

ANTÔNIO CÉSAR BATISTA MATOS

**ANÁLISE FISIOLÓGICA E MOLECULAR DA GERMINAÇÃO DE
SEMENTES DE BRAUNA (*Melanoxylon brauna* Schott) SOB ESTRESSES
HÍDRICO E SALINO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

M433a
2017
Matos, Antônio César Batista, 1984-
Análise fisiológica e molecular da germinação de sementes
de brauna (*Melanoxylon brauna* Schott) sob estresses hídrico e
salino / Antônio César Batista Matos. – Viçosa, MG, 2017.
viii, 84f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.59-77.

1. Sementes florestais. 2. Germinação. 3. *Melanoxylon
brauna*. 4. Sementes florestais - Relações hídricas. 5. Sementes
florestais - Efeito do sal. 6. Enzimas. 7. Proteoma.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia
Florestal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal.
II. Título.

CDD 22 ed. 634.923231

ANTÔNIO CÉSAR BATISTA MATOS

**ANÁLISE FISIOLÓGICA E MOLECULAR DA GERMINAÇÃO DE
SEMENTES DE BRAUNA (*Melanoxylon brauna* Schott) SOB ESTRESSES
HÍDRICO E SALINO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 10 de outubro de 2017.

Camilo Elber Vital

Dimas Mendes Ribeiro

Edvaldo Barros

Anderson Cleiton José
(Coorientador)

Eduardo Euclides de Lima e Borges
(Orientador)

Aos meus pais, Antônio e Maria das Graças.

À minha esposa, Fernanda Lima.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida e por me proporcionar saúde para chegar até aqui.

Aos meus pais, Antônio e Maria das Graças, pelo amor incondicional, apoio incessante e por serem meus primeiros educadores e a base dos meus princípios. À minha irmã Ilmara Lícia, por sempre dividir momentos inesquecíveis e companheirismo.

À minha esposa Fernanda, pelo amor, compreensão, carinho e por alimentar este sonho.

Aos meus familiares, pela união e carinho de sempre.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade, em especial ao Departamento de Engenharia Florestal e aos professores do DEF, por participarem da minha formação; e ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao professor Eduardo Borges pelo incentivo durante todo este trabalho, pelas boas conversas e pela amizade desde quando cheguei à Viçosa para o mestrado. Muito obrigado!

Aos técnicos do LASF, Mauro, Pedro, Gilberto e Leacir pela ajuda e por tornar o trabalho do laboratório mais prazeroso.

Ao professor Anderson (UFLA), pela disponibilidade em ceder o uso das dependências dos laboratórios de Biotecnologia Florestal e de Sementes Florestais da UFLA e pelas sugestões durante a análise proteômica. Agradeço também ao Wilson, pela disponibilidade e ajuda no protocolo das fases iniciais da análise proteômica. E ao professor José Marcio, pela amizade e disponibilidade para resolver qualquer pendência no LSF.

Aos amigos do LASF, Paulo, Marcone, Luciane e Rodrigo pela amizade e fazer deste laboratório um ótimo ambiente de trabalho.

Aos amigos do doutorado, principalmente ao amigo Álvaro pela amizade desde os tempos de Lavras e por sempre dividir vários momentos até aqui. E ao amigo Ricardo pela amizade, ajuda e constantes sugestões.

Aos amigos do Gsem, principalmente ao Marcelo Sekita pela amizade e incentivo e ao professor Laércio pela amizade desde que cheguei à Viçosa. Às suas respectivas esposas, Larissa e Carla, pela amizade.

Ao professor Wagner Otoni pela atenção e disponibilidade em ceder as ponteiros ZipTip.

Ao Edvaldo e Camilo, do Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) da UFV, pela ajuda e sugestões preciosas durante análise proteômica e de fitohormônios. Agradeço ao Núcleo de Análise de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa por facilitar a condução dos experimentos. Agradeço ao apoio financeiro das seguintes agências brasileiras: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) e Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias (SisNANO)/Ministério da Ciência, Tecnologia e Informação (MCTI).

A todos, meu sincero agradecimento!

BIOGRAFIA

ANTÔNIO CÉSAR BATISTA MATOS, filho de Antônio Batista de Matos e Maria das Graças Dias Matos, nasceu na cidade de Divinópolis, Minas Gerais, em 21 de novembro de 1984. Viveu toda infância e adolescência em Carmo do Cajuru, Minas Gerais, no meio do Cerrado Mineiro, rodeado de espécies arbóreas como ipê, cedro, pequi, sucupira-preta, vinhático, pau-terra, jacarandá, entre outras. Este foi, é e sempre será o meu sertão.

Em novembro de 2006, ingressou na Universidade Federal de Lavras, graduando-se em Engenharia Florestal em julho de 2011. Trabalhou com ecologia e inventário florestal, proteção ambiental e incêndios florestais e com sementes e mudas de espécies arbóreas nativas.

Em março de 2012, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciência Florestal, nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae* em julho de 2013. Na ocasião, a dissertação foi intitulada “Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de Jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra*) ((Vell.) Fr. All. Ex Benth) sob estresse térmico”.

Em agosto de 2013, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciência Florestal, nível de Doutorado, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Doctor Scientiae* em outubro de 2017, com defesa da tese. Esta foi intitulada “Análise fisiológica e molecular da germinação de sementes de braúna (*Melanoxylon brauna* Schott) sob estresses hídrico e salino”.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Material vegetal	11
4.2 Determinação do grau de umidade	12
4.3 Curvas de embebição	12
4.4 Germinação	12
4.5 Peso Fresco e comprimento do eixo embrionário	13
4.6 Quantificação de fitohormônios	13
4.7 Avaliação da peroxidação de lipídios (MDA)	15
4.8 Ânion superóxido	15
4.9 Peróxido de hidrogênio	16
4.10 Atividade das enzimas do sistema antioxidante	16
4.11 Material vegetal e análise proteômica	18
4.12 Análise estatística	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1 Curvas de embebição	24
5.2 Germinação	26
5.3 Peso fresco e comprimento do eixo embrionário	31
5.4 Fitohormônios	33
5.5 Espécies reativas de oxigênio (EROs) e peroxidação de lipídios (MDA)	37
5.6 Enzimas do sistema antioxidante	41
5.7 Análise proteômica	45
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXO	78

RESUMO

MATOS, Antônio César Batista, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2017. **Análise fisiológica e molecular da germinação de sementes de brauna (*Melanoxylon brauna* Schott) sob estresses hídrico e salino.** Orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges. Coorientador: Anderson Cleiton José.

Estresses abióticos, como seca e salinidade, influenciam a sobrevivência das plantas. A germinação de sementes é um dos pontos críticos durante o ciclo de vida das plantas. Mecanismos de resposta a nível fisiológico e molecular são escassos para sementes de espécies arbóreas como *Melanoxylon brauna*. O presente trabalho teve por objetivo investigar os efeitos dos estresses hídrico e salino durante a germinação de sementes de brauna. Avaliou-se as curvas de embebição e a germinação nos potenciais de 0, -0,2, -0,4, -0,6 e -0,8 Mpa (PEG e NaCl). Para as demais análises utilizou-se o potencial de 0,0 e -0,4 MPa, no qual foram avaliados peso fresco e comprimento do eixo embrionário, fitohormônios, peroxidação de lipídios (MDA), produção de ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ação do sistema antioxidante, pela atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase (POX) e análise proteômica para elucidar os mecanismos de resposta sob estresse. Para sementes do grupo controle foi possível observar padrão trifásico de embebição, maiores porcentagens de germinação e taxas de crescimento do eixo embrionário em relação aos tratamentos sob estresse hídrico e salino. Em condições salinas houve atraso do ganho de peso de sementes, reduções da germinação e do crescimento do eixo embrionário, sendo classificada como halófita. Sob estresse hídrico ocorre redução mais drástica do ganho de peso de sementes, a germinação é inibida, bem como o crescimento do eixo embrionário. Sementes de *M. brauna* são mais sensíveis ao estresse hídrico do que ao estresse salino. Níveis endógenos de ACC foram superiores após a germinação de sementes. Níveis endógenos de ABA, AIA e AS foram superiores em resposta ao estresse hídrico. ABA e AIA induzem um estado de quiescência sob condições de estresse hídrico. Não houve danos oxidativos pelos dados de MDA. Ocorreram reduções dos níveis de H_2O_2 e MDA durante o tempo. Proteínas como PGK, α -L-arabinofuranosidase e conglutina são temporariamente inibidas sob estresses hídrico e salino. Anexina pode estar relacionada ao controle dos estresses hídrico e salino. Mecanismos fisiológicos e moleculares atuam de forma integrada em sementes de brauna, sendo fundamentais para explicar a germinação e as diferentes respostas sob condições de estresse.

ABSTRACT

MATOS, Antônio César Batista, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2017. **Physiological and molecular analysis of the germination of brauna (*Melanoxylon brauna* Schott) seeds under water and saline stress.** Advisor: Eduardo Euclides de Lima e Borges. Co-advisor: Anderson Cleiton José.

Abiotic stresses, such as drought and salinity, affect the survival of plants. Seed germination is one of the critical points during the plant life cycle. Mechanisms of response at physiological and molecular levels are scarce for seeds of forest species such as *Melanoxylon brauna*. The objective of this study was to investigate the effects of water and saline stress during a germination of Brauna seeds. The imbibition curves and germination were evaluated in the potentials of 0,0; -0.2; -0.4; -0.6 and -0.8 MPa (PEG and NaCl). For the subsequent analyses the potential of 0.0 and -0.4 Mpa were used, in which were evaluated fresh weight and embryo axis length, phytohormones, lipid peroxidation (MDA), superoxide anion (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) production, antioxidant system by enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and peroxidase (POX), and proteomic analysis to elucidate the mechanisms of stress response. For seeds of control group was possible to show the phases of imbibition, germination increases and higher growth rates of the embryonic axis in relation to the treatments under water and saline stress. Under saline stress, there was delay of seed weight gain, germination reductions and lower growth rates of the embryonic axis, classified as halophyte. Under water stress a drastic reduction of seed weight gain occurs, germination was inhibited, as well as embryonic axis growth. Seeds of Brauna are more sensitive to water stress than to saline stress. Later levels of ACC were higher after seed germination. Endogenous levels of ABA, AIA and AS were higher in response to water stress. ABA and AIA induce a state of quiescence under water stress. There was no oxidative damage from MDA data. H_2O_2 and MDA levels decrease over time. Proteins such as PGK, α -L-arabinofuranosidase and conglutin are temporarily inhibited under water and saline stress. Annexin may be related to the control of water and saline stresses. Physiological and molecular mechanisms act in an integrated way in Brauna seeds, being fundamental to explain the germination and the different responses under stress conditions.

