 79
- Tabela 3** – Índice mitótico e porcentagem das anomalias cromossômicas avaliadas em células meristemática de raízes dos acessos de *Phaseolus vulgaris* L. GF003 e GF007 submetidos a controles e ao teste de envelhecimento acelerado. .... 80

### **Capítulo 3**

<b>Tabela 1</b> – Data da introdução e poder de germinação dos acessos de arroz e feijão mantidos em câmara fria. ....	97
<b>Tabela 2</b> – Porcentagem de plântulas normais obtida na primeira contagem e final do teste de germinação, plântulas anormais, sementes duras, sementes mortas, e índice de velocidade de germinação (IVG) de acessos de arroz e feijão armazenados em câmara fria. ....	101
<b>Tabela 3</b> – Índice mitótico e porcentagem de anomalias cromossômicas avaliadas em células meristemática de raízes de arroz e feijão armazenados em câmara fria. .	103

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACs	anomalias cromossômicas
APs	apurínicos e apirimidínicos
BER	<i>base excision repair</i> , isto é, reparo por excisão de base
CDB	Convenção sobre a Diversidade Biológica
CN	controle negativo
Colbase	coleção de base
CP	controle positivo
DNA	ácido desoxirribonucleico
DSB	<i>double strand break</i> , isto é, quebras de fita dupla
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i> , isto é, ácido etilendiamino tetra-acético
EMBRAPA	empresa brasileira de pesquisa agropecuária
ERRO	espécies reativas de oxigênio
IM	índice mitótico
IVG	índice de velocidade de germinação
LMP	<i>low-melting-point</i> , isto é, ponto de fusão baixo
MMS	metanossulfonato de metila
MNs	Micronúcleos
N <sup>3</sup> -MeA	3-metiladenina
N <sup>7</sup> -MeG	7-metilguanina
NMP	<i>normal-melting-point</i> , isto é, ponto de fusão normal
O <sup>6</sup> -MeG	O <sup>6</sup> -metilguanina
pH	potencial hidrogeniônico
RNA	ácido ribonucleico
SCGE	<i>single cell gel eletrophoresis assay</i> , isto é, teste eletroforese em gel de célula única
SSB	<i>single strand break</i> , isto é, quebra de fita simples
TBE	tris-borato-EDTA

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
2.1. O ARROZ – <i>Oryza sativa</i> L. ....	18
2.1.1. Aspectos Botânicos de <i>Oryza sativa</i> L. ....	18
2.2. O FEIJÃO – <i>Phaseolus vulgaris</i> L. ....	21
2.2.1. Aspectos Botânicos de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. ....	22
2.3. CONSERVAÇÃO DE RECURSOS FITOGENÉTICOS .....	23
<b>2.3.1. Tipos de conservação <i>ex situ</i></b> .....	24
<b>2.3.2. Bancos de Germoplasma</b> .....	25
<b>2.3.3. Monitoração das Sementes</b> .....	26
2.3.3.1. Teste de Germinação .....	26
2.3.3.2. Teste de Envelhecimento Acelerado .....	27
2.4. DETERIORAÇÃO DE SEMENTES .....	28
2.5. TESTES DE INTEGRIDADE GENÉTICA .....	30
<b>2.5.1. Testes citogenéticos</b> .....	30
2.5.1.1. Índice Mitótico .....	30
2.5.1.2. Anomalias cromossômicas .....	32
<b>2.5.2. Teste de Eletroforese em Gel de Célula Única – Teste Cometa</b> .....	35
2.6. METANOSSULFONATO DE METILA .....	39
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	42
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	44
4.1. OBJETIVO GERAL .....	44
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	44

### CAPÍTULO 1

<b>Testes cometa e citogenéticos como ferramentas para avaliação da instabilidade genômica em sementes de <i>Oryza sativa</i> L. (arroz) e <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (feijão) de bancos de germoplasma</b> .....	45
<b>Resumo</b> .....	46
<b>Introdução</b> .....	47
<b>Materiais e Métodos</b> .....	48

Material vegetal .....	48
Químicos .....	49
Testes citogenéticos .....	49
Teste cometa .....	50
Análise estatística .....	52
<b>Resultados e Discussão</b> .....	52
Testes citogenéticos .....	52
Teste cometa .....	60
<b>Conclusão</b> .....	64
<b>Conflito de interesse</b> .....	65
<b>Agradecimentos</b> .....	65
<b>Referências</b> .....	65

## **CAPÍTULO 2**

<b>Avaliação da integridade genética em lotes de sementes de arroz (<i>Oryza sativa</i> L) e feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) envelhecidas artificialmente</b> .....	70
<b>RESUMO</b> .....	71
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	72
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	73
MATERIAL VEGETAL .....	73
TESTE DE ENVELHECIMENTO ACELERADO .....	73
TESTES DE GERMINAÇÃO E PRIMEIRA CONTAGEM .....	74
ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO .....	74
TESTES CITOGENÉTICOS .....	74
TESTE COMETA .....	75
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	76
<b>RESULTADOS</b> .....	77
TESTES DE PRIMEIRA CONTAGEM, GERMINAÇÃO E IVG .....	77
TESTES CITOGENÉTICOS .....	77
TESTE COMETA .....	81
<b>DISCUSSÃO</b> .....	86
<b>Conflito de interesse</b> .....	90
<b>Agradecimentos</b> .....	90



<b>REFERÊNCIAS</b> .....	90
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>Análise da integridade genética e eficácia do sistema de reparo de acessos de arroz e feijão armazenados em bancos de germoplasma</b> .....	93
<b>RESUMO</b> .....	94
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	95
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	96
MATERIAL VEGETAL .....	96
TESTES DE GERMINAÇÃO E PRIMEIRA CONTAGEM .....	97
ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO .....	98
TESTES CITOGENÉTICOS .....	98
TESTE COMETA .....	99
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	100
<b>RESULTADOS</b> .....	100
TESTES DE PRIMEIRA CONTAGEM, GERMINAÇÃO E IVG .....	100
TESTES CITOGENÉTICOS .....	101
TESTE COMETA .....	104
<b>DISCUSSÃO</b> .....	104
<b>Conflito de interesse</b> .....	111
<b>Agradecimentos</b> .....	111
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	111
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	114
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	115
<b>ANEXOS</b>	
ANEXO A – Primeira página do Capítulo 1 publicado .....	127

## 1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade desempenha um papel importante na manutenção de espécies e dos processos ecológicos, bem como no modo de vida humano e, como parte integrante da natureza, o ser humano necessita de outras espécies de forma direta ou indireta para a sua existência e sobrevivência. Além disso, as formas de vida devem ser conservadas, porque existem, devido ao fato de ser o produto de uma longa história de evolução contínua, por meio de processos ecológicos tendo o direito a existência continuada (ALHO, 2008).

A parte da biodiversidade que contém valor real ou potencial é denominada de recursos genéticos (IBPGR, 1991). Tais recursos podem ser conservados por meio do seu germoplasma, o qual consiste de qualquer forma, porção, parte ou estrutura biológica que reúne o conjunto de materiais hereditários de uma espécie (SALOMÃO, 2010).

Estes recursos são fundamentais para garantir a segurança alimentar e o agronegócio de qualquer país. Há vários exemplos da importância dos recursos genéticos na segurança alimentar, como o caso de infestação em batata na Irlanda no ano de 1845 causada pelo fungo *Phytophthora infestans* levando a morte e migração de milhões de irlandeses (RISTAINO, 2002). No Brasil, pode ser citado o ataque da ferrugem do cafeeiro em todas as regiões no ano 1970, o que levou a introdução de germoplasma constituídos por materiais portadores de alelos que conferem resistência ao agente causador da ferrugem do cafeeiro (MIRANDA et al., 2005).

Os recursos genéticos vegetais, também conhecidos como recursos fitogenéticos, são mantidos em amostras de germoplasma representativas de um indivíduo ou de uma população de determinada espécie denominadas de acessos (VEIGA et al., 2015). A conservação dos recursos genéticos pode ser realizada *in situ* ou *ex situ*. A conservação *ex situ* é o método principal para a conservação de sementes, pois muitas das espécies de interesse agrônomico têm sementes ortodoxas, o que confere as elas resistência à dessecação aos baixos teores de umidade permitindo o armazenamento em baixas temperaturas em longo prazo (RAO et al., 2006).

A monitoração de sementes em bancos de germoplasma, a qual pode ser definida como a verificação periódica da qualidade e da quantidade do acesso conservado (SALOMÃO, 2010), é uma fase fundamental do processo de conservação. Esta avaliação é feita através de testes que estimam a porcentagem de sementes com capacidade para germinar e se desenvolver, conhecidos como teste de germinação e vigor (VEIGA et al., 2015).

Entretanto, estes testes podem não detectar processos iniciais de deterioração das sementes porque no teste de germinação.

A instabilidade genômica é um dos estágios iniciais no processo de deterioração de sementes (PEIXOTO et al., 2006) e a detecção precoce deste processo poderia contribuir na tomada de decisões em bancos de germoplasma, reduzindo a possibilidade de perda de variabilidade genética causada pela morte da semente. Neste contexto, este estudo teve como foco principal avaliar a integridade genética de germoplasma associada a sua conservação. Para tanto, esta tese foi dividida em três etapas: avaliação da exposição de acessos de arroz e feijão a um agente mutagênico conhecido (metanossulfonato de metila) para determinar viabilidade dos testes de integridade genética (**Capítulo 1**); envelhecimento artificial de acessos de arroz e feijão e avaliação de testes de integridade genética (**Capítulo 2**); e, por fim análise de acessos de arroz e feijão armazenados em longo prazo em bancos de germoplasma (**Capítulo 3**).

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

No Brasil, o arroz e feijão destacam-se entre os recursos genéticos vegetais por serem tradicionalmente os produtos alimentícios mais consumidos desempenhando papel importante do ponto de vista socioeconômico (dos SANTOS JÚNIOR, 2017; RUAS, 2017) e, por isto, grandes coleções de germoplasma dessas espécies foram estabelecidas.

### 2.1. O ARROZ – *Oryza sativa* L.

De acordo com a *Food and Agriculture Organization*, estima-se que apenas 30 das espécies de plantas fornecem 95% das necessidades energéticas de alimentos humanos e somente cinco dessas fornecem mais de 60%, entre elas está o arroz. Mais da metade da população mundial consome arroz, sendo que a Ásia é a maior região produtora e consumidora, e o Brasil se encontra entre os dez maiores produtores mundiais (FAO, 2013).

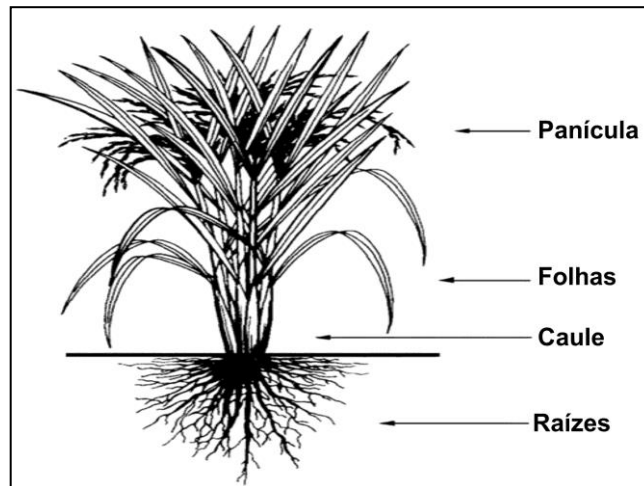
O arroz contribui na alimentação como fonte de energia e carboidratos (HINNIG e BERGAMASCHI, 2012). Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram potenciais efeitos benéficos do arroz à saúde humana, como a redução do estresse oxidativo que auxilia na prevenção de câncer, doenças cardiovasculares e complicações de diabetes devido à atividade antioxidante dos seus polifénóis (WALTER e MARCHESAN, 2011), apesar da redução do conteúdo de compostos polifenólicos e da capacidade antioxidante depois do cozimento (ZAUPA et al., 2015). Além dos efeitos benéficos do arroz à saúde através do seu consumo, o arroz também pode ter aplicabilidade em outras áreas por apresentar proteínas que representam agentes potenciais para o tratamento eficaz de doenças inflamatórias (SCHUSSHEIM et al., 2011); poder contribuir como fonte de obtenção de agentes promissores para promover a propagação de células-tronco para aplicações clínicas (YOUNGBLOOD et al., 2014); e possuir polissacarídeos na sua casca que são uma excelente fonte natural de materiais imunomodulatórios (YANG et al., 2015).

#### 2.1.1. Aspectos Botânicos de *O. sativa*

O arroz, *Oryza sativa* L. (família Poaceae), é uma gramínea anual de origem asiática que se adapta a uma ampla variedade de condições ambientais (de SOUSA et al., 1995) (**Fig. 1**). Esta espécie é distribuída em regiões tropicais, subtropicais e em algumas regiões temperadas (VAUGHAN, 1994). As raízes de *O. sativa* podem ser classificadas de acordo

com o seu desenvolvimento em raízes seminais, as quais surgem a partir do embrião (MOLDENHAUER e GIBBONS, 2003) e sobrevivem por um curto espaço de tempo após a germinação da semente, ou adventícias, as quais substituem as raízes seminais e que se desenvolvem a partir de nós subterrâneos (de SOUSA et al., 1995).

**Figura 1** – Principais estruturas do arroz.



Fonte: adaptada de Vergara (1992)

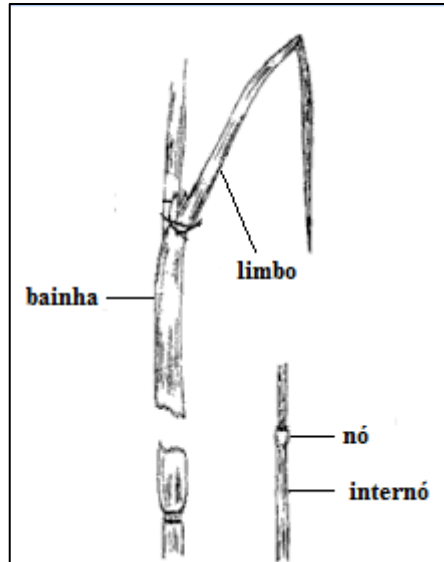
O caule de *O. sativa* é denominado de colmo, e esse possui uma série de nós e entrenós (**Fig. 2**). O colmo principal consiste na primeira haste da planta desenvolvendo-se cedo durante o crescimento vegetativo e antes do processo de formação dos perfilhos, sendo que estes últimos são colmos que se desenvolvem a partir do colmo principal e análogos aos ramos (MOLDENHAUER e GIBBONS, 2003).

As folhas de *O. sativa* são constituídas por limbo e bainha (**Fig. 2**). A bainha é uma folha alongada enrolada em um cilindro que está envolvido no desenvolvimento de novas folhas e suportam a planta durante o crescimento vegetativo e funciona como um local de armazenamento de amido e açúcares. O limbo consiste do principal órgão para a fotossíntese e transpiração caracterizado por ser longo e lanceolado com as nervuras paralelas (MOLDENHAUER e GIBBONS, 2003).

A flor do *O. sativa*, também denominada de espiguetas, é composta por seis estames (antera e filetes), um pistilo (dois estigmas, dois estiletes, e um ovário) e duas lodículas na base do pistilo, além de possuir um par de glumas rudimentares, uma lema e uma pálea (MOLDENHAUER e GIBBONS, 2003) (**Fig. 3**). O conjunto de flores do colmo forma a inflorescência, denominada de panícula (de SOUSA et al., 1995). Devido a fatores estruturais das flores, como estilete, estigma e anteras curtos, viabilidade limitada do pólen, e também ao

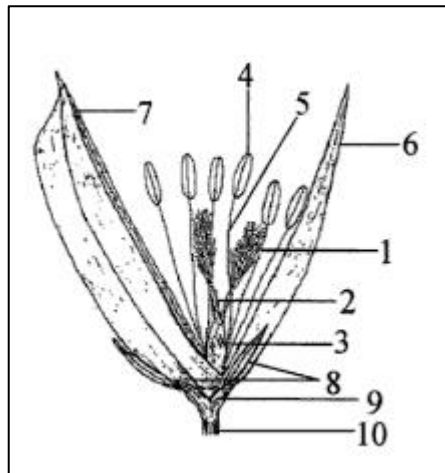
breve período entre a abertura da flor jovem e a liberação do pólen, o arroz é uma planta predominantemente autógama, ou seja, se reproduz preferencialmente por autofecundação, apesar de ocorrer fecundação cruzada em baixa frequência (AUSTRALIA, 2005).

**Figura 2** – Principais estruturas do caule e da folha do arroz.



Fonte: adaptada de Moldenhauer e Gibbons (2003)

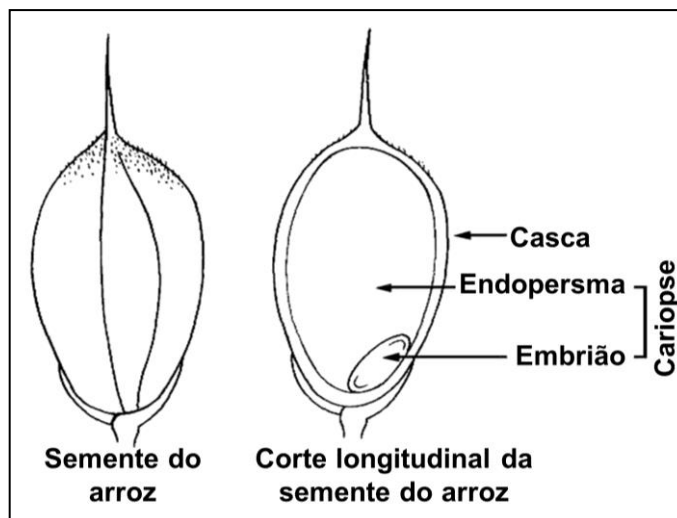
**Figura 3** – Estruturas da flor (espiguetas) do arroz.



1) estigma; 2) estilete; 3) ovário; 4) antera; 5) filamento; 6) pálea; 7) lema; 8) lemas estéreis; 9) glumas rudimentares; 10) pedicelo Fonte: adaptada de Moldenhauer e Gibbons (2003).

O grão do arroz é constituído por uma casca e uma cariopse (**Fig. 4**). A casca é composta por lemas estéreis, ráquilla, pálea e lema. A cariopse tem o embrião e endosperma com amido, cercado pelo tegumento e o pericarpo (de SOUSA et al., 1995).

**Figura 4** – Principais estruturas da semente do arroz.



Fonte: adaptada de Vergara (1992).

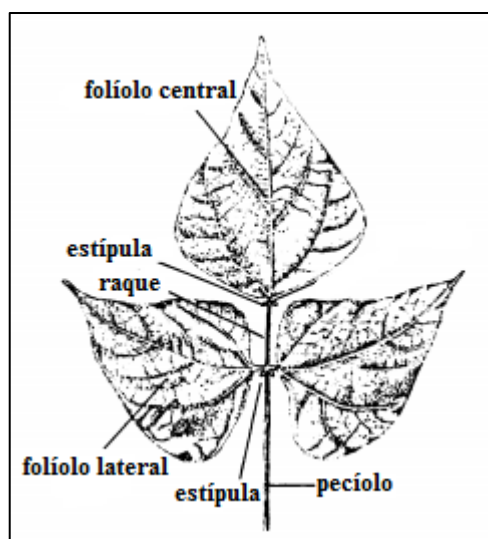
## 2.2. O FEIJÃO – *Phaseolus vulgaris* L.

O feijão, *Phaseolus vulgaris* L. (família Fabaceae), é uma planta com alto teor de proteínas em sua semente e cultivada de zonas tropicais a temperadas devido ao seu grande valor para nutrição humana sendo componente essencial na dieta alimentar, principalmente nas Américas Central e do Sul (DEBOUCK et al., 1986). Além de fonte de nutrientes, o consumo de feijão pode levar a diversos benefícios a saúde humana, uma vez que possui atividades antioxidante, antitumoral e neuroprotetora (LÓPEZ et al., 2013). Em ratos e camundongos, a incorporação de feijão na dieta reduziu o risco de desenvolver doenças cardiovasculares devido à redução dos níveis de colesterol total no plasma e colesterol LDL (lipoproteínas de baixa densidade) sem afetar os níveis de colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidade), além de ter induzido a perda de peso dos animais testados (ZHU et al., 2012). As sementes do feijão também podem ser utilizadas como um complemento medicinal para tratar a população diabética devido ao seu potencial anti-hiperglicêmico, reduzindo significativamente a dose de medicamentos padronizados (ATCHIBRI et al., 2010). Além disso, as sementes de feijão comum podem ser usadas como uma fonte de compostos antiproliferativos, antifúngicos (ANG et al., 2014) e anti-inflamatórios (GARCÍA-LAFUENTE et al., 2014).

### 2.2.1. Aspectos Botânicos de *P. vulgaris*

A espécie *P. vulgaris* possui porte herbáceo, ramos dotados de suave pubescência e hábito de crescimento determinado ou indeterminado. No primeiro caso, a planta é ereta, com caule principal e ramificações terminando em uma inflorescência, já nas variedades de crescimento indeterminado, a extremidade do talo nunca termina em inflorescência. O sistema radicular do feijão é pivotante, entretanto muito ramificado e superficial (PEIXOTO et al., 2000). As folhas são compostas por três folíolos, um pecíolo e uma raque (DEBOUCK et al., 1986) (**Fig. 5**). As flores, geralmente, estão agrupadas em cachos encobertos por folhas. O cálice é revestido por brácteas verdes persistentes e a corola é formada por cinco pétalas podendo ser brancas, violáceas, ou rosadas. O androceu é constituído por nove estames unidos ou adelfos e um livre e o gineceu é composto por um ovário alongado e estilete com estigma recurvado e apresentando pelos (PEIXOTO et al., 2000). A morfologia das flores de *P. vulgaris* favorece a autopolinização devido ao fato das anteras estarem no mesmo nível dos estigmas (DEBOUCK et al., 1986). Os frutos do feijão são vagens arredondadas, pouco curvadas ou retas, achatadas ou alongadas, apresentando em média de três a seis sementes (PEIXOTO et al., 2000).

**Figura 5** – Principais estruturas das folhas do feijão.



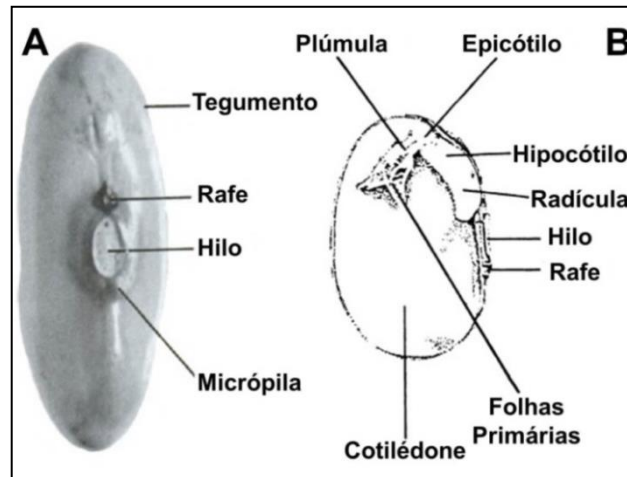
Fonte: adaptada de Debouck et al. (1986).

As sementes são formadas pelo embrião e tegumento sendo que este apresenta variações de cores, listras, manchas, tamanho e forma (PEIXOTO et al., 2000). Externamente, as partes da semente de *P. vulgaris* são: o tegumento, o hilo, a micrópila e a rafe (**Fig. 6A**).



Internamente, a semente de *P. vulgaris* é composta por uma plúmula, duas folhas primárias, um hipocótilo, dois cotilédones e uma radícula (DEBOUCK et al., 1986) (**Fig. 6B**).

**Figura 6** – Estruturas da semente de feijão.



**A)** Partes externas da semente de *P. vulgaris*; **B)** Partes internas da semente de *P. vulgaris*. Fonte: adaptada de Debouck et al. (1986).

### 2.3. CONSERVAÇÃO DE RECURSOS FITOGENÉTICOS

A conservação dos recursos fitogenéticos pode ser feita por meio de dois tipos distintos de abordagens complementares, conservação *in situ* e *ex situ* (XU e Mc NALLY, 2010). Segundo a Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB) de 1994, a conservação *in situ* “significa a conservação de ecossistemas e habitats naturais e a manutenção e recuperação de populações viáveis de espécies em seus meios naturais e, no caso de espécies domesticadas ou cultivadas, nos meios onde tenham desenvolvido suas propriedades características”. Esta conservação pode ser realizada por meio de reservas genéticas isoladas ou localizadas dentro de unidades de conservação ambiental, como parques, santuários e refúgios (VILELA-MORALES e VALOIS, 2000).

De acordo com a CDB de 1994, a conservação *ex situ* “significa a conservação de componentes da diversidade biológica fora de seus habitats naturais”. Este tipo de conservação implica remover o germoplasma (sementes, pólen, espora e organismos individuais) de seus habitats originais e preservá-los em jardins botânicos ou em bancos de germoplasma (XU e Mc NALLY, 2010).

A conservação *in situ* difere da *ex situ* por possuir um caráter mais dinâmico enquanto que a *ex situ*, por permitir uma evolução contínua e uma adaptação melhor à seleção natural. A técnica *in situ* é mais estática, pois a evolução das espécies é congelada desde que nenhuma outra adaptação a estresses ambientais e bióticos naturais à sua origem pode acontecer, uma vez que está conservado em condições controladas. Porém, a conservação *in situ* possui como principal desvantagem a dificuldade de caracterização e avaliação dos recursos genéticos, além de uma despesa monetária elevada e da suscetibilidade a riscos, como condições climáticas extremas, pragas e doenças. As principais desvantagens da conservação *ex situ* são a interrupção do processo de seleção das espécies e a ocorrência de desvio genético (XU e McNALLY, 2010).

Há uma terceira estratégia de conservação de recursos fitogenéticos denominada de conservação *on farm*. Esta forma tem como principais objetivos conservar o processo evolutivo e adaptar os recursos fitogenéticos, bem como a diversidade em diferentes níveis – ecossistemas e espécies, além de conservar os serviços dos ecossistemas fundamentais para suporte da vida no planeta (JARVIS et al., 2000). Esta estratégia de conservação consiste na manutenção de variedades tradicionais de plantas e raças locais em comunidades indígenas, rurais ou em campos de agricultores (SALOMÃO, 2010).

### **2.3.1. Tipos de conservação *ex situ***

Existem três formas de conservação *ex situ* que dependem de características reprodutivas do germoplasma a ser conservado: a conservação *in vitro*, no campo e de sementes (DANTAS e LUZ, 2015). A conservação *in vitro* é a manutenção de germoplasma dentro de recipientes pequenos com condições artificiais de retardamento de crescimento e armazenados em salas com controle de temperatura e luminosidade ou em tambores de nitrogênio líquido (-196 °C). A conservação no campo consiste no ato de manter *in vivo* as espécies vegetais em bancos de germoplasma plantados no campo ou em cultivos protegidos (VEIGA et al., 2015). A forma de conservação *ex situ* é preferencialmente escolhida por ser mais prática e econômica para o armazenamento de sementes ortodoxas (RAO et al., 2006).

As sementes podem ser armazenadas com pelo menos três objetivos, os quais determinam o tempo de armazenamento e os tipos de estratégias e procedimentos a serem adotados. As sementes podem ser armazenadas por períodos muito curtos entre a colheita e a semeadura, e também por períodos de 10 ou menos anos para assegurar um fornecimento confiável de sementes na ausência de culturas anuais. O armazenamento em longo prazo (de

10 a 50 anos ou acima) é usado para conservação do germoplasma (BONNER, 2008a). A conservação *ex situ* utiliza-se de câmaras frias a temperaturas de  $-18 \pm 3^{\circ}\text{C}$  para a conservação de sementes com grau de umidade entre 10 e 25%, dependendo da espécie, e germinação inicial acima dos 85% para espécies cultivadas (FAO, 2014).

O principal fator a ser considerado para a longevidade das sementes é a fisiologia da espécie. Roberts (1973) categorizou as sementes em dois grupos baseados nas suas características de armazenamento. De acordo com a esta classificação, as sementes podem ser divididas em: 1) ortodoxas, as quais podem ser secas a teor de umidade abaixo de 10% tonando o armazenamento a baixas temperaturas efetivo; 2) recalcitrantes, as quais não podem ser secas a níveis de umidade relativamente altos (25 a 45%) e, portanto, não podem ser armazenadas em temperaturas abaixo de zero. Ellis et al. (1990) propuseram uma terceira categoria denominada de intermediárias. As sementes pertencentes a esta categoria pode ser armazenadas secar a teor de umidade semelhante aos das sementes ortodoxas (12 a 15%), mas são mais sensíveis a temperaturas usadas para o armazenamento de sementes ortodoxas.

Além disso, outro fator fisiológico que também afeta a longevidade das sementes em câmaras frias é a qualidade inicial, pois o potencial de longevidade das sementes depende deste fator (RAO, 2017). Outros fatores como a morfologia das sementes, composição química, maturidade, processamento e ambiente de armazenamento das sementes também influenciam na longevidade das sementes em câmaras frias (BONNER, 2008a).

### **2.3.2. Bancos de Germoplasma**

Os bancos de germoplasma mantêm coleções de sementes, plantas em crescimento, pólen, esporos, ou amostras vegetativas *in vitro* (BLACK et al., 2006). Esses bancos possuem como principal finalidade a manutenção da viabilidade e da integridade genética dos recursos genéticos sendo conservados *ex situ* (RAO et al., 2006) e tornando-os disponíveis aos usuários (TOLL, 1996). A maioria das coleções é mantida como sementes porque os bancos de germoplasma oferecem potencial de longevidade da amostra, recuperação do material, aplicabilidade a uma grande variedade de espécies e também oferece bom compromisso entre capacidade de armazenar variação intraespecífica (BLACK et al., 2006).

Os bancos de germoplasma podem ser classificados em dois tipos: 1) bancos ativos de germoplasma, os qual tratam se de áreas ou unidade de conservação de germoplasma de uso atual ou potencial onde são desenvolvidas atividades pertinentes aos recursos genéticos, tais como: introdução, intercâmbio, avaliação, caracterização, seleção, multiplicação,

regeneração e preservação (SALOMÃO, 2010); e 2) banco base de germoplasma, o qual se refere de um local de armazenagem de acessos, a médio e longo prazo podendo ser conservados em câmaras-frias de -10 a -20°C com controle de umidade, *in vitro* e em tambores com nitrogênio líquido (VEIGA et al., 2015).

As principais funções dos bancos de germoplasma são: a aquisição de germoplasma e sua conservação, a distribuição de amostras a usuários, o estudo e documentação dos recursos conservados, a melhoria do germoplasma, o desenvolvimento de tecnologias de conservação e o monitoramento do germoplasma conservado (TOLL, 1996).

### **2.3.3. Monitoração das Sementes**

Boas condições de armazenamento mantêm a viabilidade do germoplasma, mas em condições abaixo das ideais a viabilidade é reduzida. Por isto, é necessário avaliar a viabilidade periodicamente (FAO, 2014). A viabilidade das sementes pode ser medida indiretamente, em testes de excisão de embrião ou bioquímicos como o teste de tetrazólio, ou diretamente por meio de testes de germinação (BLACK et al., 2006).

#### **2.3.3.1. Teste de Germinação**

O monitoramento da viabilidade do germoplasma em bancos de germoplasma é realizado pelo teste de germinação, o qual consiste de um procedimento para determinar a porcentagem de sementes que são capazes de germinar sob um determinado conjunto de condições (FAO, 2014). O teste de germinação pode ser usado para comparar a qualidade de diferentes lotes (BRASIL, 2009).

O processo de germinação ocorre em uma sequência de eventos que se inicia com a absorção de água. Em seguida ocorre o aumento da respiração, atividade enzimática e consumo das reservas de energia promovendo, conseqüentemente, o aumento de adenosina fosfato e ácidos nucléicos. Por último, estes eventos ocasionam o crescimento e divisão das células até a diferenciação dos tecidos. Todo este processo é influenciado por eventos dentro das próprias sementes e por condições ambientais tais como temperatura, luz, aeração e umidade ou teor de água (BONNER, 2008b).

Dentre as condições ambientais que influenciam a germinação, a água é o fator externo o qual a maioria das sementes é inteiramente dependente para retomar os processos fisiológicos, metabólicos e moleculares que levam até a germinação (BLACK et al., 2006). A

absorção de água pelas sementes possui um padrão típico dividido em três fases: a primeira fase é um processo físico de deslocamento de umidade do substrato com alto conteúdo de água para a semente com baixo conteúdo, e ocorre tanto em sementes vivas como em sementes mortas; a segunda fase, possui o período relacionado ao grau de dormência ou atraso da germinação nas sementes podendo estar ausente ou extenso em alguns casos; e a terceira fase onde o metabolismo torna-se ativo e o tegumento é rompido levando a maior absorção de oxigênio (BONNER, 2008b). Após o metabolismo das sementes se tornar ativo, a respiração e a síntese de proteínas são retomadas minutos depois da hidratação seguido da síntese de RNA, do reparo e da síntese de DNA e, por fim, há expansão das células da radícula precedendo a divisão celular (BLACK et al., 2006).

Quando as sementes são armazenadas, os danos acumulam-se no interior das células devido principalmente ao teor de água e a temperatura de armazenamento levando as sementes a perderem a capacidade de germinar e conseqüentemente aumentando o tempo necessário para germinarem, ou até eventualmente levando estas sementes à morte. Em um teste de germinação, pode ser difícil detectar esta queda na qualidade, por isto, a extensão destes danos acumulados é medida através do vigor das sementes (BLACK et al., 2006).

O vigor das sementes pode ser definido como a capacidade de um lote de sementes estabelecer plântulas em campo. Os testes de vigor têm como principais objetivos avaliar ou detectar diferenças significativas na qualidade fisiológica de lotes com germinação semelhante; distinguir lotes de alto vigor dos de baixo vigor; separar lotes em diferentes níveis de vigor, de maneira proporcional ao comportamento à emergência das plântulas, resistência ao transporte e potencial de armazenamento (PEIXOTO et al., 2006).

#### 2.3.3.2. Teste de Envelhecimento Acelerado

Para estudar os mecanismos de perda de vigor e da germinação durante o armazenamento, tratamentos são utilizados para simular o envelhecimento natural o que permite acelerar experimentalmente a taxa de envelhecimento podendo, desta forma, obter sementes envelhecidas em dias com características de sementes envelhecidas naturalmente por anos (RAJJOU e DEBEAUJON, 2008). Há duas abordagens principais para determinar o vigor das sementes: a primeira através da avaliação do estado metabólico atual das sementes; e a segunda pela da resposta das sementes a condições de estresse, como testes de frio, deterioração controlada e envelhecimento acelerado, seguidos por teste de germinação (PEIXOTO et al., 2006).

O teste de envelhecimento acelerado é conduzido sob condições de estresse com alta temperatura e umidade por período de dias. Ao final deste período, as sementes são testadas no teste de germinação (KARRFALT, 2008). Portanto, o teste de envelhecimento acelerado distingue lotes de sementes que têm elevada porcentagem de germinação em laboratório, uma vez que o envelhecimento ocasiona a redução da viabilidade das sementes levando a germinação pobre ou esporádica, e também provoca a redução do vigor das plântulas ou até mesmo perda total da capacidade de germinação (BLACK et al., 2006).