1. INTRODUÇÃO

A entrada de água pela semente é o passo inicial da germinação, caracterizada pela fase I, através de um processo físico, em que a absorção de água pela semente ocorre devido à diferença de potencial hídrico entre a semente seca e o meio de hidratação. Após a embebição inicial, o conteúdo de água permanece estável, porém, ocorre a retomada dos processos metabólicos, denominada de fase II (Bradford, 1986; Nonogaki et al., 2010; Bewley et al., 2013). A retomada do metabolismo garante a transição para a fase III, quando ocorre o aumento do conteúdo de água e a protrusão radicular (Bradford, 1986; Galland et al., 2014). Desta forma, a embebição de sementes normalmente apresenta um padrão trifásico (Bradford, 1986; Bewley et al., 2013).

Em condições de estresse hídrico e salino, o potencial hídrico do solo diminui, limitando a disponibilidade de água e a germinação de sementes. A exposição de sementes a solutos osmóticos, como polietileno glicol (PEG) ou sais, é uma estratégia capaz de simular tais situações durante a germinação como ocorre no ambiente (Vallejo et al., 2010). O PEG é um polímero inerte, que se liga à água com uma cadeia impermeável não iônica, capaz de gerar um potencial osmótico negativo devido à presença de grupos hidroxilas ligadas ao polímero, e assim, simular uma condição de estresse hídrico (Michel e Kaufmann, 1973; Henning, 2002). A exposição ao NaCl, por exemplo, causa estresse osmótico, e efeitos tóxicos devido ao acúmulo dos íons Na^+ e Cl^- nos tecidos das plantas (Munns e Tester, 2008). Logo, a redução do potencial hídrico, independente do agente osmótico, promove atraso da germinação e a permanência das sementes na fase II por tempo indeterminado, já que estas tem absorção mais lenta de água. E conseqüentemente, ocorre a restrição da protrusão radicular (Bradford, 1986; Bewley et al., 2013).

A seca e a salinidade estão entre os principais estresses abióticos que comprometem o desenvolvimento das plantas e a produtividade vegetal (Tester e Langridge, 2010; Agarwal et al., 2013). Fatores como intensidade do estresse, espécie vegetal e estágio de desenvolvimento da planta influenciam a susceptibilidade das plantas às condições de estresse (Llanes et al., 2016). Entre as moléculas responsáveis pela regulação dos processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares das plantas, seja em condições de estresse ou não, podemos destacar os fitohormônios entre as mais importantes neste controle (Fatma et al., 2013). Giberelina (GA) e ácido abscísico (ABA) atuam de forma antagonista durante a germinação de sementes. A dormência é induzida pelo ABA e superada pela síntese de GA (Daszkowska-Golec, 2011). A

biossíntese de ABA é controlada pela enzima *9-cis-epoxy-carotenoid dioxygenases* (NCEDs) e degradado por *8'-hydroxylases* (CYP707As) (Okamoto et al., 2006; Seo et al., 2006). A biossíntese de GA é controlada pelas enzimas GA20 e GA3, enquanto GA2 oxidase regula sua degradação (Ogawa et al., 2003). A sinalização e interação entre os fitohormônios são fundamentais para os processos fisiológicos que ocorrem durante a germinação (Kucera et al., 2005). O ABA também é um dos principais componentes de sinalização e regulação de fatores de transcrição responsivos ao estresse (Zhu et al., 2010).

As plantas sob condições de estresses abióticos como a seca, salinidade, altas e baixas temperaturas e inundações estão sujeitas a danos oxidativos pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Gill e Tuteja, 2010). As EROs são formas reduzidas do oxigênio molecular (O_2), altamente reativas e que podem causar estresse oxidativo a diversos componentes celulares, incluindo cloroplastos, mitocôndrias, membrana plasmática, peroxissomos, parede celular e apoplasto. Dentre esses, podemos citar o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (OH) e o oxigênio “singlete” (O.) (Mittler, 2002). Para reduzir ou eliminar os danos oxidativos causados pelo acúmulo de EROs, as plantas possuem um sistema antioxidante composto por enzimas, entre elas podemos citar a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase do ascorbato (APX) e as peroxidases (POX) (Mittler et al., 2004; Gill e Tuteja, 2010).

Além disso, para elucidar os mecanismos de resposta das sementes aos diferentes estresses abióticos, técnicas pós-genômicas como a proteômica tem se mostrado valiosa para ajudar na compreensão de tais mecanismos, como a sinalização e rotas metabólicas envolvidas (Tan et al., 2013). Desta forma, o estudo do proteoma de sementes é fundamental para o conhecimento de mecanismos reguladores da germinação e de tolerância a estresses abióticos, ainda mais diante do cenário de mudanças climáticas e eventos ambientais extremos.

Para sementes de espécies arbóreas nativas, existe um potencial ainda pouco explorado, principalmente com pesquisas a nível molecular. Entre as espécies arbóreas nativas, podemos citar *Melanoxylon brauna*, conhecida braúna ou braúna-preta, e pertencente à família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae (Oliveira-Filho, 2006; Carvalho, 2010). Devido à qualidade de sua madeira e intensa exploração, a espécie faz parte da lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (IBAMA, 2008).

Assim, diante deste contexto, é possível enumerar as seguintes hipóteses:

- 1 - A exposição de sementes de braúna a estresses abióticos, como estresses hídrico e salino, pode atrasar ou inibir a germinação?
- 2 - Sementes de braúna são mais sensíveis ao estresse hídrico ou salino?
- 3 - Sob condições de estresses hídrico e salino, ocorre o acúmulo de EROs e a peroxidação de lipídios em sementes de braúna?
- 4 - O sistema antioxidante é capaz de neutralizar possíveis danos oxidativos?
- 5 - Os fitohormônios atuam em resposta ao estresse durante a germinação ou são inibidos?
- 6 - Através do proteoma de sementes de braúna sob estresses hídrico e salino, quais proteínas atuam na regulação das diferentes rotas metabólicas envolvidas durante o processo de germinação? Em quais condições estas proteínas são induzidas/inibidas?
- 7 - É possível elucidar novos mecanismos de tolerância a estresses hídrico e salino em sementes de braúna?

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste projeto foi avaliar a influência do estresse hídrico e salino na germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* sob os aspectos fisiológicos, bioquímicos, hormonais e do proteoma.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do estresse hídrico e salino durante a germinação de sementes;
- Quantificar o crescimento do eixo embrionário em condições de estresse hídrico e salino;
- Relacionar o estresse hídrico e salino às alterações hormonais em sementes;
- Estabelecer a relação entre o estresse hídrico e salino e as espécies reativas de oxigênio e MDA;
- Quantificar a atividade de enzimas do sistema antioxidante de sementes sob estresse hídrico e salino;
- Comparar as mudanças de abundância de proteínas em sementes sob estresse hídrico e salino.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Condições climáticas, ecologia florestal e perspectivas futuras

De acordo com o relatório da conjuntura dos recursos hídricos de 2014, da Agência Nacional de Águas (ANA), observou-se reduções nos índices pluviométricos que ocorrem desde 2012 para a região nordeste e 2013 para a região sudeste, em relação à média histórica mensal de cada região. Além disso, o nordeste brasileiro apresenta um agravante de ter a maior representatividade de solos salinizados do país, devido às suas condições climáticas, precipitação reduzida e mal distribuída (Freire e Freire, 2007).

Em 2014, os índices de precipitações foram próximos dos mínimos já registrados, comprometendo os níveis dos principais reservatórios do país, afetando o abastecimento de água das regiões mais populosas e que mais demandam água (ANA, 2014). O relatório sobre impactos, adaptação e vulnerabilidade às mudanças climáticas do Painel Intergovernamental Sobre Mudanças Climáticas (IPCC) também projetou a diminuição da disponibilidade hídrica, principalmente para as zonas semiáridas das Américas do Sul e Central (Magrin et al., 2014).

A partir dos modelos e projeções a respeito do o clima, a temperatura máxima diária pode aumentar em até 8 °C durante o verão na região sudeste da América do Sul (IPCC, 2013). O ritmo com que estas alterações climáticas vêm ocorrendo, quando comparado com o processo natural de sucessão ecológica dos ecossistemas florestais, coloca em risco a diversidade das espécies dos ecossistemas tropicais. Resumidamente, com o aumento da temperatura haverá incremento da evapotranspiração, culminando com a diminuição da água disponível no solo. Esta alteração, por exemplo, poderá favorecer a substituição de biomas como a Amazônia pelo cerrado, sendo este último mais adaptado ao déficit hídrico, colocando em risco os demais biomas (Hutyra et al., 2005).

Como fator adicional, segundo relatório da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO, 2010), durante a década de 1990 o desmatamento de florestas tropicais foi de aproximadamente 16 milhões de hectares por ano e de 13 milhões de hectares na década seguinte. Os principais motivos foram a conversão de áreas florestais para a agricultura, infraestrutura ou por desastres naturais. O Brasil foi responsável por devastar 2,64 milhões de hectares por ano entre 2000 e 2010. Tal situação coloca em risco dois biomas brasileiros que estão na lista de *Hotspots* de biodiversidade, a Mata Atlântica e o Cerrado (Myers et al., 2000).

Para um cenário de variações climáticas, as sementes e mudas podem ser sensíveis a estas oscilações, que dependerá de alguns fatores como interações bióticas, genótipo, plasticidade fenotípica, ciclo evolutivo, localização geográfica, nicho ecológico e magnitude das variações climáticas (Dawson et al., 2011; Neale e Kremer, 2011; Cochrane, 2016).

3.2 Estresse hídrico e germinação de sementes

Entre as diferentes condições de estresse abiótico, a seca é considerada a condição ambiental mais significativa, limitando o crescimento e produtividade vegetal no mundo (Farooq et al., 2009). Sob condições de estresse hídrico, as plantas podem ter como efeitos primários a redução do potencial hídrico, desidratação celular e resistência hidráulica. Como efeitos secundários podem ocorrer a redução da expansão celular, redução das atividades celulares e metabólicas, fechamento estomático, inibição fotossintética, abscisão foliar, alteração da partição de carbono, desestabilização de membranas e proteínas, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), citotoxicidade iônica e morte celular (Taiz e Zeiger, 2013).

Em sementes, a germinação inicia-se com a entrada de água e termina com a protrusão radicular (Bewley et al., 2013). A germinação e o estabelecimento das mudas são influenciados pelas características de propagação das espécies, além de estarem ligados a aspectos ecológicos. Devido a diferentes condições ambientais e susceptibilidade a danos e doenças, a germinação é considerada a fase mais crítica do ciclo de vida das plantas (Nonogaki et al., 2010). Sob condições de estresse hídrico, o crescimento do eixo embrionário é inibido em resposta ao ácido abscísico (ABA), prevenindo que a planta entre precocemente num estado vulnerável, já que as condições ambientais são desfavoráveis (Lopez-Molina et al., 2001; Lopez-Molina et al., 2002).