#### 2.4. DETERIORAÇÃO DE SEMENTES

O processo de deterioração é resultante da combinação de uma série de alterações bioquímicas, fisiológicas, físicas e citológicas, determinando a queda progressiva da qualidade da semente. As sementes envelhecem como consequência do processo de deterioração. O envelhecimento é caracterizado pela perda gradativa da permeabilidade seletiva das membranas, da capacidade de síntese e atividade catalítica de enzimas e alterações em macromoléculas (PEIXOTO et al., 2006).

Geralmente, as sementes armazenadas em condições secas exibem um período inicial de deterioração no qual a porcentagem de germinação é relativamente constante indicando que a perda do vigor precede a perda da viabilidade (BEWLEY et al., 2012). De acordo com Bewley et al. (2012), o atraso na germinação de sementes à medida que elas envelhecem pode ser atribuído ao maior tempo necessário para que o processo de reparo possa ser efetuado, o que pode levar a consequências à sementes desde a um atraso na conclusão da germinação, germinação anormal até a morte, caso os danos sejam suficientes para comprometer componentes funcionais críticos.

Acredita-se que a peroxidação de lipídios é a principal causa da deterioração de sementes (PEIXOTO et al., 2006). A peroxidação de lipídios pode iniciar uma reação em cadeia que provoca a degradação de lipídios e a liberação de subprodutos como espécies reativas de oxigênio (ERO) (BEWLEY et al., 2012; VENTURA et al., 2012). Este subproduto da peroxidação lipídica pode danificar o DNA e aumentar a frequência de anormalidades cromossômicas (BEWLEY et al., 2012), que desempenham um papel importante no processo de envelhecimento das sementes (RAJJOU e DEBEAUJON, 2008).

As ERO são produzidas normalmente nas células e possuem uma alta reatividade química que conduz a peroxidação lipídica e a oxidação de DNA e proteínas (MATÉS, 2000). As ERO também são mediadores da cascata de sinalização intracelular, mas a sua produção

excessiva pode levar a um estresse oxidativo (NORDBERG e ARNÉR, 2001). O estresse ocorre quando as ERO sobrecarregam as defesas antioxidantes do organismo resultando na degeneração genética e disfunção fisiológica, que podem eventualmente levar a morte celular (MORANO et al., 2012). A diminuição da proteção antioxidante pode ocasionar a citotoxicidade, mutagenicidade e/ou carcinogenicidade (MATÉS, 2000).

Em sementes, as ERO são os principais componentes das vias de transdução de sinal levantando a hipótese de que a germinação pode ser completada apenas quando o conteúdo de ERO é mantido sob um nível crítico (VENTURA et al., 2012). Assim como os outros seres vivos, as sementes possuem um mecanismo de desintoxicação para controlar os danos resultantes de ERO através do uso de enzimas antioxidantes, tais como: superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, glutathione peroxidase e glutathione redutase. Além do sistema de desintoxicação enzimática, as sementes possuem vias não enzimáticas de eliminação de ERO através do acúmulo de componentes antioxidantes, como flavonoides e tocoferóis, que contribuem para o controle do potencial de armazenamento da semente durante a etapa final de maturação (RAJJOU e DEBEAUJON, 2008).

O dano oxidativo aos ácidos nucléicos de sementes armazenadas em longo prazo inclui quebras de fita simples causada pelo ataque direto de ERO a unidades desoxirribose ou por modificação covalente de bases, mudanças no conteúdo de DNA e fragmentação do DNA (VENTURA et al., 2012). Antioxidantes, como tocoferóis, fenóis e ascorbato, podem eliminar ERO e parar sua produção reduzindo o dano a semente. Entretanto, em condições de armazenamento em longo prazo, ou seja, a baixos níveis de teor de água, mecanismos enzimáticos para regenerar antioxidantes são ineficientes permitindo danos pela atividade de ERO (BEWLEY et al., 2012).

Em sementes submetidas ao teste de envelhecimento acelerado, água suficiente está disponível para algumas enzimas tornarem-se ativas e alguns aspectos metabólicos são iniciados. Reações hidrolíticas tornam-se possíveis à medida que água livre fica disponível, entretanto isto é perigoso para as sementes, pois atividade respiratória ineficiente pode gerar ERO e mecanismos de proteção antioxidante e regeneração podem ser ineficientes (BEWLEY et al., 2012).

O potencial de desintoxicação de ERO das sementes pode ser fortemente alterado se as enzimas envolvidas neste processo foram submetidas a alguns danos que conduz a uma redução do vigor das sementes. Estes danos podem ser restaurados ou acumulados e atingirem níveis nocivos, os quais levam as sementes a perderem a capacidade de controlar ERO

podendo não suportar o reinício do metabolismo que ocorre durante a germinação das sementes (RAJJOU e DEBEAUJON, 2008).

## 2.5. TESTES DE INTEGRIDADE GENÉTICA

Danos ao DNA podem causar efeitos genotóxicos e citotóxicos nas células e gerar mutações em sequências codificantes de proteínas que afetam vários processos biológicos acarretando instabilidade genômica. Dentre estas consequências biológicas provocadas pelos danos ao DNA está a indução da proliferação celular, a condução a uma deterioração geral da função e a morte celular (TUTEJA et al., 2001).

A conservação de sementes em bancos de germoplasma requer que a integridade genética do material conservado seja mantida em um alto padrão para períodos prolongados (DULLOO e ENGELS, 2003). Por esta razão, a manutenção de um complexo funcional de reparo do DNA apresenta ser uma condição essencial para a sobrevivência das sementes em longo prazo, uma vez que o material genético destas está sujeito a lesões durante a secagem e armazenamento (RAJJOU e DEBEAUJON, 2008).

Existem diversos testes para avaliar a integridade genética em diferentes organismos, desde leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (MYUNG e KOLODNER, 2003), roedores (KWONG et al., 2017) até humanos (LAMM et al., 2016). Em plantas, os testes citogenéticos e cometa se destacam devido a sua simplicidade, sensibilidade e versatilidade.

### 2.5.1. Testes Citogenéticos

Os testes citogenéticos têm por objetivo reconhecer visualmente células que apresentam danos citológicos (PRESTON e HOFFMANN, 2008). São métodos largamente utilizados e bem estabelecidos, tanto em células animais (OECD, 1997a; 1997b), como em células vegetais (WHO, 1985). Através dos testes citogenéticos podem ser analisados vários parâmetros, nos quais estão inclusos o Índice Mitótico e as Anomalias cromossômicas estruturais e numéricas.

#### 2.5.1.1. Índice Mitótico

O ciclo celular pode ser analisado em dois momentos: um onde a célula está em crescimento e outro no qual a célula está em divisão celular propriamente dita. Quando as



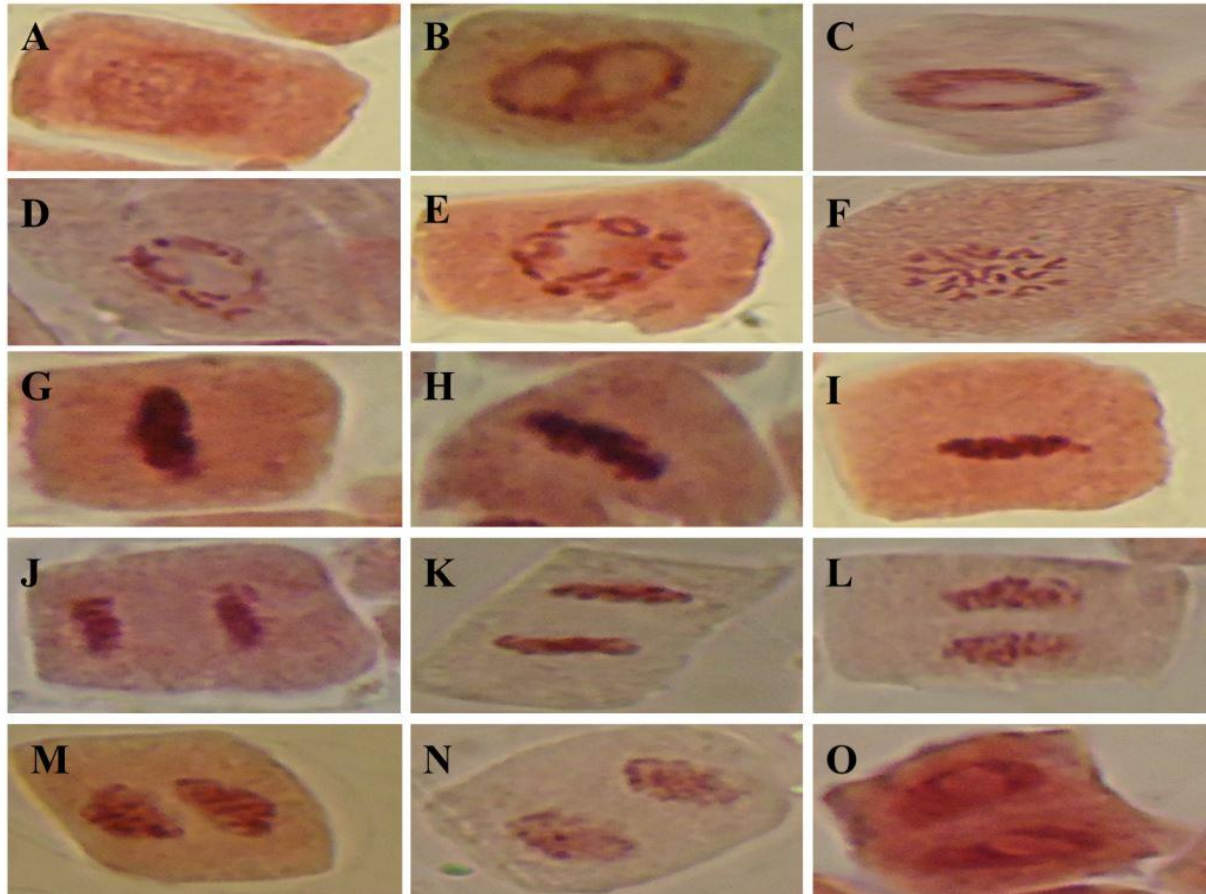
células não estão em divisão, elas se encontram em interfase (**Fig. 7 A-C**). Neste período, no qual a célula passa maior parte do tempo, ela aumenta o seu volume e duplica os cromossomos, os quais estão total ou parcialmente descondensados. A interfase é classificada em três períodos:  $G_1$ , S e  $G_2$ . No período  $G_1$ , a síntese de RNA e proteínas é ativada e, conseqüentemente, há o crescimento das células. Este período é de suma importância, pois nele ocorre a decisão se a célula continua a se proliferar ou interrompe o ciclo e entrar em  $G_0$ , fase em que a síntese proteica é reduzida e a célula não consegue passar para a fase S. Durante a fase S, o DNA é replicado e há síntese de histonas. Em seguida, na fase  $G_2$ , ocorre o reparo do DNA e, caso não tenha acontecido algum erro durante a duplicação, a célula entra na divisão propriamente dita. Caso a célula não tenha duplicado ou reparado completamente o DNA em  $G_2$ , a célula permanece temporariamente em  $G_2$  até que seja completado a replicação ou o reparo do DNA (DIAS e MALUF, 2011).

A divisão celular propriamente dita, cuja é caracterizada pela divisão do núcleo (mitose) e conseqüente formação de duas células filhas, apresentam quatro fases características: prófase, metáfase, anáfase e telófase. A prófase é caracterizada pela condensação da cromatina, dissolução da membrana nuclear, desaparecimento dos centríolos e formação do fuso acromático (**Fig. 7 D-F**). Este fuso é constituído por microtúbulos que se ligam ao cinetócoro, o qual interage com os microtúbulos do fuso durante o movimento dos cromossomos ainda espalhados no núcleo, o que é conhecido como prometáfase. Durante a metáfase, os cromossomos atingem o máximo grau de condensação e estão alinhados na região equatorial da célula, denominada de placa metafásica, e mantidos nesta posição pelos microtúbulos do fuso (**Fig. 7 G-I**). Em seguida, na anáfase, os microtúbulos do fuso ligados ao cinetócoro são encurtados e o centrômero separa as cromátides-irmãs distribuindo igualmente os cromossomos-filhos nos polos da célula (**Fig. 7 J-L**). Na última fase, a telófase, os cromossomos apresentam-se muito unidos e em alta condensação originando núcleos pequenos e bem densos, então os núcleos são reconstruídos e ocorre à divisão citoplasmática, processo este denominado de citocinese, o que irá originar duas células filhas (DIAS e MALUF, 2011) (**Fig. 7 M-O**).

O índice mitótico (IM) consiste no número de células em divisão dividido por 1.000 células observadas (FISKESJÖ, 1985) sendo utilizado para avaliar efeitos citotóxicos (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Níveis significativamente menores de IM, em relação ao controle negativo, podem indicar alterações devido à ação do agente no crescimento e desenvolvimento do organismo exposto. Já níveis significativamente maiores de IM, quando comparado com controle (negativo), são resultantes do aumento da divisão celular, o que pode

conduzir a uma proliferação celular desordenada e até mesmo para a formação de tecidos tumorais (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

**Figura 7** – Fotomicrografias de células meristemáticas de raízes de arroz em diferentes estágios do ciclo celular.



A-C) Células em interfase. D-F) Células em prófase. G-I) Células em metáfase. J-L) Células em anáfase. M-N) Células em telófase. O) Duas células filhas recém-formadas. Fonte: Arquivo Pessoal.

#### 2.5.1.2. Anomalias Cromossômicas

Danos ao DNA podem consistir de pequenas lesões em locais muito específicos dentro da molécula de DNA, tais como adutos ao DNA, ligações cruzadas de DNA, sítios abásicos e mutações pontuais ou podem ser anormalidades grosseiras que surgem ao nível cromossômico, denominadas de anomalias cromossômicas ou ACs (DOAK et al., 2012). As ACs podem ser consequências de quebras de fita dupla no DNA que foram reparadas incorretamente ou não foram reparadas fazendo com que o cromossomo perca a região telomérica tornando-o pegajoso, o que pode permitir a fusão entre cromossomos sem

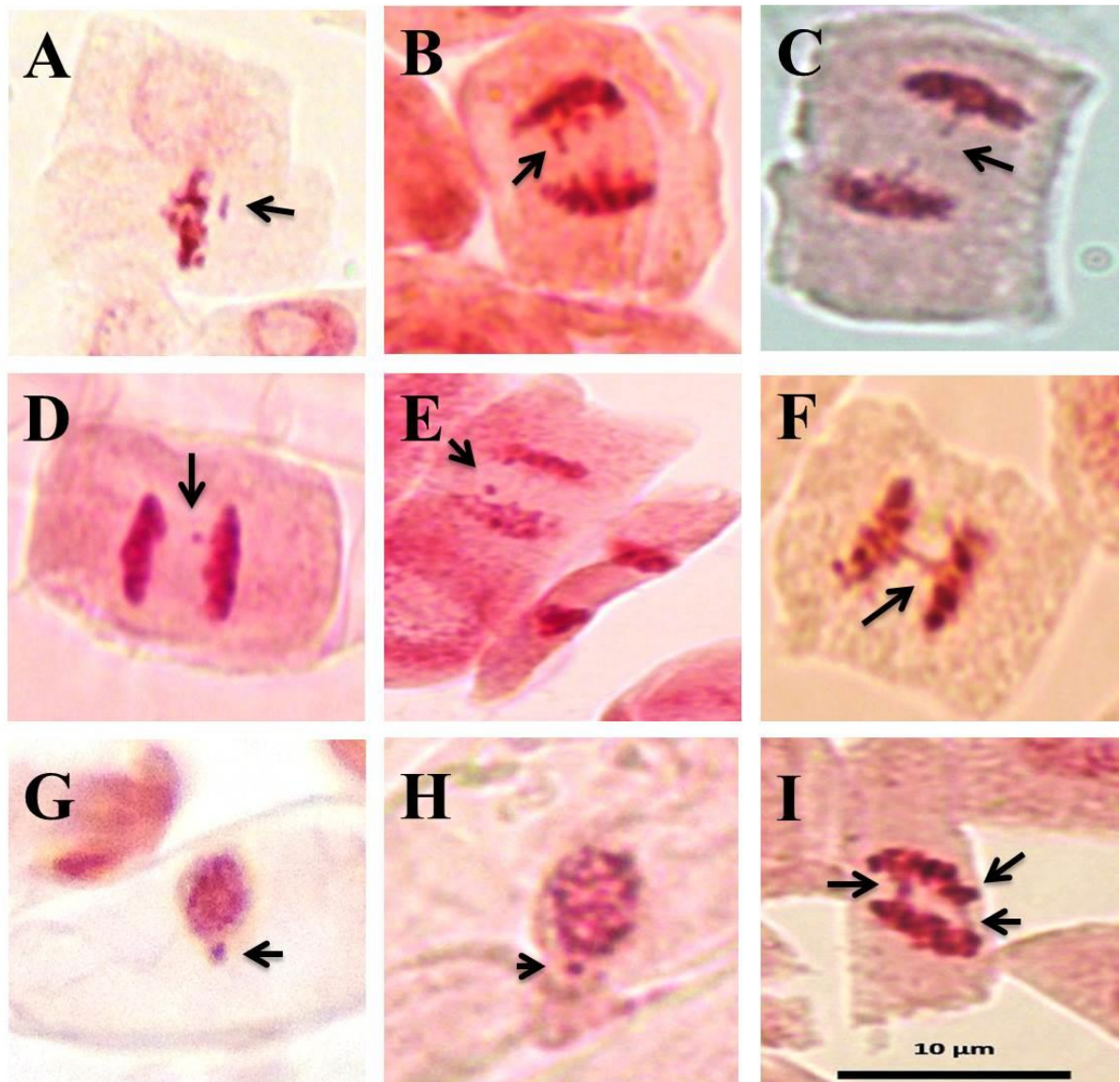
telômeros (MALUSZYNSKA e JUCHIMIUK, 2005). Além disso, ACs caracterizam-se pela alteração da estrutura cromossômica ou alteração no número total de cromossomos as quais podem ocorrer espontaneamente e como resultado da exposição a agentes físicos ou químicos (LEME e MARIN-MORALES, 2009) sendo que a alteração na estrutura do cromossomo é resultante principalmente de quebras no DNA, danos ao molde de DNA para replicação e inibição da síntese de DNA, e a alteração numérica de cromossomos ocorrem devido à divisão celular anormal (ALBERTINI et al., 2000).

Ao longo de todas as fases do ciclo celular, é possível visualizar ACs. Entretanto, em plantas, não é simples fazer uma avaliação de ACs em todas as fases, uma vez que para isto é necessário um conhecimento preciso das fases de divisão celular e suas possíveis anormalidades (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Por esta razão, tem sido proposto avaliar ACs em células de plantas em anáfase e telófase por serem facilmente observadas (RANK, 2003).

Dentre as ACs visualizadas em células vegetais em anáfase e telófase, destacam-se: desalinhamento em metáfase, cromossomos retardatários, além de fragmentos e pontes cromossômicas. Desalinhamento em metáfase é identificado como cromossomos alinhados incorretamente fora da placa equatorial na metáfase (RAO et al., 2008) (**Fig. 8A**). Os cromossomos retardatários caracterizam-se pelo retardo da migração de cromossomos inteiros devido à rápida polimerização (alongamento) dos microtúbulos, o que pode dessincronizar a anáfase (BAJER e VANTARD, 1988) (**Fig. 8B e C**). Os fragmentos cromossômicos são formados por quebras de cadeia dupla de DNA e podem consistir de uma ou duas cromátides-irmãs sendo que os fragmentos não interagem com o fuso mitótico, pois são incapazes de fornecer um local efetivo para a formação do cinetócoro devido à ausência de sequências repetitivas da região centromérica, podendo ser deixados para trás tanto na metáfase quanto na anáfase (GISSELSSON, 2008) (**Fig. 8D e E**). As pontes cromossômicas consistem de uma sequência contínua da cromatina com alongamento de um polo da anáfase para o outro e, após o seu rompimento, formam vários fragmentos (GISSELSSON, 2008; HOFFELDER et al., 2004) (**Fig. 8I**).

Através das ACs pode ser avaliado tanto os efeitos mutagênicos como os mecanismos de ação do agente exposto, pois pontes e fragmentos cromossômicos são indicadores de ação clastogênica, ou seja, promovem quebras cromossômicas, enquanto desalinhamento em metáfase e cromossomos retardatários indicam ação aneugênica, isto é, induzem a má segregação dos cromossomos (LEME e MARIN-MORALES, 2009; TERRADAS et al., 2010).

**Figura 8** – Fotomicrografias de anomalias cromossômicas (setas) encontradas em células meristemáticas de raízes de arroz expostas ao metanossulfonato de metila.



A) Desalinhamento em metáfase; B e C) Cromossomos retardatários; D e E) Fragmentos cromossômicos; J) Ponte cromossômica; G e H) Micronúcleos; e I) Pontes cromossômicas e cromossomo retardatário. Fonte: Arquivo Pessoal.

As ACs citadas anteriormente podem originar micronúcleos (MNs) (Fig. 8G e H). Os MNs são pequenas estruturas arredondadas ou ovais morfológicamente idênticas ao núcleo principal presentes em células em divisão podendo ocorrer espontaneamente ou serem resultantes da exposição a agentes aneugênicos ou clastogênicos (FENECH, 2000; FENECH et al. 2003; RAO et al., 2008; VRAL et al., 2011). MNs têm atividade transcricional reduzida causada pela formação incompleta do complexo de poro nuclear e defeitos na importação nuclear (HOFFELDER et al., 2004) tornando-se um dano grave e irreversível a célula.

Entretanto, tais ACs podem não produzir MNs nas células filhas. Os cromossomos desalinhados na metáfase podem ser reparados pelo processo de revisão do alinhamento cromossômico que ocorre durante a metáfase. Os cromossomos retardatários e as pontes cromossômicas podem ser reincorporados aos núcleos das células filhas através do retardo da citocinese, enquanto que fragmentos cromossômicos originados de pontes podem desaparecer logo em seguida (RAO et al., 2008).

### 2.5.2. Teste de Eletroforese em Gel de Célula Única – Teste Cometa

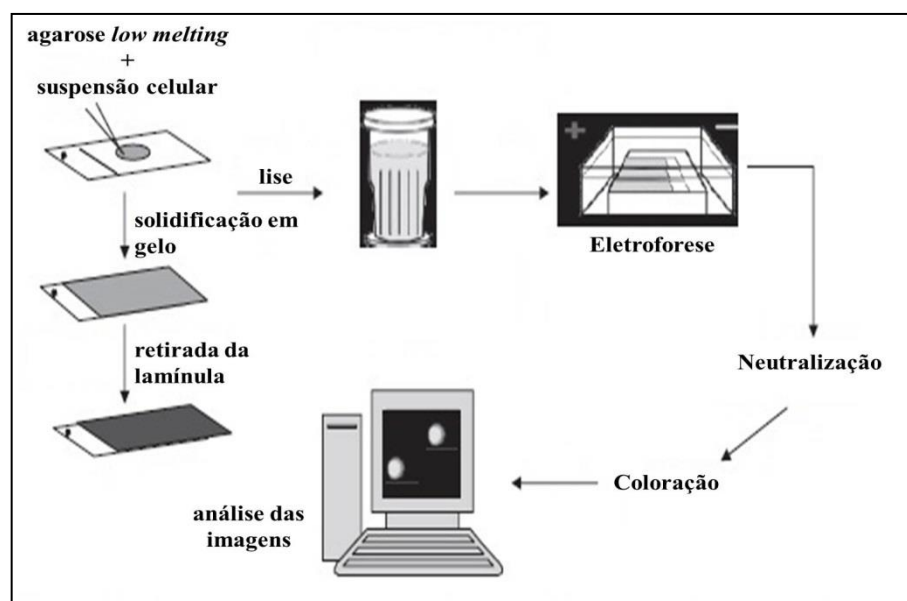
O teste de eletroforese em gel de célula única (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*, ou SCGE), também conhecido como teste cometa, consiste de um método simples, sensível, confiável, rápido e, relativamente de baixo custo para a detecção de danos ao DNA (COLLINS et al., 1997), tais como quebras de fita simples e dupla no DNA, sítios alcali-lábeis, danos oxidativos e ligações cruzadas, bem como permite avaliar capacidade de reparo a estes danos (VILLELA et al., 2003). Este teste é amplamente utilizado para o biomonitoramento humano (COLLINS et al., 2014), a epidemiologia molecular (COELHO et al., 2013) e a ecogenotoxicologia (ŠRUT et al., 2011).

No SCGE (**Fig. 9**), células embebidas em agarose sobre lâminas são lisadas com detergentes e sais para remover membranas e constituintes celulares solúveis, nos quais estão incluídas as histonas, deixando nas lâminas somente estruturas formadas por alças de DNA superenroladas ligadas a matriz nuclear denominadas de nucleoides (AZQUETA et al., 2009). Em seguida, as lâminas são colocadas em solução tampão de pH variável para desenovelamento das cadeias de DNA e submetidas a uma corrente elétrica (VILLELA et al., 2003). Uma quebra em uma alça de DNA é suficiente para desfazer o superenrolamento dos nucleoides e, durante a eletroforese, as alças relaxadas são capazes de migrar no sentido da corrente elétrica (AZQUETA et al., 2009). Quando as lâminas são coradas por agentes capazes de associar ao DNA, como o brometo de etídio, os nucleoides apresentam-se semelhantes a “cometas” nos quais a intensidade relativa de cauda representa a frequência de quebras (VILLELA et al., 2003).

A análise das lâminas pode ser feita através da pontuação visual dos nucleoides ou com o auxílio de programas que calculam parâmetros de fluorescência para os nucleoides selecionados pelo pesquisador. Na avaliação das lâminas por pontuação visual, os nucleoides são classificados em cinco categorias, as quais variam de zero a quatro, de modo que o zero representa nucleoides intactos e de um a quatro representa o aumento da intensidade relativa

da cauda. Na análise das lâminas por meio de programas, um sistema de captura de imagem é acoplado a um computador com programa adequado para avaliação dos nucleoides (COLLINS et al., 2008). Os parâmetros mais utilizados por este último método de avaliação são a intensidade da cauda, também denominada de porcentagem de DNA na cauda, o comprimento e o momento da cauda (COLLINS, 2004). A intensidade da cauda é o parâmetro mais recomendado para análise (COLLINS et al., 2008), pois este parâmetro tem uma relação linear com a frequência de quebras no DNA, é relativamente pouco afetado pelas configurações de limite e permite discriminar os danos de 0 a 100% de DNA na cauda (COLLINS, 2004). Apesar de ambos os métodos de análise de lâminas de cometa ser diferentes, estes dois métodos demonstram ter uma boa correlação entre eles, principalmente quando os parâmetros analisados com o auxílio de programas são a intensidade da cauda ou o momento da cauda (COLLINS et al., 2008).

**Figura 9** – Esquema do teste cometa demonstrando as principais etapas.



Fonte: adaptado de Dhawan et al. (2009).

Há dois protocolos principais para a realização do teste cometa que diferem quanto ao pH empregado: a versão neutra e a versão alcalina. O SCGE em condições alcalinas ( $\text{pH} > 13$ ) é capaz de detectar quebras de fita simples e dupla, sítios álcali-lábeis, ligações cruzadas entre DNA-DNA e DNA-proteína e quebras de fita simples associadas com sítios reparo por excisão incompleto (TICE et al., 2000), devido ao fato que soluções com alto valor de pH ( $\text{pH} > 12$ ) promovem a ruptura das pontes de hidrogênio entre as fitas de DNA, detectando quebras de fita simples e dupla no DNA (KOHNS, 1991). Para o teste cometa em condições

neutras ou próximas ao neutro ( $\text{pH} < 9,5$ ), tanto na etapa de lise como na eletroforese (VENTURA et al., 2013), acredita-se que estas condições impedem o desenovelamento do DNA permitindo a detecção somente de quebras de fitas dupla no DNA (OLIVE e BANÁTH, 2006; SINGH et al., 1988).

Entretanto, esta compreensão sobre a versão neutra do SCGE permitir observar apenas quebras de fitas dupla no DNA está relacionada a uma comparação deste método com outros anteriores utilizados também para a detecção de danos ao DNA, os quais dependem de um alto valor do pH para separação das fitas de simples no DNA (AZQUETA e COLLINS, 2013; COLLINS et al., 2008). Um pH elevado não é essencial para detectar quebras de fita simples no DNA no teste cometa (COLLINS, 2004), uma vez que isto depende do relaxamento das alças de DNA superenroladas e não da influência do pH (AZQUETA e COLLINS, 2013). Além disso, Östling e Johanson (1984), que foram os primeiros a descreverem o teste cometa, observaram que doses baixas de radiação ionizante induziram danos ao DNA de células de mamíferos empregando soluções para lise e eletroforese com o pH a 9,5, bem abaixo do que requerido para desenrolar o DNA, assim como Singh et al. (1988) utilizando o teste cometa em condições alcalinas. Dificilmente os resultados encontrados por Östling e Johanson (1984) seriam explicados se a versão neutra do SCGE detectasse apenas quebras de fita dupla no DNA, uma vez que a radiação ionizante produz predominantemente quebras de fita simples no DNA (COLLINS et al., 2008). Portanto, o teste cometa em condições neutras, assim como a versão alcalina, consegue detectar tanto quebras de fitas dupla como quebras de fita simples no DNA. Nas lâminas da versão neutra do SCGE, os nucleoides de células não expostas a agentes que causam danos ao DNA desenvolvem um “halo” ao seu redor e apresentam-se mais alongados possuindo mais DNA na região da cauda do cometa quando comparada aos nucleoides do teste cometa em condições alcalinas (OLIVE e BANÁTH, 2006).

Existem variantes do teste cometa comumente usadas para observar outros tipos de danos ao DNA além de quebras, como sítios álcali-lábeis e danos oxidativos. Os sítios álcali-lábeis, nos quais estão inclusos sítios apurínicos e apirimidínicos (APs), surgem a partir da perda de uma base danificada nas fitas de DNA e convertida em quebra quando o DNA passa por eletroforese a um  $\text{pH} > 13$  (COLLINS et al., 2008). Os danos oxidativos podem ser observados no SCGE com o auxílio de enzimas que reconhecem bases oxidadas e removem estas bases criando sítios APs e convertendo-os em quebras (COLLINS, 2014). Outra variante do teste cometa aplicada é a combinação deste método com a técnica de hibridização por fluorescência *in situ* utilizando sondas específicas a sequência de gene, região ou cromossomo

para determinar a localização do DNA danificado (McKELVEY-MARTIN e McKENNA, 2009). Atualmente, tem sido desenvolvida uma técnica de alto rendimento do teste cometa denominada *CometChip*, que é compatível com as variantes citadas anteriormente, na qual as células estão individualizadas em micropoços de uma matriz de agarose, o que permite maximizar o SCGE e potencializar a sua sensibilidade (GE et al., 2012; 2014).

O teste cometa pode ser realizado virtualmente em qualquer organismo eucarioto, sem a necessidade das células estarem em proliferação (VILLELA et al., 2003). Entretanto, os protocolos do SCGE para plantas e animais diferem devido ao fato das células vegetais apresentarem uma parede celular formada de celulose, enquanto que as células animais possuem apenas uma membrana. Esta dificuldade, em relação ao teste cometa em plantas, pode ser solucionada pelo isolamento dos núcleos das células vegetais através da formação de protoplastos (isto é, células vegetais sem parede celular, que pode ser eliminada utilizando enzimas, como celulase e pectinase, que digerem a parede celular) ou por processos mecânicos colocando o tecido da planta sobre gelo e cortando-o com auxílio de lâminas de bisturi (GICHNER et al., 2009). Após o isolamento dos núcleos, a suspensão nuclear pode ser submetida ao mesmo protocolo do teste cometa para células animais, diferindo em alguns casos na ausência da etapa de lise com detergente (GHOSH et al., 2012; NAVARRETE et al., 1997). Em plantas, o SCGE emerge como uma ferramenta útil na avaliação do potencial de plantas superiores como sensores estáveis nos ecossistemas e fonte de informações sobre o impacto genotóxico de poluentes perigosos (VENTURA et al., 2013), sendo utilizado para avaliar os efeitos da radiação (CERDA et al., 1997) de agentes mutagênicos (BANDYOPADHYAY e MUKHERJEE, 2011) e análise de danos ao ambiente através do monitoramento de águas (GARAJ-VRHOVAC et al., 2013) e solos (GHOSH et al., 2015).

As vantagens do teste cometa em relação a outros métodos que detectam danos ao DNA são: a sensibilidade para detectar baixos níveis de danos ao DNA; o pequeno número de células requerido por amostras; a flexibilidade; o baixo custo; a facilidade de aplicação; a capacidade de ser realizado utilizando pequenas quantidades da substância teste; e o período de tempo relativamente curto para completar o teste (TICE et al., 2000). Entretanto, o teste cometa apresenta algumas limitações, tais como: não ser um teste de mutagênese, pois os danos observados no SCGE podem ser reparados pelos mecanismos de reparo da célula; o fato de ser muito sensível deve fazer com que os resultados encontrados sejam tratados com cautela, por isso deve-se ter um bom controle para análise das conclusões; e o período entre a exposição ao agente e o preparo das lâminas deve ser curto, não excedendo 24 horas porque o reparo começa imediatamente (VILLELA et al., 2003).



É importante ressaltar que índices elevados de quebras encontrados no teste SCGE podem indicar altos níveis de danos ou reparo, uma vez que sítios APs, detectados no teste cometa em condições alcalinas ( $\text{pH} > 13$ ), são produzidos como intermediários durante reparo por excisão de base e também podem surgir espontaneamente devido à estabilidade química alterada resultante de mudanças nas bases ou açúcares (COLLINS et al., 1997; 2008). Além disso, independentemente das condições do teste SCGE empregada, os danos observados são reparados. Por esta razão é desejável a combinação do teste cometa com um marcador citogenético o que aumenta a sensibilidade e proporciona uma melhor interpretação dos dados obtidos no teste (VASQUEZ, 2010).

## 2.6. METANOSSULFONATO DE METILA

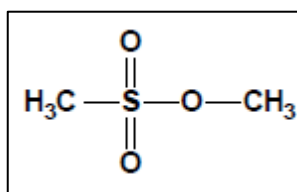
Vários testes de integridade genética estão estabelecidos em diversos organismos, como em bactérias (*Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*) (OECD, 1997c), cebola comum (*Allium cepa* L.) (FISKESJÖ, 1985), roedores e humanos (OECD, 1997a; 1997b). Quando os testes de integridade genética não estão estabelecidos nas espécies a ser estudadas, se faz necessário o uso de um agente de referência para viabilizar tais metodologias. Em plantas, o metanossulfonato de metila (MMS) tem sido utilizado como agente de referência.

O MMS (C.A.S:66-27-3; fórmula molecular:  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_3\text{S}$  – **Fig. 10**) é um agente alquilante capaz de interagir com macromoléculas, tais como o DNA (IARC, 1999; MALINI et al., 2010). Este agente modifica o DNA pela adição de grupos metil a uma série de sítios nucleofílicos nas bases do DNA formando adutos. Os adutos mais frequentemente são a 7-metilguanina (N7-MeG), a 3-metiladenina (N3-MeA) e a  $O^6$ -metilguanina ( $O^6$ -MeG). A N7-MeG, o aduto mais predominante em cadeia dupla de DNA resultante da exposição de MMS, parece não bloquear a replicação ou ocasionar um erro no código genético, mas produz sítios abásicos, o que provoca efeitos mutagênicos e tóxicos. A N3-MeA impede a ação de polimerases sobre o DNA, impossibilitando a extensão de pares de bases recém-sintetizados, conseqüentemente bloqueando a replicação. A  $O^6$ -MeG aparentemente não produz conseqüências biológicas até ser pareada com timina, pois a ligação entre  $O^6$ -MeG e timina é reconhecida pelo sistema de reparo de pareamento incorreto como um potente sinal para apoptose (WYATT e PITTMAN, 2006).

O MMS exibe uma elevada ação clastogênica, porém possui um baixo potencial para produzir mutação de ponto (KAINA, 2004). Este agente clastogênico tem a capacidade de induzir trocas entre cromátides irmãs (KAINA e AURICH, 1985) e os grupos metil

adicionados por ele ao DNA causam anomalias cromossômicas (KAINA, 2004), embora estudos demonstrem que o MMS não induz quebras de fitas duplas *in vivo* (LUNDIN et al., 2005). Além disso, o MMS possui uma reputação de ser radiomimético – isto é, atua como radiação produzindo alterações genéticas com eficácia similar em todos os estágios do ciclo celular (PRESTON e HOFFMANN, 2008) – porque uma serie de leveduras deficientes no reparo de danos ocasionados pela radiação também são sensíveis ao MMS (XIAO et al., 1996). Entretanto, esta reputação do metanossulfonato de metila e as suas propriedades de induzir trocas entre cromátides irmãs, não distingue se o MMS provoca quebras de fita de DNA diretamente ou se as quebras de fita observadas são consequências de eventos posteriores aos danos ocasionados pelo MMS, como intermediários de reparo que são quebras de fita ou forquilhas de replicação em colapso ou paralisadas (WYATT e PITTMAN, 2006).

**Figura 10** – Estrutura química do metanossulfonato de metila.



Fonte: IARC (1999).

Os mecanismos de defesa inicial de células bacterianas e de mamíferos contra danos a agentes de metilação, como o MMS, são a remoção destes danos por proteínas de reversão direta e a via reparo por excisão de bases (BER). Entretanto dados sugerem fortemente que os intermediários de BER gerados pela remoção de *N*-metilpurinas são tóxicos e clastogênicos. Quando estes mecanismos são insuficientes ou estão em desequilíbrio, vias adicionais são ativadas após a exposição ao MMS, nas quais estão inclusas o reparo de pareamento incorreto, o mecanismo de *bypass* e a recombinação homóloga (WYATT e PITTMAN, 2006).

Devido à sua capacidade de causar danos ao DNA, o MMS tem sido amplamente utilizado, às vezes como controle positivo, para avaliar o comportamento de diferentes organismos a sua exposição. Em leveduras, o metanossulfonato de metila induz rearranjos cromossômicos na qual a extremidade de um cromossomo é eliminada e um novo telômero é adicionado e também induz translocações (MYUNG e KOLODNER, 2003). Estudos em peixe-zebra (*Danio rerio*) mostram que o MMS eleva a frequência de micronúcleos em gônadas, fígado e brânquias e causa efeitos genotóxicos dose dependente em todos estes órgãos, além de aumentar os efeitos teratogênicos e reduzir a sobrevivência das larvas

(FABBENDER e BRAUNBECK, 2013a; 2013b). Em camundongos, o metanossulfonato de metila reduz o número de células da medula óssea em mitose e induz um aumento significativo de anomalias cromossômicas, sendo que as principais delas são quebras, trocas e deleções intra cromátides (GURUPRASAD et al., 2012). Outros estudos demonstram que o MMS ocasiona quebras de DNA em células do fígado, sangue, medula óssea, rim, intestino e cólon de camundongos e também aumenta significativamente danos cromossômicos pelo aumento da frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (BAZIN et al., 2010).

Em plantas, o MMS também é usado na avaliação da resposta a agentes causadores de danos ao DNA, sendo já bem estabelecido como controle positivo para algumas espécies (LIMAN et al., 2015; LIU et al., 2013). Os efeitos do MMS têm sido demonstrados em sementes de pimentão (*Capsicum annuum* L.) através da indução de uma série de aberrações meióticas, como a formação de univalentes, multivalentes, cromossomos pegajosos, bivalentes dispersos em metáfase I/II, separação desigual, cromossomos retardatários e pontes cromossômicas em anáfase I/II, e distúrbios na polaridade e micronúcleos em telófase I/II (GULFISHAN et al., 2011; 2012). Também têm sido observadas anomalias meióticas em fava (*Vicia faba* L.) expostas ao MMS (BHAT et al., 2006; SHARMA et al., 2006). Para a cebola, o MMS é utilizado como agente indutor de danos ao DNA, principalmente nas concentrações de 10 e 15 mg/L, devido as suas atividades citotóxicas e mutagênicas em células meristemáticas das raízes, sendo que os principais efeitos encontrados são a redução do índice mitótico, aumento na frequência de micronúcleos e de anomalias cromossômicas, como cromossomos retardatários, pontes cromossômicas e fragmentos (MAURO et al. 2014; RANK, 2003; RANK e NIELSEN, 1993).

### 3. JUSTIFICATIVA

No Brasil, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) promove e viabiliza a internalização segura de recursos genéticos estratégicos para o país (DANTAS e LUZ, 2015). A EMBRAPA atua desde 1974 e conta atualmente com 170 bancos de germoplasma em suas unidades descentralizadas distribuídas por todo o território nacional (PLATAFORMA NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS, 2017). O novo banco genético ou coleção de base (Colbase) da Embrapa, localizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, armazena amostras de todas as espécies vegetais dos bancos mantidos pela empresa e de outras instituições e universidades conveniadas de todo o país e do exterior. São conservadas na Colbase mais de 124 mil amostras de sementes de 765 espécies podendo abrigar, após ampliação das instalações, até 750 mil amostras de espécies vegetais, além de material genético de animais e microrganismos (DANTAS e LUZ, 2015).

A manutenção da viabilidade e da integridade genética de sementes armazenadas é fundamental na gestão de banco de germoplasma (RAO et al., 2006). Neste contexto, a deterioração das sementes pode desempenhar consequências importantes do ponto de visto econômico, pois o tempo que as sementes permanecem viáveis em bancos de germoplasma determina o custo da conservação (BLACK et al., 2006). Atualmente, a monitoração do germoplasma não permite detectar o progresso da deterioração, indicando apenas os estágios finais do processo, podendo assim, inviabilizar a sua utilização, no momento em que for solicitado. Estágios iniciais da deterioração, como a instabilidade genômica, poderiam ser detectados antes e durante do armazenamento, contribuindo para explicar as diferenças de comportamento das sementes com diferentes qualidades durante o período de conservação.

Um teste de integridade genética geralmente usada em recursos fitogenéticos são os testes citogenéticos. Estes testes têm sido utilizados para indicar estratégias e diretrizes para preservação ambiental dos recursos fitogenéticos ou de como utilizá-los dentro de um programa de melhoramento vegetal (PINTO-MAGLIO e PIEROZZI, 2015). De acordo com Pinto-Maglio e Pierozzi (2015), a caracterização citogenética dos recursos fitogenéticos é realizada através do registro do número básico de cromossomos, da detecção de indivíduos poliploides/aneuploides, do estabelecimento de cariótipos com diferentes graus de detalhamento e do estudo da biologia da reprodução. Entretanto, poucos estudos têm sido demonstrados a relação entre a presença de anomalias nucleares e a perda da germinação de sementes envelhecidas, como em sementes de trigo, cevada (AKHTER et al., 1992), araucária

(FONTES et al., 2001) e ervilhas (KHAN et al., 2003) e, até o presente momento, não tem sido relatado o uso do teste cometa em sementes de bancos de germoplasma.

O uso de testes de integridade genética demonstra potencial para observar estágios iniciais de deterioração de recursos fitogenéticos em forma de sementes contribuindo para a conservação destes através da monitoração dos níveis de deterioração do DNA relacionadas à perda da viabilidade ocasionada pelas condições de armazenamento. Além disso, as informações obtidas pelos testes de integridade genética poderia complementar os resultados da monitoração feita atualmente permitindo uma melhor compreensão do comportamento dos recursos fitogenéticos, bem como poderia determinar uma técnica mais bem apropriada para detectar estágios iniciais de deterioração de sementes armazenadas em bancos de germoplasma.

Além do exposto acima, estudos sobre a integridade genética de sementes envelhecidas podem ser uma boa ferramenta para a compreensão dos efeitos da progressão do envelhecimento nas células e no DNA, uma vez que os danos ao DNA estão associados ao processo de envelhecimento em células e organismos (BERTRAM e HASS, 2008). Deste modo, as sementes fornecem um modelo adequado para estudar o envelhecimento, o que é de interesse fundamental para a saúde humana (RAJJOU e DEBEAUJON, 2008).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo teve por objetivo avaliar a integridade genética em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenadas em bancos de germoplasma.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Viabilizar os testes citogenéticos e de eletroforese em gel de célula única em acessos de *O. sativa* e *P. vulgaris* por meio do tratamento destes acessos ao metanossulfonato de metila.
- Determinar concentrações do metanossulfonato de metila mais adequadas para ser utilizadas como controle positivo nos testes citogenéticos e eletroforese em gel de célula única em acessos de *O. sativa* e *P. vulgaris*.
- Verificar a viabilidade e o vigor de acessos de *O. sativa* e *P. vulgaris* submetidos ao envelhecimento acelerado e armazenados em longo prazo pelos testes de primeira contagem, germinação e índice de velocidade de germinação.
- Observar as ações citotóxicas pelo Índice Mitótico e ações mutagênicas pelas frequências de anomalias cromossômicas ocasionadas pelo envelhecimento acelerado e as condições de armazenamento em longo prazo em acessos de *O. sativa* e *P. vulgaris*.
- Analisar a integridade genética e capacidade de reparo a danos ao DNA de acessos de *O. sativa* e *P. vulgaris* submetidos ao envelhecimento acelerado e armazenados em longo prazo por meio do teste de eletroforese em gel de célula única.

## **CAPÍTULO 1**

### **Testes cometa e citogenéticos como ferramentas para avaliação da instabilidade genômica em sementes de *Oryza sativa* L. (arroz) e *Phaseolus vulgaris* L. (feijão) de bancos de germoplasma**

DANTAS, A. F.; LOPES, R. M.; FASCINELI, M. L.; JOSÉ, S. C. B. R.; PÁDUA, J. G.; GIMENES, M. A.; GRISOLIA, C. K. **Comet and cytogenetic tests as tools for evaluating genomic instability in seeds of *Oryza sativa* L. and *Phaseolus vulgaris* L. from gene banks.** *Genetics and Molecular Biology*. v. 41, p. 145–153. 2018.

Testes cometa e citogenéticos como ferramentas para avaliação da instabilidade genômica em sementes de *Oryza sativa* L. e *Phaseolus vulgaris* L. de bancos de germoplasma

Alisson F. Dantas<sup>1</sup>, Renata M. Lopes<sup>2</sup>, Maria L. Fascineli<sup>1</sup>, Solange C.B.R. José<sup>3</sup>, Juliano G. Pádua<sup>3</sup>, Marcos A. Gimenes<sup>3</sup>, Cesar K. Grisolia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF*

<sup>2</sup>*Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF*

<sup>3</sup>*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, D.F.*

## **Resumo**

Este estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade dos testes citogenéticos e cometa como ferramentas para avaliação da instabilidade genômica de sementes de *Oryza sativa* L. (arroz) e *Phaseolus vulgaris* L. (feijão) de bancos de germoplasma. Sementes de arroz e feijão foram expostas a metanossulfonato de metila (MMS) como um agente de referência causador de danos ao DNA. Sementes de dois acessos de arroz e feijão foram obtidas da Embrapa Arroz e Feijão – Brasil. As sementes foram embebidas em três concentrações de MMS por três intervalos de tempo para a realização de testes citogenéticos e cometa. Nas concentrações de 10 e 15 mg/L, o MMS induziu efeitos citotóxicos e/ou mutagênicos em células meristemáticas de raízes de todos os acessos de ambas as espécies. No teste cometa, o MMS induziu efeitos genotóxicos em todas as



concentrações nos acessos de arroz e feijão avaliados, exceto em um acesso de *P. vulgaris* para a menor concentração (5 mg/L). Ambas as espécies mostraram sensibilidade ao MMS. O teste cometa pode ser proposto para medir a instabilidade genômica em acessos de arroz e feijão de bancos de germoplasma mostrando ser mais sensível do que os testes citogenéticos utilizados.

Palavras-chave: *Oryza sativa* L., *Phaseolus vulgaris* L., metanossulfonato de metila, testes citogenéticos, teste cometa.

## **Introdução**

O arroz comum, *Oryza sativa* L. (família Poaceae), e feijão comum, *Phaseolus vulgaris* L. (família Fabaceae) desempenham um papel importante na alimentação de diversos países, sendo no Brasil os principais componentes da dieta alimentar (Barbosa, 2007). O arroz comum é uma gramínea anual de origem asiática que se adapta a uma ampla variedade de condições ambientais (Sousa *et al.*, 1995) e distribuída em regiões tropicais, subtropicais e em algumas regiões temperadas (Vaughan, 1994). O feijão comum é uma espécie de leguminosa que apresenta um grande número de variedades e cultivares distribuídas em diferentes continentes devido ao seu alto valor para nutrição humana (Peixoto *et al.*, 2000). O consumo de ambas as espécies pode levar a diversos efeitos benéficos a saúde humana devido à presença de compostos antioxidantes (Walter e Marchesan, 2011; López *et al.*, 2013).

Devido à importância alimentar do arroz e feijão, grandes coleções de germoplasma foram estabelecidas, há estudos sobre avaliação citotóxica, mutagênica e genotóxica em *O. sativa* (Mei *et al.*, 1994; Todoriki e Toru, 1999; Mohanty *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2010; Endo *et al.*, 2012; Kwon *et al.*, 2013; Macovei e

Tuteja, 2013; Macovei *et al.*, 2014) e em *P. vulgaris* (Hallak *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2002, Cenkci *et al.*, 2010). A utilização de metodologias para detectar danos ao DNA baseadas na quebra e má segregação cromossômica desempenhariam um papel importante na compreensão da estabilidade genômica e viabilidade de sementes armazenadas em bancos de germoplasma porque a perda da estabilidade genômica é um dos estágios iniciais no processo de deterioração de sementes (Peixoto *et al.*, 2006). Neste caso, o metanossulfonato de metila (MMS) foi usado como composto de referência para induzir tais danos em sementes de arroz e feijão. O MMS é um agente alquilante capaz de adicionar grupos metil a uma série de sítios nucleofílicos nas bases do DNA (Wyatt e Pittman, 2006; Malini *et al.*, 2010), o que pode ocasionar anomalias cromossômicas (Kaina, 2004). Este composto é usado para avaliação mutagênica e genotóxica em diferentes organismos, desde fungos (Myung e Kolodner, 2003) a roedores (Muto *et al.*, 2015; Plappert-Helbig *et al.*, 2015).

O principal objetivo do presente estudo foi testar metodologias citogenéticas conhecidas e teste de eletroforese em gel de célula individualizada (teste cometa) como ferramentas para medir a instabilidade genômica em sementes armazenadas em bancos de germoplasma.

## **Materiais e Métodos**

### **Material vegetal**

Sementes de dois acessos de *O. sativa* (BGA012099 “Ferrinho” e BGA008070 “Primavera”) e de dois acessos de *P. vulgaris* (GF004 e GF007) foram obtidas do Banco Ativo de Germoplasma de Arroz e Feijão (Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, Brasil). A germinação inicial das sementes foi de 97 e 94% para

o acesso de *O. sativa* BGA012099 Ferrinho e BGA008070 Primavera, respectivamente, e 56 e 99% para o acesso de *P. vulgaris* GF004 e GF007, respectivamente.

### Químicos

O MMS (CAS N. 66-27-3), brometo de etídio, dodecil sulfato de sódio, tris (hidroximetil) metano, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e ácido bórico foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). A agarose de ponto normal de fusão (NMP) foi adquirida da empresa Life Technologies (Nova Iorque, EUA) e a agarose de baixo ponto de fusão (LMP) da empresa Laboratorios Conda (Madri, Espanha).

### Testes citogenéticos

Vinte sementes dos dois acessos de *O. sativa* ( $2n = 2x = 24$ ) e 30 sementes dos dois acessos de *P. vulgaris* ( $2n = 2x = 22$ ) foram embebidas a concentrações diferentes de MMS por três intervalos de tempo: MMS 5 mg/L por 4, 8 e 24 h; MMS 10 mg/L por 4, 8 e 24 h e MMS 15 mg/L por 4, 8 e 24 h. Além desses tratamentos, as sementes dos diferentes acessos foram embebidas em apenas água destilada por 24 horas. Como controle, foram utilizadas sementes de *O. sativa* e *P. vulgaris* sem exposição ao MMS ou à água destilada. Em seguida, as sementes de cada tratamento foram semeadas em substrato, rolo de papel tipo “germitest”, umedecido com água destilada, na proporção de 2,5 mL/g de papel seco. Os rolos de papel com sementes permaneceram em temperatura ambiente (20-30°C) até as raízes atingirem o tamanho entre 1 a 2 cm para *O. sativa*, e entre 1 a 3 cm para *P. vulgaris*. As raízes foram fixadas em solução Carnoy (etanol/ácido acético glacial - 3:1 v/v) e armazenadas em etanol 70% até o preparo das lâminas.

As lâminas foram preparadas de acordo com a metodologia proposta por Guerra e de Souza (2002), com modificações. As raízes foram lavadas em água destilada durante 5 min, hidrolisadas em ácido clorídrico (5N) por 25 min, lavadas novamente em água destilada por 2 min e dispostas nas lâminas para o corte da região meristemática das raízes e consequente coloração comorceína acética 2% durante 15 min. Em seguida, a região meristemática foi recoberta por uma lamínula e, então, avaliadas em microscópio óptico (1.000 X).

Foram avaliadas 1.000 células por raiz sendo utilizadas quatro raízes por grupo em um total 4.000 células analisadas por cada grupo testado. Os parâmetros utilizados para caracterizar os grupos foram: (a) Índice Mitótico como indicativo de citotoxicidade, (b) frequência de Anomalias cromossômicas, e (c) frequência de Micronúcleos (MNs) como indicativo de mutagenicidade. Para a análise de alterações cromossômicas, foram avaliados cromossomos retardatários e pontes cromossômicas em anáfase e/ou telófase e fragmentos cromossômicos em metáfase, anáfase e/ou telófase. A avaliação das lâminas foi feita em teste cego.

#### Teste cometa

10 sementes dos dois acessos de *O. sativa* e dos dois acessos de *P. vulgaris* foram embebidas a concentrações diferentes de MMS por um único intervalo de tempo: MMS 5 mg/L por 24 h; MMS 10 mg/L por 24 h e MMS 15 mg/L por 24 h. De forma similar aos testes citogenéticos, um grupo de sementes de *O. sativa* e *P. vulgaris* também foi submetido à embebição em água destilada por 24 h. O controle consistiu de sementes de *O. sativa* e *P. vulgaris* sem exposição ao MMS ou à água destilada.

Suspensões celulares foram obtidas a partir de embriões de sementes dos dois acessos de arroz e feijão para conseqüente processamento no teste. A obtenção das suspensões celulares foi feita de acordo com Koppen e Cerda (1997), com algumas adaptações. Os embriões coletados foram transferidos para microtubos de 2 mL contendo 1 mL de tampão fosfato salina (PBS) frio, macerados e deixados por 1 h em geladeira. Em seguida, o sobrenadante foi utilizado para a realização do teste cometa.

O teste cometa foi realizado de acordo com Cerda et al. (1997), com modificações. Quinze microlitros da suspensão celular foram misturados com 85  $\mu$ L de agarose LMP (0,8%) a 45°C e dispostos em lâminas pré-cobertas com agarose NMP (0,5%). Em seguida, as lâminas foram recobertas imediatamente com lamínula, colocadas em placa de metal, e levadas primeiro a refrigerador e depois a geladeira por 5 minutos cada. Após a solidificação do gel de agarose, as lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas em solução tampão TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8,4) contendo 2,5% de dodecil sulfato de sódio por 30 min. Após a etapa de lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese contendo solução tampão TBE e deixadas em descanso por 5 min antes da corrida de eletroforese a 0,5 V/cm por 2 min. Para a determinação da voltagem mais adequada para a observação dos nucleoides de embriões de *O. sativa* e de *P. vulgaris* foram feitos testes SCGE com diferentes voltagens (0,5, 0,75, 1 e 2 V/cm para o arroz e 0,5, 0,75 e 1 V/cm para o feijão) por 2 minutos. Posteriormente a eletroforese, as lâminas foram mergulhadas em água destilada gelada por 10 min, secas a temperatura ambiente e guardadas em geladeira até o momento de coloração. As lâminas foram coradas com 50  $\mu$ L de brometo de etídio (20  $\mu$ g/mL) e analisadas em microscópio de fluorescência (400 X) usando filtros de excitação e emissão de 546 nm e 590 nm. Todos os passos foram realizados em luz fraca ou amarela. Três lâminas foram preparadas para cada grupo de ambas as espécies

sendo que nas lâminas de *O. sativa*, foram analisados entre 20 a 50 nucleoides por lâmina, devido à pequena quantidade de nucleoides obtidos em algumas lâminas, e nas lâminas de *P. vulgaris*, foram analisados 50 nucleoides por lâmina. A avaliação dos nucleoides de embriões de *O. sativa* e de *P. vulgaris* foi feita usando o programa *Comet Assay IV* versão 4.3.1 sendo o parâmetro intensidade da cauda escolhido para medir os danos ao DNA como indicativo de genotoxicidade. A avaliação das lâminas foi feita em teste cego.

#### Análise estatística

As análises estatísticas dos dados dos testes citogenéticos e do cometa foram feitas com o software GraphPad Prism versão 5.00, por meio de One-way ANOVA seguido Teste de Tukey com níveis de significâncias de  $p < 0,05$ .

### Resultados e Discussão

Inicialmente, sementes de *O. sativa* e *P. vulgaris* foram expostas somente a água destilada por 24 h para verificar a influência da embebição, pois o excesso de água poderia ser prejudicial para as sementes e interferir indiretamente na oxigenação do embrião (Black *et al.*, 2006). Entretanto, observou-se que a embebição das sementes em água por 24 h não induziu danos observáveis ( $p \geq 0,05$ ) nos testes citogenéticos e do cometa em sementes dos dois acessos de *O. sativa* e *P. vulgaris* avaliados.

#### Testes citogenéticos

Nos acessos avaliados de *O. sativa*, o MMS inibiu significativamente o IM das células meristemáticas de raízes do acesso BGA012099 “Ferrinho” na concentração de 15 mg/L por 4 e 8 h, quando comparado com o controle (**Tabela 1**). Além disso, o

MMS diminui significativamente o IM das células meristemáticas de raízes do acesso BGA008070 “Primavera” na concentração de 15 mg/L por 4 h, quando comparado com o controle. (**Tabela 2**). No acesso de *P. vulgaris* GF004, o MMS na concentração de 10 e 15 mg/L por 24 h reduziu o IM das células meristemáticas de raízes do acesso diferindo estatisticamente dos demais grupos testados (**Tabela 3**). Isto indica que o tempo de exposição pode ser um fator determinante para a observação destes efeitos. No acesso de *P. vulgaris* GF007, o MMS reduziu significativamente o IM das células meristemáticas de raízes na concentração de 15 mg/L por 24 h, quando comparado aos grupos controle e água destilada (**Tabela 4**).

Em mamíferos, o MMS produz forquilhas de replicação em colapso ou paralisadas devido à adição de grupos metil a molécula de DNA impedindo a progressão da replicação do DNA no ciclo celular (Wyatt e Pittman, 2006). Embora não tenham sido reportadas na literatura ações citotóxicas do MMS nas plantas avaliadas neste presente estudo, a citotoxicidade do MMS tem sido relatada em células meristemáticas de raízes de plantas, como *Allium cepa* L. (Rank e Nielsen, 1993), sendo bem estabelecido como controle positivo no teste *A. cepa* (Liman *et al.*, 2015).

**Tabela 1** – Índice mitótico, frequência de anomalias cromossômicas e de micronúcleos obtidos nos testes citogenéticos de células da região meristemática (n = 4.000) de raízes de *Oryza sativa* L. acesso BGA012099 “Ferrinho” expostas ao metanossulfonato de metila (MMS).

Grupos	Índice Mitótico	Anomalias cromossômicas			Frequência Total	Frequência de micronúcleos
		Cromossomos Retardatários	Fragmentos	Pontes		
Controle	8,42 ± 0,91	0,25 ± 0,50	—	—	0,25 ± 0,50	—
Água destilada	6,82 ± 0,68	1,00 ± 0,81	0,25 ± 0,50	—	1,25 ± 0,50	—
<b>MMS 5 mg/L</b>						
4 h	7,42 ± 1,47	0,25 ± 0,50	—	—	0,25 ± 0,50	—
8 h	8,35 ± 0,42	1,00 ± 0,81	—	—	1,00 ± 0,81	—
24 h	7,77 ± 1,07	0,75 ± 0,95	—	0,50 ± 0,74	1,25 ± 0,95	—
<b>MMS 10 mg/L</b>						
4 h	7,67 ± 1,17	1,75 ± 0,95	0,75 ± 0,95	—	2,50 ± 1,00	0,25 ± 0,50
8 h	7,40 ± 0,60	1,25 ± 0,95	0,75 ± 0,50	0,75 ± 0,95	2,50 ± 1,29	0,25 ± 0,50
24 h	8,40 ± 0,49	1,75 ± 1,70	0,25 ± 0,50	0,75 ± 1,50	2,75 ± 1,50 <sup>a*</sup>	—
<b>MMS 15 mg/L</b>						
4 h	6,27 ± 0,76 <sup>a*</sup>	0,75 ± 1,50	0,50 ± 0,57	—	1,25 ± 1,25	—
8 h	6,02 ± 0,91 <sup>a**</sup>	—	0,25 ± 0,50	0,50 ± 1,00	0,75 ± 0,95	—
24 h	6,95 ± 0,62	1,50 ± 1,73	—	—	1,50 ± 1,73	—

Controle = sementes não expostas ao MMS (metanossulfonato de metila) ou a água destilada. (—) = não observado. Os dados estão representados pelas médias ± SD; <sup>a</sup>significante em relação ao controle; One-way ANOVA seguido Teste de Tukey. (\**p*<0,05; \*\**p*<0,01).



**Tabela 2** – Índice mitótico, frequência de anomalias cromossômicas e de micronúcleos obtidos nos testes citogenéticos de células da região meristemática (n = 4.000) de raízes de *Oryza sativa* L. BGA008070 “Primavera” expostas ao metanossulfonato de metila (MMS).

Grupos	Índice Mitótico	Anomalias cromossômicas				Frequência de micronúcleos
		Cromossomos Retardatários	Fragmentos	Pontes	Frequência Total	
Controle	8,05 ± 1,30	—	—	—	—	—
Água destilada	6,77 ± 0,49	0,50 ± 0,74	—	—	0,50 ± 0,74	—
<b>MMS 5 mg/L</b>						
4 h	7,42 ± 1,47	0,50 ± 0,74	—	—	0,50 ± 0,74	—
8 h	8,35 ± 0,42	0,50 ± 1,00	0,50 ± 0,74	0,50 ± 1,00	1,50 ± 1,73	—
24 h	7,77 ± 1,07	—	0,50 ± 0,74	—	0,50 ± 0,74	—
<b>MMS 10 mg/L</b>						
4 h	7,40 ± 0,77	0,50 ± 1,00	1,25 ± 1,50	—	1,75 ± 1,25	0,25 ± 0,50
8 h	7,50 ± 0,50	1,00 ± 0,81	1,25 ± 0,95	0,50 ± 1,00	2,75 ± 1,50 <sup>a*</sup>	0,50 ± 0,57
24 h	7,17 ± 2,14	0,75 ± 1,50	2,25 ± 1,25 <sup>a*;b*</sup>	—	3,00 ± 1,15 <sup>a**;b*</sup>	—
<b>MMS 15 mg/L</b>						
4 h	5,77 ± 0,85 <sup>a*</sup>	0,75 ± 1,50	0,50 ± 0,57	0,25 ± 0,50	1,50 ± 2,38	—
8 h	7,00 ± 0,98	0,25 ± 0,50	0,25 ± 0,50	—	0,50 ± 0,57	—
24 h	7,85 ± 1,05	0,75 ± 0,95	0,75 ± 0,50	—	1,50 ± 1,29	—

Controle = sementes não expostas ao MMS (metanossulfonato de metila) ou a água destilada. (—) = não observado. Os dados estão representados pelas médias ± SD; <sup>a</sup> significativa em relação ao controle; <sup>b</sup> significativa em relação ao grupo água destilada; One-way ANOVA seguido Teste de Tukey. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

**Tabela 3** – Índice mitótico, frequência de anomalias cromossômicas e de micronúcleos obtidos nos testes citogenéticos de células da região meristemática (n = 4.000) de raízes de *Phaseolus vulgaris* L. acesso GF004 expostas ao metanossulfonato de metila (MMS).

Grupos	Índice Mitótico	Anomalias cromossômicas				Frequência de micronúcleos
		Cromossomos Retardatários	Fragmentos	Pontes	Frequência Total	
Controle	5,92 ± 1,29	—	—	—	—	—
Água destilada	5,15 ± 1,00	—	—	—	—	—
<b>MMS 5 mg/L</b>						
4 h	5,67 ± 1,43	1,00 ± 1,15	0,75 ± 0,95	—	1,75 ± 1,70	—
8 h	5,17 ± 1,55	0,25 ± 0,50	0,50 ± 0,57	—	0,75 ± 0,95	—
24 h	3,95 ± 0,91	0,25 ± 0,50	0,75 ± 0,95	—	1,00 ± 1,15	0,50 ± 0,57
<b>MMS 10 mg/L</b>						
4 h	4,72 ± 0,49	0,25 ± 0,50	0,50 ± 0,57	—	0,75 ± 0,50	—
8 h	4,85 ± 0,68	1,00 ± 0,00 <sup>a**</sup> ;b** <sup>*</sup> ;c*	0,25 ± 0,50	—	1,25 ± 0,50 <sup>a*</sup> ;b*	—
24 h	2,72 ± 0,47 <sup>a***</sup> ;b** <sup>*</sup> ;c** <sup>*</sup> ;d*	0,50 ± 0,57	—	0,25 ± 0,50	0,75 ± 0,95	0,25 ± 0,50
<b>MMS 15 mg/L</b>						
4 h	7,87 ± 2,45	1,25 ± 0,50 <sup>a***</sup> ;b*** <sup>*</sup> ;c** <sup>*</sup> ;e***	—	—	1,25 ± 0,50 <sup>a***</sup> ;b*** <sup>*</sup> ;c** <sup>*</sup> ;e***	—
8 h	4,15 ± 0,56 <sup>c*</sup>	0,25 ± 0,50	—	—	0,25 ± 0,50	—
24 h	1,82 ± 0,90 <sup>a**</sup> ;b** <sup>*</sup> ;c***	—	—	—	—	—

Controle = sementes não expostas ao MMS (metanossulfonato de metila) ou a água destilada. (—) = não observado. Os dados estão representados pelas médias ± SD; <sup>a</sup> significativa em relação ao controle; <sup>b</sup> significativa em relação ao grupo água destilada; <sup>c</sup> significativa em relação ao tempo de 4 h; <sup>d</sup> significativa em relação ao tempo de 8 h; <sup>e</sup> significativa em relação ao tempo de 24 h. One-way ANOVA seguido Teste de Tukey. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

**Tabela 4** – Índice mitótico, frequência de anomalias cromossômicas e de micronúcleos obtidos nos testes citogenéticos de células da região meristemática (n = 4.000) de raízes de *Phaseolus vulgaris* L. acesso GF007 expostas ao metanossulfonato de metila (MMS).

Grupos	Índice Mitótico	Anomalias cromossômicas			Frequência Total	Frequência de micronúcleos
		Cromossomos Retardatários	Fragmentos	Pontes		
Controle	7,90 ± 1,60	—	—	—	—	—
Água destilada	5,97 ± 1,21	0,25 ± 0,50	—	—	0,25 ± 0,50	—
<b>MMS 5 mg/L</b>						
4 h	8,00 ± 1,60	0,25 ± 0,50	—	0,25 ± 0,50	0,50 ± 0,57	0,25 ± 0,50
8 h	5,47 ± 2,10	0,25 ± 0,50	0,25 ± 0,50	—	0,50 ± 1,00	—
24 h	6,37 ± 2,65	0,25 ± 0,50	—	—	0,25 ± 0,50	—
<b>MMS 10 mg/L</b>						
4 h	8,15 ± 3,37	—	—	0,25 ± 0,50	0,25 ± 0,50	—
8 h	6,67 ± 1,21	0,25 ± 0,50	—	—	0,25 ± 0,50	—
24 h	5,17 ± 1,42	1,50 ± 1,73	0,25 ± 0,50	—	1,75 ± 1,70	—
<b>MMS 15 mg/L</b>						
4 h	8,35 ± 1,27	0,50 ± 1,00	0,25 ± 0,50	0,25 ± 0,50	1,00 ± 1,41	—
8 h	7,07 ± 1,87	0,50 ± 0,57	—	0,75 ± 1,50	1,25 ± 1,89	—
24 h	4,52 ± 0,95 <sup>a*;b*</sup>	1,25 ± 1,25	0,25 ± 0,50	—	1,50 ± 1,29	—

Controle = sementes não expostas ao MMS (metanossulfonato de metila) ou a água destilada. (—) = não observado. Os dados estão representados pelas médias ± SD; <sup>a</sup> significativo em relação ao controle; <sup>b</sup> significativo em relação ao grupo água destilada. One-way ANOVA seguido Teste de Tukey. (\*  $p < 0,05$ ).

Há uma série de eventos que ocorrem na semente até a sua completa germinação. O metabolismo das sementes começa após a hidratação. A respiração e a síntese de proteínas são retomadas minutos depois da hidratação seguido da síntese de RNA, dos mecanismos de reparo e da síntese de DNA. O último evento na germinação é a expansão das células da radícula precedendo a divisão celular. A maioria das sementes não consegue germinar quando imersa em água, entretanto algumas sementes de plantas aquáticas, como o arroz, conseguem germinar bem nesta condição (Black *et al.*, 2006). Esta característica do arroz poderia ajudar a explicar o fato de não ter sido observado efeitos citotóxicos ocasionados pelo MMS em acessos de *O. sativa* no período de 24 h para o acesso BGA012099 “Ferrinho”, e nos períodos de 8 e 24 h para o acesso BGA008070 “Primavera”. A absorção do MMS nos primeiros períodos de exposição por estes acessos de *O. sativa* poderia retardar os eventos que ocorrem até a germinação, principalmente o reparo e a síntese de DNA, que seriam retomados mais tarde. Isto é corroborado pela ausência de efeitos citotóxicos nos períodos de exposição maiores.

Importante mencionar que para sementes do acesso de feijão GF004, valores menores de IM já foram observados em concentrações intermediárias de MMS, diferentemente do arroz. E para a maior concentração, de 15 mg/L, o período de 8 h foi suficiente para reduzir o IM, quando comparado ao grupo MMS 15 mg/L por 4 h. Pode-se sugerir também, que para sementes de feijão, o processo de reparo e síntese de DNA possam ocorrer em estágios iniciais de embebição. Comparando os dois acessos de feijão, a germinação inicial das sementes do acesso GF007 era de 99%, bem superior à do acesso GF004, que era de 56%. Isso pode ter influenciado numa maior sensibilidade das sementes do acesso GF004 aos efeitos deletérios do MMS.