Para sementes de espécies arbóreas, Guedes et al. (2013) observaram que sementes de *Apeiba tibourbou* tiveram redução drástica da germinação entre os potenciais osmóticos de -0,4 e -0,6 MPa, 26 e 0% de germinação, respectivamente. Para o potencial osmótico de -0,4 Mpa, *Poincianella pyramidalis* e *Anadenanthera colubrina* tiveram 78 e 75% de germinação, respectivamente (Santos et al., 2016). Luna e Chamorro et al. (2016) estudaram oito diferentes espécies de sementes da família Cistaceae sob condições de estresse hídrico e observaram que *Cistu clusii* e *Halimum viscosum* foram altamente sensíveis a partir do potencial osmótico de -0,2 MPa. Para sementes de *Erythrina falcata*, Pelegrini et al. (2013), observaram redução da

germinação a partir do potencial de -0,4 MPa e aumento do tempo médio de germinação. Para sementes de *Melanoxylon brauna*, Corte et al. (2010) observaram redução da germinação a partir do potencial de -0,1 MPa, sendo que a germinação foi nula no potencial de -0,4 MPa.

3.3 Estresse salino e germinação de sementes

De acordo com a tolerância à salinidade as plantas podem ser divididas em glicófitas, que são capazes de crescer em solos com baixas concentrações de sal, ou seja, são intolerantes à salinidade e representam a maioria de espécies de plantas, e as halófitas, que são capazes de crescer em condições de altas concentrações de sal (≥ 200 mM de NaCl) e representam apenas 1% da flora mundial (Flowers e Colmer, 2008).

O estresse salino é um dos principais fatores ambientais que limitam a produtividade vegetal (Shabala, 2013), afetando economicamente várias regiões pelo mundo, reduzindo o crescimento e interferindo no metabolismo das plantas (Qadir et al., 2008; Flowers et al., 2010; Munns e Gilliham, 2015). Entre os principais mecanismos utilizados pelas plantas para atenuar os danos causados pela salinidade cita-se o ajuste osmótico, em que as células devem acumular solutos para compensar a baixa disponibilidade hídrica e garantir a manutenção do turgor (Munns e Gilliham, 2015).

A salinidade reduz a germinação de sementes, porém dependendo da concentração, pode induzir estado de dormência para garantir a viabilidade das sementes (Kazachkova et al., 2016). Estes autores observaram a indução de um estado de dormência para sementes de *Eutrema salsugineum* submetidas a estresse salino (200 mM de NaCl). Tal fato se deve pela redução da concentração de giberelina e ácido abscísico (GA/ABA) e aumento da expressão dos genes reguladores de dormência, como RGL2, ABI5 e DOG1. Além disso, houve acúmulo de osmoprotetores e de reservas. De acordo com os autores, estes fatores favorecem a sobrevivência destas sementes em condições salinas até a chegada do período chuvoso. Santo et al. (2017) observaram que sementes de *Brassica insularis* germinam até as concentrações entre 200 e 300 mM de NaCl. Para sementes de nabiça (*Raphanus raphanistrum*) e fedegoso (*Senna obtusifolia*), Pereira et al. (2014a) observaram que o potencial de -0,4 MPa foi o ponto crítico de germinação para estas espécies.

3.4 Fitohormônios e germinação de sementes

Os fitohormônios são compostos químicos que tem papel fundamental no desenvolvimento, germinação e estabelecimento das plântulas, e atuam em diversos processos fisiológicos das plantas (Verma et al., 2016; Llanes et al., 2016). Em sementes, ABA e GAs atuam na regulação da dormência e germinação e atuam em resposta à percepção ambiental (Nonogaki et al., 2010; Weitbrecht et al., 2011; Rajjou et al., 2012; Arc et al., 2013, Miransari e Smith, 2014). Etileno, auxinas, ácido jasmônico, citocininas, brassinosteróides e estrigolactonas podem atuar de maneira positiva e negativa no controle da germinação de sementes (Llanes et al., 2016). E sob condições de estresse, estes hormônios tem papel fundamental na regulação da resposta, podendo ser complexa e integrada a outras rotas de sinalização (Verma et al., 2016; Llanes et al., 2016). O ABA é altamente responsivo à seca e à salinidade (Lata e Prasad, 2011). Para *Arabidopsis*, Park et al. (2011) relataram que auxina atua na sinalização sob estresse salino e Liu et al. (2013) observaram relação estreita entre auxina e ABA no controle da dormência em condições adversas. Além destes, etileno e GAs estão envolvidos nas respostas ao estresse salino (Iqbal et al., 2013). Alonso-Ramírez et al. (2009) relataram o aumento da germinação de sementes de *Arabidopsis* sob estresse salino após aplicação de ácido salicílico (AS), indicando possível regulação deste hormônio durante o estresse.

O avanço das pesquisas a nível molecular, somado a quantificação dos níveis endógenos dos reguladores de crescimento são fundamentais para entendimento dos processos fisiológicos durante a vida da planta. Esta interação de mecanismos, principalmente em condições de estresse abiótico, como seca e salinidade, amplia o conhecimento das respostas fisiológicas durante a germinação de sementes (Llanes et al., 2016).

3.5 Estresse oxidativo em sementes

As EROs podem ter dupla função nas plantas, seja como subproduto tóxico do metabolismo bem como reguladoras de inúmeros processos biológicos, tais como ciclo celular, crescimento, sinalização hormonal, respostas a estresses bióticos e abióticos e morte celular programada (Foyer e Noctor, 2005; Mittler et al., 2004; Fujita et al., 2006).

Danos oxidativos podem ser minimizados pela ação de enzimas responsáveis pela eliminação das EROs, como dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidases (POX) (Mittler et al., 2004; Gill e Tuteja, 2010). Assim, para manter os níveis homeostáticos das EROs nas células é necessário que estas enzimas atuem de forma integrada (Mittler, 2002).

A dismutase do superóxido (SOD) é uma metaloenzima localizada em diferentes compartimentos celulares como mitocôndrias, cloroplastos, apoplasto, citosol, peroxissomos e glioxissomos (Gill e Tuteja, 2010). É classificada em três famílias que diferem de acordo com o íon metálico, podendo ser com níquel (NiSOD), complexo de cobre e zinco (Cu,ZnSOD) e manganês (MnSOD) ou ferro (FeSOD) e também com a conformação da proteína (Miller, 2012). Representa a primeira linha de defesa contra as EROs, na qual realiza a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (Gill e Tuteja, 2010).

A catalase (CAT) é uma enzima tetramérica, localizada predominantemente nos peroxissomos, devido à geração de peróxido de hidrogênio pela β -oxidação de ácidos graxos, fotorespiração e catabolismo de purinas (Gill e Tuteja, 2010). Willekens et al. (1995) sugerem a classificação das catalases em função do seu padrão de expressão, sendo assim, divididas na classe I aquelas expressas em tecidos fotossintéticos, as da classe II expressas em tecidos vascularizados e as da classe III aquelas expressas em sementes e plântulas. Apresentam alta especificidade para H_2O_2 , podendo converter aproximadamente 6 milhões de moléculas de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio por minuto (Gill e Tuteja, 2010).

A peroxidase do ascorbato (APX) é uma enzima que participa do ciclo glutationa-ascorbato (AsA-GSH) como componente central, utiliza o ácido ascórbico como agente redutor e atua na remoção de peróxido de hidrogênio, formando duas moléculas de água e uma de dehidroascorbato (Asada, 1999; Gill e Tuteja, 2010). É amplamente distribuída em diferentes compartimentos celulares, como cloroplasto, citosol, mitocôndria, peroxissomos e apoplasto (Asada, 1992; Mittler, 2002). Tem maior afinidade por peróxido de hidrogênio quando comparada com catalase e peroxidase (Gill e Tuteja, 2010; Das e Roychoudhury, 2014), e isto sugere que APX tenha papel essencial no ajuste dos níveis de H_2O_2 e na sinalização durante o estresse, enquanto que a CAT é responsável pela remoção do excesso de peróxido de hidrogênio (Mittler, 2002; Gill e Tuteja, 2010).

As peroxidases fazem parte de uma superfamília que contém três classes de peroxidases: classe I intracelulares, encontradas na maioria dos organismos vivos,

exceto nos animais; classe II, produzidas por fungos; e a classe III, encontradas nas plantas (POX) (Welinder, 1992). São amplamente distribuídas nos compartimentos celulares, estando associadas às paredes celulares, membranas celulares, organelas, vacúolos e citosol (Siegel, 1993; Passardi et al., 2005; Gill e Tuteja, 2010). As peroxidases utilizam o peróxido de hidrogênio para oxidar diferentes substratos (Asada, 1992; Almagro et al., 2009). Apresentam menor massa molecular (35 kDa) e mobilidade mais eficiente do que a catalase (248 kDa), o que facilita sua difusão e a remoção de H₂O₂ (Siegel, 1993). Devido ao grande número de isoformas e diferentes mecanismos de regulação da sua expressão, atuam em diversos processos fisiológicos durante o ciclo de vida das plantas (Cosio e Dunand, 2009; Passardi et al., 2005).

O processo de germinação é controlado pelas condições ambientais, logo, estes fatores influenciam o equilíbrio entre a produção e a remoção das EROs, sendo traduzida ao nível celular pelas alterações na homeostase das EROs (Bailly et al., 2008). Corbineau et al. (2002) observaram danos oxidativos e formação de radicais livres durante dessecação de sementes, confirmados pela peroxidação de lipídios e danos as sementes. Por outro lado, Das e Kar, (2017) observaram regulação de O₂ e H₂O₂ em plantas de *Vigna radiata* submetidas a estresse hídrico, na qual estas EROs promoveram o crescimento radicular sob estresse. Matos et al. (2014) observaram redução da produção destas EROs em sementes de *Dalbergia nigra* durante a embebição em diferentes temperaturas. A exposição de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) (Abass e Mohamed, 2011) e cevada (*Hordeum vulgare*) (Cavusoglu e Kabar, 2010) à soluções de H₂O₂ aumenta a tolerância a estresses abióticos, como hídrico e salino, respectivamente.

3.6 Análise proteômica em sementes

A proteômica é uma área da biotecnologia que estuda as proteínas contidas numa amostra biológica em uma dada célula, tecido ou organismo (Agrawal et al., 2015), representando imediatamente a condição testada (Gupta et al., 2015). A análise proteômica está entre as técnicas que mais crescem nos estudos com plantas, e é uma estratégia robusta na qual reflete os diferentes processos que ocorrem nos sistemas biológicos, promovendo o entendimento das rotas metabólicas e suas interações (Esteve et al., 2013). Em sementes, a análise do proteoma pode ser realizada desde o desenvolvimento, tolerância à dessecação, germinação, dormência e vigor (Wang et al., 2015).

Uma das técnicas mais utilizadas para análise proteômica em sementes é baseada na separação de proteínas, via eletroforese, através do ponto isoelétrico dessas macromoléculas via focalização isoelétrica (IEF) na primeira dimensão, e pelo peso molecular, via SDS-PAGE na segunda dimensão. Para identificação e quantificação das proteínas pode ser utilizada a espectrometria de massas (MS) (Tan et al., 2013; Gupta et al., 2015).