A mutagenicidade também pode ser analisada pelos testes citogenéticos em células meristemáticas de raízes de plantas através das frequências de anomalias cromossômicas e MNs (Leme e Marin-Morales, 2009). O MMS ocasionou efeitos mutagênicos pelo aumento significativo da frequência de anomalias cromossômicas em células meristemáticas de raízes de *O. sativa* na concentração de 10 mg/L expostas por 24 h no acesso BGA012099 “Ferrinho” e por 8 e 24 h no acesso BGA008070 “Primavera”. Nesse último acesso, houve um aumento significativo de fragmentos cromossômicos por um período de exposição de 24 h em relação ao grupo controle e água destilada. O aumento significativo de fragmentos cromossômicos induzidos por MMS em células meristemáticas de raízes de *O. sativa* corrobora com o que tem sido relatado sobre a ação clastogênica do MMS (Kaina, 2004). A capacidade do MMS de produzir quebras parece depender em grande parte da geração de intermediários de reparo por excisão de base (BER), uma vez que estudos sugerem que os intermediários de BER gerados pela remoção de N-metilpurinas são tóxicos e clastogênicos (Wyatt e Pittman, 2006).

No acesso de *P. vulgaris* GF004, o MMS na concentração de 10 mg/L por 8 h induziu um aumento na ocorrência de cromossomos retardatários em células meristemáticas de raízes do acesso GF004, o que diferiu estatisticamente dos grupos controle, água destilada e MMS 10 mg/L por 4 h (**Tabela 3**). Também houve um aumento da frequência total de anomalias cromossômicas nas células meristemáticas das raízes para o grupo MMS 10 mg/L por 8 h, quando comparado com o controle e água destilada. Efeitos similares foram encontrados para o MMS na concentração de 15 mg/L. Ou seja, houve um aumento da presença de cromossomos retardatários e frequência total de anomalias cromossômicas após exposição a 4 h em relação a todos os grupos testados. O fato de não ter sido observado um aumento significativo de cromossomos retardatários e anomalias cromossômicas em períodos posteriores aos períodos observados nas concentrações de 10 e 15 mg/L no acesso de feijão GF004 ( $p \geq 0,05$ ) pode ser explicado devido à inibição do IM em um período de exposição de

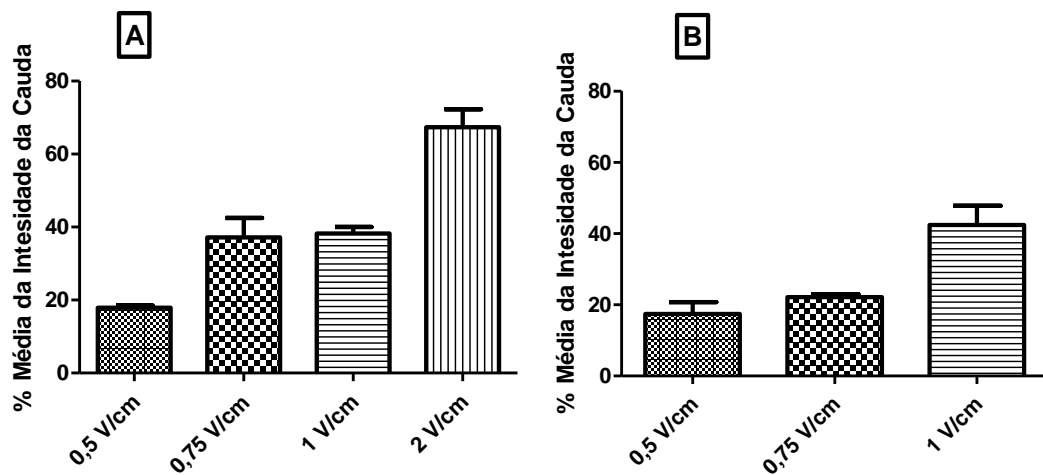
24 h, pois as anomalias cromossômicas avaliadas neste estudo necessitam de células em divisão para que sejam observadas (Rank, 2003). MMS é um agente clastogênico, ou seja, promove quebras cromossômicas e a indução de cromossomos retardatários tem sido relatada em plantas, como em *Capsicum annum* L. (Gulfishan *et al.*, 2011; 2012) e *Vicia faba* L. (Sharma *et al.*, 2009) e também foi observada no presente estudo. No acesso de *P. vulgaris* GF007, o não produziu um aumento significativo na frequência de anomalias cromossômicas nas células meristemáticas de raízes nos dois acessos testados de *P. vulgaris*, quando comparado com o controle (**Tabela 4**).

Embora tenha havido um aumento significativo da frequência de anomalias cromossômicas nos acessos de *O. sativa* “Ferrinho” e BGA008070 “Primavera” e no acesso de *P. vulgaris* GF004, o MMS não induziu um aumento significativo na frequência de MNs as células meristemáticas de raízes nos dois acessos testados de *O. sativa* e *P. vulgaris*, quando comparado com o controle. Além disso, os micronúcleos encontrados foram de tamanho pequeno sugerindo que estes foram originados de ação clastogênica. As anomalias cromossômicas são os principais mecanismos de formação de MNs, porém podem não produzir MNs nas células filhas, uma vez que cromossomos retardatários, pontes cromossômicas e fragmentos cromossômicos originados de pontes podem ser corrigidos, ou ter seus efeitos minimizados (Rao *et al.*, 2008).

#### Teste cometa

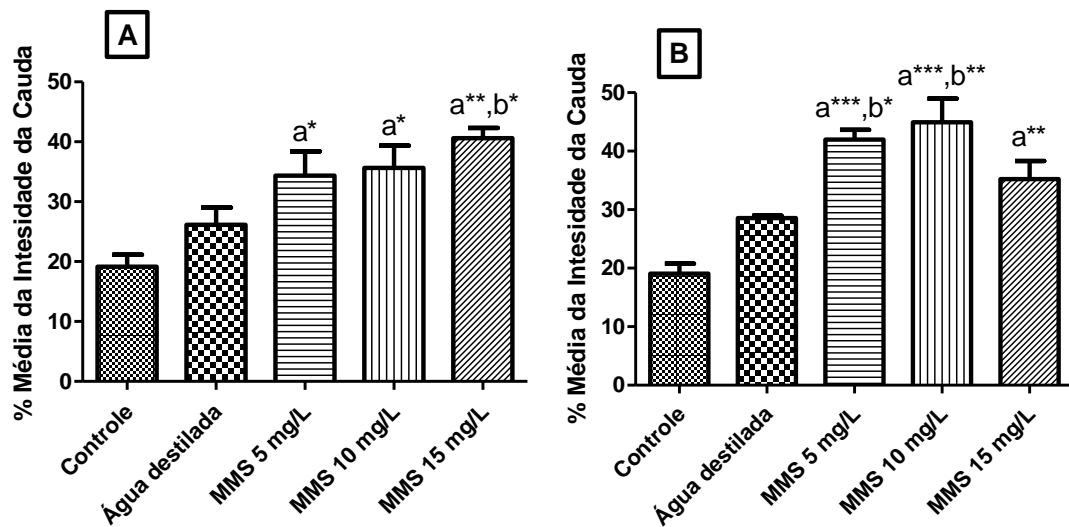
Antes da realização do teste do cometa, foram verificadas diferentes voltagens durante a etapa de eletroforese. Isso foi realizado com a finalidade de determinar qual a voltagem mais adequada para observação de nucleoides de embriões de *O. sativa* e de *P. vulgaris*. Como descrito na literatura, a porcentagem de DNA na cauda de nucleoides encontrada no controle deve ser entre 10 a 20% a para evitar resultados falso-positivo e erros

estatísticos (Lovell e Omori, 2008). Somente a voltagem de 0,5 V/cm mostrou resultados entre 10 e 20 %, sendo, portanto, a voltagem mais adequada (**Figura 1**). Deve-se ressaltar que foi utilizada versão neutra do teste, na qual os nucleoides de células não tratadas com agente genotóxico possuem mais DNA na região da cauda do cometa quando comparada aos nucleoides da versão alcalina do teste (Olive e Banáth, 2006). Por isto, os valores das percentagens média da intensidade da cauda dos nucleoides do controle dos dois acessos de *O. sativa* foram próximos ao limite máximo estabelecido de 20%.



**Figura 1** – Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides submetidos a diferentes voltagens no teste de eletroforese em gel de célula única. **A)** Nucleoides de embriões de sementes de *O. sativa*. **B)** Nucleoides de embriões de sementes de *P. vulgaris*. Os dados estão representados pelas médias  $\pm$  SEM.

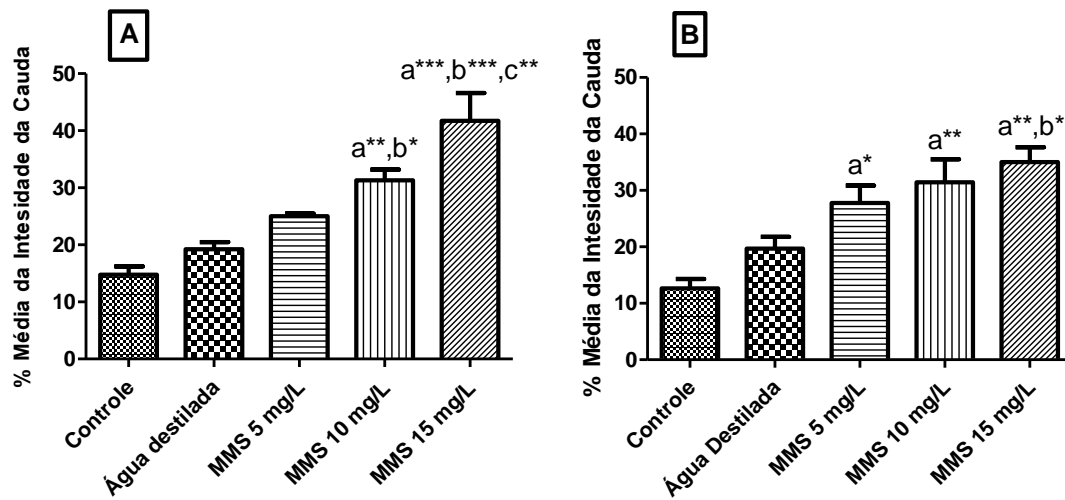
Os resultados dos testes do cometa estão representados nas **Figuras 2 e 3**. O MMS ocasionou um aumento significativo da intensidade da cauda de nucleoides de embriões dos dois acessos avaliados de *O. sativa* em todas as concentrações testadas, quando comparado com o controle (**Figura 2**). No acesso de arroz BGA012099 “Ferrinho”, o MMS na concentração de 15 mg/L também diferiu estatisticamente do grupo água destilada (**Figura 2A**) e no acesso de arroz BGA008070 “Primavera” as concentrações de MMS que diferiram estatisticamente do grupo água destilada foram de 5 e 10 mg/L (**Figura 2B**).



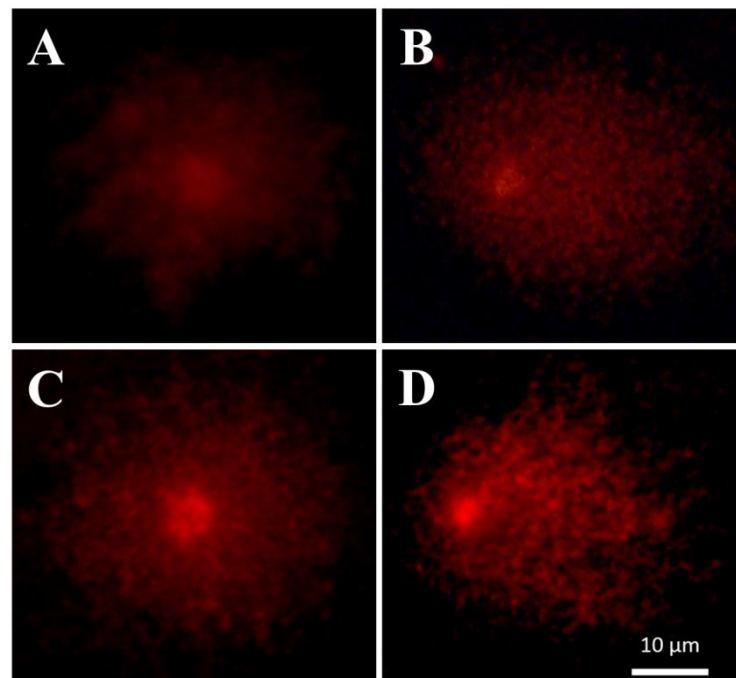
**Figura 2** – Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides de *Oryza sativa* L. expostos a diferentes concentrações de metanossulfonato de metila (MMS). **A)** acesso BGA012099 “Ferrinho”. **B)** acesso BGA008070 “Primavera”. Os dados estão representados pelas médias  $\pm$  SEM. Controle = sementes não expostas ao MMS ou a água destilada. <sup>a</sup> Significante em relação ao controle. <sup>b</sup> Significante em relação ao grupo água destilada. One-way ANOVA seguido Teste de Tukey. (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Nos acessos de *P. vulgaris*, o MMS também produziu um aumento significativo da intensidade da cauda de nucleoides de embriões em todas as concentrações testadas (**Figura 3**), exceto na concentração de 5 mg/L no acesso de *P. vulgaris* GF004 (**Figura 3A**). No acesso de feijão GF004, houve também um aumento da intensidade da cauda dos nucleoides nas concentrações de 10 e 15 mg/L de MMS, quando comparados ao grupo água destilada, sendo que a concentração de 15 mg/L ainda diferiu estatisticamente do grupo exposto ao MMS na concentração de 5 mg/L. No acesso de feijão GF007, somente a concentração de 15 mg/L de MMS diferiu estatisticamente do grupo água destilada (**Figura 3B**). Os perfis dos nucleoides obtidos no nosso laboratório para arroz e feijão comum estão mostrados na **Figura 4**. O MMS, quando usado como controle positivo para avaliar dois herbicidas auxínicos, na concentração de 10 ppm, demonstrou alta atividade genotóxica no teste cometa meio alcalino (pH 12,3) em raízes de *P. vulgaris* (Cenkci *et al.*, 2010).





**Figura 3** – Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides de *Phaseolus vulgaris* L. expostos a diferentes concentrações de metanossulfonato de metila (MMS). **A)** acesso GF004. **B)** acesso GF007. Os dados estão representados pelas médias  $\pm$  SEM. Controle = sementes não expostas ao MMS ou a água destilada. <sup>a</sup> Significante em relação ao controle. <sup>b</sup> Significante em relação ao grupo água destilada. <sup>c</sup> Significante em relação ao grupo MMS 5 mg/L. One-way ANOVA seguido Teste de Tukey. (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



**Figura 4** – Perfis dos nucleoides observados no teste cometa em arroz e feijão comum. **A** e **C)** Nucleoides de embriões de controle de *O. sativa* e *P. vulgaris*, respectivamente. **B** e **D)** nucleoides de embriões *O. sativa* e *P. vulgaris* expostas ao MMS, respectivamente.

A versão neutra do teste do cometa pode detectar quebras de fita simples e dupla (Collins *et al.*, 2008). Quebras de fita simples visualizadas durante o tratamento de células com MMS são prováveis intermediários de BER, enquanto, quebras de fita dupla são resultantes de forquilhas de replicação que encontram danos metil ou quebras de fita produzidas intermediários por de BER (Wyatt e Pittman, 2006). Entretanto, danos observados durante o teste do cometa podem ser reparados pelos mecanismos de reparo da célula (Villela *et al.*, 2003). Portanto, pode-se sugerir que os danos genotóxicos ocasionados pelo MMS nos dois acessos de *O. sativa* e *P. vulgaris* avaliados podem ser passíveis de reparo.

O teste cometa é um bioensaio de avaliação a danos ao DNA muito sensível, e esta sensibilidade pode ter contribuído para a detecção dos danos ocasionados pelo MMS em concentrações que não produziram efeitos significativos nos testes citogenéticos. Além disso, este teste foi realizado logo após a exposição das sementes de arroz e feijão ao MMS, enquanto, houve a necessidade de germinação das sementes para os testes citogenéticos após a exposição ao MMS. A germinação e crescimento levaram 2 a 5 dias para obtenção de raízes no tamanho ideal para os testes citogenéticos. Este período pode ser suficiente para que danos ao DNA sejam reparados (Villela *et al.*, 2003). Vale ressaltar que a utilização de testes citogenéticos em conjunto com teste do cometa proporciona uma melhor compreensão dos resultados obtidos, uma vez que danos como a formação de micronúcleos são irreversíveis nas células, enquanto que, os danos no teste do cometa podem ser reparados (VASQUEZ, 2010).

## **Conclusão**

As sementes de arroz e feijão mostraram sensibilidade aos efeitos citotóxicos, mutagênicos e genotóxicos do MMS. Este estudo fornece contribuições para a padronização de metodologias para avaliar citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade em sementes de arroz e feijão. Demonstrou-se que o teste cometa foi mais sensível que os testes

citogenéticos usados. O teste cometa, em particular, pode ser proposto para avaliação da instabilidade genômica em acessos de arroz e feijão em bancos de germoplasma. Isto pode contribuir para estabelecer uma ferramenta sensível para detectar a deterioração ocasionada pelo envelhecimento acelerado e pelas condições de armazenamento em bancos de germoplasma.

### **Conflito de interesse**

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

### **Agradecimentos**

Este projeto foi apoiado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Universidade de Brasília.

### **Referências**

- Barbosa L (2007) Feijão com arroz e arroz com feijão: O Brasil no prato dos brasileiros. *Horiz Antropol* 28:87–116.
- Black M, Bewley JD and Halmer P (2006) *The Encyclopedia of Seeds: Science, Technology and Uses*. CABI, Wallingford, 900 pp.
- Cenkci S, Yildiz M, Ciğerci IH, Bozdağ A, Terzi H and Terzi ESA (2010) Evaluation of 2,4-D and Dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:1558–1564.
- Cerda H, Delincée H, Haine H and Rupp H (1997) The DNA ‘comet assay’ as a rapid screening technique to control irradiated food. *Mutat Res* 375:167–181.

- Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC and Štětina R (2008) The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis* 23:143–151.
- Endo M, Nakayama S, Umeda-Hara C, Ohtsuki N, Saika H, Umeda M and Toki S (2012) CDKB2 is involved in mitosis and DNA damage response in rice. *Plant J* 69:967–977.
- Guerra M and de Souza MJ (2002) Como observar cromossomos: Um Guia de Técnicas em Citogenética Vegetal, Animal e Humana. FUNPEC, Riberão Preto, 131 pp.
- Gulfishan M, Khan AH and Jafri IF (2011) Genotoxic effects induced by methyl methane sulphonate in 2 cultivars of *Capsicum annuum* L.. *Cytologia* 76:381–385.
- Gulfishan M, Khan AH, Jafri IF and Bhat TA (2012) Assessment of mutagenicity induced by MMS and DES in *Capsicum annuum* L.. *Saudi J Biol Sci* 19:251–255.
- Hallak AMG, Davide LC and Souza IF (1999) Effects of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) root exudates on the cell cycle of the bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.) root. *Genet Mol Biol* 22:95–99.
- Kaina B (2004) Mechanisms and consequences of methylating agent-induced SCEs and chromosomal aberrations: A long road traveled and still a far way to go. *Cytogenet. Genome Res* 104:77–86.
- Khan AA, Khan HM and Delincée H (2002) Detection of radiation treatment of beans using DNA comet assay. *Radiat Phys Chem* 63:407–410.
- Koppen G and Cerda H (1997) Identification of low-dose irradiated seeds using the neutral comet assay. *Lebensm Wiss Technol* 30:452–457.
- Kwon YI, Abe K, Endo M, Osakabe K, Ohtsuki N, Nishizawa-Yokoi A, Tagiri A, Saika H and Toki S (2013) DNA replication arrest leads to enhanced homologous recombination and cell death in meristems of rice OsRecQ14 mutants. *BMC Plant Biol* 13:62.
- Leme DM and Marin-Morales MA (2009) *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutat Res* 682:71–81.

- Liman R, Ciğerci İH and Öztürk NS (2015) Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay. *Pest Biochem Physiol* 118:38–42.
- López A, El-Naggar T, Dueñas M, Ortega T, Estrella I, Hernández T, Gómez-Serranillos MP, Palomino OM and Carretero ME (2013) Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem* 138:547–555.
- Lovell DP and Omori T (2008) Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis*. 23:171–182.
- Macovei A and Tuteja N (2013) Different expression of miRNAs targeting helicases in rice in response to low and high dose rate  $\gamma$ -ray treatments. *Plant Signal Behav* 8:1–11.
- Macovei A, Garg B, Raikwar S, Balestrazzi A, Carbonera D, Buttafava A, Bremont JFJ, Gill SS and Tuteja N (2014) Synergistic exposure of rice seeds to different doses of  $\gamma$ -ray and salinity stress resulted in increased antioxidant enzyme activities and gene-specific modulation of TC-NER pathway. *Biomed Res Int* 2014:676934.
- Malini M, Marin-Morales MA, Mantovani MS, Jamal CM, Nati N, Passos T da S and Matsumoto ST (2010) Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (*Rhizophoraceae*), using *in vivo* and *in vitro* test systems. *Genet Mol Biol* 33:176–181.
- Mei M, Deng H, Lu Y, Zhaung C, Liu Z, Qiu Q, Qui Y and Yang TC (1994) Mutagenic effects of heavy ion radiation in plants. *Adv Space Res.* 14:363–372.
- Mohanty S, Das AB, Das P and Mohanty P (2004) Effect of a low dose of aluminum on mitotic and meiotic activity, 4C DNA content, and pollen sterility in rice, *Oryza sativa* L. cv. Lalat. *Ecotoxicol Environ Saf* 59:70–75.

Muto S, Yamada K, Kato T, Wako Y, Kawasaki K, Iwase Y and Uno Y (2015) Assessment of methyl methanesulfonate using the repeated-dose liver micronucleus assay in young adult rats. *Mutat Res* 780-781:107–110.

Myung K and Kolodner RD (2003) Induction of genome instability by DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 2:243–258.

Olive PL and Banáth JP (2006) The Comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 1:23–29.

Peixoto AM, de Toledo FF, Reichardt K, Filho Molina J and de Sousa JSI (2000) Enciclopédia agrícola brasileira: E-H. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 511 p.

Peixoto AM, de Sousa JSI, de Toledo FF, Reichardt K and Filho JM (2006) Enciclopédia agrícola brasileira: S-Z, 6th volume. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 632 p.

Plappert-Helbig U, Junker-Walker U and Martus HJ (2015) Evaluation of methyl methanesulfonate, 2,6-diaminotoluene and 5-fluorouracil: Part of the Japanese center for the validation of alternative methods (JaCVAM) international validation study of the *in vivo* rat alkaline comet assay. *Mutat Res* 786-788:120–124.

Rank J (2003) The method *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Ekologija* 1:38–42.

Rank J and Nielsen MH (1993) A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas* 118:49–53.

Rao X, Zhang Y, Yia Q, Hou H, Xu B, Chu L, Huang Y, Zhang W, Fenech M and Shi Q (2008) Multiple origins of spontaneously arising micronuclei in HeLa cells: Direct evidence from long-term live cell imaging. *Mutat Res* 646:41–49.

- Sharma M, Khan AH and Bhat TA (2009) Assessment of mutagenicity of individual and combination treatments of gamma rays and MMS in broad bean (*Vicia faba* L.). *Cytologia* 74:235–241.
- Shi JM, Guo JG, Li WJ, Zhang M, Huang L and Sun YQ (2010) Cytogenetic effects of low doses of energetic carbon ions on rice after exposures of dry seeds, wet seeds and seedlings. *J Radiat Res* 51:235–242.
- Sousa JSI de, Peixoto AM and de Toledo FF (1995) *Enciclopédia Agrícola Brasileira A-B*. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 508 p.
- Todoriki S and Toru H (1999) DNA comet assay for rice seeds treated with low energy electrons (“soft-electrons”). *Food Irradiation Japan* 34:9–15.
- Vasquez MR (2010) Combining the *in vivo* comet and micronucleus assays: A practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. *Mutagenesis* 25:187–199.
- Vaughan DA (1994) *The wild relatives of rice: A genetic resources handbook*. International Rice Research Institute, Manila, 137 p.
- Villela IV, Lau A, Silveira J, Prá D, Rolla HC and Silveira J de D (2003) *Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental*. In: da Silva J, Erdtmann B and Henriques JAP (eds) *Genética Toxicológica*. Alcance, Porto Alegre, pp 147–163.
- Walter M and Marchesan E (2011) Phenolic compounds and antioxidant activity of rice. *Braz Arch Biol Technol* 54:371–377.
- Wei LJ, Yang Q, XIA HM, Furusawa Y, Guan SH, Xin P and Sun YQ (2006) Analysis of cytogenetic damage in rice seeds induced by energetic heavy ions on-ground and after spaceflight. *J Radiat Res* 47:273–278.
- Wyatt MD and Pittman DL (2006) Methylating agents and dna repair responses: methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol* 19:1580-1594.

## **CAPÍTULO 2**

**Avaliação da integridade genética em lotes de sementes de arroz (*Oryza sativa* L) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) envelhecidas artificialmente**



Avaliação da integridade genética em lotes de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) envelhecidas artificialmente

Alisson F. Dantas<sup>1</sup>, Maria L. Fascineli<sup>1</sup>, Solange C.B.R. Jose<sup>2</sup>, Juliano G. Pádua<sup>2</sup>, Cesar K. Grisolia<sup>1</sup>, Marcos A. Gimenes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF

<sup>2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, D.F.

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do envelhecimento acelerado sobre a integridade genética em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Ambas as espécies foram envelhecidas artificialmente a 45 °C sendo as sementes de arroz expostas por um período de 40, 72, 96 e 120 h e as sementes de feijão por 24, 48, 72, e 96 h. Testes de primeira contagem, germinação e índice de velocidade de germinação foram realizados para medir a qualidade fisiológica das sementes e testes citogenéticos e cometa foram realizados para avaliar a integridade genética dos diferentes lotes de sementes. À medida que houve o aumento do período de envelhecimento, houve diminuição na germinação, vigor e índice mitótico, bem como o aumento da frequência de anomalias cromossômicas e quebras do DNA em ambas as espécies avaliadas. Os nossos resultados sugerem que o envelhecimento causa inibição do índice mitótico, o aumento de anomalias cromossômicas e da fragmentação do DNA dos acessos de arroz e feijão avaliados. Estes dados fornecem os primeiros passos para demonstrar o potencial uso dos testes citogenéticos e cometa em programas de conservação de sementes.

Palavras-chave: *Oryza sativa* L., *Phaseolus vulgaris* L., envelhecimento acelerado, teste citogenéticos, teste cometa.

## INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a integridade genética de sementes armazenadas em bancos de germoplasma tem potencial para ser utilizado, em conjunto com evidências fisiológicas e bioquímicas, como uma ferramenta capaz de melhorar o manejo de bancos. Isto pode permitir a identificação precoce do processo de deterioração de sementes e planejar a regeneração dos acessos antes que a redução de viabilidade e, conseqüentemente, o uso dos recursos genéticos em cruzamentos e/ou comprometa a variabilidade genética dos mesmos, pela perda de alguns genótipos. Uma vez que a perda da integridade genética é um dos estágios iniciais no processo de deterioração de sementes (PEIXOTO et al., 2006), metodologias para avaliar danos ao DNA baseadas na quebra e má segregação cromossômica poderiam auxiliar na compreensão da integridade genética e viabilidade de sementes armazenadas em bancos de germoplasma.

Para estudar os mecanismos da perda de vigor das sementes durante o armazenamento, tratamentos que simulam o envelhecimento natural são usados como prognóstico para o vigor e longevidade das sementes (RAJOU e DEBEAUJON, 2008). A obtenção de sementes envelhecidas pode ser feita por meio do teste de envelhecimento acelerado pela rápida perda da percentagem de germinação em lotes de sementes submetidas por um breve período a condições de estresse (BLACK et al., 2006). O teste de envelhecimento acelerado tem sido utilizado com sucesso em sementes economicamente relevantes para predizer o seu comportamento durante o armazenamento (MONCALEANO-ESCANDON et al., 2013; LIMA et al., 2014; MISSAOUI e HILL, 2015; MOURAD et al., 2016).

O arroz (*Oryza sativa* L., família Poaceae) e o feijão (*Phaseolus vulgaris* L., família Fabaceae) são os principais componentes de a dieta alimentar brasileira (BARBOSA, 2007) e, por isto, grandes coleções de germoplasma de ambas as espécies foram estabelecidas. Não tem sido relatado do uso de técnicas para medir a integridade genética em sementes de arroz e feijão envelhecidas artificialmente, para fins de conservação. O presente estudo teve por objetivo avaliar a citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de envelhecimento acelerado por meio do uso de testes citogenéticos e pelo teste cometa com a finalidade de observar o comportamento quanto à integridade genética de sementes de arroz e feijão envelhecidas artificialmente.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### MATERIAL VEGETAL

Sementes de dois acessos de *O. sativa* (BGA007553 Formoso e BGA008070 Primavera) e de dois acessos de *P. vulgaris* (GF003 e GF007) foram obtidas do Banco Ativo de Germoplasma de Arroz e Feijão (Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brasil). As sementes foram mantidas em câmara de secagem climatizada (20°C e 15% de UR, constantes) até a realização dos testes.

### TESTE DE ENVELHECIMENTO ACELERADO

O teste de envelhecimento acelerado foi realizado de acordo com Marcos Filho (1999), com modificações. O teste foi conduzido em caixas de plástico tipo “gerbox” onde 200 sementes de arroz e feijão foram distribuídas sobre uma tela suspensa no interior de caixas contendo 40 mL de água. As caixas foram mantidas em incubadora a 45°C por 40, 72, 96 e 120 horas para as sementes de arroz e por 24, 48, 72 e 96 horas para as sementes de feijão. Sementes de arroz e feijão não expostas ao envelhecimento acelerado foram referidas como controle negativo (0 h). As sementes de feijão foram pré-embebidas em germinador tipo “mangelsdorf” regulado para a temperatura de 25°C dentro de sacos de papel tipo “Kraft” por 48 horas, antes do teste de envelhecimento acelerado. Esse procedimento foi para possibilitar que as sementes atingissem um conteúdo de água que possibilitasse o envelhecimento, já que as sementes dos acessos utilizadas apresentavam baixa taxa de absorção de água. A pré-embebição não foi necessária para as sementes de arroz.

Após o envelhecimento acelerado, 100 sementes de cada tratamento dos dois acessos de arroz e feijão foram submetidas aos testes de primeira contagem e contagem final do teste de germinação, e índice de velocidade de germinação para avaliar a qualidade fisiológica das sementes. O restante das sementes (100 sementes) foi submetido ao processo de secagem em câmara de secagem por um mês e, depois, acondicionadas em embalagens aluminizadas hermeticamente fechadas e mantidas em câmara de espera regulada para 10 °C e 30% de UR, até a realização dos testes citogenéticos e cometa para a avaliação da integridade genética.

## TESTES DE GERMINAÇÃO E PRIMEIRA CONTAGEM

O teste de germinação foi realizado segundo recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), com adaptações. Quatro repetições de 25 sementes de cada tratamento dos dois acessos de arroz e feijão foram semeadas em substrato rolo de papel tipo “germitest” umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco. Os rolos foram mantidos em germinador regulado na temperatura de 25°C. Foram avaliadas as porcentagens de plântulas normais (germinação) e anormais, sementes duras e mortas ao décimo quarto dia após a semeadura para as sementes de arroz e ao nono dia para as sementes de feijão. Os resultados foram expressos em porcentagem média das repetições. Conjuntamente com o teste de germinação, foi realizada a primeira contagem, ao quinto dia após semeadura para ambas as espécies avaliadas (BRASIL, 2009).

## ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi realizado conjuntamente com o teste de germinação. As plântulas normais foram contabilizadas em dias alternados após o quinto dia de semeadura até a estabilização da contagem, que ocorreu no final do teste de germinação. O IVG foi a média aritmética das quatro repetições, determinado de acordo com a fórmula proposta por Maguirre (1962):

$$IVG = \frac{G1}{N1} + \frac{G2}{N2} + \dots + \frac{Gn}{Nn}$$

onde:

*IVG* = índice de velocidade de germinação

*G1, G2, ... Gn* = número de plântulas normais, computadas na primeira contagem, segunda contagem, ... , última contagem.

*N1, N2, ... Nn* = número de dias de semeadura à primeira, segunda, ... , última contagem.

## TESTES CITOGENÉTICOS

Vinte sementes de cada tratamento dos dois acessos arroz ( $2n = 2x = 24$ ) e feijão ( $2n = 2x = 22$ ) foram semeadas em papel tipo “germitest”, umedecido com água destilada, na proporção de 2,5 mL/g de papel seco para obtenção de raízes e conseqüente processamento

nos testes citogenéticos. Os rolos de papel com sementes permaneceram em germinador regulado na temperatura de 25°C até as raízes atingirem o tamanho entre 1 a 2 cm para arroz, e entre 1 a 3 cm para feijão. As raízes foram fixadas em solução Carnoy (etanol/ácido acético glacial - 3:1 v/v) e armazenadas em etanol 70% até o preparo das lâminas. Como controle negativo, foram utilizadas sementes de arroz e feijão não expostas ao envelhecimento acelerado. Com base em Dantas et al. (2018), sementes de arroz expostas a 15 mg/L de MMS por 4 h e sementes de feijão expostas a 15 mg/L de MMS por 24 h foram utilizadas como controle positivo.

As lâminas foram preparadas de acordo com a metodologia proposta por Guerra e Souza (2002), com modificações. As raízes foram lavadas em água destilada durante 5 minutos, hidrolisadas em ácido clorídrico 5N por 35 minutos para raízes de arroz e 25 minutos para raízes de feijão, lavadas novamente em água destilada por 2 minutos e dispostas nas lâminas para o corte da região meristemática das raízes e coloração com orceína acética 2% durante 25 minutos. Em seguida, a região meristemática foi recoberta por uma lamínula e, então, avaliadas em microscópio óptico (1.000 X).

Foram avaliadas, no mínimo, 1.000 células por raiz sendo utilizadas quatro raízes em um total de no mínimo 4.000 células analisadas para cada tratamento. Os parâmetros utilizados para caracterizar os tratamentos foram: (a) índice mitótico (IM) como indicativo de citotoxicidade e (b) frequência de anomalias cromossômicas (ACs) por células avaliadas como indicativo de mutagenicidade. Para a análise de ACs, foram avaliados cromossomos retardatários, desalinhamento em metáfase, fragmentos e pontes cromossômicas em anáfase e/ou telófase. A avaliação das lâminas foi feita em teste cego.

## TESTE COMETA

O teste cometa foi realizado em sementes de arroz e feijão secas (sem estarem embebidas) para determinar os efeitos genotóxicos e em sementes de arroz e feijão embebidas em papel “germitest” umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco em germinador a temperatura de 25°C por 9 e 17 horas para observar a capacidade de reparo de DNA nas sementes envelhecidas artificialmente.

A obtenção das suspensões celulares e a realização do teste cometa foram conduzidas de acordo com as adaptações feitas para sementes de arroz e feijão por Dantas et al. (2018). Dez embriões de cada tratamento foram coletados e divididos igualmente em dois microtubos de 2 ml contendo 0,25 e 0,5 ml de tampão fosfato salina frio para obter suspensões celulares

de arroz e feijão, respectivamente. Em seguida, os embriões foram macerados e deixados por no mínimo 1 h em geladeira sendo o sobrenadante utilizado para a realização do teste cometa. O controle negativo consistiu de sementes de arroz e feijão não expostas ao envelhecimento acelerado dos acessos testados. Com base em Dantas et al. (2018), sementes foram imersas em 10 mg/L de MMS por 24 h para o controle positivo.