Em sementes de espécies arbóreas nativas do Brasil são raros os trabalhos realizados com base na análise proteômica, entre os quais cita-se a *Hevea brasiliensis* (Wong e Abubakar, 2005), no qual pode-se identificar a beta glucosidase e rubisco, antes e após a germinação. Para sementes de *Ocotea catharinensis*, Dias et al. (2010) identificaram durante o desenvolvimento de sementes proteínas como BiP (membro de *heat shock 70 protein*), endopeptidase, ATP sintase e ascorbato peroxidase. Balbuena et al. (2011a) identificaram proteínas como vicilina, aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e ATPase em embriões secos e germinados de *Araucaria angustifolia*. Para sementes de *Magnolia ovata*, José et al. (2011) identificaram proteínas de leguminas durante estudo de tolerância à dessecação.

3.7 *Melanoxylon brauna*

Recentemente foi realizada revisão sobre a distribuição de espécies arbóreas no mundo. O número de espécies arbóreas conhecidas atualmente é de 60065, sendo que 45% destas estão distribuídas em apenas 10 famílias (Beech et al., 2017). Estes autores destacam as famílias Fabaceae, Rubiaceae e Myrtaceae como as três mais ricas em número de espécies. Ainda segundo os autores, o Brasil é o país com maior número de espécies (8715) e também com maior número de espécies endêmicas (4333). Dentre estas está *Melanoxylon brauna*, conhecida popularmente como braúna ou braúna-preta. É uma espécie arbórea pertencente à família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae (Oliveira-Filho, 2006; Carvalho, 2010). No Brasil, tem ocorrência nos estados de AL, BA, DF, ES, MG, RJ e SP, principalmente em áreas de fitofisionomias do Domínio Atlântico, mas também pode ser encontrada em áreas do Domínio do Cerrado. Seu status de conservação é considerado ocasional (Oliveira-Filho, 2006). Sua madeira é conhecida pela qualidade e durabilidade natural (Gonzaga, 2006). Devido à intensa exploração e a falta de programas de reflorestamento, a espécie está incluída na lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (IBAMA, 2008). Carvalho et al. (2007) relataram que a espécie raramente tem sido registrada em levantamentos

florísticos, fato que coloca em risco a conservação da espécie e alerta para a necessidade de conservação de fragmentos florestais com certa diversidade florística.

Encontrou-se na literatura apenas o trabalho de Corte et al. (2010) que aborda a qualidade fisiológica de sementes de braúna relacionado ao estresse hídrico. Os autores concluíram que a redução do potencial hídrico reduziu a germinação das sementes de braúna, sendo que a germinação no potencial de -0,4 MPa da solução de polietilenoglicol (PEG) foi nula. Além disso, nenhum trabalho foi encontrado na literatura referente ao estresse salino em sementes de braúna, visto que a espécie tem ocorrência em estados do nordeste brasileiro, caracterizado pela ocorrência de solos salinizados. Assim, a sensibilidade de sementes de braúna a estresse hídrico e uma possível resposta positiva da espécie à ambientes salinos, pode ser um alvo de estudo de extrema importância, a fim de elucidar os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares envolvidos, e gerar possíveis explicações para os aspectos ecológicos e ambientais, já que a sensibilidade/tolerância à seca e às condições salinas pelas sementes reflete o potencial de estabelecimento das plantas no campo e a regeneração natural.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

As sementes de *Melanoxlon brauna* foram coletadas em setembro de 2013 na região de Leopoldina – MG, (21° 31' 55" S e 42° 38' 35" W) de 10 árvores. Os frutos foram secos ao sol até a sua abertura, sendo as sementes extraídas manualmente. Durante o beneficiamento, foram retiradas as impurezas e sementes deterioradas ou danificadas. Após a secagem, quando as sementes atingiram valor médio de 10,85% de teor de água, elas foram armazenadas em câmara fria (5 °C/60% umidade relativa). Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Análises de Sementes Florestais (LASF) do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Para análise proteômica, os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Sementes Florestais e de Biotecnologia Florestal do Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Lavras (UFLA). E para procedimento de análise de géis, digestão e identificação de proteínas e análise de fitohormônios, os experimentos foram conduzidos no Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) da UFV.

4.2 Determinação do grau de umidade

O grau de umidade foi determinado pelo método de estufa a 105 ± 3 °C, por 24 horas (Brasil, 2009), sendo utilizadas três repetições de 20 sementes. O cálculo foi feito na base úmida, sendo o grau de umidade expresso em porcentagem.

4.3 Curvas de embebição

A porcentagem de ganho de peso de água (%) foi calculada em relação ao peso inicial das sementes em cada tratamento. Antes de iniciar a embebição as sementes foram pesadas em balança digital de precisão de 0,0001 g e, em seguida, foram colocadas para embeber em placas de petri, forradas com duas folhas de papel do tipo *germitest*, umedecidas com 4,0 mL de água destilada, e mantidas sob luz constante, na temperatura de 25 °C. As sementes foram pesadas em intervalos de duas horas durante as primeiras 12 horas e, em seguida, em intervalos de 12 horas até que atingissem 50% de germinação ou até o décimo dia após o início da embebição. Antes de cada pesagem, as sementes foram secas superficialmente com papel e recolocadas em placas de petri nas condições citadas anteriormente. Foram utilizadas cinco repetições de 20 sementes.

Para indução do estresse hídrico foram utilizadas soluções de polietilenoglicol (PEG 6000) e para estresse salino foram utilizadas soluções de NaCl, ambos nos potenciais osmóticos de -0,2; -0,4; -0,6 e -0,8 MPa. Os potenciais osmóticos das soluções de PEG foram preparados de acordo com a fórmula de Michel e Kaufman (1973) e os potenciais osmóticos das soluções de NaCl foram calculados por meio da curva de calibração estabelecida por Braccini et al. (1996), conforme a seguir: $Y = 0,194699 + 0,750394 * C$, em que Y = potencial osmótico (MPa) e C = concentração (g/L).

4.4 Germinação

Após imersão em solução de Captan[®] 0,5%, por três minutos, as sementes foram dispostas sobre duas folhas de papel umedecidas com água destilada ou em soluções de NaCl ou de PEG, em placas de petri, e mantidas em germinador do tipo BOD, na temperatura de 25 °C e sob luz constante durante 10 dias. Para indução do estresse hídrico foram utilizadas soluções de polietilenoglicol (PEG 6000) e para estresse salino

foram utilizadas soluções de NaCl, ambos nos potenciais osmóticos de -0,2; -0,4; -0,6 e -0,8 MPa, preparadas conforme descrição do item anterior, sendo avaliadas diariamente. Concomitantemente, após 10 dias de exposição ao estresse hídrico e salino, as sementes foram primeiramente lavadas em água para eliminação do excesso das soluções osmóticas, sendo então, transferidas para água, conforme as condições descritas anteriormente, para o teste de germinação. Um experimento adicional com os potenciais osmóticos -0,2, -0,4; -0,6, -0,8, -1,0 e -1,2 MPa em soluções de NaCl foi montado para classificação das sementes com relação à tolerância ao estresse salino, conforme Khan (1999).

Foram feitas avaliações diárias, tendo como critério de germinação a protrusão radicular. Para o cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG), foi utilizada a fórmula proposta por Maguire (1962): $IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \dots + \frac{G_n}{N_n}$, onde G1, G2, ... Gn é o número de sementes germinadas por dia e N1, N2, ... Nn é número de dias desde a semeadura até cada contagem. Cada tratamento foi constituído de cinco repetições de 20 sementes.

4.5 Peso Fresco e comprimento do eixo embrionário

A partir dos dados de germinação, foram selecionadas sementes oriundas dos tratamentos: água (controle), -0,4 MPa NaCl e -0,4 MPa PEG nos tempos 0, 1, 3, 5 e 7 dias para análise do crescimento do eixo embrionário de sementes de *M. brauna*. Para determinação do peso fresco, as amostras foram pesadas em balança digital de precisão de 0,0001g. Para calcular o comprimento médio dos eixos embrionários, foi utilizado um ampliador fotográfico com escala de 3,3 vezes e régua milimetrada. Foram utilizadas cinco repetições de 10 eixos embrionários.

4.6 Quantificação de fitohormônios

4.6.1 Material vegetal para quantificação de fitohormônios

A partir dos dados de germinação, foram selecionados os seguintes tratamentos para a realização da análise de fitohormônios: sementes secas (controle), sementes embebidas em água, sementes embebidas em solução de -0,4 MPa NaCl e sementes embebidas em solução de -0,4 MPa PEG por 3, 5 e 7 dias, totalizando 10 tratamentos.

4.6.2 Extração

Os fitohormônios foram extraídos de sementes de *M. brauna*, seguindo a metodologia descrita por Muller e Munné-Bosch (2011). Foram utilizadas três repetições de 110 mg de tecido fresco de eixos embrionários de sementes. Estes foram macerados em nitrogênio líquido, seguida da adição de 400 µL de solução extratora (metanol:isopropanol:ácido acético 20:79:1). As amostras foram agitadas 4 vezes em vórtex por 20 segundos, incubadas em sonicador ultrasônico na frequência de 25 kHz por 5 minutos e mantidas no gelo por 30 minutos. Após centrifugação a 13.000g, por 10 minutos a 4 °C, 350 µL do sobrenadante foram transferidos para novo tubo. Ao pellet resultante, repetiu-se o processo de extração e, em seguida, adicionado aos sobrenadantes. Uma última centrifugação a 20.000g por 5 minutos a 4°C foi realizada para remoção de restos de tecido em suspensão.

4.6.3 Cromatografia líquida de ultra eficiência em tandem com espectrometria de massas (UPLC-MS/MS)

Do extrato obtido foram injetados 5 µL no sistema LC-MS/MS. Para a análise utilizou-se o equipamento modelo Agilent 1200 Infinity Series acoplado ao espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo (QqQ), modelo 6430 Agilent Technologies. A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se a coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (1,8 µm, 2.1 x 50mm) (Agilent) em série com uma coluna guarda Zorbax SB-C18, 1,8 µm (Agilent). A fase móvel foi constituída de: (A) ácido acético 0,02% em água e (B) ácido acético 0,02% em acetonitrila em um gradiente de tempo/% B de: 0/5; 11/60; 13/95; 17/95; 19/5; 20/5. Um fluxo de 0,3 mL/minuto e temperatura da coluna de 23 °C foram utilizados.

No espectrômetro de massas foi utilizada a fonte de ionização ESI (*Electrospray Ionisation*) com as seguintes condições: temperatura do gás de 300 °C, taxa de fluxo de nitrogênio de 10 L/min, pressão do nebulizador de 35psi e voltagem de 4000 V.

O equipamento foi operado no modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) no qual foram monitoradas as massas do íon precursor/fragmento estabelecidas mediante testes de fragmentação de cada molécula: citocinina (zeatina) (220/136), etileno via ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano (ACC) (102,1/56,2), ABA(263/153), AIA(176/130), SA(137/93), GA3(345/142.9), JA (209/59), GA4(331/21). Citocinina, AIA e ACC foram escaneados no modo positivo, enquanto ABA, AS, GA3, GA4 e JA

no modo negativo. Uma curva de calibração (0,1 ng a 200 ng) utilizando os respectivos padrões de cada hormônio foi feita para a obtenção da quantificação absoluta. Os dados gerados foram analisados no software “MassHunter Workstation” para obtenção da área dos picos de cada hormônio nas amostras e os resultados foram expressos em ng/g de tecido fresco.

4.7 Avaliação da peroxidação de lipídios (MDA)

Amostras de 0,2 g de eixos embionários isolados foram homogeneizadas com 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) e o homogeneizado foi centrifugado a 12.000g por 15 minutos. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada a 1,5 mL de TBA 0,5% (p/v) e TCA 20%. A mistura foi incubada em água fervente por 30 minutos, e imediatamente resfriada em gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000g durante 10 minutos. A leitura da absorvância foi lida nos comprimentos de onda de 532 nm e 600 nm em espectrofotômetro modelo Thermo Scientific EVOLUTION 60S.

Os resultados foram representados pelos níveis de malondialdeído (MDA) e foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para quantificar a concentração de peróxidos de lipídios, sendo os resultados expressos em nmol MDA g^{-1} (Heath e Packer, 1968).

4.8 Ânion superóxido

Amostras de 20 eixos embrionários foram pesadas em balança de precisão 0,0001 g e cortadas em três segmentos e incubadas em 2 mL de meio de reação constituído do sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (Na_2EDTA) 100 μM , β -nicotinamida adenina nucleotídeo reduzida (NADH) 20 μM e tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi e Karr, 2001) em tubos, tipo “penicilina”, hermeticamente fechados. A reação foi iniciada pela introdução de 100 μL de epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N, utilizando-se seringa cromatográfica. As amostras foram incubadas a 28 °C, permanecendo em agitação, por 5 minutos. Depois disso, os segmentos foram removidos e, a partir do sétimo minuto, iniciou-se a leitura da absorvância em 480 nm, em espectrofotômetro, durante cinco minutos. O branco foi realizado sob as mesmas condições, mas sem tecido vegetal. A produção de ânion superóxido foi avaliada pela determinação da quantidade de adenocromo acumulado

(Misra e Fridovich, 1971), utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de $4,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Boveris, 1984).

4.9 Peróxido de hidrogênio

Amostras de 20 eixos embrionários foram pesadas em balança de precisão 0,0001g, trituradas em nitrogênio líquido e, em seguida, homogeneizadas em 2,0 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM, seguido de centrifugação a 10.000g, por 15 minutos, 4 °C, e coletado o sobrenadante (Kuo e Kao, 2003). Alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação constituído de sulfato ferroso amoniacal 250 µM, ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 µM e sorbitol 100 mM, em volume final de 2 mL (Gay e Gebicki, 2000), homogeneizadas e mantidas no escuro por 30 minutos. A determinação da absorvância foi feita em espectrofotômetro, em 560 nm, e a quantificação de H₂O₂ foi realizada com base em curva de calibração, utilizando-se de concentrações de peróxido como padrão. Brancos para os reagentes e os extratos vegetais foram preparados em paralelo e subtraídos da amostra.

4.10 Atividade das enzimas do sistema antioxidante

Para avaliar o efeito do estresse hídrico e salino durante a germinação de sementes de *M. brauna*, foram quantificadas as atividades das enzimas dismutase do superóxido, catalase, peroxidase do ascorbato e peroxidase. As análises foram realizadas em eixos embrionários de sementes que foram embebidas em água e no potencial osmótico de -0,4 MPa para NaCl e PEG por 0 (controle), 1, 3, 5 e 7 dias. Para as análises das atividades das enzimas, as sementes foram colocadas nas mesmas condições do teste de germinação.

4.10.1 Obtenção dos extratos enzimáticos brutos

Os extratos enzimáticos foram obtidos pela homogeneização de amostras de 0,1 g de eixos embrionários na presença de 2 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000g durante 15 minutos a 4 °C, e o sobrenadante

utilizado como extrato bruto na determinação das atividades enzimáticas, avaliadas em quatro repetições de cada tratamento.

4.10.2 Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade da dismutase do superóxido foi determinada pela adição de 50 µL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 5 mM e riboflavina 2 µM (Del Longo et al., 1993). A reação foi conduzida a 25 °C, sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após cinco minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi medida em espectrofotômetro pela absorvância em 560 nm. A absorvância em 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual período, serviu de branco e foi subtraído da amostra que recebeu iluminação (Giannopolis e Ries, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

4.10.3 Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 30 µL do extrato enzimático bruto a 2,97 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM (Havir e Mchale, 1987). O decréscimo na absorvância a 240 nm, à temperatura de 25 °C foi medido até o segundo minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (Anderson et al., 1995) e o resultado expresso em µmol/min/mg de proteína.

4.10.4 Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)

A atividade da peroxidase do ascorbato foi determinada pela adição de 150 µL do extrato enzimático bruto a 2,85 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H₂O₂ 1 mM. O decréscimo na absorvância a 290 nm, a 25 °C, foi medido até o segundo minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹

(Nakano e Asada, 1981; Koshiba, 1993), e o resultado expresso em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

4.10.5 Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)

A atividade da peroxidase foi determinada pela adição de 30 μL do extrato enzimático bruto a 2,97 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H_2O_2 20 mM (Kar e Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorvância em 420 nm, em espectrofotômetro, a 25 °C, até o segundo minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Chance e Maehley, 1995) e expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

4.10.6 Determinação de proteínas

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina (BSA) como padrão.

4.11 Material vegetal e análise proteômica

A partir dos dados de germinação, foram selecionados os seguintes tratamentos para a realização da análise proteômica diferencial em sementes de *M. brauna*: sementes secas (controle), sementes embebidas em água, sementes embebidas em solução de -0,4 MPa NaCl e sementes embebidas em solução de -0,4 MPa PEG por 3, 5 e 7 dias, totalizando 10 tratamentos.

4.11.1 Obtenção de extratos protéicos

Extratos de proteínas totais foram obtidos de eixos embrionários de sementes de *M. brauna*. Amostras de 300 mg de eixos embrionários foram maceradas em nitrogênio líquido, usando um almofariz e pistilo. Para cada tratamento foram utilizadas três repetições. A extração foi realizada de acordo com Gallardo et al. (2003), com modificações propostas por José et al. (2011). Após a maceração, o pó foi homogeneizado com 800 μL de tampão de extração uréia/tiouréia (uréia 7 M, tiouréia 2 M, Trizma HCl 18 mM, Trizma base 14 mM, coquetel de inibidores de protease, 12

unidades de DNase I, 20µL de RNase A (20 mg/mL), 0,2% (v/v) de Triton X-100, CHAPS 60 mM e DTT 17,5 mM) em gelo. A mistura foi agitada em vórtex e os tubos foram mantidos em repouso em gelo por 20 minutos. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 18.188g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante contendo o extrato protéico foi submetido a uma segunda centrifugação e o sobrenadante coletado com micropipeta e armazenado a -20 °C em alíquotas de 100 µL. Após isto, cada amostra teve sua concentração de proteínas determinada pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina bovina (BSA) como padrão.

4.11.2 Focalização isoeétrica (IEF)

As proteínas foram separadas por focalização isoeétrica (IEF) usando gel em fita de 13 cm (pH imobilizado entre 4,0 e 7,0 – *Immobiline Drystrips* – Amersham Biosciences). A reidratação das fitas foi realizada durante 15 horas em suporte de reidratação “reswelling tray” (GE Healthcare), em sala climatizada à 20 °C, em tampão de reidratação, contendo uréia 7 M, tiuréia 2 M, 1% (v/v) de IPG Buffer (Amersham Bioscience), 2,2% (v/v) de reagente Destreak, 2% CHAPS (p/v), DDT (2,8 mg/mL) e traços de azul de bromofenol. O volume final de 250 µL de tampão contendo 200 ug de proteína foi aplicado nas canaletas e após reidratação, as fitas foram levadas ao focalizador isoeétrico Ettan IPGphor3 (GE Healthcare), posicionadas nas canaletas e imersas em óleo mineral para eletroforese (Amersham Biosciences).

A focalização isoeétrica foi realizada em 4 fases: a 500 V por 1 hora, 1000 V por 1 hora, 8000 V por 2,5 horas e 8000 V por 55 minutos. Em seguida, as fitas foram armazenadas em tubos a -80 °C até o início da eletroforese na segunda dimensão. Imediatamente antes do início da segunda dimensão, as fitas foram equilibradas em cinco etapas em solução contendo uréia 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), trizma base 75 mM em pH 8,8. Na primeira etapa (I), as fitas foram colocadas em tubos contendo 5 mL da solução de equilíbrio acrescida de DDT para concentração final de 65 mM e mantidas em agitador oscilante por 30 minutos. Na segunda etapa (II), as fitas foram colocadas em tubos contendo 5 mL da solução de equilíbrio e mantidas em agitador oscilante por 20 minutos. Após isto, as etapas I e II foram repetidas. Na terceira etapa, as fitas foram colocadas em tubos contendo 5mL da solução de equilíbrio acrescida de iodoacetamida para concentração final de 0,2 M e mantidas em agitador oscilante por 30 minutos.

4.11.3 Segunda dimensão

As fitas de gel equilibradas foram colocadas no topo de um gel de poliacrilamida vertical de 12% (v/v) de solução de acrilamida/bisacrilamida, 0,3 M de Trizma-base pH 8,8, 0,08% (v/v) de persulfato de amônia e 0,04% (v/v) TEMED. Marcadores de proteína de peso molecular (10 - 225 kDa) (Promega®) foram utilizados como padrão. As tiras de gel foram seladas com agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (p/v) contendo 0,1% (p/v) de SDS, Trizma base 25 mM, glicina 192 mM e traços de azul de bromofenol. Os géis permaneceram em repouso por 5 minutos para solidificação da agarose. A eletroforese foi realizada a 20 °C em tampão contendo 0,1% (p/v) de SDS, glicina 192 mM e trizma-base 25 mM, por 20 minutos inicialmente a 15 mA (por gel) e 80 V, e posteriormente, por 4 horas a 25 mA (por gel) e 250 V, numa cuba SE600 (Hoefer). Para cada tratamento foram corridos três géis carregados com proteínas de extração independentes.

4.11.4 Coloração dos géis

Primeiramente, os géis foram colocados por 30 minutos em solução de fixação contendo 7% (v/v) de ácido acético e 40% (v/v) de metanol. Em seguida, os géis foram transferidos para a solução de coloração contendo 0,1% (p/v) de azul brilhante de *Coomassie* G-250, 1,6% (v/v) ácido fosfórico, 12% (p/v) de sulfato de amônia e 20% (v/v) de metanol. Os géis foram mantidos na solução de coloração por 72 horas. Ao final desse período, os géis foram neutralizados por 3 minutos em solução de descoloração contendo 1,2% (p/v) de tris-base, pH 6,5 aferido com ácido ortofosfórico. Posteriormente, foram lavados em solução contendo 40% (v/v) de metanol por 1 minuto e deixados em água por mais 72 horas. Por fim, os géis foram armazenados em solução contendo 5% (v/v) de ácido acético e mantidos em câmara fria à 5 °C, até a digitalização das imagens e excisão dos *spots*.