Quinze microlitros da suspensão celular de cada tratamento foram misturados com 85 µl de agarose LMP (0,8%) a 45°C e dispostos em lâminas pré-cobertas com agarose NMP (0,5%). Em seguida, as lâminas foram recobertas imediatamente com lamínula, colocadas em placa de metal e levadas primeiro a refrigerador e depois a geladeira por 10 minutos cada. Após a solidificação do gel de agarose, as lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas em solução tampão TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8,4) contendo 2,5 % de dodecil sulfato de sódio por 30 minutos. Após a etapa de lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese contendo solução tampão TBE e deixadas em descanso por 5 minutos antes da corrida de eletroforese conduzida a 0,5 V/cm por 2 minutos. Depois, as lâminas foram mergulhadas em água destilada gelada por 10 minutos, secas a temperatura ambiente e guardadas em geladeira até o momento de coloração, a qual foi realizada com 50 µL de brometo de etídio (20 µg/ml) e analisadas em microscópio de fluorescência (400 X) usando filtros de excitação e emissão de 546 nm e 590 nm. Todos os passos foram realizados em luz fraca ou amarela. Foram feitas duas lâminas para cada grupo de ambas as espécies sendo analisados no mínimo 20 nucleoides por lâmina, como sugerido por Dehon et al. (2008). A avaliação dos nucleoides de embriões de *O. sativa* e de *P. vulgaris* foi feita pelo programa *Comet Assay IV* versão 4.3.1 sendo o parâmetro intensidade da cauda escolhido para medir os danos ao DNA como indicativo de genotoxicidade.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre os controles negativo e positivo dos testes citogenéticos e cometa foram feitas pelo teste t não pareado. As demais análises para comparações múltiplas ( $\geq 3$  grupos) foram realizadas por meio de One-way ANOVA seguido Teste de Tukey. A análise dos dados foi feita com o software GraphPad Prism versão 5.00, com níveis de significâncias de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### TESTES DE PRIMEIRA CONTAGEM, GERMINAÇÃO E IVG

Os resultados dos testes de primeira contagem, germinação e IVG são apresentados na **Tabela 1**. O acesso Formoso apresentou uma diminuição significativa do percentual de plântulas normais na primeira contagem nos períodos de 72, 96 e 120 h de envelhecimento acelerado e diminuição significativa do IVG nos períodos de 96 e 120 h. Entretanto, no teste de germinação, não foi observado influência do envelhecimento acelerado no percentual de plântulas normais nas suas sementes. Já no acesso Primavera foi observado um decréscimo significativo do percentual de plântulas normais na primeira contagem nos períodos de 96 e 120 h de envelhecimento acelerado, embora, não tenha sido observada diminuição significativa da germinação e do IVG.

Os acessos de feijão GF003 e GF007 tiveram um comportamento semelhante quanto aos efeitos ocasionados pelo envelhecimento acelerado. Em ambos os acessos, houve uma redução significativa do percentual de plântulas na primeira contagem, da germinação e do IVG nos períodos de 72 e 96 horas de envelhecimento acelerado. Os baixos valores encontrados na germinação de sementes envelhecidas por 72 e 96 horas foi influenciado pelo aumento significativo do percentual de sementes mortas nestes períodos em relação aos demais períodos.

### TESTES CITOGENÉTICOS

Antes da avaliação dos efeitos do envelhecimento acelerado foi feita a comparação dos parâmetros analisados nos testes citogenéticos (IM e ACs) entre os controles negativo e positivo, isto é, entre o material não envelhecido e o tratado com MMS. Nas células meristemáticas das raízes das plântulas de arroz, o controle positivo apresentou diminuição significativamente do IM em relação ao controle negativo em ambos os acessos (**Tabela 2**). No acesso primavera de arroz, foi observado aumento na ocorrência de cromossomos retardatários (efeito biologicamente), embora sem significado estatístico. Nas células meristemáticas das raízes das plântulas de feijão, o MMS reduziu significativamente o IM e induziu um aumento significativo na frequência total de ACs em relação ao controle negativo em ambos os acessos, sendo os cromossomos retardatários o principal tipo de aberração encontrado (**Tabela 3**).

**Tabela 1** – Porcentagem de plântulas normais obtida na primeira contagem e final do teste de germinação, plântulas anormais, sementes duras, sementes mortas, e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de arroz e feijão submetidas a envelhecimento acelerado.

Acessos		Primeira contagem	Teste de Germinação				IVG
			Germinação	Plântulas anormais	Sementes duras	Sementes mortas	
Formoso	0 h	51,00 ± 10,52 <sup>a</sup>	84,00 ± 5,65	11,00 ± 2,00	6,00 ± 2,30 <sup>a</sup>	0	3,48 ± 0,14 <sup>a</sup>
	40 h	50,00 ± 8,32 <sup>a</sup>	80,00 ± 4,61	13,00 ± 3,83	6,00 ± 2,30 <sup>a</sup>	1,00 ± 2,00	3,41 ± 0,07 <sup>a</sup>
	72 h	32,00 ± 4,61 <sup>b</sup>	85,00 ± 5,03	15,00 ± 3,83	1,00 ± 2,00 <sup>b</sup>	0	3,20 ± 0,22 <sup>a,b</sup>
	96 h	1,00 ± 2,00 <sup>c</sup>	87,00 ± 8,24	11,00 ± 6,83	1,00 ± 2,00 <sup>b</sup>	1,00 ± 2,00	2,72 ± 0,38 <sup>b,c</sup>
	120 h	0 <sup>c</sup>	87,00 ± 3,83	6,00 ± 5,16	2,00 ± 2,30 <sup>a,b</sup>	5,00 ± 6,00	2,63 ± 0,14 <sup>c</sup>
Primavera	0 h	33,00 ± 8,86 <sup>a</sup>	93,00 ± 3,83	6,00 ± 5,16	0 <sup>a</sup>	1,00 ± 2,00	3,47 ± 0,32
	40 h	28,00 ± 6,53 <sup>a,b</sup>	84,00 ± 7,30	16,00 ± 7,30	0 <sup>a</sup>	0	3,15 ± 0,29
	72 h	23,00 ± 5,03 <sup>a,b,c</sup>	86,00 ± 5,16	14,00 ± 5,16	0 <sup>a</sup>	0	3,13 ± 0,03
	96 h	18,00 ± 6,92 <sup>b,c</sup>	81,00 ± 7,57	15,00 ± 6,00	3,00 ± 2,00 <sup>b</sup>	1,00 ± 2,00	2,94 ± 0,50
	120 h	11,00 ± 3,83 <sup>c</sup>	80,00 ± 8,64	14,00 ± 10,58	3,00 ± 2,00 <sup>b</sup>	3,00 ± 3,83	2,82 ± 0,33
GF003	0 h	68,00 ± 12,65 <sup>a</sup>	86,00 ± 5,16 <sup>a</sup>	11,00 ± 2,00	0	3,00 ± 3,83 <sup>a</sup>	4,01 ± 0,36 <sup>a</sup>
	24 h	71,67 ± 10,41 <sup>a</sup>	80,00 ± 10,00 <sup>a</sup>	16,67 ± 5,77	0	3,33 ± 5,77 <sup>a</sup>	3,85 ± 0,50 <sup>a</sup>
	48 h	46,00 ± 11,55 <sup>a,b</sup>	68,00 ± 8,64 <sup>a</sup>	7,00 ± 6,83	0	25,00 ± 2,00 <sup>b</sup>	3,05 ± 0,44 <sup>a</sup>
	72 h	29,00 ± 8,86 <sup>b,c</sup>	40,00 ± 5,65 <sup>b</sup>	8,00 ± 6,53	0	52,00 ± 8,64 <sup>c</sup>	1,81 ± 0,32 <sup>b</sup>
	96 h	17,00 ± 12,81 <sup>c</sup>	20,00 ± 11,78 <sup>c</sup>	5,00 ± 2,00	0	75,00 ± 12,81 <sup>d</sup>	0,94 ± 0,60 <sup>b</sup>
GF007	0 h	95,00 ± 2,00 <sup>a</sup>	99,00 ± 2,00 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0	1,00 ± 2,00 <sup>a</sup>	4,89 ± 0,00 <sup>a</sup>
	24 h	98,00 ± 4,00 <sup>a</sup>	98,00 ± 4,00 <sup>a</sup>	1,00 ± 2,00 <sup>a</sup>	1,00 ± 2,00	0 <sup>a</sup>	4,90 ± 0,20 <sup>a</sup>
	48 h	92,00 ± 7,30 <sup>a</sup>	95,00 ± 3,83 <sup>a</sup>	2,00 ± 2,30 <sup>a</sup>	1,00 ± 2,00	2,00 ± 2,30 <sup>a</sup>	4,69 ± 0,25 <sup>a</sup>
	72 h	77,00 ± 6,00 <sup>b</sup>	85,00 ± 3,83 <sup>b</sup>	3,00 ± 2,00 <sup>a</sup>	0	12,00 ± 4,61 <sup>b</sup>	4,13 ± 0,17 <sup>b</sup>
	96 h	40,00 ± 6,53 <sup>c</sup>	45,00 ± 6,83 <sup>c</sup>	9,00 ± 6,00 <sup>b</sup>	5,00 ± 5,03	41,00 ± 3,83 <sup>c</sup>	2,17 ± 0,31 <sup>c</sup>

Os dados estão representados pela  $\bar{x} \pm s.d.$  Letras representam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. One-way ANOVA seguido Teste de Tukey.



**Tabela 2** – Índice mitótico e porcentagem das anomalias cromossômicas avaliadas em células meristemática de raízes dos acessos de *Oryza sativa* L. Formoso e Primavera submetidos a controles e ao teste de envelhecimento acelerado.

Grupos	Índice Mitótico	Anomalias cromossômicas				Frequência Total
		Cromossomos Retardatários	Desalinhamento em metáfase	Fragmentos Cromossômicos	Pontes Cromossômicas	
<b>Formoso</b>						
CN	6,685 ± 1,263 <sup>a</sup>	0	0	0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>
CP	3,248 ± 2,128*	0,024 ± 0,049	0,024 ± 0,049	0,024 ± 0,049	0,049 ± 0,099	0,124 ± 0,189
40 h	5,980 ± 0,770 <sup>a,b</sup>	0,024 ± 0,049	0	0 <sup>a</sup>	0	0,024 ± 0,049 <sup>a,b</sup>
72 h	6,415 ± 1,530 <sup>a,b</sup>	0,047 ± 0,055	0,048 ± 0,056	0,024 ± 0,049 <sup>a,b</sup>	0,047 ± 0,055	0,169 ± 0,094 <sup>a,b</sup>
96 h	6,435 ± 2,056 <sup>a,b</sup>	0,067 ± 0,045	0,046 ± 0,053	0,069 ± 0,046 <sup>b</sup>	0,021 ± 0,042	0,204 ± 0,101 <sup>b</sup>
120 h	3,675 ± 0,581 <sup>b</sup>	0,049 ± 0,057	0,049 ± 0,057	0 <sup>a</sup>	0,047 ± 0,055	0,146 ± 0,127 <sup>a,b</sup>
<b>Primavera</b>						
CN	8,388 ± 0,392 <sup>a</sup>	0	0,049 ± 0,099	0	0	0,049 ± 0,099
CP	4,915 ± 0,328***	0,137 ± 0,044	0,021 ± 0,042	0,044 ± 0,050	0	0,203 ± 0,123
40 h	6,615 ± 1,053 <sup>a,b</sup>	0,024 ± 0,048	0	0,022 ± 0,045	0,022 ± 0,045	0,069 ± 0,087
72 h	6,418 ± 1,285 <sup>a,b</sup>	0,021 ± 0,042	0,024 ± 0,048	0	0,021 ± 0,042	0,066 ± 0,081
96 h	6,278 ± 0,998 <sup>a,b</sup>	0,091 ± 0,073	0,022 ± 0,045	0	0	0,113 ± 0,086
120 h	5,983 ± 1,152 <sup>b</sup>	0,043 ± 0,086	0,024 ± 0,049	0	0	0,068 ± 0,084

CN = sementes não envelhecidas. CP = sementes não envelhecidas expostas a 15 mg/L de MMS por 4 h. Os dados estão representados pela  $\bar{x} \pm s.d.$  Letras representam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. One-way ANOVA seguido Teste de Tukey. Asteriscos representam diferenças significativas entre os grupos CN e CP ( $p < 0,05^*$  e  $p < 0,001^{***}$ ) avaliados pelo teste t não pareado.

**Tabela 3** – Índice mitótico e porcentagem das anomalias cromossômicas avaliadas em células meristemática de raízes dos acessos de *Phaseolus vulgaris* L. GF003 e GF007 submetidos a controles e ao teste de envelhecimento acelerado.

Grupos	Índice Mitótico	Anomalias cromossômicas				Frequência Total
		Cromossomos Retardatários	Desalinhamento em metáfase	Fragmentos Cromossômicos	Pontes Cromossômicas	
<b>GF003</b>						
CN	8,563 ± 0,742 <sup>a</sup>	0,023 ± 0,047 <sup>a</sup>	0,047 ± 0,055	0	0 <sup>a</sup>	0,071 ± 0,047 <sup>a</sup>
CP	5,978 ± 0,496 <sup>**</sup>	0,173 ± 0,061 <sup>**</sup>	0,065 ± 0,044	0,022 ± 0,044	0,066 ± 0,133	0,328 ± 0,080 <sup>**</sup>
24 h	6,540 ± 0,836 <sup>a,b</sup>	0,089 ± 0,076 <sup>a,b</sup>	0,110 ± 0,040	0	0 <sup>a</sup>	0,199 ± 0,084 <sup>a,b</sup>
48 h	5,620 ± 2,180 <sup>a,b</sup>	0,043 ± 0,050 <sup>a,b</sup>	0,064 ± 0,085	0,020 ± 0,040	0,020 ± 0,040 <sup>a,b</sup>	0,148 ± 0,136 <sup>a,b</sup>
72 h	5,538 ± 0,666 <sup>a,b</sup>	0,182 ± 0,085 <sup>b</sup>	0,061 ± 0,075	0,019 ± 0,038	0,060 ± 0,040 <sup>b</sup>	0,323 ± 0,158 <sup>b</sup>
96 h	4,558 ± 2,866 <sup>b</sup>	0,043 ± 0,086 <sup>a,b</sup>	0	0	0 <sup>a</sup>	0,043 ± 0,086 <sup>a</sup>
<b>GF007</b>						
CN	9,358 ± 0,905 <sup>a</sup>	0,024 ± 0,049	0,024 ± 0,049	0	0	0,049 ± 0,056 <sup>a</sup>
CP	6,810 ± 1,103 <sup>*</sup>	0,141 ± 0,068 <sup>*</sup>	0,165 ± 0,163	0	0,040 ± 0,046	0,347 ± 0,162 <sup>*</sup>
24 h	7,970 ± 1,338 <sup>a,b</sup>	0,072 ± 0,048	0,095 ± 0,074	0,025 ± 0,050	0	0,192 ± 0,108
48 h	7,330 ± 1,130 <sup>a,b</sup>	0,160 ± 0,044	0,045 ± 0,053	0,022 ± 0,044	0,022 ± 0,044	0,251 ± 0,131
72 h	6,723 ± 1,486 <sup>a,b</sup>	0,070 ± 0,047	0,093 ± 0,108	0	0	0,164 ± 0,140
96 h	6,070 ± 1,509 <sup>b</sup>	0,090 ± 0,104	0,068 ± 0,045	0	0,043 ± 0,050	0,202 ± 0,132

CN = sementes não envelhecidas. CP = sementes não envelhecidas expostas a 15 mg/L de MMS por 24 h. Os dados estão representados pela  $\bar{x} \pm s.d.$  Letras representam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos (One-way ANOVA seguido Teste de Tukey). Asteriscos representam diferenças significativas entre os grupos CN e CP ( $p < 0,05^*$  e  $p < 0,01^{**}$ ) avaliados pelo teste t não pareado.

Nos acessos de arroz, observou-se uma redução significativa do IM em ambos os acessos de arroz testados apenas no período de 120 horas de envelhecimento acelerado, em relação ao controle negativo (**Tabela 2**). Nos acessos de feijão, foi observado decréscimo significativo do IM somente no período de 96 horas de envelhecimento acelerado em ambos os acessos avaliados, quando comparado ao controle negativo (**Tabela 3**).

Quanto à avaliação da frequência de ACs em células meristemáticas das raízes das sementes de arroz, pôde ser observado um aumento significativo em relação ao controle negativo apenas no acesso de arroz Formoso apenas no período de 96 h de envelhecimento acelerado, sendo que o principal tipo de aberração cromossômica encontrada foram os fragmentos cromossômicos (**Tabela 2**). Nas sementes de feijão, o acesso GF003 demonstrou um aumento significativo da frequência de ACs somente no período de 72 h de envelhecimento acelerado em relação ao controle negativo, sendo os cromossomos retardatários e pontes cromossômicas os principais tipos de anomalias cromossômicas observadas. No acesso de feijão GF007 não foi encontrado um aumento significativo das ACs nos períodos de envelhecimento acelerado avaliados (**Tabela 3**).

O aumento de ACs no acesso Formoso de arroz e no acesso GF003 de feijão foram observados em um período anterior à diminuição significativa do IM. Isto sugere que os acúmulo de ACs ocasionados pelo envelhecimento acelerado em sementes de arroz e feijão precedem ao declínio do IM demonstrando a necessidade de células em divisão para a ocorrência das ACs avaliadas no presente estudo.

## TESTE COMETA

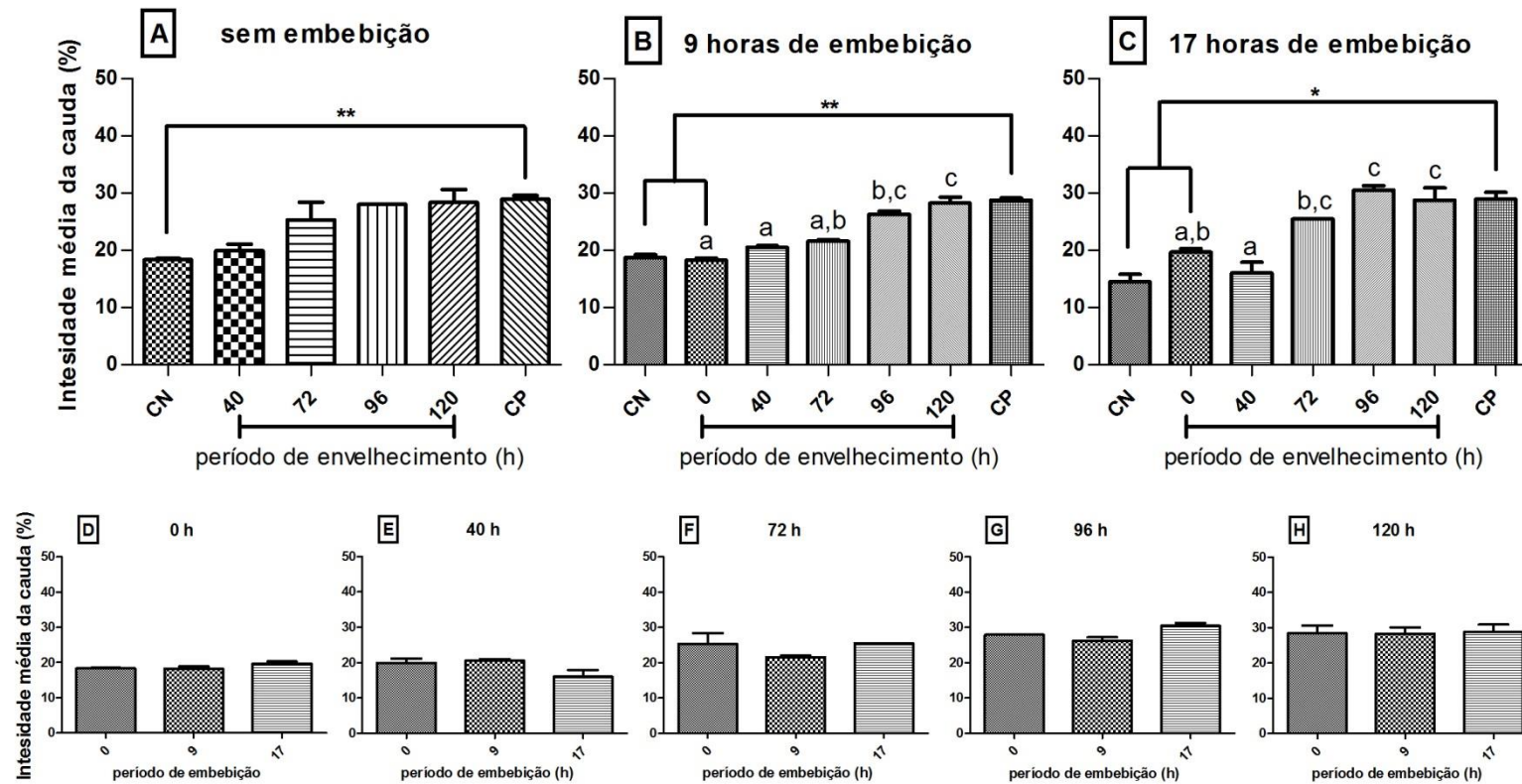
De forma semelhante aos testes citogenéticos foi feita a comparação do percentual da intensidade da cauda entre os grupos não envelhecidos e controle positivo. Os resultados demonstraram que as amostras tratadas com MMS na concentração de 10 mg/L por 24 horas de todos os acessos de ambas as espécies avaliadas produziu um aumento significativo do percentual da intensidade da cauda em relação ao grupo 0 hora de envelhecimento acelerado sem embebição (controle negativo) embebidos por 9 e 17 horas. Cabe enfatizar que os valores dos percentuais da intensidade da cauda no grupo 0 hora de envelhecimento acelerado sem embebição e embebidos por 9 e 17 horas foram inferiores a 20% estando dentro do limite recomendado para controles negativos, valor este o qual evita resultados falso-positivo e erros estatísticos (LOVELL e OMORI, 2008).

No acesso Formoso de arroz, foi observado um aumento significativo do percentual da intensidade da cauda nos períodos de 96 e 120 horas de envelhecimento acelerado, em relação ao período de 0 hora, somente após a embebição das sementes por 9 e 17 horas (**Figura 1A-C**). Quando analisado a capacidade de reparo de cada tratamento neste acesso, não foi observada uma diminuição significativa do percentual da intensidade da cauda nos períodos de envelhecimento acelerado (**Figura 1D-H**).

No acesso Primavera de arroz, os períodos de 72, 96 e 120 horas de envelhecimento acelerado induziram um aumento significativo do percentual da intensidade da cauda antes da embebição, em relação ao controle negativo (**Figura 2A**) e à medida que as sementes foram embebidas apenas os períodos de 96 e 120 horas continuaram a induzir um aumento significativo do percentual da intensidade da cauda, em relação ao período de 0 hora (**Figura 2B e C**). Na avaliação da capacidade de reparo, houve uma redução significativa do percentual da intensidade da cauda nos períodos de 0, 40 e 72 horas de envelhecimento acelerado após 17 horas de embebição, somente em relação ao período de 0 hora de embebição (**Figura 2D-G**). Também foi observada uma redução significativa do percentual da intensidade da cauda no período de 120 horas de envelhecimento acelerado após 17 horas de embebição, em relação ao período de 0 hora de embebição (**Figura 2H**), entretanto este mesmo período de envelhecimento aumentou significativamente o percentual da intensidade da cauda, em relação ao período de 0 hora (**Figura 2C**).

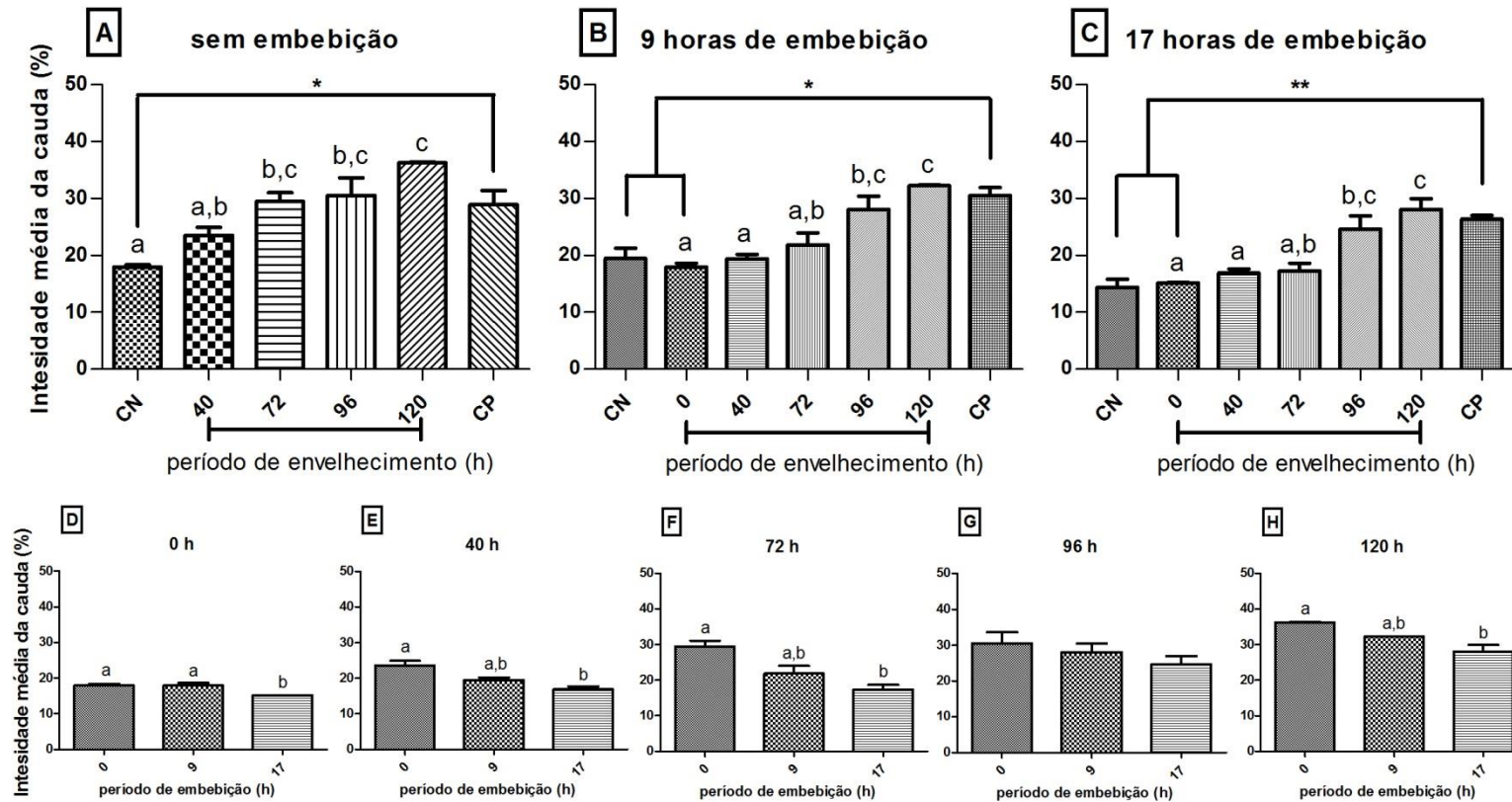
Foi observada uma indução do aumento do percentual da intensidade da cauda nos períodos de 48, 72 e 96 horas de envelhecimento acelerado antes da embebição no acesso GF003 de feijão, em relação ao controle negativo (**Figura 3A**). Após a embebição, somente os períodos de 72 e 96 horas de envelhecimento acelerado produziram um aumento significativo do percentual da intensidade da cauda, em relação ao período de 0 hora (**Figura 3B e C**). Quanto à avaliação da capacidade de reparo, apenas no período de 48 horas de envelhecimento acelerado foi observada uma redução significativa o percentual da intensidade da cauda depois de 17 horas de embebição, em relação ao período de 0 hora de embebição (**Figura 3F**).

**Figura 1** - Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides do acesso de *Oryza sativa* L. Formoso submetido a controles e ao teste de envelhecimento acelerado.



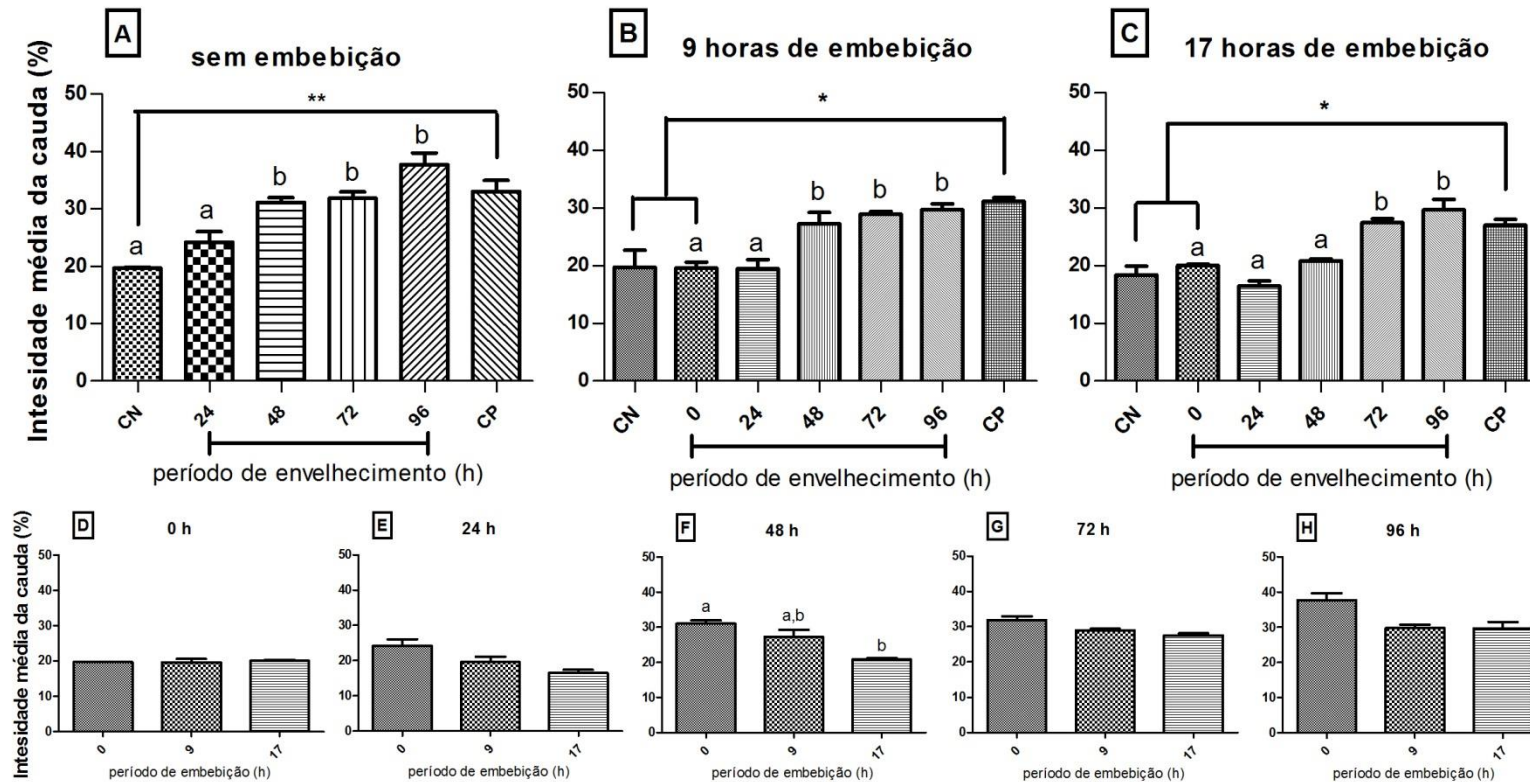
**A-C)** comportamento das sementes envelhecidas submetidas ao teste cometa sem e com embebição por 9 e 17 horas, respectivamente. **D-H)** resposta das sementes envelhecidas expostas por 0, 40, 72, 96 e 120 horas de envelhecimento acelerado, respectivamente, aos períodos de embebição. CN = sementes não envelhecidas e não embebidas. CP = sementes não envelhecidas expostas a 10 mg/L de Metanossulfonato de metila por 24 horas. Os dados estão representados pela  $\bar{x} \pm s.e.$  Letras representam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. One-way ANOVA seguido teste de Tukey. Asteriscos na **Figura 1A** representam diferenças significativas entre os grupos CN e CP ( $p < 0,01^{**}$ ) avaliados pelo teste t não pareado e nas **Figuras 1B e C** representam entre os grupos CN, 0 hora e CP ( $p < 0,05^*$  e  $p < 0,01^{**}$ ) avaliados por one-way ANOVA seguido teste de Tukey.

**Figura 2** - Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides do acesso de *Oryza sativa* L. Primavera submetido a controles e ao teste de envelhecimento acelerado.



**A-C)** comportamento das sementes envelhecidas submetidas ao teste cometa sem e com embebição por 9 e 17 horas, respectivamente. **D-H)** resposta das sementes envelhecidas expostas por 0, 40, 72, 96 e 120 horas de envelhecimento acelerado, respectivamente, aos períodos de embebição. CN = sementes não envelhecidas e não embebidas. CP = sementes não envelhecidas expostas a 10 mg/L de metanossulfonato de metila por 24 horas. Os dados estão representados pela  $\bar{x} \pm s.e.$  Letras representam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. One-way ANOVA seguido teste de Tukey. Asteriscos na **Figura 2A** representam diferenças significativas entre os grupos CN e CP ( $p < 0,01^{**}$ ) avaliados pelo teste t não pareado e nas **Figuras 2B e C** representam entre os grupos CN, 0 hora e CP ( $p < 0,05^*$  e  $p < 0,01^{**}$ ) avaliados por one-way ANOVA seguido teste de Tukey.

**Figura 3** - Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides do acesso de *Phaseolus vulgaris* L. GF003 submetido a controles e ao teste de envelhecimento acelerado.



**A-C)** comportamento das sementes envelhecidas submetidas ao teste cometa sem e com embebição por 9 e 17 horas, respectivamente. **D-H)** resposta das sementes envelhecidas expostas por 0, 24, 48, 72 e 96 horas de envelhecimento acelerado, respectivamente, aos períodos de embebição. CN = sementes não envelhecidas e não embebidas. CP = sementes não envelhecidas expostas a 10 mg/L de metanossulfonato de metila por 24 horas. Os dados estão representados pela  $\bar{x} \pm s.e.$  Letras representam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. One-way ANOVA seguido teste de Tukey. Asteriscos na **Figura 3A** representam diferenças significativas entre os grupos CN e CP ( $p < 0,01^{**}$ ) avaliados pelo teste t não pareado e nas **Figuras 3B e C** representam entre os grupos CN, 0 hora e CP ( $p < 0,05^*$  e  $p < 0,01^{**}$ ) avaliados por one-way ANOVA seguido teste de Tukey.

As sementes do acesso GF007 de feijão apresentaram um aumento do percentual da intensidade da cauda nos períodos de 72 e 96 horas de envelhecimento acelerado antes e após a embebição de 9 horas, em relação ao controle negativo e ao período de 0 hora respectivamente (**Figura 4A e B**). Após 17 horas de embebição, somente no período de 96 horas de envelhecimento acelerado foi observado um aumento do percentual da intensidade da cauda, em relação ao período de 0 hora (**Figura 4C**). Quando avaliado a capacidade de reparo de cada tratamento neste acesso, não foi observada uma redução significativa do percentual da intensidade da cauda nos períodos de envelhecimento acelerado (**Figura 4D-H**).