4.11.5 Digitalização e análise dos géis bidimensionais

As imagens dos géis foram digitalizadas utilizando um scanner *ImageScanner II* (GE Healthcare, Upsala, Suécia) e o programa *LabsScan* (GE Healthcare, Upsala, Suécia), no Núcleo de Análise de Biomoléculas da UFV. As imagens foram analisadas com o software *ImageMaster 2D Platinum 7.0* (Amersham Bioscience). Os géis foram

alinhados e agrupados por tratamento e os pontos de proteínas comparados em função da média do seu volume normalizado (% Vol) entre as repetições. O volume normalizado dos spots em um gel foi determinado a partir da fórmula:

$$\%Vol = \frac{Vol}{\sum_{S=1}^n (Vols)} \times 100, \text{ onde Vols é o volume do spot } S \text{ em um gel contendo } n \text{ spots.}$$

Após isto, os grupos foram comparados por análise da variância (ANOVA) e teste de média a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott, utilizando o programa STATISTICA 8.0. Foram considerados pontos de proteína com uma alteração relativa de pelo menos 3,5 vezes e resultado significativo na ANOVA ($p < 0,05$).

4.11.6 Excisão dos spots

Os *spots* com alteração na abundância entre os tratamentos foram retirados dos géis com o auxílio de ponteira de pipeta e bisturi, transferidos para tubos contendo solução 5% (v/v) de ácido acético até o início da digestão trípica.

4.11.7 Digestão trípica

A digestão foi realizada segundo protocolo de digestão trípica estabelecido por Shevchenko et al. (2006). Os pedaços de géis excisados foram descorados com 3 lavagens com solução de acetonitrila 50% em bicarbonato de amônia 25 mM, pH 8,0. Após a segunda lavagem, foram incubados na mesma solução por 12 horas (*overnight*), e depois procedeu-se a terceira lavagem na mesma solução. A solução de lavagem foi removida e o gel foi desidratado com 200 μ L de acetonitrila (100%). Posteriormente à remoção da acetonitrila, os fragmentos de géis foram secados a vácuo por 15 minutos. Os pedaços de gel foram reduzidos em 100 μ L de DTT 65 mM por 30 minutos, à temperatura de 56 °C. Posteriormente, foram alquilados com 100 μ L de iodoacetamida 200 mM, por 30 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz, lavados com solução de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 minutos. Após isto, as amostras passaram por nova desidratação com acetonitrila (100%). A acetonitrila foi removida e feita nova reidratação com 200 μ L de bicarbonato de amônio 100 mM, seguido de duas etapas de desidratação com 200 μ L de acetonitrila (100%). Após remoção da solução de acetonitrila, os fragmentos de gel foram secos a vácuo por 15 minutos.

Aos fragmentos de gel foi adicionado solução de tripsina (*trypsin from porcine pancreas - Proteomics grade - Sigma*), solubilizada em ácido acético 50 mM e ativada

com solução de bicarbonato de amônio 40 mM em acetonitrila 10%, tendo como concentração final 25 ng/ μ L. Após isto, as amostras foram imediatamente colocadas em gelo por 45 minutos para reidratação do gel e absorção da enzima na malha do gel. Em seguida, foi adicionada uma solução de 50 μ L de bicarbonato de amônio 40 mM em acetonitrila 10%, permanecendo por *overnight* (20 horas) à 37 °C.

Para recuperação dos peptídeos trípticos, as amostras foram incubadas em sonicador ultrasônico na frequência de 25 kHz, por 10 minutos, agitadas em vórtex por 20 segundos, centrifugadas a 10.000g por 1 minuto e a solução com tripsina foi removida e transferida para um microtubo limpo. Com o objetivo de lavar os fragmentos do gel e recuperar o máximo de peptídeos trípticos possível, foram adicionados 50 μ L de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50% aos fragmentos de gel de cada *spot*. As amostras foram agitadas em vórtex por 20 segundos e centrifugadas a 10.000g por 1 minuto. Após 15 minutos em repouso, a temperatura ambiente, as amostras foram incubadas em sonicador ultrasônico na frequência de 25 kHz, por 2 minutos, agitadas em vórtex por 20 segundos e centrifugadas a 10.000g por 1 minuto. A solução foi removida e adicionada àquela recuperada anteriormente. Estes passos para recuperação dos peptídeos trípticos foram repetidos mais uma vez. As amostras contendo peptídeos foram secas em sistema de centrifugação a vácuo até atingirem um volume de aproximadamente 10 μ L.

As amostras constituídas de peptídeos obtidos por digestão tríptica foram purificadas e desalinizadas utilizando ponteiras de 10 μ L ZipTip® com resina C18 (Millipore) segundo o protocolo do fabricante. Primeiramente, a C18 das ponteiras ZipTip® foi ativada com uma solução de acetonitrila 100%, usando o volume de 5 μ L da ponteira, certificando-se de que foram feitas 10 lavagens, dispensando sempre a solução após cada lavagem. Após a etapa de ativação, as ponteiras foram equilibradas com solução de ácido trifluoroacético 0,1%, aspirando e dispensando a solução cerca de 10 vezes. Após a etapa de equilíbrio, as ponteiras foram carregadas com amostra, aspirando pelo menos 20 vezes a amostra e adsorvendo a mesma na resina de sílica com C18. Após o carregamento, as ponteiras foram lavadas com solução de ácido trifluoroacético 0,1%, aspirando e dispensando a solução cerca de 10 vezes. Em um microtubo contendo 2,5 μ L de solução de acetonitrila 50% em ácido trifluoroacético 0,1%, os peptídeos foram eluídos aspirando e dispensando a amostra 20 vezes dentro do mesmo microtubo.

4.11.8 Análise por espectrometria de massa

Os peptídeos resultantes da digestão trípica foram analisados no intervalo de 750–4000 Da no instrumento ULTRAFLEX III MALDI-TOF/TOF (BRUKER *Daltonics*) no modo MS reflectivo positivo e o sequenciamento por MS/MS foi realizado usando o LIFT, no modo positivo, para o qual foram selecionados os íons com maior intensidade em relação à m/z . Os peptídeos foram identificados usando o método de *MS-MS ion search*, contido no programa Mascot Daemon, v.2.4.0, Matrix Science, UK. Os espectros MS/MS gerados foram confrontados contra o banco de dados Uniprot (www.uniprot.org) e foram analisados a partir dos grupos taxonômicos Fabaceae e Viridiplantae, sendo que proteínas com espectros com valor do índice iônico (*ion score*) abaixo do nível de confiabilidade não foram consideradas como proteínas identificadas. Foi considerada como modificação fixa a carbamidometilação dos resíduos de cisteína e como variável a oxidação dos resíduos de metionina. A digestão enzimática foi realizada pela tripsina. Foi aceito no máximo peptídeos com até 1 sítio de clivagem perdida, e considerada uma tolerância para a variação de massa dos peptídeos de 0,2 Da para íons parentais e 0,5 Da para os fragmentos.

As amostras contendo peptídeos trípticos das proteínas dos *spots* do gel foram aplicadas em placa de MALDI na proporção 1:1 de amostra e matriz (ácido α -ciano-4-hidrocinâmico) em solução de acetonitrila 50%, acidificada com ácido trifluoroacético 0,1%. O programa utilizado para obtenção dos espectros foi o Flex Control 3.3 (Bruker Daltonics®). Espectros adquiridos com tiros a laser de nitrogênio foram somados para gerar o perfil de massas de peptídeos. Os perfis obtidos foram analisados e editados manualmente utilizando o software Flex analysis 3.3 (Bruker Daltonics - Germany). As listas de massas de MS/MS foram geradas no formato *mascot generic format* (mgf) pelo aplicativo Biotools, v.3.2 (Bruker Daltonics).

Para visualização dos espectros, organização e validação de todos os dados gerados foi utilizado o software SCAFFOLD® v.3.6.4 (©2006 Proteome Software Inc, USA), usando 90% de filtro de probabilidade para a identificação de proteínas e peptídeos, e no mínimo um peptídeo único para cada proteína.

Massas moleculares e pontos isoelétricos foram preditos através da entrada das sequências no <http://expasy.ch/tools/peptide-mass.html> e foram comparados com as massas e pontos isoelétricos experimentais.

4.12 Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

Para análise do ganho de peso e germinação foi utilizado para cada tipo de estresse um fatorial duplo 5 x 11 (5 tratamentos osmóticos: 0,0; -0,2; -0,4; -0,6 e -0,8 MPa) e (11 tempos: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 dias). Após a definição dos potenciais osmóticos, foi utilizado um fatorial duplo 2 x 5 (3 tratamentos: controle, -0,4 MPa de solução de NaCl e -0,4 MPa de solução de PEG) e (5 tempos: 0, 1, 3, 5 e 7 dias) para análise do crescimento do eixo embrionário, EROs e enzimas do sistema antioxidante. Para análise de fitohormônios e perfil protéico foi utilizado fatorial duplo com os mesmos tratamentos, porém com os tempos de 0, 3, 5 e 7 dias. Sendo que o teste de Scott-Knott foi utilizado exclusivamente para a análise proteômica.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias obtidas foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey ($p < 0,05$). Quando pertinente, os dados foram submetidos à análise de regressão, e avaliada com base na significância pelo teste F, no p valor dos coeficientes e no coeficiente de determinação.

Para verificar a similaridade entre modelos de regressões gerados, foi realizado o teste de identidade de modelos, conforme sugerido por Leite e Oliveira (2002), quando pertinente. Para verificar a correlação entre as variáveis testadas foi utilizada a correlação de Spearman.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curvas de embebição

A germinação de sementes de *M. brauna* apresenta padrão trifásico durante a embebição em água (Figura 1). Foram necessárias 60 horas para a fase I (122,11 %) e 60 horas para a fase II (132,76 %) até as sementes atingirem a fase III. Para sementes submetidas à embebição em condições de estresse osmótico induzido por PEG não apresentou tal comportamento em nenhum dos potenciais testados, já que a restrição hídrica diminuiu a hidratação e inibiu a germinação. As sementes de *M. brauna* mostraram-se sensíveis ao estresse hídrico, já que a partir do potencial osmótico de -0,2 MPa houve redução da absorção de água. Assim, quanto maior o potencial osmótico menor foi o ganho de peso das sementes, fato que aumenta o tempo de permanência das sementes na fase II e altera o formato da curva de embebição. Segundo Pereira et al.

(2014b) o padrão trifásico de ganho de peso de sementes de *Amburana cearensis* ocorreu apenas quando estas foram embebidas em água, enquanto aquelas submetidas a embebição em soluções de PEG tiveram redução de hidratação e de ganho de peso e, conseqüentemente, não houve protrusão radicular da raiz primária.