## DISCUSSÃO

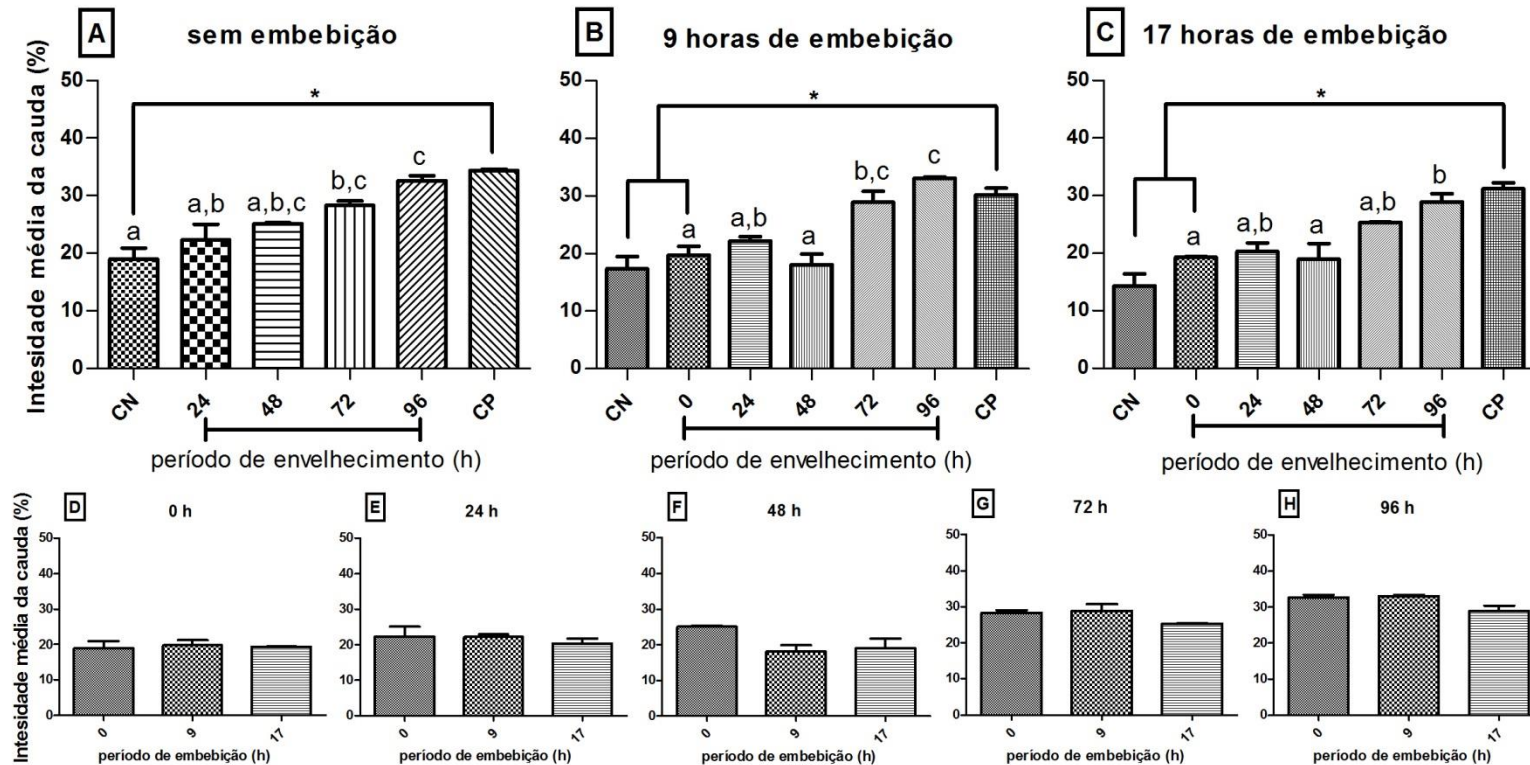
Pôde ser observado no presente estudo que os danos citogenéticos observados foram em períodos de envelhecimento que diminuíram significativamente a viabilidade e/ou vigor das sementes de arroz e feijão. Estudos têm demonstrado uma relação entre anomalias nucleares, como inibição do IM e aumento de ACs, e a redução da viabilidade e do vigor das sementes ocasionado pelo envelhecimento acelerado (FONTES et al., 2001; KHAN et al., 2003; SISTON, 2013; MENEZES et al., 2014).

A relação entre anomalias nucleares e a redução da viabilidade e do vigor de sementes envelhecidas pode estar associada aos eventos que ocorrem até a sua completa germinação. Para isto, o metabolismo das sementes é retomado logo após a embebição iniciando uma série de eventos como a respiração, síntese de proteínas e RNA, mecanismos de reparo e síntese de DNA conduzindo até a expansão das células da radícula, o que precede a divisão celular (BLACK et al., 2006). De acordo com Black et al. (2006), danos não reparados pelos mecanismos de reparo impedem as células de substituir o seu material genético podendo retardar as alterações necessárias para a realização da germinação e, eventualmente, conduzir a disfunção e morte celular.

O processo de deterioração das sementes reduz principalmente a divisão celular e, conseqüentemente, o IM afetando negativamente o vigor e, em estágios avançados de deterioração, afeta as taxas de germinação (MENEZES et al., 2014). Portanto, o acúmulo de ACs observado no presente estudo pode ter retardado a divisão celular devido a ativação dos mecanismos de reparo ao longo do ciclo celular influenciando o vigor das sementes envelhecidas. Vale ressaltar que apesar das aberrações cromossômicas poderem originar danos irreversíveis, as ACs avaliadas no presente estudo podem ser reparadas ou minimizadas pelas células (RAO et al., 2008).



**Figura 4** - Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides do acesso de *Phaseolus vulgaris* L. GF007 submetidos a controles e ao teste de envelhecimento acelerado.



**A-C)** comportamento das sementes envelhecidas submetidas ao teste cometa sem e com embebição por 9 e 17 horas, respectivamente. **D-H)** resposta das sementes envelhecidas expostas por 0, 24, 48, 72 e 96 horas de envelhecimento acelerado, respectivamente, aos períodos de embebição. CN = sementes não envelhecidas e não embebidas. CP = sementes não envelhecidas expostas a 10 mg/L de metanossulfonato de metila por 24 horas. Os dados estão representados pela  $\bar{x} \pm s.e.$  Letras representam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. One-way ANOVA seguido teste de Tukey. Asteriscos na **Figura 4A** representam diferenças significativas entre os grupos CN e CP ( $p < 0,01^{**}$ ) avaliados pelo teste t não pareado e nas **Figuras 4B e C** representam entre os grupos CN, 0 hora e CP ( $p < 0,05^*$  e  $p < 0,01^{**}$ ) avaliados por one-way ANOVA seguido teste de Tukey.

De forma similar aos resultados dos testes citogenéticos, os efeitos genotóxicos significativos encontrados no teste cometa foram em períodos de envelhecimento que diminuíram significativamente a viabilidade e/ou vigor das sementes de arroz e feijão, exceto no acesso GF007 de feijão. Neste acesso, o período de 72 horas de envelhecimento após 17 horas embebição não induziu danos significantes, em relação ao período de 0 hora de embebição. Isto pode estar refletido nos resultados do teste de germinação, uma vez que as sementes deste período possuem o percentual de germinação de 85%, o qual é considerado um valor mínimo no monitoramento da viabilidade de sementes conservadas de espécies cultivadas como o feijão (FAO, 2014). Os dados em conjunto demonstram que, apesar da redução significativa da germinação no período de 72 horas de envelhecimento, estas sementes atingem níveis de germinação e danos ao DNA aceitáveis.

Os resultados do teste cometa demonstraram a importância da embebição na diferenciação dos danos ao DNA, uma vez que houve diferenças entre e dentro dos períodos de envelhecimento após a embebição. Mecanismos de reparo durante o processo de embebição das sementes é um fator determinante para diferenciar níveis de fragmentação do DNA em sementes envelhecidas com diferentes percentuais de germinação (KRANNER et al., 2011). Vale ressaltar que os danos observados no teste cometa podem ser reparados (COLLINS, et al. 2008), tornando o teste cometa uma metodologia viável para avaliar a capacidade de reparo das sementes envelhecidas de arroz e feijão após a embebição.

A versão neutra do teste cometa, usada no presente estudo, pode detectar quebras de fita simples (SSB) e dupla (DSB) (AZQUETA e COLLINS, 2013). Em sementes submetidas ao teste de envelhecimento acelerado, a retomada do metabolismo pode causar mecanismos de proteção antioxidante e regeneração ineficientes gerando espécies reativas de oxigênio (BEWLEY et al., 2012) e, conseqüentemente, ocasionando SSB a partir do ataque direto às unidades desoxirribose ou por modificação covalente de bases, mudanças no conteúdo de DNA e fragmentação do DNA (VENTURA et al., 2012).

DSB e as suas vias de reparo associadas são fatores que influenciam a germinação e o vigor das sementes (WATERWORTH et al., 2010), uma vez que tem sido demonstrado que sementes envelhecidas deficientes no reparo de DSB apresentam atraso no aparecimento de radículas e no início do ciclo celular, bem como possuem a replicação do DNA inibida e um aumento na frequência de pontes cromossômicas (WATERWORTH et al., 2016). Ou seja, os danos observados no teste cometa do presente estudo podem ter sido originados de SSB e/ou DSB.

Apesar do relato da influência de quebras a fita de DNA na germinação e no vigor de sementes envelhecidas artificialmente (WATERWORTH et al., 2010), até o presente momento não tem sido relatado o uso do teste cometa em sementes envelhecidas. O teste cometa é uma técnica sensível e flexível para a detecção de baixos níveis de danos ao DNA, relativamente de baixo custo e demanda de pequeno número de amostra e de período de tempo relativamente curto (alguns dias) necessário para completar um experimento (TICE et al., 2000). Neste contexto, o presente estudo destaca-se por ser um dos primeiros a usar o teste cometa em sementes envelhecidas artificialmente demonstrando o seu potencial para avaliar a integridade genética e eficácia do sistema de reparo de sementes envelhecidas. Embora este estudo tenha utilizado o teste cometa em espécies de plantas cultivadas, esta técnica pode ser aplicada em outras espécies de plantas, uma vez que tem sido utilizada em vários organismos, tecidos e tipos celulares (DHAWAN et al., 2009), principalmente, devido ao fato de não necessitar de proliferação celular permitindo a sua realização virtualmente em qualquer organismo eucarioto (VILLELA et al., 2003).

A combinação do teste cometa com marcadores citogenéticos aumenta a sensibilidade e permitem uma melhor interpretação dos dados encontrados no teste cometa (VASQUEZ, 2010). Por exemplo, ações aneugênicas em células meristemáticas de raízes de plantas podem ser visualizadas nos testes citogenéticos pela ocorrência de cromossomos retardatários e desalinhamento em metáfase. Como estas ACs são caracterizadas pelo retardo da migração de cromossomos inteiros (BAJER e VANTARD, 1988), mecanismos aneugênicos não podem ser detectados no teste cometa, uma vez que o teste cometa detecta danos originados a partir de ação clastogênica, isto é, danos que ocasionam quebras ao DNA (COLLINS et al., 2008). Em mamíferos, os resultados do teste cometa e do teste de anomalias cromossômicas mostram um alto nível concordância independentemente do tipo celular utilizado (HARTMANN et al., 2003).

O uso dos testes citogenéticos e cometa permitiu uma compreensão mais ampla dos efeitos do envelhecimento acelerado na integridade genética e do sistema de reparo de DNA em sementes de arroz e feijão. Os resultados aqui apresentados sugerem que o envelhecimento acelerado causa inibição do índice mitótico, o aumento de anomalias cromossômicas e da fragmentação do DNA dos acessos de arroz e feijão avaliados. Estes dados demonstram o potencial dos testes citogenéticos e cometa em programas de conservação de sementes. O uso destas técnicas poderia auxiliar na seleção de acessos mais adequados para o armazenamento por períodos prolongados sem comprometer a sua integridade genética e, conseqüentemente, sua viabilidade e vigor.

### **Conflito de interesse**

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

### **Agradecimentos**

Este projeto foi apoiado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Universidade de Brasília.

### **REFERÊNCIAS**

AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. **The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair**. Archives of Toxicology. v. 87, p. 949-968. 2013.

BARBOSA, L. **Feijão com arroz e arroz com feijão: o Brasil no prato dos brasileiros**. Horizontes Antropológicos. v. 28, p. 87-116. 2007.

BAJER, A. S.; VANTARD, M. **Microtubule dynamics determine chromosome lagging and transport of acentric fragments**. Mutation Research. v. 201, p. 271-281. 1988.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3rd. New York: Springer Science & Business Media, 2012. 392p.

BLACK, M.; BEWLEY, J. D.; HALMER, P. **The Encyclopedia of Seeds: Science, Technology and Uses**. Wallingford: CABI, 2006. 900p.

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

COLLINS, A. R.; OSOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; ŠTĚTINA, R. **The comet assay: topical issues**. Mutagenesis. v. 23, p. 143-151. 2008.

DANTAS, A. F.; LOPES, R. M.; FASCINELLI, M. L.; JOSÉ, S. C. B. R.; PÁDUA, J. G.; GIMENES, M. A.; GRISOLIA, C. K. **Comet and cytogenetic tests as tools for evaluating genomic instability in seeds of *Oryza sativa* L. and *Phaseolus vulgaris* L. from gene banks**. Genetics and Molecular Biology. v. 41, p. 145–153. 2018.

DEHON, G.; CATOIRE, L.; DUEZ, P.; BOGAERTS, P.; DUBOIS, J. **Validation of an automatic comet assay analysis system integrating the curve fitting of combined comet intensity profiles**. Mutation Research. v. 650, p. 87-95. 2008.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. **The Comet Assay: A Versatile Tool for Assessing DNA Damage**. In: DHAWAN, A.; ANDERSON, D. (Org.). *The Comet Assay in Toxicology*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, p. 3-53. 2009.

FAO. **Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. 166p.

FONTES, B. P. D.; DAVIDE, L. C.; DAVIDE, A. C. **Fisiologia e citogenética de sementes envelhecidas de *Araucaria angustifolia***. *Ciência agrotecnologia*. v. 25, p. 346-355. 2001.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. de. **Como observar cromossomos: Um Guia de Técnicas em Citogenética Vegetal, Animal e Humana**. Riberão Preto: Fundação de Pesquisas Científicas de Riberão Preto. 2002. 131p.

HARTMANN, A.; PLAPPERT, U.; POETTER, F.; SUTER, W. **Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test**. *Mutation Research*. v. 536, p. 27-38. 2003.

KHAN, M. M.; IQBAL, M. J.; ABBAS, M.; USMAN, M. **Effect of Ageing on Viability, Vigour and Chromosomal Damage in Pea (*Pisum Sativum* L.) Seeds**. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. v. 40, p. 50-54. 2003.

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

LIMA, D. de C.; DUTRA, A. S.; CAMILO, J. de M. **Physiological quality of sesame seeds during storage**. *Revista Ciência Agronômica*. v. 45, p. 138-145. 2014.

LOVELL, D. P.; OMORI, T. **Statistical issues in the use of the comet assay**. *Mutagenesis*. v. 23, p. 171-182. 2008.

MAGUIRRE, J. D. **Speed of germination - aid seedling emergence and vigor**. *Crop Science*, v. 2, p. 176-177. 1962.

MARCOS FILHO, J. **Testes de vigor: importância e utilização**. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R. D. (Org.) *Vigor de sementes: Conceitos e testes*. Londrina: ABRATES. 1999. p. 3-24.

MENEZES, V. O.; LOPES, S. J.; TEDESCO, S. B.; HENNING, F. A.; ZEN, H. D.; MERTZ, L. M. **Cytogenetic analysis of wheat seeds submitted to artificial aging stress**. *Journal of Seed Science*. v. 36, p. 71-78. 2014.

MISSAOUI, A. M.; HILL, N. S. **Use of accelerated aging as a surrogate phenotyping approach to improve endophyte survival during storage of tall fescue seed**. *Field Crops Research*. v. 183, p 43-49. 2015.

MONCALEANO-ESCANDON, J.; SILVA, B. C. F.; SILVA, S. R. S.; GRANJA, J. A. A.; ALVES, M. C. J. L.; POMPELLI, M. F. **Germination responses of *Jatropha curcas* L. seeds to storage and aging**. *Industrial Crops and Products*. v. 44, p. 648-690. 2013.

MOURAD, A. L.; NETO, A. R.; MIGUEL, A. M. R. DE O.; HENRIQUES, E. A.; ALVES, R. M. V. **Storage stability of three genotypes of sunflower seeds**. *Industrial Crops and Products*. v. 80, p. 6-16. 2016.

PEIXOTO, A. M.; SOUSA, J. S. I de; TOLEDO, F. F. de; REICHARDT, K.; FILHO, J. M. **Enciclopédia agrícola brasileira: S-Z**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, v. 6. 2006. 632p.

RAJJOU, L.; DEBEAUJON, I. **Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds**. *Comptes Rendus Biologies*. v. 331, p. 796-805. 2008.

RAO, X.; ZHANG, Y.; YIA, Q.; HOU, H.; XU, B.; CHU, L.; HUANG, Y.; ZHANG, W.; FENECH, M.; SHI, Q. **Multiple origins of spontaneously arising micronuclei in HeLa cells: Direct evidence from long-term live cell imaging**. *Mutation Research*. v. 646, p. 41-49. 2008.

SISTON, L. C. S. **Detecção da deterioração de acessos de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All – (Fabaceae) por testes bioquímicos, de vigor e análise citogenética**. 2013. 69 f. Dissertação de Mestrado em Engenharia Florestal. Publicação PPG EFL 221/2013, Faculdade de Tecnologia, Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 71p.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. **Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing**. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. v. 35, p. 206-221. 2000.

VASQUEZ, M. R. **Combining the *in vivo* comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation**. *Mutagenesis*. v. 25, p. 187-199. 2010.

VENTURA, L.; DONÀ, M.; MACOVEI, A.; CARBONERA, D.; BUTTAFAVA, A.; MONDONI, A.; ROSSI, G.; BALESTRAZZI, A. **Understanding the molecular pathways associated with seed vigor**. *Plant Physiology and Biochemistry*. v. 60, p. 196-206. 2012.

VILLELA, I. V.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; PRÁ, D.; ROLLA, H. C.; SILVEIRA, J. de D. **Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental**. In: SILVA, J. da.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Org.). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance. 2003. p. 147-163.

WATERWORTH, W. M.; MASNAVI, G.; BHARDWAJ, R. M.; JIANG, Q.; BRAY, C. M.; WEST, C. E. **A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity**. *The Plant Journal*. v. 63, p. 848-860. 2010.

WATERWORTH, W. M.; FOOTITT, S.; BRAY, C. M.; FINCH-SAVAGE, W. E.; WEST, C. E. **DNA damage checkpoint kinase ATM regulates germination and maintains genome stability in seeds**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 113, p. 9647-9652. 2016.

### **CAPÍTULO 3**

**Análise da integridade genética e eficácia do sistema de reparo de acessos de arroz e feijão armazenados em bancos de germoplasma**

Análise da integridade genética e eficácia do sistema de reparo de acessos de arroz e feijão armazenados em bancos de germoplasma

Alisson F. Dantas<sup>1</sup>, Maria L. Fascineli<sup>1</sup>, Solange C.B.R. José<sup>2</sup>, Juliano G. Pádua<sup>2</sup>, Marcos A. Gimenes<sup>2</sup>, Cesar K. Grisolia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF

<sup>2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, D.F.

## RESUMO

A conservação de germoplasma semente é importante para manter a variabilidade genética de espécies fundamentais para o agronegócio e segurança alimentar, como o arroz (*Oryza sativa* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Por isto, o presente estudo teve por objetivo analisar a integridade genética e eficácia do sistema de reparo de sementes de arroz e feijão armazenados em bancos de germoplasma. Foram analisados dois acessos de arroz e feijão com três e duas datas de armazenamento, respectivamente, do Banco Genético da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil. Testes de primeira contagem, germinação e índice de velocidade de germinação foram realizados para medir a qualidade fisiológica das sementes. Testes citogenéticos e cometa foram realizados para avaliar a integridade genética dos diferentes lotes. Não foram observadas diferenças significativas entre as amostras das duas espécies nos testes citogenéticos. Nos testes de qualidade fisiológica, foram observadas diferenças significativas quanto à viabilidade e/ou vigor dos lotes das duas espécies. No teste cometa, os lotes das duas espécies com sementes menos viáveis e/ou vigorosas apresentaram mais danos ao DNA e menor capacidade de reparo. Tal similaridade poderia abrir perspectivas para uso do teste cometa na avaliação de sementes armazenadas em bancos de germoplasma.

Palavras-chave: arroz; feijão; testes citogenéticos; teste cometa; bancos de germoplasma.



## INTRODUÇÃO

Os bancos de germoplasma podem ser referidos como local de armazenagem de amostras (acessos) a médio e longo prazo em câmaras frias, *in vitro* ou em tambores com nitrogênio líquido (VEIGA et al., 2015). Estes bancos possuem como principal finalidade manutenção da viabilidade e da integridade genética dos recursos genéticos conservados (RAO et al., 2006). A maior parte dos recursos genéticos vegetais em bancos de germoplasma é mantida como sementes porque os bancos possibilitam a conservação em longo prazo de maneira segura de uma parte considerável da variabilidade genética de diferentes espécies (VIEIRA et al., 2008; MARIM et al., 2009; de OLIVEIRA et al., 2010).

O monitoramento da viabilidade das sementes durante o armazenamento é uma fase fundamental do processo de conservação de sementes sendo feita, principalmente, utilizando-se o teste de germinação (FAO, 2014). No entanto, este teste pode não detectar processos iniciais de deterioração das sementes porque no teste de germinação pode ser difícil detectar queda na qualidade das sementes (BLACK et al., 2006). Técnicas moleculares podem contribuir para o entendimento do processo de perda de viabilidade, uma vez que a redução da capacidade do sistema de reparo é um dos processos que ocorrem durante o envelhecimento (FU et al., 2015). Essas técnicas poderiam ainda contribuir na monitoração da integridade genética do material, minimizando alterações em função da erosão genética e variação introduzida em função do envelhecimento (BLACK et al., 2006).

Os bancos de germoplasma mantêm um grande número de espécies e acessos (FAO, 2010). Em função desses altos números, os gastos para sua manutenção e monitoramento são altos (RAO et al., 2017) e por isso o teste de germinação tem sido a primeira opção da maioria dos bancos. Testes que visam a aplicação em bancos tem que ser de baixo custo e alta repetibilidade e passíveis de utilização em várias espécies, com poucos ajustes. Os testes citogenéticos atendem esses critérios e têm sido utilizados na avaliação de material envelhecido de espécies como *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze (FONTES et al., 2001), *Pisum Sativum* L. (KHAN et al., 2003), *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All (SISTON, 2013), *Triticum aestivum* L. (AKHTER et al., 1992; MENEZES et al., 2014), *Hordeum vulgare* L. (AKHTER et al., 1992; LOPES, 2016) e *Glycine max* (L.) Merr. (LOPES, 2016).

Outro teste que demonstra potencial para avaliar a integridade genética em sementes de bancos de germoplasma é o teste de eletroforese em gel de célula única, também conhecido como teste cometa. O potencial deste teste está na sua simplicidade, sensibilidade,

confiabilidade, rapidez e ser, relativamente, de baixo custo para a detecção de danos ao DNA (COLLINS et al., 1997).

O presente estudo teve por objetivo analisar a integridade genética e eficácia do sistema de reparo sementes de arroz (*Oryza sativa* L., família Poaceae) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L., família Fabaceae) armazenados em longo prazo em bancos de germoplasma por meio dos testes citogenéticos e cometa visando obter uma melhor compreensão da qualidade de sementes armazenadas em bancos de germoplasma por períodos prolongados. O arroz e feijão comum foram escolhidos devido a sua importância alimentar no Brasil, pois são os principais componentes de a dieta alimentar (BARBOSA, 2007) e, por isto, possuem grandes coleções estabelecidas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### MATERIAL VEGETAL

Três amostras de sementes mantidas por diferentes períodos de dois acessos de *O. sativa* (CNA 2020 e CNA 4008) e duas amostras de sementes de dois acessos de *P. vulgaris* (CNF 2035 e CF 810527) foram obtidas do banco genético da Embrapa (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil) (**Tabela 1**). Estes acessos foram selecionados por estarem armazenados a pelo menos 14 anos em câmaras frias e por ter sido introduzido mais de uma vez no banco genético da Embrapa. Além disso, as datas de introdução de cada acesso diferem em pelo menos de cinco anos (acessos de *O. sativa* CNA 2020 e CNA 4008 e acesso de *P. vulgaris* CNF 2035) ou apresentavam uma data com decréscimo na germinação em relação ao inicial (acesso de *P. vulgaris* CF 810527).

As sementes encontravam-se armazenadas em câmaras frias a -20°C, dentro de embalagens aluminizadas hermeticamente fechadas. As amostras dos acessos CNA 2020 e CNA 4008 de *O. sativa* foram introduzidas na coleção em: 01/06/1981, 01/05/1996 e em 11/06/2003 e em 01/02/1987, 01/03/1999 e em 30/03/2004, respectivamente. As amostras dos acessos de *P. vulgaris* foram introduzidas na coleção em duas datas de armazenamento, sendo 01/06/1992 e 06/06/2001 para o acesso CNF 2035 e em 01/01/1994 e em 01/03/1997 o acesso CF 810527. As diferentes datas de armazenamento de cada um dos acessos ocorreram em função de multiplicação dos materiais nos bancos ativos de germoplasma.

**Tabela 1** – Data da introdução e poder de germinação dos acessos de arroz e feijão mantidos em câmara fria.

<b>Acesso</b>	<b>Data da introdução</b>	<b>Germinação inicial<sup>1</sup></b>	<b>Germinação atual<sup>1, 2</sup></b>
CNA 2020 de arroz	01/06/1981	88,00	94,00
	01/05/1996	92,00	90,80
	11/06/2003	89,00	–
CNA 4008 de arroz	01/02/1987	98,00	68,00
	01/03/1999	99,00	95,00
	30/03/2004	99,00	–
CNF 2035 de feijão	01/06/1992	98,00	96,00
	06/06/2001	100,00	–
CF 810527 de feijão	01/01/1994	98,00	84,00
	01/03/1997	100,00	99,00

<sup>1</sup> Dados obtidos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. <sup>2</sup> Dados obtidos da avaliação mais recente da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia realizada entre os anos de 2012 e 2014, exceto o lote do acesso CNA 4008 de arroz introduzido em 1987 o qual foi avaliado em 1994. – avaliação da germinação não realizada.

As embalagens aluminizadas foram retiradas das câmaras frias e deixadas a temperatura ambiente por 24 h antes da coleta das sementes. Em seguida, as sementes foram mantidas em câmara de espera regulada para 10 °C e 30% de UR até a realização dos testes de primeira contagem, germinação e índice de velocidade de germinação para medir a qualidade fisiológica das sementes, e dos testes citogenéticos e cometa para avaliação da integridade genética. Antes de todos os testes, as sementes foram deixadas a temperatura ambiente por 24 h para aclimatização.

#### TESTES DE GERMINAÇÃO E PRIMEIRA CONTAGEM

O teste de germinação foi realizado segundo recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), com adaptações. Quatro repetições de 25 sementes de cada tratamento de quatro acessos, sendo dois acessos de arroz e dois de feijão, foram semeadas em substrato rolo de papel toalha tipo “germitest” umedecido com água destilada na proporção de

2,5 vezes a massa do papel seco. Os rolos foram mantidos em germinador regulado a temperatura de 25°C. Foram avaliadas as porcentagens de plântulas normais (germinação) e anormais, sementes duras e mortas ao décimo quarto dia após a semeadura para as sementes de arroz e ao nono dia para as sementes de feijão. Os resultados foram expressos em porcentagem média das repetições. Conjuntamente com o teste de germinação, foi realizada a primeira contagem, ao quinto dia após semeadura para ambas as espécies avaliadas (BRASIL, 2009).

### ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi estimado conjuntamente com o teste de germinação. As plântulas normais foram contabilizadas em dias alternados após o quinto dia de semeadura até a estabilização da contagem, que ocorreu no final do teste de germinação. O IVG foi a média aritmética das quatro repetições, determinado de acordo com a fórmula proposta por Maguirre (1962):

$$IVG = \frac{G1}{N1} + \frac{G2}{N2} + \dots + \frac{Gn}{Nn}$$

onde:

*IVG* = índice de velocidade de germinação

*G1, G2, ... Gn* = número de plântulas normais, computadas na primeira contagem, segunda contagem, ... , última contagem.

*N1, N2, ... Nn* = número de dias de semeadura à primeira, segunda, ... , última contagem.

### TESTES CITOGENÉTICOS

Vinte sementes de cada data de armazenamento dos dois acessos de arroz e de feijão foram semeadas em substrato, rolo de papel tipo “germitest”, umedecido com água destilada, na proporção de 2,5 mL/g de papel seco para obtenção de raízes e consequente processamento nos testes citogenéticos. Os rolos de papel com sementes permaneceram em germinador regulado na temperatura de 25°C até as raízes atingirem o tamanho entre 1 a 2 cm para arroz, e entre 1 a 3 cm para feijão. As raízes foram fixadas em solução Carnoy (etanol/ácido acético glacial - 3:1 v/v) e armazenadas em etanol 70% até o preparo das lâminas.

As lâminas foram preparadas de acordo com a metodologia proposta por Guerra e Souza (2002), com modificações. As raízes foram lavadas em água destilada durante 5 minutos, hidrolisadas em ácido clorídrico 5N por 35 minutos para raízes de arroz e 30 minutos para raízes de feijão, lavadas novamente em água destilada por 2 minutos e dispostas nas lâminas para o corte da região meristemática das raízes e coloração com orceína acética 2% durante 25 e 30 minutos para as raízes de feijão e arroz, respectivamente. Em seguida, a região meristemática foi recoberta por uma lamínula e, então, avaliadas em microscópio óptico (1.000 X).

Foram avaliadas, no mínimo, 1.000 células por raiz sendo utilizadas quatro raízes em um total de no mínimo 4.000 células analisadas para cada tratamento. Os parâmetros utilizados para caracterizar os tratamentos foram: (a) índice mitótico (IM) como indicativo de citotoxicidade e (b) frequência de anomalias cromossômicas (ACs) por células avaliadas como indicativo de mutagenicidade. Para a análise de ACs, foram avaliados cromossomos retardatários, desalinhamento em metáfase, fragmentos e pontes cromossômicas em anáfase e/ou telófase. A avaliação das lâminas foi feita em teste cego.

## TESTE COMETA

O teste cometa foi realizado em sementes dos dois acessos de arroz e de feijão antes e após embebição. As sementes foram embrulhadas em papel “germitest” umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco em germinador a temperatura de 25°C por 9 e 17 horas para observar a capacidade de reparo de DNA nas sementes.

A obtenção das suspensões celulares e a realização do teste cometa foram conduzidas de acordo com as adaptações feitas para sementes de arroz e feijão por Dantas et al. (2018). Dez embriões de cada tratamento foram coletados e divididos igualmente em dois microtubos de 2 ml contendo 0,25 e 0,5 ml de tampão fosfato salina frio para obter suspensões celulares de arroz e feijão, respectivamente. Em seguida, os embriões foram macerados e deixados por no mínimo 1 h em geladeira sendo o sobrenadante utilizado para a realização do teste cometa.

Quinze microlitros da suspensão celular de cada tratamento foram misturados com 85 µl de agarose LMP (0,8%) a 45 °C e dispostos em lâminas pré-cobertas com agarose NMP (0,5%). Em seguida, as lâminas foram recobertas imediatamente com lamínula, colocadas em placa de metal e levadas primeiro a refrigerador e depois a geladeira por 10 minutos cada. Após a solidificação do gel de agarose, as lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas em solução tampão TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8,4) contendo 2,5 % de dodecil

sulfato de sódio por 30 minutos. Após a etapa de lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese contendo solução tampão TBE e deixadas em descanso por 5 minutos antes da corrida de eletroforese ser conduzida a 0,5 V/cm por 2 minutos. Depois, as lâminas foram mergulhadas em água destilada gelada por 10 minutos, secas a temperatura ambiente e guardadas em geladeira até o momento de coloração a qual foi realizada com 50 µL de brometo de etídio (20 µg/ml) e analisadas em microscópio de fluorescência (400 X) usando filtros de excitação e emissão de 546 nm e 590 nm. Todos os passos foram realizados em luz fraca ou amarela. Foram feitas duas lâminas para cada grupo de ambas as espécies sendo analisados no mínimo 20 nucleoides por lâmina, como sugerido por Dehon et al. (2008). A avaliação dos nucleoides de embriões de *O. sativa* e de *P. vulgaris* foi feita pelo programa *Comet Assay IV* versão 4.3.1 sendo o parâmetro intensidade da cauda escolhido para medir os danos ao DNA como indicativo de genotoxicidade. A avaliação das lâminas foi feita em teste cego.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos dados de todos os testes em sementes de arroz e as comparações entre os períodos de embebição de cada ano de armazenamento no teste cometa em sementes de feijão foram realizadas por meio de One-way ANOVA seguido Teste de Tukey. As demais análises dos dados dos testes em sementes de feijão foram feitas pelo teste t não pareado. A análise dos dados foi feita com o software GraphPad Prism versão 5.00, com níveis de significâncias de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### TESTES DE PRIMEIRA CONTAGEM, GERMINAÇÃO E IVG

Os resultados dos testes de primeira contagem, germinação e IVG são apresentados na **Tabela 2**. O acesso CNA 2020 de arroz apresentou diferenças significativas quanto aos valores absolutos observados na primeira contagem e no IVG entre os três lotes de sementes sendo que o maior valor absoluto foi do lote introduzido em 1996 seguido pelo lote de 1981 e, por último, pelo lote de 2003.

**Tabela 2** – Porcentagem de plântulas normais obtida na primeira contagem e final do teste de germinação, plântulas anormais, sementes duras, sementes mortas, e índice de velocidade de germinação (IVG) de acessos de arroz e feijão armazenados em câmara fria.

Acesso	Ano da introdução	Primeira contagem	Teste de germinação				IVG
			Germinação	Plântulas anormais	Sementes duras	Sementes mortas	
CNA 2020 de arroz	1981	68,00 ± 8,64 <sup>a</sup>	89,00 ± 5,03 <sup>a</sup>	6,00 ± 5,16 <sup>a</sup>	4,00 ± 3,26 <sup>a</sup>	1,00 ± 2,00	3,99 ± 0,35 <sup>a</sup>
	1996	95,00 ± 5,03 <sup>b</sup>	95,00 ± 5,03 <sup>a</sup>	1,00 ± 2,00 <sup>a</sup>	1,00 ± 2,00 <sup>a</sup>	3,00 ± 3,82	4,75 ± 0,25 <sup>b</sup>
	2003	5,00 ± 10,00 <sup>c</sup>	53,00 ± 8,24 <sup>b</sup>	25,00 ± 10,00 <sup>b</sup>	21,00 ± 6,83 <sup>b</sup>	1,00 ± 2,00	1,53 ± 0,31 <sup>c</sup>
CNA 4008 de arroz	1987	62,00 ± 9,52 <sup>a</sup>	71,00 ± 6,00 <sup>a</sup>	6,00 ± 4,00	12,00 ± 7,30 <sup>a</sup>	11,00 ± 11,01	3,39 ± 0,36
	1999	89,00 ± 11,01 <sup>b</sup>	92,00 ± 7,30 <sup>b</sup>	7,00 ± 6,00	1,00 ± 2,00 <sup>b</sup>	0	4,56 ± 0,46
	2004	96,00 ± 3,26 <sup>b</sup>	98,00 ± 4,00 <sup>b</sup>	2,00 ± 4,00	0 <sup>b</sup>	0	4,84 ± 0,17
CNF 2035 de feijão	1992	84,00 ± 8,64	95,00 ± 3,82	4,00 ± 3,26	0	1,00 ± 2,00	4,57 ± 0,22
	2001	91,00 ± 6,83	99,00 ± 2,00	1,00 ± 2,00	0	0	4,81 ± 0,12
CF 810527 de feijão	1994	72,00 ± 6,53 <sup>a</sup>	90,00 ± 7,65	4,00 ± 4,61	5,00 ± 3,82	1,00 ± 2,00	4,21 ± 0,34 <sup>a</sup>
	1997	88,00 ± 5,65 <sup>b</sup>	98,00 ± 2,30	0	0	2,00 ± 2,30	4,75 ± 0,13 <sup>b</sup>

Os dados estão representados pela  $\bar{x} \pm s.d.$  Letras representam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. A estatística dos resultados dos acessos de arroz foi realizada usando one-way ANOVA seguido teste de Tukey. A estatística dos resultados dos acessos de feijão foi realizada usando pelo teste t não pareado.