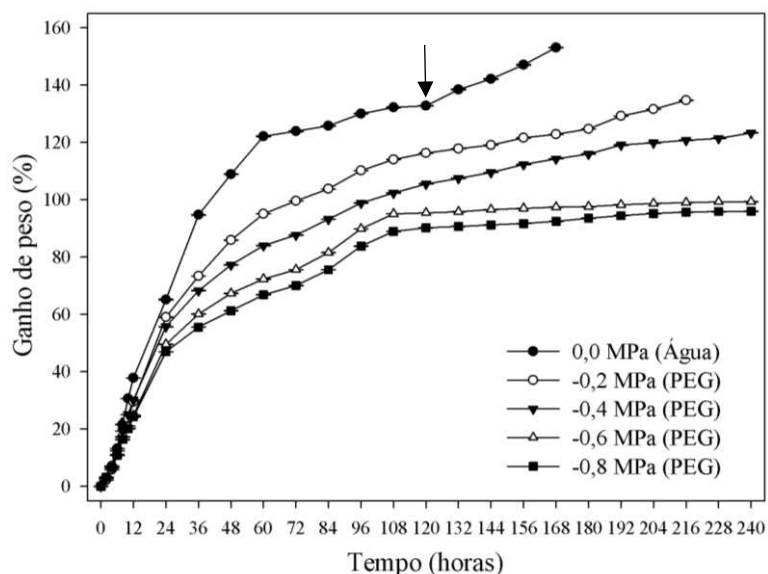


Figura 1. Curvas de embebição de sementes de *Melanoxylon brauna* em água e em diferentes potenciais osmóticos induzidos por PEG. Seta indica o início da fase III em sementes embebidas em água. Médias \pm erro padrão.

A hidratação inicial das sementes (fase I) é determinada pela diferença entre os potenciais hídricos da semente e do meio, o que determina o fluxo de água do ambiente para a semente. A fase I é considerada como um processo físico essencial para reativação do metabolismo das sementes. Com o aumento do estresse hídrico ocorre a diminuição da disponibilidade de água para a semente, o que resulta em hidratação abaixo da qual o embrião não pode expandir e garante a manutenção das sementes na fase II.

Já com relação aos dados de ganho de peso de sementes de *M. brauna* durante a embebição em soluções de NaCl, até o potencial de -0,4 MPa foi possível observar o padrão trifásico de embebição (Figura 2). Porém, houve atraso na embebição, e conseqüentemente, alteração nas curvas de embebição. Para os potenciais de -0,2 e -0,4 MPa foram necessárias 72 (122,92 %) e 96 horas (124,36 %) para a fase I, 72 (131,07 %) e 84 (132,90 %) horas para a fase II e após 144 e 180 horas, respectivamente, as sementes atingiram a fase III. A partir do potencial de -0,6 MPa observou-se atraso mais acentuado no ganho de peso nas fases I e II, sendo que a fase III só ocorreu após 240

horas de embebição. E no potencial de -0,8 MPa não foi possível observar padrão trifásico de embebição.

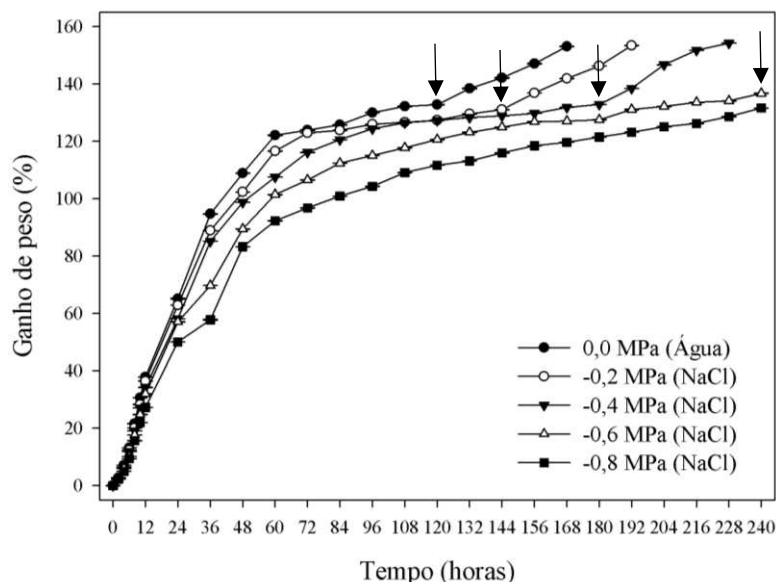


Figura 2. Curvas de embebição de sementes de *Melanoxylon brauna* em água e em diferentes potenciais osmóticos induzidos por NaCl. Seta indica o início da fase III. Médias \pm erro padrão.

O aumento do estresse salino inibe a germinação pela restrição ao fornecimento de água (efeito osmótico) ou pelo dano específico ao metabolismo pelo distúrbio iônico, com acúmulo dos íons de Na^+ e Cl^- (efeito iônico) (Munns e Tester, 2008; Gul et al., 2013). Além disso, o aumento da concentração de sal resulta em desequilíbrio nutricional, estresse oxidativo, desorganização de membranas e redução na divisão celular em plantas (Carillo et al., 2011).

5.2 Germinação

A germinação de sementes embebidas em água foi de 89% e 2,86 para o IVG (Figuras 3A e 3B). Em condições de estresse osmótico induzido por PEG, a germinação estimada foi de 16, 3, 0 e 0% para os potenciais -0,2; -0,4; -0,6 e -0,8 MPa, respectivamente. O mesmo comportamento foi observado para o IVG, em que foram estimados os valores de 0,36; 0,04 para os potenciais osmóticos de -0,2; -0,40, respectivamente, e zero para -0,6 e -0,8 MPa, respectivamente. Corte et al. (2010) observaram que o decréscimo do potencial hídrico reduziu a germinação das sementes de *M. brauna*, sendo que nos potenciais de -0,1, -0,2, -0,3 MPa a germinação foi de 77,

15 e 10%, respectivamente. Já para o potencial de -0,4 MPa a germinação foi nula.

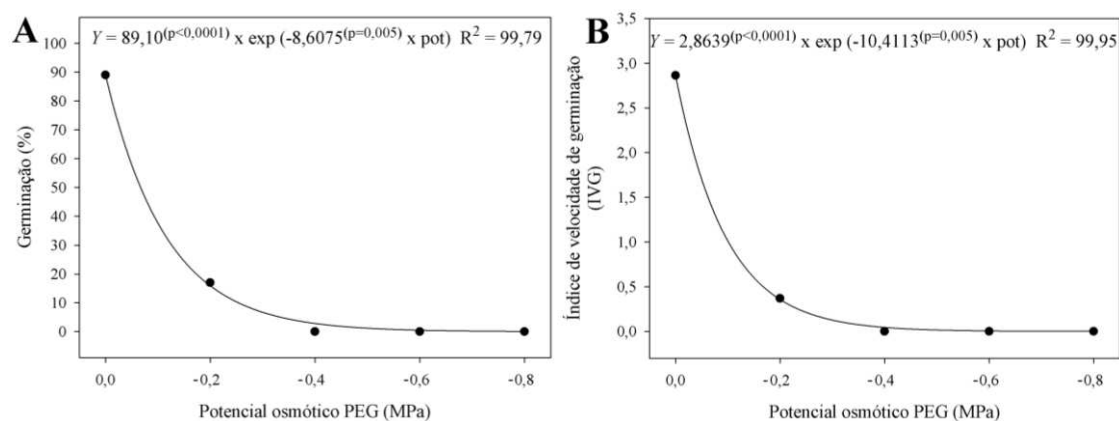


Figura 3. Germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Melanoxylon brauna* durante a embebição em diferentes potenciais osmóticos induzidos por PEG.

Para sementes de *Chorisia glaziovii* a germinação foi nula a partir do potencial de -0,2 MPa na temperatura de 20 °C e a partir de -0,3 MPa nas temperaturas de 25 e 30 °C (Silva et al., 2016). Segundo Almeida et al. (2014), sementes de *Amburana cearensis* tiveram redução drástica da germinação a partir do potencial de -0,6 MPa, sendo limitante para formação de plântulas normais. Por outro lado, para sementes de *Eucalyptus camaldulensis*, *E. citriodora*, *E. grandis*, *E. robusta* e *E. urophylla* foi observado que o potencial osmótico de -0,8 MPa é o limite para germinação destas espécies (Martins et al., 2014). De acordo com Pelegrini et al. (2013), sementes de *Erythrina falcata* tiveram redução significativa da germinação a partir do potencial de -0,4 MPa.

A dispersão de sementes de *M. brauna* ocorre entre os meses de agosto e novembro (Carvalho, 2010), período que antecede o período chuvoso na região sudeste. Assim, a dispersão coincide com a época de aumento da disponibilidade hídrica no solo, fato que aumenta as chances de regeneração natural da espécie.

Os dados de germinação e IVG relativos às soluções de NaCl podem ser observados nas figuras 4A e 4B, respectivamente. Houve redução da germinação e do IVG com o aumento do estresse. Para os potenciais de -0,2, -0,4, -0,6 e -0,8 MPa a germinação foi de 83, 77, 50 e 40% e 2,76, 2,14, 1,25 e 0,89 para IVG, respectivamente.

Segundo Flowers e Colmer (2008), plantas que são capazes de crescer em solos com baixas concentrações de sal são definidas como glicófitas. Este grupo representa a maioria das espécies de plantas e são intolerantes à salinidade, além disso, na presença

de altas concentrações de sal podem sofrer danos severos (Koyro e Eisa, 2008). Por outro lado, halófitas são plantas capazes de crescer em condições de altas concentrações de sal (≥ 200 mM de NaCl), representando apenas 1% da flora mundial (Flowers e Colmer, 2008). De acordo com Gul et al. (2013), espécies halófitas podem germinar em ampla faixa com relação ao hábitat, população e zona climática. Em condições de estresse salino (NaCl), espécies de regiões subtropicais podem germinar em potenciais de 0,25 até 1,0 M. Para regiões temperadas esta faixa varia de 0,26 até 1,7 M. E em regiões temperadas e secas a variação é de 0,3 até 1,4 M.

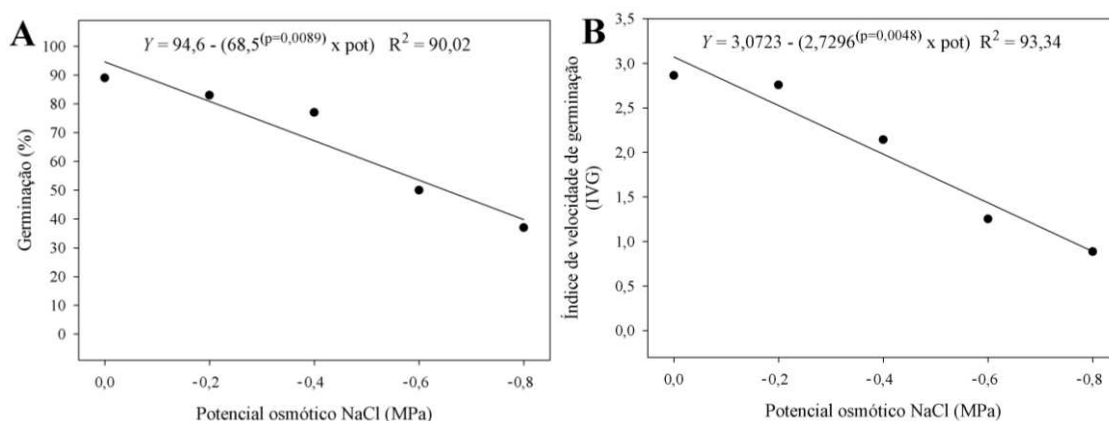


Figura 4. Germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Melanoxylon brauna* durante a embebição em diferentes potenciais osmóticos induzidos por NaCl.