No acesso CNA 2020 de arroz também foi observada redução significativa do valor absoluto observado do poder de germinação do lote introduzido em 2003 em relação aos lotes introduzidos em 1981 e 1996. Esta redução foi influenciada pelo aumento significativo do percentual de plântulas anormais e sementes duras em relação aos demais lotes.

No acesso CNA 4008 de arroz, o lote introduzido em 1987 apresentou percentual de plântulas normais na primeira contagem e germinação significativamente menor dos lotes introduzidos em 1999 e 2004. Não foram observadas diferenças significativas entre os lotes quanto ao IVG. A diminuição do percentual de plântulas normais na germinação do lote introduzido em 1987 foi influenciada pelo aumento significativo do percentual de sementes duras em relação aos outros lotes deste acesso.

Para o acesso CNF 2035 de feijão, não foram observadas diferenças significativas entre os lotes introduzidos em 1992 e 2001 quanto aos valores absolutos na primeira contagem, germinação e IVG. Quando comparadas a germinação atual dos lotes com a germinação inicial, foi observada uma leve redução da germinação em ambos os lotes avaliados. Já no acesso CF 810527 de feijão, houve diferenças significativas entre os lotes introduzidos em 1994 e 1997 quanto aos valores absolutos na primeira contagem e IVG. Similar ao acesso CNF 2035, foi visualizada uma leve redução da germinação em ambos os lotes avaliados.

### TESTES CITOGENÉTICOS

Os dois acessos avaliados, de ambas as espécies, não exibiram diferenças significativas entre os lotes das diferentes datas de armazenamento de cada acesso nos parâmetros analisados pelos testes citogenéticos, IM e ACs (**Tabela 3**).



**Tabela 3** – Índice mitótico e porcentagem de anomalias cromossômicas avaliadas em células meristemática de raízes de arroz e feijão armazenados em câmara fria.

Acesso	Ano da Introdução	Índice Mitótico	Anomalias cromossômicas				Frequência Total
			Cromossomos Retardatários	Desalinhamento em metáfase	Fragmentos Cromossômicos	Pontes Cromossômicas	
CNA 2020 de arroz	1981	7,403 ± 0,348	0	0,024 ± 0,048	0	0	0,024 ± 0,048
	1996	7,560 ± 1,429	0,024 ± 0,049	0	0,022 ± 0,044	0,022 ± 0,044	0,069 ± 0,086
	2003	5,330 ± 1,441	0,071 ± 0,089	0	0	0	0,071 ± 0,089
CNA 4008 de arroz	1987	6,265 ± 2,236	0,049 ± 0,057	0,024 ± 0,048	0	0	0,073 ± 0,093
	1999	7,130 ± 1,711	0,048 ± 0,056	0,024 ± 0,049	0,024 ± 0,048	0	0,097 ± 0,003
	2004	6,833 ± 1,553	0	0	0	0	0
CNF 2035 de feijão	1992	7,625 ± 1,133	0,021 ± 0,043	0,043 ± 0,086	0	0	0,064 ± 0,129
	2001	6,810 ± 1,359	0	0,024 ± 0,048	0	0	0,024 ± 0,048
CF 810527 de feijão	1994	6,438 ± 2,103	0	0,048 ± 0,055	0,021 ± 0,042	0	0,069 ± 0,046
	1997	9,005 ± 2,128	0,046 ± 0,053	0,055 ± 0,090	0	0	0,091 ± 0,128

Os dados estão representados pela  $\bar{x} \pm s.d.$  A estatística dos resultados dos acessos de arroz foi realizada usando one-way ANOVA seguido teste de Tukey. A estatística dos resultados dos acessos de feijão foi realizada usando pelo teste t não pareado.

## TESTE COMETA

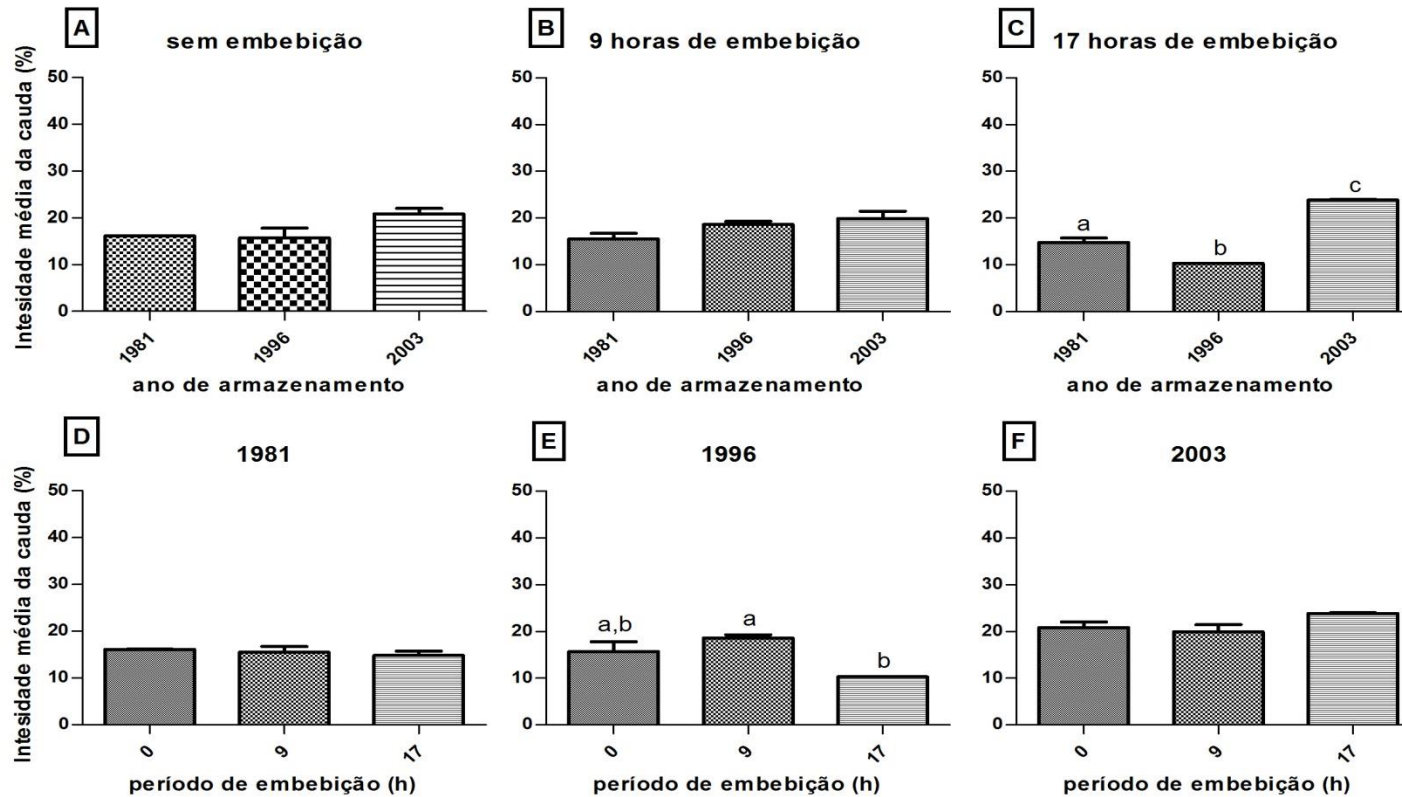
No geral, todos aos acessos de arroz e feijão não diferiram quando não embebidos (**Figuras 1 e 3 A**) e no tempo 9 h (**Figuras 1, 2, 3 e 4 B**), com exceção do acesso CNA 4008 de arroz e CF 810527 de feijão (**Figuras 2 e 4 B**, respectivamente). Diferença nos acessos foi somente evidenciada após 17 h de embebição entre os lotes dos dois acessos de arroz e de feijão (**Figuras 1, 2, 3 e 4 C**). Pôde ser observado também que o grau de integridade não foi relacionado com o tempo de armazenamento, pois, por exemplo, os lotes mais recentes dos acessos de arroz tiveram nucleoides com porcentagem da intensidade da cauda maior em relação a pelo menos um lote mais antigo.

A avaliação da capacidade de reparo de DNA em função do tempo de embebição permitiu a identificação dos seguintes padrões: 1) acessos com lotes que não deferiram significativamente em nenhum tempo de embebição (**Figuras 1 D e F, Figura 2 D, Figuras 3 D e E, e Figura 4 D**); 2) acessos com lotes que aumentaram a porcentagem da intensidade da cauda após 9 h de embebição e em seguida após 17 h diminuíram significativamente (**Figuras 1 E e Figura 2 F**); 3) acesso com lotes que diminuíram significativamente apenas após 17 horas de embebição (**Figura 2 E**); e 4) acesso com lotes que diminuíram significativamente nos dois tempos de embebição (**Figura 4 E**).

## DISCUSSÃO

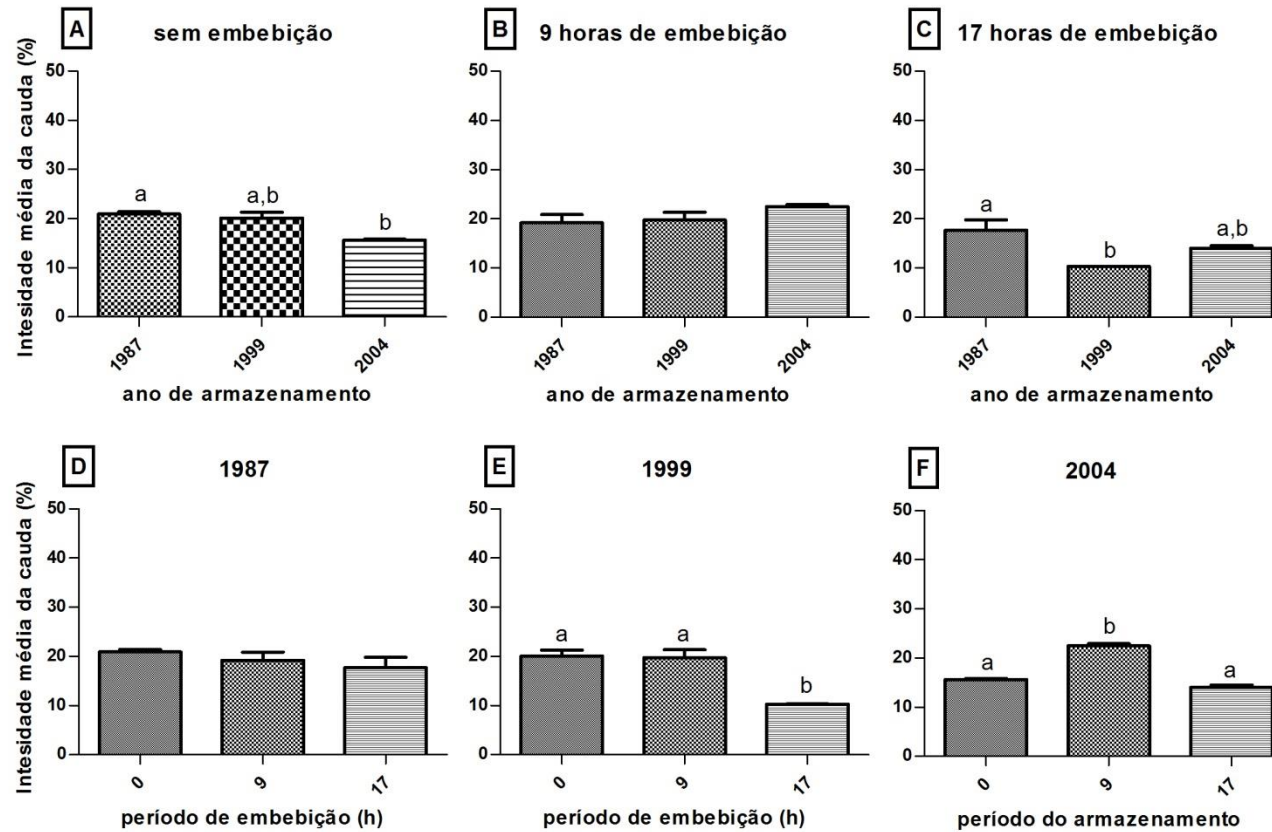
Diversos fatores podem afetar a longevidade de sementes armazenadas em câmaras frias. Entre eles, destacam-se a fisiologia, morfologia, composição química, maturidade, processamento e ambiente de armazenamento das sementes (BONNER, 2008). Porém, o principal fator é a qualidade inicial das sementes, pois o potencial de longevidade das sementes depende da qualidade inicial (RAO, 2017). Portanto, de acordo com os resultados dos testes fisiológicos, pode-se sugerir que as diferenças observadas no acesso CNA 2020 de arroz podem estar relacionadas principalmente com a colheita de sementes inadequadas para a conservação, uma vez que o lote mais recente apresentou menor viabilidade e vigor em relação aos demais. Tal explicação também pode ser sugerida ao acesso CF 810527 de feijão, pois a diferença nas datas de armazenamento dos lotes é de apenas 3 anos. Já para o acesso CNA 4008 de arroz, a diferença encontrada pode estar relacionada principalmente ao tempo de armazenamento porque o lote mais menos vigoroso em relação aos demais foi o lote mais antigo.

**Figura 1** – Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides do acesso CNA 2020 de *Oryza sativa* L. armazenadas em câmaras frias.



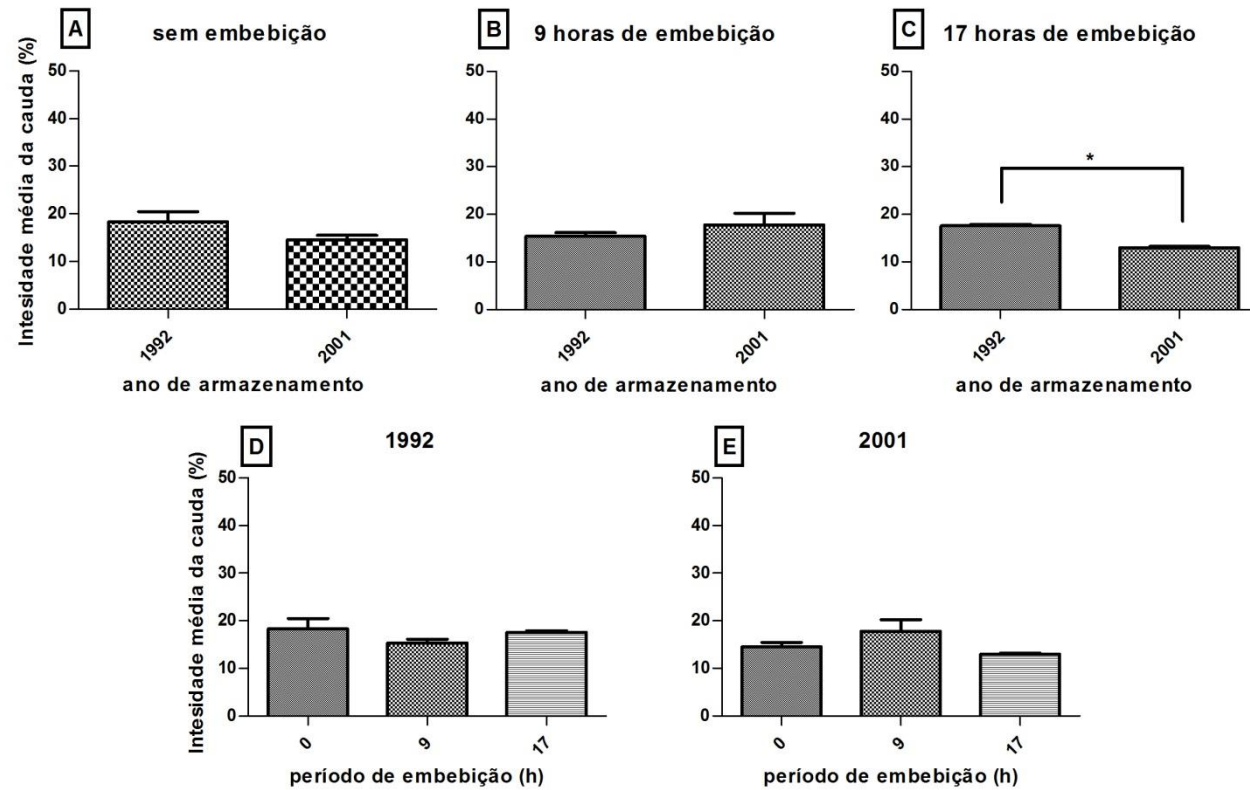
**A-C)** comportamento das sementes sem e com embebição por 9 e 17 horas, respectivamente. **D-F)** resposta das sementes aos tempos de embebição. Os dados estão representados pela  $\bar{x} \pm s.e.$ . Letras representam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. One-way ANOVA seguido teste de Tukey.

**Figura 2** - Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides do acesso CNA 4008 de *Oryza sativa* L. armazenadas em câmaras frias.



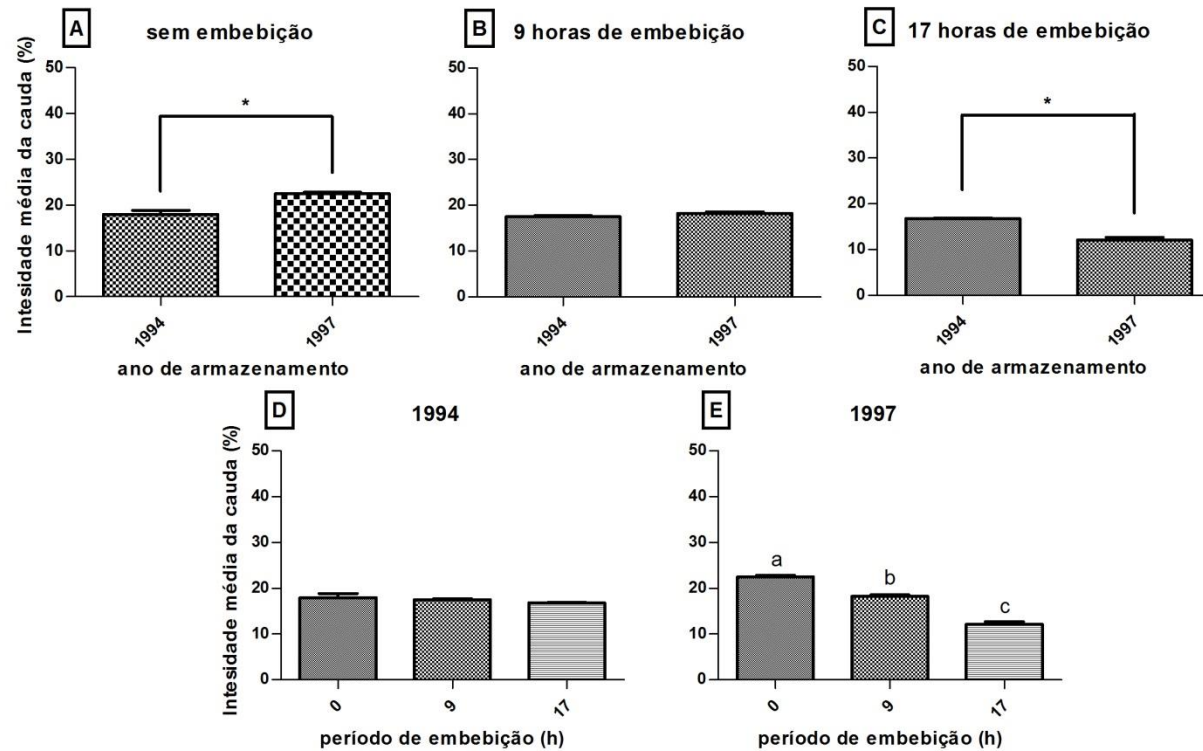
**A-C)** comportamento das sementes sem e com embebição por 9 e 17 horas, respectivamente. **D-F)** resposta das sementes aos tempos de embebição. Os dados estão representados pela  $\bar{x} \pm s.e.$  Letras representam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. One-way ANOVA seguido teste de Tukey.

**Figura 3** - Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides do acesso CNF 2035 de *Phaseolus vulgaris* L. armazenadas em câmaras frias.



**A-C)** comportamento das sementes sem e com embebição por 9 e 17 horas, respectivamente. **D-E)** resposta das sementes aos tempos de embebição. Os dados estão representados pela  $\bar{x} \pm s.e.$  Asteriscos representam diferença estatística significativa ( $p < 0,05^{**}$ ) entre os grupos avaliados pelo teste t não pareado.

**Figura 4** - Porcentagem média da intensidade da cauda de nucleoides do acesso CF 810527 de *Phaseolus vulgaris* L. armazenadas em câmaras frias.



**A-C)** comportamento das sementes sem e com embebição por 9 e 17 horas, respectivamente. **D-E)** resposta das sementes aos tempos de embebição. Os dados estão representados pela  $\bar{x} \pm s.e.$  Asteriscos representam diferença estatística significativa ( $p < 0,05^{**}$ ) entre os grupos avaliados pelo teste t não pareado.

Os testes de primeira contagem, germinação e IVG exibiram resultados similares aos dados obtidos do teste cometa, ou seja, quanto maior a qualidade fisiológica, menor o percentual de danos ao DNA e maior a capacidade de reparar a estes danos. A maioria dos danos ao DNA associados com envelhecimento de sementes resulta de espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas durante a dessecação e armazenamento prolongado (VENTURA et al., 2012). Quando os danos ocasionados por ERO se acumulam a níveis perigosos, as sementes perdem a capacidade de controlar ERO e não conseguem suportar o reinício do metabolismo que ocorre durante a germinação das sementes conduzindo a uma redução do vigor (RAJJOU e DEBEAUJON, 2008).

Dentre os danos oxidativos a DNA ocasionados por ERO estão inclusos as quebras de fita simples (SSB) as quais são originadas a partir do ataque direto às unidades desoxirribose ou por modificação covalente de bases, mudanças no conteúdo de DNA e fragmentação do DNA (VENTURA et al., 2012). Paralelamente, tem sido demonstrado que quebras de fita dupla (DSB) e as suas vias de reparo associadas são fatores que influenciam a germinação e o vigor das sementes envelhecidas artificialmente (WATERWORTH et al., 2010). Ambas as classes de danos ao DNA citadas acima podem ser detectadas pela versão neutra do teste cometa (AZQUETA e COLLINS, 2013), versão usada no presente estudo. Portanto, as diferenças encontradas no presente estudo quanto aos resultados do teste cometa pode ser devido à presença elevada de DSB e/ou SSB ocasionados por ERO, bem como também pode ser reflexo da capacidade das sementes em reparar estes danos.

Cabe enfatizar que o valor de 20% de DNA na cauda de nucleoides é recomendado como o máximo a ser encontrado em controle negativo, isto é, em grupo o qual se espera que não haja danos, para evitar resultados falso-positivo e erros estatísticos (LOVELL e OMORI, 2008). Tomando este valor como referência para estabelecer um padrão de integridade genética, todos os lotes de arroz e feijão estão com níveis aceitáveis de danos ao DNA porque os valores ou foram acima de 20% e reduzido para abaixo deste valor no período seguinte de embebição ou foram inferiores a 20% para todos os períodos de embebição, exceto o lote introduzido em 2003 do acesso CNA 2020 de arroz.

Nota-se que não houve diferenças significativas quanto aos resultados observados nos testes citogenéticos entre os lotes de diferentes datas de armazenamento nos acessos de ambas as espécies. Esta ausência de diferenças significativas pode estar relacionada com a metodologia dos testes citogenéticos. A obtenção de raízes para realização destes testes foi feita no máximo cinco dias após a semeadura das sementes, ou seja, as raízes coletadas para os testes citogenéticos possivelmente eram de sementes as quais tinham uma maior

viabilidade e vigor dentro do lote fazendo com que lotes de diferentes datas de armazenamento apresentassem IM e quantidade de ACs semelhantes. Na literatura, têm sido relatadas anormalidades mitóticas e meióticas em acessos de trigo, *Triticum aestivum* L., mantidos em câmaras frias a -20°C e 5% de umidade ou a 10°C e 7% de umidade por 20 ou 30 anos. Entretanto, as prováveis causas dessas anormalidades não foram detectadas, o que sugere que sua ocorrência esteja vinculada à origem do acesso e não relacionada a tempo e condições de armazenamento (RIBEIRO et al., 2010).

Atualmente, o teste de germinação é o método recomendado para avaliar a viabilidade de sementes armazenadas em bancos de germoplasma (FAO, 2014). Entretanto, o teste de germinação apresenta algumas desvantagens relacionadas aos períodos de incubação extensos, o que pode ocasionar a morte das sementes (HAY e PROBERT, 2013); e ao fato de não avaliar mecanismos subjacentes a deterioração das sementes (FU et al., 2015).

Uma vez que o envelhecimento das sementes é uma característica biológica complexa e envolve uma rede de processos moleculares, bioquímicos, fisiológicos e metabólicos; técnicas baseadas nestes sinais de envelhecimento poderiam desempenhar um papel no monitoramento da viabilidade das sementes para a conservação *ex situ* de sementes (FU et al., 2015). Até o presente momento não tem sido relatado o uso do teste cometa em sementes envelhecidas. O teste cometa é uma técnica sensível e flexível para a detecção de baixos níveis de danos ao DNA, relativamente de baixo custo e demanda de pequeno número de amostra e de período de tempo relativamente curto (alguns dias) necessário para completar um experimento (TICE et al., 2000). Desta forma, o presente estudo abre perspectiva para uso teste cometa na avaliação de sementes armazenadas em bancos de germoplasma devido à similaridade encontrada entre os resultados do teste cometa e os resultados dos testes de primeira contagem, germinação e IVG com os resultados do teste cometa.

O teste cometa poderia ser utilizado principalmente em acessos com pequena quantidade de sementes armazenadas, abaixo de 1.500 (DULLO e ENGELS, 2003), porque demanda uma quantidade pequena de sementes. No presente estudo, o teste cometa necessitou de apenas 10 sementes de cada acesso para ser realizado, enquanto que para o teste de germinação recomenda-se o uso de 400 sementes (BRASIL, 2009), ou de 100 em alguns casos (FAO, 2014). Entretanto, o teste cometa poderia ser usado como uma alternativa e não para substituir o teste de germinação. Como sugerido por Fu et al. (2015) o teste de germinação continuará a desempenhar um papel central no monitoramento da viabilidade das sementes e a combinação de técnicas que abordam sinais de envelhecimento com o teste de germinação poderia fornecer um monitoramento melhor da viabilidade das sementes no



armazenamento em longo prazo. Cabe enfatizar que a realização de teste cometa em mais acessos e outras espécies é necessária para a validação do teste cometa como ferramenta para avaliar sementes armazenadas em bancos de germoplasma.

### **Conflito de interesse**

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

### **Agradecimentos**

Este projeto foi apoiado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Universidade de Brasília.

## **REFERÊNCIAS**

- AKHTER, F. N.; KABIR, G.; MANNAN, M. A.; SHAHEEN, N. N. **Aging Effect of Wheat and Barley Seeds Upon Germination Mitotic Index and Chromosomal Damage**. Journal of Islamic Academy of Sciences. v. 5, p. 44-48. 1992.
- AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. **The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair**. Archives of Toxicology. v. 87, p. 949-968. 2013.
- BARBOSA, L. **Feijão com arroz e arroz com feijão: o Brasil no prato dos brasileiros**. Horizontes Antropológicos. v. 28, p. 87-116. 2007.
- BLACK, M.; BEWLEY, J. D.; HALMER, P. **The Encyclopedia of Seeds: Science, Technology and Uses**. Wallingford: CABI. 2006. 900p.
- BONNER, F. T. **Storage of Seeds**. In: BONNER, F. T.; KARRAFALT, R. P. (Org.). The woody plant seed manual. Washington: Agriculture Handbook, 2008. p. 85-95.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.
- COLLINS, A. R.; DOBSON, V. L.; DUŠINSKÁ, M.; KENNEDY, G.; ŠTĚTINA, R. **The comet assay: what can it really tell us?**. Mutation Research. v. 375, p. 183-193. 1997.
- de OLIVEIRA, M. do S. P.; dos SANTOS, J. B.; AMORIM, E. P.; FERREIRA, D. F. Variabilidade genética entre acessos de açaizeiro utilizando marcadores microssatélites. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 34, p. 1253-1260. 2010.

DANTAS, A. F.; LOPES, R. M.; FASCINELI, M. L.; JOSÉ, S. C. B. R.; PÁDUA, J. G.; GIMENES, M. A.; GRISOLIA, C. K. **Comet and cytogenetic tests as tools for evaluating genomic instability in seeds of *Oryza sativa* L. and *Phaseolus vulgaris* L. from gene banks.** Genetics and Molecular Biology. v. 41, p. 145–153. 2018.

DEHON, G.; CATOIRE, L.; DUEZ, P.; BOGAERTS, P.; DUBOIS, J. **Validation of an automatic comet assay analysis system integrating the curve fitting of combined comet intensity profiles.** Mutation Research. v. 650, p. 87-95. 2008.

DULLOO, E.; ENGELS, J. **Genebank standards and quality assurance.** In: ENGELS J.M.M.; VISSER, L. (Org.). A guide to effective management of germplasm collections. Rome: IPGRI Handbook for Genebanks. 2003. p.140-146.

FAO. **The state of *ex situ* conservation.** In: FAO (Org.). The second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Rome: Commission on genetic resources for food and agriculture food and agriculture organization of the united nations. 2010. p. 54-90.

FAO. **Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture.** Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. 166p.

FONTES, B. P. D.; DAVIDE, L. C.; DAVIDE, A. C. **Fisiologia e citogenética de sementes envelhecidas de *Araucaria angustifolia*.** Ciência agrotecnologia. v. 25, p. 346-355. 2001.

FU, Y. B.; AHMED, Z.; DIEDERICHSEN, A. **Towards a better monitoring of seed ageing under *ex situ* seed conservation.** Conservation Physiology. v. 3, p.1-16. 2015.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. de. **Como observar cromossomos: Um Guia de Técnicas em Citogenética Vegetal, Animal e Humana.** Riberão Preto: Fundação de Pesquisas Científicas de Riberão Preto. 2002. 131p.

HAY, F. R.; PROBERT, R. J. **Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research.** Conservation Physiology. v. 1, p.1-11. 2013.

KHAN, M. M.; IQBAL, M. J.; ABBAS, M.; USMAN, M. **Effect of Ageing on Viability, Vigour and Chromosomal Damage in Pea (*Pisum Sativum* L.) Seeds.** Pakistan Journal of Agricultural Sciences. v. 40, p. 50-54. 2003.

LOPES, R. M. **Avaliação de metodologias moleculares e citogenéticas para detectar níveis de deterioração em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) e cevada (*Hordeum vulgare* L.).** Tese de doutorado. Brasília: Programa de Pós Graduação em Botânica, Unb. 2016. 92f.

LOVELL, D. P.; OMORI, T. **Statistical issues in the use of the comet assay.** Mutagenesis. v. 23, p. 171-182. 2008.

MAGUIRRE, J. D. **Speed of germination - aid seedling emergence and vigor.** Crop Science, v. 2, p. 176-177. 1962.

MARIM, B. G.; da SILVA, D. J. H.; CARNEIRO, P. C. S.; MIRANDA, G. V.; MATTEDI, A. P.; CALIMAN, F. R. B. Variabilidade genética e importância relativa de caracteres em acessos de germoplasma de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 44, p. 1283-1290. 2009.

MENEZES, V. O.; LOPES, S. J.; TEDESCO, S. B.; HENNING, F. A.; ZEN, H. D.; MERTZ, L. M. **Cytogenetic analysis of wheat seeds submitted to artificial aging stress**. *Journal of Seed Science*. v. 36, p. 71-78. 2014.

RAJJOU, L.; DEBEAUJON, I. **Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds**. *Comptes Rendus Biologies*. v. 331, p. 796-805. 2008.

RAO, N. K.; HANSON, J.; DULLOO, M. E.; GHOSH, K.; NOWELL, A.; LARINDE, M. **Manual of Seed Handling in Genebanks**. Roma: Biodiversity International. 2006. 147p.

RAO, N. K.; DULLOO, M. E.; ENGELS, J. M. M. **A review of factors that influence the production of quality seed for long-term conservation in genebanks**. *Genetic Resources and Crop Evolution*. v. 64, p.1061–1074. 2017.

RIBEIRO, M. R.; da SILVA, R. de C.; PEÑALOZA, A. del P. de S.; BRAMMER, S. P.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; GOEDERT, C. de O.; dos SANTOS, S.; OLIVEIRA, A. R. da S.; POZZOBON, M. T. **Análise citogenética em acessos de trigo armazenados a longo e médio prazo**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2010. 26p.

SISTON, L. C. S. **Deteção da deterioração de acessos de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All – (Fabaceae) por testes bioquímicos, de vigor e análise citogenética**. 2013. 69 f. Dissertação de Mestrado em Engenharia Florestal. Publicação PPG EFL 221/2013, Faculdade de Tecnologia, Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 71p.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. **Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing**. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. v. 35, p. 206-221. 2000.

VENTURA, L.; DONÀ, M.; MACOVEI, A.; CARBONERA, D.; BUTTAFAVA, A.; MONDONI, A.; ROSSI, G.; BALESTRAZZI, A. **Understanding the molecular pathways associated with seed vigor**. *Plant Physiology and Biochemistry*. v. 60, p. 196-206. 2012.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. de F.; SILVA, M. S.; FUKUDA, W. M. G.; FALEIRO, F. G. Variabilidade genética do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa cerrados acessada por meio de descritores morfológicos. **Científica**. v. 36, p. 56-67. 2008.

WATERWORTH, W. M.; MASNAVI, G.; BHARDWAJ, R. M.; JIANG, Q.; BRAY, C. M.; WEST, C. E. **A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity**. *The Plant Journal*. v. 63, p. 848-860. 2010.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tomados todos os resultados em conjunto, pode se concluir que: 1) o MMS permitiu viabilizar os testes citogenéticos e cometa nas sementes de arroz e feijão sendo as concentrações de 10 e 15 mg/L as mais adequadas para observar efeitos citotóxicos, mutagênicos e/ou genotóxicos, confirmando o seu uso como controle positivo nestas espécies; 2) a redução da viabilidade e, principalmente, do vigor de sementes de arroz e feijão envelhecidas artificialmente foi acompanhada pela inibição do IM e pelo aumento de ACs e da fragmentação do DNA; 3) o teste cometa possibilitou observar diferenças em sementes de arroz e feijão quanto aos danos ao DNA entre lotes com diferentes datas de armazenamento em bancos de germoplasma; e 4) o teste cometa apresenta-se como uma boa ferramenta para avaliar a capacidade de reparo em sementes envelhecidas.

O uso dos testes citogenéticos e cometa em conjunto com os testes de qualidade fisiológica poderia fornecer uma melhor compreensão sobre a qualidade das sementes em bancos de germoplasma. Os dados aqui apresentados quanto aos efeitos do envelhecimento acelerado fornecem os primeiros passos para demonstrar o potencial uso de ambos os testes em programas de conservação de sementes, os quais permitiriam auxiliar na decisão de quais sementes poderiam ser armazenadas por períodos prolongados sem comprometer a sua integridade genética e, conseqüentemente, sua viabilidade e vigor.

Esse é o primeiro estudo sobre integridade genética e eficácia do sistema de reparo de germoplasma de semente conservado em longo prazo indicando que o teste cometa pode ser utilizado para esta finalidade. Isto abre a possibilidade do monitoramento de diferentes espécies, principalmente em acessos com uma pequena quantidade de sementes armazenadas (abaixo de 1.500), pois a quantidade de material utilizada (sementes e DNA) é baixa. Cabe enfatizar que o teste cometa não substituiria o tradicional teste de germinação, mas poderia ser uma alternativa para a monitoração e compreensão dos acessos conservados. Entretanto, para a validação do teste cometa como ferramenta para avaliação da integridade genética de amostras armazenadas em bancos de germoplasma, se faz necessário a realização deste teste em mais acessos e em outras espécies.

## REFERÊNCIAS

- AKHTER, F. N.; KABIR, G.; MANNAN, M. A.; SHAHEEN, N. N. **Aging Effect of Wheat and Barley Seeds Upon Germination Mitotic Index and Chromosomal Damage.** Journal of Islamic Academy of Sciences. v. 5, p. 44-48. 1992.
- ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A. T.; NORPPA, H.; SHUKER, D. E. G.; TICE, R.; WATERS, M. D.; AITIO, A. **IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans.** Mutation Research. v. 463, p. 111-172. 2000.
- ALHO, C. J. R. **The value of biodiversity.** Brazilian Journal of Biology. v. 68, p. 1115-1118. 2008.
- ANG, A. S. W.; CHEUNG, R. C. F.; DAN, X.; CHAN, Y. S.; PAN, W.; NG, T. B. **Purification and Characterization of a Glucosamine-Binding Antifungal Lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. Chinese Pinto Beans with Antiproliferative Activity Towards Nasopharyngeal Carcinoma Cells.** Applied Biochemistry and Biotechnology. v. 172, p. 672-686. 2014.
- ATCHIBRI, A. L. O. A.; BROU, K. D.; KOUAKOU, T. H.; KOUADIO, Y. J.; GNAKRI, D. **Screening for antidiabetic activity and phytochemical constituents of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds.** Journal of Medicinal Plants Research. v. 4, p. 1757-1761. 2010.
- AUSTRALIA. **The Biology and Ecology of Rice (*Oryza sativa* L.) in Australia.** Woden: The Office of the Gene Technology Regulator. 2005. 26p.
- AZQUETA, A.; SHAPOSHNIKOV, S.; COLLINS, A. R. **Detection of Oxidised DNA Using DNA Repair Enzymes.** In: DHAWAN, A.; ANDERSON, D. (Org.). *The Comet Assay in Toxicology.* Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 2009. p. 57-78.
- AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. **The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair.** Archives of Toxicology. v. 87, p. 949-968. 2013.
- BAJER, A. S.; VANTARD, M. **Microtubule dynamics determine chromosome lagging and transport of acentric fragments.** Mutation Research. v. 201, p. 271-281. 1988.
- BANDYOPADHYAY, A.; MUKHERJEE, A. **Sensitivity of *Allium* and *Nicotiana* in cellular and acellular comet assays to assess differential genotoxicity of direct and indirect acting mutagens.** Ecotoxicology and Environmental Safety. v. 74, p. 860-865. 2011.
- BAZIN, E.; HUET, S.; JARRY, G.; HÉGARAT, L. LE.; MUNDAY, J. S.; HUMPAGE, A. R.; FESSARD, V. **Cytotoxic and Genotoxic Effects of Cylindrospermopsin in Mice Treated by Gavage or Intraperitoneal Injection.** Environmental Toxicology. v. 27, p. 277-284. 2010.
- BERTRAM, C.; HASS, R. **Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging.** Biological Chemistry. v. 389, p. 211-220. 2008.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3rd. New York: Springer Science & Business Media, 2012. 392p.

BHAT, T. A.; PARVEEN, S.; KHAN, A. H. **MMS-Induced Cytomixis in Pollen Mother Cells of Broad Bean (*Vicia faba* L.)**. Turkish Journal Of Botany. v. 30, p. 273-279. 2006.

BLACK, M.; BEWLEY, J. D.; HALMER, P. **The Encyclopedia of Seeds: Science, Technology and Uses**. Wallingford: CABI, 2006. 900p.

BONNER, F. T. **Storage of Seeds**. In: BONNER, F. T.; KARRAFALT, R. P. (Org.). The woody plant seed manual. Washigton: Agriculture Handbook, 2008a. p. 85-95.

BONNER, F. T. **Seed Biology**. In: BONNER, F. T.; KARRAFALT, R. P. (Org.). The woody plant seed manual. Washigton: Agriculture Handbook, 2008b. p. 3-37.

BRASIL. **Decreto Legislativo nº 2, de 1994**. A Convenção sobre Diversidade Biológica – CBD, Brasília, DF, p. 30, 1994.

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

BUSTAMANTE, P. G.; FERREIRA, F. R. **Accessibility and exchange of plant germplasm by Embrapa**. Crop Breeding and Applied Biotechnology. v. 1, p. 95-98. 2011.

CERDA, H.; DELINCÉE, H.; HAINE, H.; RUPP, H. **The DNA ‘comet assay’ as a rapid screening technique to control irradiated food**. Mutation Research. v. 375, p. 167-181. 1997.

COELHO, P.; GARCÍA-LESTÓN, J.; COSTA, S.; COSTA, C.; SILVA, S.; DALL'ARMI, V.; ZOFFOLI, R.; BONASSI, S.; LIMA, J. P de.; GASPAR, J. F.; PÁSARO, E.; LAFFON, B.; TEIXEIRA, J. P. **Genotoxic effect of exposure to metal(loid)s. A molecular epidemiology survey of populations living and working in Panasqueira mine area, Portugal**. Environment International. v. 60, p. 163-170. 2013.

COLLINS, A. R.; DOBSON, V. L.; DUŠINSKÁ, M.; KENNEDY, G.; ŠTĚTINA, R. **The comet assay: what can it really tell us?**. Mutation Research. v. 375, p. 183-193. 1997.

COLLINS, A. R. **The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations**. Molecular Biotechnology. v. 26, p. 249-261. 2004.

COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; ŠTĚTINA, R. **The comet assay: topical issues**. Mutagenesis. v. 23, p. 143-151. 2008.

COLLINS, A. R. **Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay**. Biochimica et Biophysica Acta. v. 1840, p. 794-800. 2014.

COLLINS, A.; KOPPEN, G.; VALDIGLESIAS, V.; DUSINSKA, M.; KRUSZEWSKI, M.; MØLLER, P.; ROJAS, E.; DHAWAN, A.; BENZIE, I.; COSKUN, E.; MORETTI, M.; SPEIT, G.; BONASSI, S. **The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project.** Mutation Research. v. 759, p. 27-39. 2014.

DANTAS, J. L.; LUZ, E. de M. **A conservação de Recursos Fitogenéticos *Ex Situ* a campo.** In: VEIGA, R. F. de A.; de QUEIRÓZ, M. A. (Org.). Recursos Fitogenéticos: a base da agricultura sustentável no Brasil. Viçosa: Editora UFV. 2015. p. 254-258.

de SOUSA, J. S. I.; PEIXOTO, A. M.; de TOLEDO, F. F. **Enciclopédia Agrícola Brasileira A-B.** São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1995. 508p.

DEBOUCK, D.; HIDALGO, R.; FERNÁNDEZ, F.; CORREA, A.; SMITHSON, J. B. **Morphology of the common bean plant *Phaseolus vulgaris*: study guide to be used as a supplement to the audiotutorial unit on the same topic.** Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1986. 56p.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. **Detection of DNA Damage in *Drosophila* and Mouse.** In: DHAWAN, A.; ANDERSON, D. (Org.). The Comet Assay in Toxicology. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 2009. p. 151-170.

DIAS, M. S.; MALUF, S. W. **Ciclo celular.** In: MALUF, S. W.; RIEGEL, M. (Org.). Citogenética humana. Porto Alegre: Artmed. 2011. p. 24-42.

DOAK, S. H.; LIU, Y.; CHEN, C. **Genotoxicity and Cancer.** In: FADEEL, B.; PIETROIUSTI, A.; SHVEDOVA, A. A. (Org.). Adverse Effects of Engineered Nanomaterials: Exposure, Toxicology, and Impact on Human Health. London: Academic Press. p. 243-257. 2012.

dos SANTOS JÚNIOR, S. R. G. **Arroz em casca natural.** Perspectivas para a Agropecuária. v. 5, p. 17-31. 2017.

DULLOO, E.; ENGELS, J. **Genebank standards and quality assurance.** In: ENGELS J.M.M.; VISSER, L. (Org.). A guide to effective management of germplasm collections. Rome: IPGRI Handbook for Genebanks. 2003. p.140-146.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. **An intermediate category of seed storage behavior? I. Coffee.** Journal of Experimental Botany. v. 41, p. 1167-1174. 1990.

FAO. **Fao Statistical Yearbook 2013: World Food and Agriculture.** Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013. 289p.

FAO. **Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture.** Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. 166p.

FABBENDER, C.; BRAUNBECK, T. **Assessment of Genotoxicity in Gonads, Liver and Gills of Zebrafish (*Danio rerio*) by Use of the Comet Assay and Micronucleus Test after In Vivo Exposure to Methyl Methanesulfonate.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. v. 91, p.89-95. 2013a.

FABENDER, C.; BRAUNBECK, T. **Reproductive and genotoxic effects in zebrafish after chronic exposure to methyl methanesulfonate in a multigeneration study.** *Ecotoxicology*. v. 22, p.825-837. 2013b.

FENECH, M. **The in vitro micronucleus technique.** *Mutation Research*. v. 455, p. 81-95. 2000.

FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. **HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures.** *Mutation Research*. v. 534, p. 65-75. 2003.

FISKESJÖ, G. **The Allium test as a standard in environmental monitoring.** *Hereditas*. v. 102, p. 99-112, 1985.

FONTES, B. P. D.; DAVIDE, L. C.; DAVIDE, A. C. **Fisiologia e citogenética de sementes envelhecidas de *Araucaria angustifolia*.** *Ciência agrotecnologia*. v. 25, p. 346-355. 2001.

GARAJ-VRHOVAC, V.; OREŠČANIN, V.; GAJSKI, G.; GERIĆ, M.; RUK, D.; KOLLAR, R.; BRKANAC, S. R.; CVJETKO, P. **Toxicological characterization of the landfill leachate prior/after chemical and electrochemical treatment: A study on human and plant cells.** *Chemosphere*. v. 93, p. 939-945. 2013.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; MORO, C.; MANCHÓN, N.; GONZALO-RUIZ, A.; VILLARES, A.; GUILLAMÓN, E.; ROSTAGNO, M.; MATEO-VIVARACHO, L. **In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans.** *Food Chemistry*. v. 161, p. 216-223. 2014.

GE, J.; WOOD, D K.; WEINGEIST, D. M.; BHATIA, S. N.; ENGELWARD, B. P. **CometChip: Single-Cell Microarray for High-Throughput Detection of DNA Damage.** In: CONN, M. (Org.). *Laboratory Methods in Cell Biology: Biochemistry and Cell Culture*. Oxford: Academic Press. 2012. p. 247-268.

GE, J.; PRASONGTANAKIJ, S.; WOOD, D K.; WEINGEIST, D. M.; FESSLER, J.; NAVASUMMRIT, P.; RUCHIRAWAT, M.; ENGELWARD, B. P. **CometChip: A High-throughput 96-Well Platform for Measuring DNA Damage in Microarrayed Human Cells.** *Journal of Visualized Experiments*. v. 92, p. 1-11. 2014.

GHOSH, M.; MANIVANNAN, J.; SINHA, S.; CHAKRABORTY, A.; MALLICK, S. K.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. **In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles.** *Mutation Research*. v. 749, p. 60-69. 2012.

GHOSH, M.; PAUL, J.; JANA, A.; DE, A.; MUKHERJEE, A. **Use of the grass, *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash for detoxification and phytoremediation of soils contaminated with fly ash from thermal power plants.** *Ecological Engineering*. v. 74, p. 258-265. 2015.

GICHNER, T.; ZNIDAR, I.; WAGNER, E. D.; PLEWA, M. J. **The Use of Higher Plants in the Comet Assay.** In: DHAWAN, A.; ANDERSON, D. (Org.). *The Comet Assay in Toxicology*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 2009. p. 98-119.



GISSELSSON, D. **Classification of chromosome segregation errors in cancer.** Chromosoma. v. 117, p. 511-519. 2008.

GUERRA, M.; de SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: Um Guia de Técnicas em Citogenética Vegetal, Animal e Humana.** Riberão Preto: Fundação de Pesquisas Científicas de Riberão Preto. 2002. 131p.

GULFISHAN, M.; KHAN, A. H.; JAFRI, I. F. **Genotoxic Effects Induced by Methyl Methane Sulphonate in 2 Cultivars of *Capsicum annuum* L.** Cytologia. v. 76, p. 381-385. 2011.

GULFISHAN, M.; KHAN, A. H.; JAFRI, I. F.; BHAT, T. A. **Assessment of mutagenicity induced by MMS and DES in *Capsicum annuum* L.** Saudi Journal of Biological Sciences. v. 19, p. 251-255. 2012.

GURUPRASAD, K. P.; SUBRAMANIAN, A.; SINGH, V. J.; SHARMA, R. S. K.; GOPINATH, P. M.; SEWRAM, V.; VARIER, P. M.; SATYAMOORTHY, K. ***Brahmarasayana* protects against Ethyl methanesulfonate or Methyl methanesulfonate induced chromosomal aberrations in mouse bone marrow cells.** BioMed Central Complementary and Alternative Medicine. v.12, p. 1-9. 2012.

HINNIGI, P.F.; BERGAMASCHI, D. P. **Itens alimentares no consumo alimentar de crianças de 7 a 10 anos.** Revista Brasileira de Epidemiologia. v. 15, p. 324-334. 2012.

HOFFELDER, D. R.; LUO, L.; BURKE, N. A.; WATKINS, S. C.; GOLLIN, S. M.; SAUNDERS, W. S. **Resolution of anaphase bridges in cancer cells.** Chromosoma. v. 112, p. 389-397. 2004.

IARC. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.** World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, v. 71, p. 1059-1078. 1999.

IBPGR. **Elsevier's Dictionary of Plant Genetic Resources.** Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1991. 187p.

JARVIS, D. I.; MYER, L.; KLEMICK, H.; GUARINO, L.; SMALE, M.; BROWN, A. H. D.; SADIKI, M.; STHAPIT, B.; HODGKIN, T. A **Training Guide for *In Situ* Conservation On-farm.** Roma: International Plant Genetic Resources Institute. 2000. 161p.

KAINA, B.; AURICH, O. **Dependency of the yield of sister-chromatid exchanges induced by alkylating agents on fixation time. Possible involvement of secondary lesions in sister-chromatid exchange induction.** Mutation Research. v. 149, 451-461. 1985.

KAINA, B. **Mechanisms and consequences of methylating agent-induced SCEs and chromosomal aberrations: a long road traveled and still a far way to go.** Cytogenetic Genome Research. v. 104, p.77-86. 2004.

KARRAFALT, R. P. **Seed Testing.** In: BONNER, F. T.; KARRAFALT, R. P. (Org.). The woody plant seed manual. Washigton: Agriculture Handbook, 2008. p. 97-115.

KHAN, M. M.; IQBAL, M. J.; ABBAS, M.; USMAN, M. **Effect of Ageing on Viability, Vigour and Chromosomal Damage in Pea (*Pisum Sativum* L.) Seeds.** Pakistan Journal of Agricultural Sciences. v. 40, p. 50-54. 2003.

KNOLL, A.; FAUSER, F.; PUCHTA, H. **DNA recombination in somatic plant cells: mechanisms and evolutionary consequences.** Chromosome Research. v. 22, p. 191-201. 2014.

KOHN, K. W. **Principles and Practice of DNA Filter Elution.** Pharmacology & Therapeutics. v. 49, p. 55-71. 1991.

KWONG, L. N.; ZOU, L.; CHAGANI, S.; PEDAMALLU, C. S.; LIU, M.; JIANG, S.; PROTOPOPOV, A.; ZHANG, J.; GETZ, G.; CHIN, L. **Modeling Genomic Instability and Selection Pressure in a Mouse Model of Melanoma.** Cell Reports. v. 19, p. 1304-1312. 2017.

LAMM, N.; BEN-DAVID, U.; GOLAN-LEV, T.; STORCHOVÁ, Z.; BENVENISITY, N.; KEREM, B. **Genomic Instability in Human Pluripotent Stem Cells Arises from Replicative Stress and Chromosome Condensation Defects.** Cell Stem Cell. v. 18, p. 1-9. 2016.

LEME, D. M.; de ANGELIS, D. de F.; MARIN-MORALES, M. A. **Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells.** Aquatic Toxicology. v. 88, p. 214-219. 2008.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES M. A. ***Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application.** Mutation Research. v. 682, p. 71-81. 2009.

LIMAN, R.; CIĞERCI, İ. H.; ÖZTÜRK, N. S. **Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay.** Pesticide Biochemistry and Physiology. v. 118, p. 38-42. 2015.

LIU, Y.; ZHANG, A.; MA, X.; WANG, X. **Genotoxicity evaluation of surface waters located in urban area of Xi'an City using *Vicia faba* bioassays.** Frontiers of Environmental Science & Engineering. v. 7, p. 860-866. 2013.

LOPES, M.; FOIANI, M.; SOGO, J. M. **Multiple Mechanisms Control Chromosome Integrity after Replication Fork Uncoupling and Restart at Irreparable UV Lesions.** Molecular Cell. v. 21, p. 15-27. 2006.

LÓPEZ, A.; EL-NAGGAR, T.; DUEÑAS, M.; ORTEGA, T.; ESTRELLA, I.; HERNÁNDEZ, T.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M. P.; PALOMINO, O. M.; CARRETERO, M. E. **Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.).** Food Chemistry. v. 138, p. 547-555. 2013.

LOVELL, D. P.; OMORI, T. **Statistical issues in the use of the comet assay.** Mutagenesis. v. 23, p. 171-182. 2008.

LUNDIN, C.; NORTH, M.; ERIXON, K.; WALTERS, K.; JENSSEN, D.; GOLDMAN, A. S. H.; HELLEDAY, T. **Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage**

**but no detectable *in vivo* DNA double-strand breaks.** *Nucleic Acids Research.* v. 33, p. 3799-3811. 2005.

MALINI, M.; MARIN-MORALES, M. A.; MANTOVANI, M. S.; JAMAL, C. M.; NATI, N.; PASSOS, T. da S.; MATSUMOTO, S. T. **Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (*Rhizophoraceae*), using *in vivo* and *in vitro* test systems.** *Genetics and Molecular Biology.* v. 33, p. 176-181. 2010.

MALUSZYNSKA, J.; JUCHIMIUK, J. **Plant Genotoxicity: A Molecular Cytogenetic Approach In Plant Bioassays.** *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology.* v. 56, p. 177-184. 2005.

MATÉS, J. M. **Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology.** *Toxicology.* v. 153, p. 83-104. 2000.

MAURO, M. O.; PESARINI, J. R.; MARIN-MORALES, M. A.; MONREAL, M. T. F. D.; MONREAL, A. C. D.; MANTOVANI, M. S.; OLIVEIRA, R. J. **Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture.** *Genetics and Molecular Research.* v. 13, p. 4808-4819. 2014.

McKELVEY-MARTIN, V. J.; McKENNA, D. J. **Development and Applications of the Comet-FISH Assay for the Study of DNA Damage and Repair.** In: DHAWAN, A.; ANDERSON, D. (Org.). *The Comet Assay in Toxicology.* Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 2009. p. 129-150.

MIRANDA, J. M.; PERECIN, D.; PEREIRA, A. A. **Produtividade e resistência à ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. et br.) de progênes f5 de catuaí amarelo com o híbrido de timor.** *Ciência e Agrotecnologia.* v. 29, p. 1195-1200. 2005.

MOLDENHAUER, K. A. K.; GIBBONS, J. H. **Rice Morphology and Development.** In: SMITH, C. W.; DILDAY, R. H. (Org.). *RICE: Origin, History, Technology, and Production.* Hoboken: JohnWiley & Sons, 2003. p. 103-127.

MORANO, K. A.; GRANT, C. M.; MOYE-ROWLEY, W. S. **The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genetics.* v. 190, p. 1157-1195. 2012.

MYUNG, K.; KOLODNER, R. D. **Induction of genome instability by DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*.** *DNA Repair.* v. 2, p. 243-258. 2003.

NAVARRETE, M. H.; CARRERA, P.; MIGUEL, M. de.; TORRE, C. de la. **A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants.** *Mutation Research.* v. 389, p. 271-277. 1997.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. **Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system.** *Free Radical Biology & Medicine.* v. 31, p. 1287-1312. 2001.

OECD. **Guideline for the Testing of Chemicals: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test.** Paris: Organization for Economic Cooperation and Development, 1997a. 10p.

OECD. **Guideline for the Testing of Chemicals: Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test**. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development, 1997b. 8p.

OECD. **Guideline for the Testing of Chemicals: Bacterial Reverse Mutation Test**. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development, 1997c. 11p.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. **The Comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells**. Nature Protocols. v.1, p. 23-29. 2006.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. **Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells**. Biochemical and Biophysical Research Communications. v. 123, p. 291-298. 1984.

PEIXOTO, A. M.; de TOLEDO, F. F.; REICHARDT, K.; FILHO, M. J.; de SOUSA, J. S. I. **Enciclopédia agrícola brasileira: E-H**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2000. 511p.

PEIXOTO, A. M.; SOUSA, J. S. I de; TOLEDO, F. F. de; REICHARDT, K.; FILHO, J. M. **Enciclopédia agrícola brasileira: S-Z**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, v. 6. 2006. 632p.

PINTO-MAGLIO, C. A. F.; PIEROZZI, N. I. **Caracterização Citogenética**. In: VEIGA, R. F. de A.; QUEIRÓZ, M. A. de (Org.). Recursos Fitogenéticos: A base da agricultura sustentável no Brasil. Viçosa: Editora UFV. 2015. p. 204-213.

PLATAFORMA NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS. **Rede Nacional de Recursos Genéticos Vegetais**. 2017. Disponível em < <http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/rede-vegetal>>. Acesso em: 24 set. 2017.

PRESTON, R. J.; HOFFMANN, G. R. **Genetic Toxicology**. In: KLAASEN, C. D. (Org.). Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science Of Poisons. Nova Iorque: McGraw-Hill. 2008. p. 381-413.

RAJJOU, L.; DEBEAUJON, I. **Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds**. Comptes Rendus Biologies. v. 331, p. 796-805. 2008.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. **A modified Allium test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures**. Hereditas. v. 118, p. 49-53. 1993.

RANK, J. **The method *Allium* anaphase-telophase chromossome aberration assay**. Ekologija, v. 1, p. 38-42, 2003.

RAO, N. K.; HANSON, J.; DULLOO, M. E.; GHOSH, K.; NOWELL, A.; LARINDE, M. **Manual of Seed Handling in Genebanks**. Roma: Biodiversity International, 2006. 147p.

RAO, X.; ZHANG, Y.; YIA, Q.; HOU, H.; XU, B.; CHU, L.; HUANG, Y.; ZHANG, W.; FENECH, M.; SHI, Q. **Multiple origins of spontaneously arising micronuclei in HeLa**

**cells: Direct evidence from long-term live cell imaging.** Mutation Research. v. 646, p. 41–49. 2008.

RAO, N. K.; DULLOO, M. E.; ENGELS, J. M. M. **A review of factors that influence the production of quality seed for long-term conservation in genebanks.** Genetic Resources and Crop Evolution. v. 64, p.1061–1074. 2017.

RISTAINO, J. B. **Tracking historic migrations of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans*.** Microbes and Infection. v. 4, p. 1369-1377. 2002.

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

RUAS, J. F. **Feijão.** Perspectivas para a Agropecuária. v. 5, p. 45-58. 2017.

SALOMÃO, A. N. **Manual de Curadores de Germoplasma – Vegetal: Glossário.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 14p.

SCHUSSHEIM, Y.; ASCHNER, M.; BRODSKY, B.; PROSCURA, E.; ERLANGER-ROSENGARTEN, A.; FELDMAN, R.; SHAPIRA, E.; WORMSER, U. **Anti-inflammatory effects of peptide fragments of H2A histone and *Oryza Sativa Japonica* protein.** Peptides. v. 32, p. 125-130. 2011.

SHARMA, M.; KHAN, A. H.; BHAT, T. A. **Assessment of Mutagenicity of Individual and Combination Treatments of Gamma Rays and MMS in Broad Bean (*Vicia faba* L.).** Cytologia. v. 74, p. 235-241. 2009

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. **A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells.** Experimental Cell Research. v. 175, p. 184-191. 1988.

ŠRUT, M.; TRAVEN, L.; ŠTAMBUK, A.; KRALJ, S.; ŽAJA, R.; MIĆOVIĆ, V.; KLOBUČAR, G. **Genotoxicity of marine sediments in the fish hepatoma cell line PLHC-1 as assessed by the Comet assay.** Toxicology in Vitro. v. 25, p. 308-314. 2011.

TERRADAS, M.; MARTÍN, M.; TUSELL, L.; GENESCÀ, A. **Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?.** Mutation Research. v. 705, p. 60–67. 2010.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. **Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing.** Environmental and Molecular Mutagenesis. v. 35, p. 206-221. 2000.

TOLL, J. **Genebank management.** In: PUIGNAU, J. P. (Org.). Conservación de germoplasma vegetal. Montevideú: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 1996. p. 143-150.

TUTEJA, N.; SINGH, M. B.; MISRA, M. K.; BHALLA, P. L.; TUTEJA, R. **Molecular Mechanisms of DNA Damage and Repair: Progress in Plants**. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. v. 36, p. 337-397. 2001.

VALOIS, A. C. C. **Conservação de germoplasma vegetal “ex situ”**. In: PUIGNAU, J. P. (Org.). Conservación de germoplasma vegetal. Montevidéo: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 1996. p. 7-11.

VASQUEZ, M. R. **Combining the *in vivo* comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation**. Mutagenesis. v. 25, p. 187-199. 2010.

VAUGHAN, D. A. 1994. **The Wild Relatives of Rice: A Genetic Handbook**. Manila: International Rice Research Institute, 1994. 137p.

VEIGA, R. F. de A.; KARASAWA, M. M. G.; BARBOSA, W. **Glossário de Termos e Expressões em Recursos Fitogenéticos**. In: VEIGA, R. F. de A.; QUEIRÓZ, M. A. de (Org.). Recursos Fitogenéticos: A base da agricultura sustentável no Brasil. Viçosa: Editora UFV. 2015. p. 415-437.

VENTURA, L.; DONÀ, M.; MACOVEI, A.; CARBONERA, D.; BUTTAFAVA, A.; MONDONI, A.; ROSSI, G.; BALESTRAZZI, A. **Understanding the molecular pathways associated with seed vigor**. Plant Physiology and Biochemistry. v. 60, p. 196-206. 2012.

VENTURA, L.; GIOVANNINI, A.; SAVIO, M.; DONÀ, M.; MACOVEI, A.; BUTTAFAVA, A.; CARBONERA, D.; BALESTRAZZI, A. **Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay with plants: Research on DNA repair and ecogenotoxicity testing**. Chemosphere. v. 92, p.1-9. 2013.

VERGARA, B. S. **A Farmer's Primer on Growing Rice**. Manila: International Rice Research Institute, 1992. 229p.

VILELA-MORALES, E. A.; VALOIS, A. C. C. **Recursos Genéticos Vegetais Autóctones e seus Usos no Desenvolvimento Sustentável**. Cadernos de Ciência & Tecnologia. v.17, p.11-42. 2000.

VILLELA, I. V.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; PRÁ, D.; ROLLA, H. C.; SILVEIRA, J. de D. **Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental**. In: SILVA, J. da.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Org.). Genética Toxicológica. Porto Alegre: Alcance. 2003. p. 147-163.

VRAL, A.; FENECH, M.; THIERENS, H. **The micronucleus assay as a biological dosimeter of *in vivo* ionising radiation exposure**. Mutagenesis. v. 26, p. 11-17. 2011.

WALTER, M.; MARCHESAN, E. **Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Rice**. Brazilian Archives of Biology and Technology. v. 54, p. 371-377. 2011.

WALTERS, C.; WHEELER, L.; STANWOOD, P. C. **Longevity of cryogenically stored seeds**. Cryobiology. v. 48, p. 229-244. 2004.

WHO. **Guide to short-term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals.** Geneva: Environmental Health Criteria 51, 1985. 208p.

WYATT, M. D.; PITTMAN, D. L. **Methylating Agents and DNA Repair Responses: Methylated Bases and Sources of Strand Breaks.** Chemical Research in Toxicology. v. 19, p. 1580-1594. 2006.

XIAO, W.; CHOW, B. L.; RATHGEBER, L. **The repair of DNA methylation damage in *Saccharomyces cerevisiae*.** Current Genetic. v. 30, p. 461-468. 1996.

XU, Y.; Mc NALLY, K. L. **Plant Genetic Resources: Management, Evaluation and Enhancement.** In: XU, Y. (Org.). Molecular Plant Breeding. Oxfordshire: CABI, 2010. p. 151-194.

YANG, L. C.; HSIEH, C. C.; LIN, W. C. **Characterization and immunomodulatory activity of rice hull polysaccharides.** Carbohydrate Polymers. v. 124, p. 150-156. 2015.

YOUNGBLOOD, B. A.; ALFANO, R.; PETTIT, S. C.; ZHANG, D.; DALLMANN, H. G.; HUANG, N.; MACDONALD, C. C. **Application of recombinant human leukemia inhibitory factor (LIF) produced in rice (*Oryza sativa* L.) for maintenance of mouse embryonic stem cells.** Journal of Biotechnology. v. 172, p. 67-72. 2014.

ZAUPA, M.; CALANI, L.; DEL RIO, D.; BRIGHENTI, F.; PELLEGRINI, N. **Characterization of total antioxidant capacity and (poly)phenolic compounds of differently pigmented rice varieties and their changes during domestic cooking.** Food Chemistry. v. 187, p. 338-347. 2015.

ZHU, Z.; JIANG, W.; THOMPSON, H. J. **Edible dry bean consumption (*Phaseolus vulgaris* L.) modulates cardiovascular risk factors and diet-induced obesity in rats and mice.** British Journal of Nutrition. v. 108, p. 66-73. 2012.

## ANEXOS




## ANEXO A – Primeira página do Capítulo 1 publicado



*Genetics and Molecular Biology*, 41, 1, 145-153 (2018)  
 Copyright © 2018, Sociedade Brasileira de Genética. Printed in Brazil  
 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0020>

Research Article

## Comet and cytogenetic tests as tools for evaluating genomic instability in seeds of *Oryza sativa* L. and *Phaseolus vulgaris* L. from gene banks

Alisson F. Dantas<sup>1</sup>, Renata M. Lopes<sup>2</sup>, Maria L. Fascineli<sup>1</sup>, Solange C.B.R. José<sup>3</sup>, Juliano G. Pádua<sup>3</sup>, Marcos A. Gimenes<sup>3</sup> and Cesar K. Grisolia<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>*Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.*

<sup>2</sup>*Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.*

<sup>3</sup>*Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil.*

### Abstract

This study aimed to assess the feasibility of comet and cytogenetic tests as tools for evaluating genomic instability in seeds of *Oryza sativa* L. (rice) and *Phaseolus vulgaris* (beans) L. from gene banks. Rice and beans were exposed to methyl methanesulfonate (MMS) as a reference DNA damaging agent. Seeds of two accessions of rice and beans were obtained from Embrapa Rice and Beans - Brazil. Seed groups were imbibed in three concentrations of MMS for three periods of time to carry out cytogenetic tests, and for one period for the comet test. At concentrations of 10 and 15 mg/L, MMS induced cytotoxic and/or mutagenic effects in the meristematic cells of roots from all the accessions of both species. In the comet test, MMS induced genotoxic effects at all the concentrations in the evaluated accessions of rice and beans, except in one accession of beans at the lowest concentration (5 mg/L). Both species showed sensitivity to MMS. The comet test can be proposed for the measurement of genomic instability in accessions of rice and beans in gene banks, as being more sensitive than the cytogenetic tests used.

**Keywords:** *Oryza sativa* L., *Phaseolus vulgaris* L., methyl methanesulfonate, cytogenetic test, comet test.

Received: January 23, 2017; Accepted: September 11, 2017.

### Introduction

Common rice, *Oryza sativa* L. (Poaceae family), and common bean, *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae family) play an important role in the nutrition of various countries, and in Brazil they are the main components of the staple diet (Barbosa, 2007). Common rice is an annual gramineous species of Asiatic origin, which can adapt to a wide range of environmental conditions (Sousa *et al.*, 1995), and it is widely distributed in tropical and subtropical regions and in some temperate regions (Vaughan, 1994). Common bean is a leguminous species that presents a large number of varieties and cultivars spread over different continents, due to the high value of its seeds for human nutrition (Peixoto *et al.*, 2000). Consumption of both can benefit human health due to the presence of antioxidant compounds (Walter and Marchesan, 2011; López *et al.*, 2013).

Because of the importance of rice and beans as food items, large germplasm collections have been established, and there are studies reporting cytotoxic, mutagenic and/or

genotoxic evaluations in *O. sativa* (Mei *et al.*, 1994; Todoriki and Toru, 1999; Mohanty *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2010; Endo *et al.*, 2012; Kwon *et al.*, 2013; Macovei and Tuteja, 2013; Macovei *et al.*, 2014) and in *P. vulgaris* (Hallak *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2002; Cenkci *et al.*, 2010). The use of methodologies to detect damage to DNA based on chromosome breaks and mis-segregation would play an important role in understanding genomic stability and the viability of seeds stored in gene banks, because the loss of genomic stability is one of the first stages in the seed deterioration process (Peixoto *et al.*, 2006). In this case, methyl methanesulfonate (MMS) was used as reference compound for inducing such genomic damages in rice and beans. MMS is an alkylating agent capable of adding methyl groups to a series of nucleophilic sites in DNA bases (Wyatt and Pittman, 2006; Malini *et al.*, 2010), which can cause chromosome aberrations (Kaina, 2004). It is used for mutagenic and genotoxic evaluation in different organisms, from fungi (Myung and Kolodner, 2003) to rodents (Muto *et al.*, 2015; Plappert-Helbig *et al.*, 2015).

The main goal of the present study was to test known cytogenetic methodologies and single cell gel electrophoresis (comet test), as tools for the measurement of genomic instability in seeds stored in a gene bank.

Send correspondence to Cesar Grisolia. Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro 7091-900 Brasília, DF, Brasil. E-mail: [grisolia@unb.br](mailto:grisolia@unb.br).