Para Khan (1999), as plantas halófitas podem ser divididas em 3 grupos: 1 – sensivelmente tolerantes, capazes de germinar em concentrações de até 125 mM de NaCl; 2 – moderadamente tolerantes, capazes de germinar em concentrações de até 500 mM de NaCl; e 3 – altamente tolerantes, capazes de germinar em concentrações acima de 800 mM.

A partir dos dados apresentados na tabela 1, sementes de *M. brauna* são capazes de germinar até o potencial de -1,0 MPa, ou seja, concentração de aproximadamente 223,59 mM de NaCl. Assim, as sementes de braúna podem ser classificadas em moderadamente tolerantes ao estresse salino induzido por NaCl, sendo uma espécie halófitas.

Tabela 1. Classificação do nível de tolerância quanto à concentração de NaCl a partir do teste de germinação de sementes de *Melanoxylon brauna*.

Potencial osmótico (MPa)	[NaCl] mM	Germinação (%)	Classificação
0,00	0,00	89	-
-0,20	41,17	83	Sensivelmente tolerante
-0,40	86,77	77	Sensivelmente tolerante
-0,60	132,38	50	Moderadamente tolerante
-0,80	177,99	37	Moderadamente tolerante
-1,00	223,59	12	Moderadamente tolerante
-1,20	269,20	0	Intolerante

Quando as sementes expostas aos estresses hídrico e salino foram transferidas para a água, foi possível observar a recuperação. Porém, a resposta variou de acordo com a intensidade do estresse e o agente osmótico (Tabela 2). Como observado anteriormente, sementes de *M. brauna* são mais sensíveis ao estresse hídrico do que ao estresse salino, fato que pode ser observado a partir do potencial osmótico de -0,2 MPa. Já para o estresse salino, a diferença significativa da recuperação pode ser observada a partir do potencial de -0,6 MPa, fato que comprova a tolerância da espécie ao NaCl e melhor recuperação após o estresse. A tolerância ao estresse salino pode ser um indicativo da presença da espécie em alguns estados do nordeste, como Bahia e Alagoas (Specieslink, 2017). Na região nordeste ocorrem os mais representativos solos salinizados no Brasil, devido às condições climáticas locais (Freire e Freire, 2007).

Segundo Kranner et al. (2010), o estresse em sementes pode ser dividido em três fases: alarme, resistência e exaustão. A fase de alarme consiste na percepção, sinalização através de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), hormônios, modificações pós-traducionais e alterações no transcriptoma para ativar mecanismos de proteção e reparo.

Tabela 2. Germinação (%) de sementes de *Melanoxylon brauna* após 10 dias de exposição aos estresses hídricos e salino e transferidas posteriormente para água.

Potencial osmótico (MPa)	PEG	→	Água	NaCl	→	Água
0,00	89 a		89 a	89 a		89 a
-0,20	17 b		70 a	83 a		85 a
-0,40	0 b		45 a	77 a		82 a
-0,60	0 b		39 a	50 b		70 a
-0,80	0 b		36 a	37 b		60 a

Tratamentos seguidos por mesma letra dentro do tipo de estresse e transferência para água não diferem entre si, a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Caso a condição de estresse seja mantida, a fase de resistência é acionada, como o sistema antioxidante, enzimas de reparo de DNA, eliminação de células danificadas e defesa contra patógenos. E por fim, a fase de exaustão é caracterizada pela falha nos mecanismos de proteção e reparo. A principal característica da fase de resistência é a manutenção da viabilidade, adquirida através da aclimação ao estresse. Fato que não pode ser observado na fase de exaustão, já que as falhas nos processos de proteção e reparo levam a redução do vigor e, conseqüentemente, perda da viabilidade. Assim, para sementes expostas às condições testadas de estresses hídrico e salino, mesmo após transferência das sementes para condições ideais, a fase de exaustão é alcançada, sendo mais pronunciada durante o estresse hídrico, já que a recuperação não é totalmente efetiva.

Após exposição à seca ou condições salinas, o ajuste osmótico tem papel durante o período de desidratação. Íons inorgânicos são armazenados no vacúolo. Solutos compatíveis, como prolina, glicina betaína, manitol e trealose são armazenados no citosol. Além disso, alguns desses solutos, como a prolina, tem função osmoprotetora, que protegem a planta de subprodutos tóxicos formados durante baixa disponibilidade hídrica. Estes solutos, além de fonte de reserva de energia, atuam na estabilização de macromoléculas e na preservação de membranas. Proteínas *late embryogenesis abundant* (LEA) e *heat shock proteins* (HSPs) também têm função protetora durante o estresse osmótico (Shinozaki et al., 2015).

A partir da caracterização fisiológica da germinação de sementes de *M. brauna* sob condições de estresses hídrico e salino, foi definido o potencial de -0,4 MPa. A partir deste potencial osmótico, sob estresse hídrico ocorreu a inibição da germinação, porém, sob estresse salino houve germinação. Assim, a partir deste mesmo potencial, as análises foram executadas para ambos os tratamentos. De maneira geral, observou-se que ocorre germinação na condição controle (sem estresse) (Figuras 5A e 5B). Sob estresse salino ocorre inibição parcial da germinação (-0,4 MPa NaCl) e a inibição total da germinação sob estresse hídrico (-0,4 MPa PEG).

Em trabalho realizado por Borges et al. (2015a) com sementes de *M. brauna* vários mecanismos mostraram-se envolvidos no crescimento do eixo embrionário, como o aumento da atividade das enzimas poligalacturonase e pectina metilesterase, que atuam na expansão celular do eixo embrionário, juntamente com o aumento da massa fresca e comprimento do eixo embrionário. Além disso, houve redução da força de ruptura da região micropilar, com valores próximos a 1,0 N a partir de 24 horas de hidratação e persistindo até 72 horas. Assim, esta redução da resistência micropilar é

essencial até o momento do início da protrusão radicular, a partir do 4º dia na curva de germinação sem estresse e do 5º dia sob estresse salino (Figura 5B).

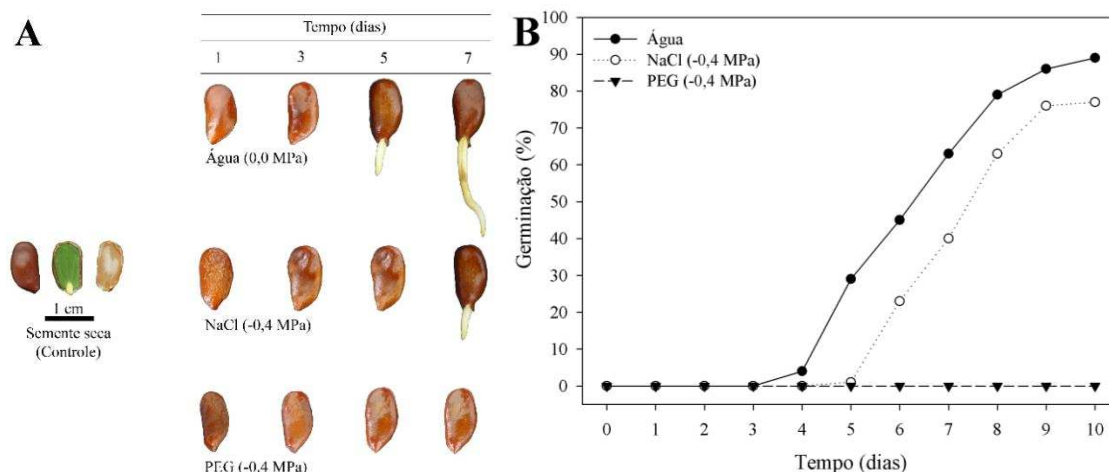


Figura 5. Detalhe do processo de germinação (A) e das curvas de germinação (B) de sementes de *Melanoxylon brauna* em água e sob estresses hídrico (PEG) e salino (NaCl) no potencial osmótico de -0,4 MPa.

5.3 Peso fresco e comprimento do eixo embrionário

A inibição da germinação de sementes de *M. brauna* sob estresse hídrico foi acompanhada pela redução do peso fresco e do comprimento do eixo embrionário (Figuras 6 e 7), sendo possível ajustar os modelos ao longo do tempo (6A e 7A). Sob estresse salino os aumentos dos pesos frescos e dos comprimentos dos eixos embrionários foram intermediários entre as condições de estresse hídrico e do tratamento controle. A partir do primeiro dia de embebição o peso fresco do eixo embrionário no tratamento controle foi superior aos demais tratamentos, permanecendo até o sétimo dia (6B). Comportamento similar ocorreu para o comprimento do eixo embrionário, porém, a partir do terceiro dia (7B). Segundo Brunner et al. (2015), os principais efeitos da restrição hídrica no crescimento do sistema radicular são as reduções da biomassa, da produção e aumento da mortalidade.

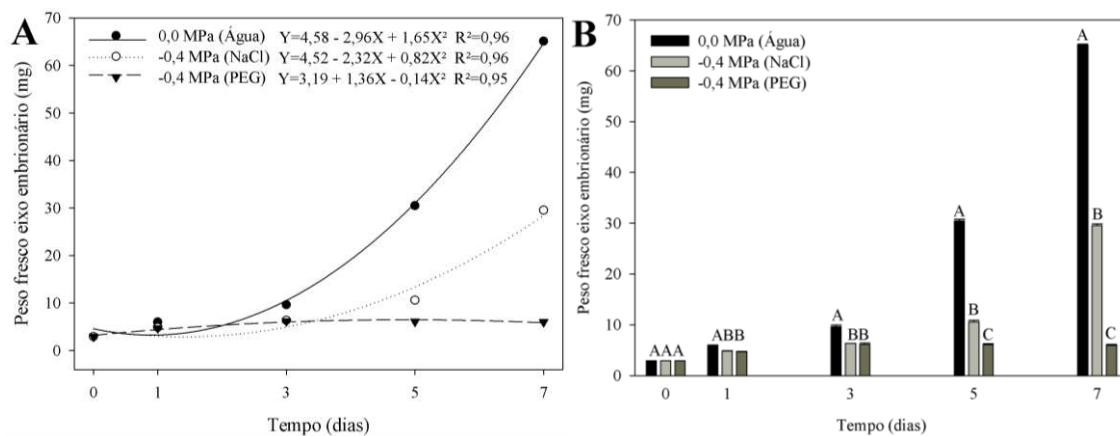


Figura 6. Peso fresco de eixos embrionários de sementes de *Melanoxyton brauna* durante a germinação em água e sob estresses hídrico e salino ao longo do tempo (A) e dentro de cada tempo (B). Médias seguidas por mesma letra entre os tratamentos dentro de cada tempo não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

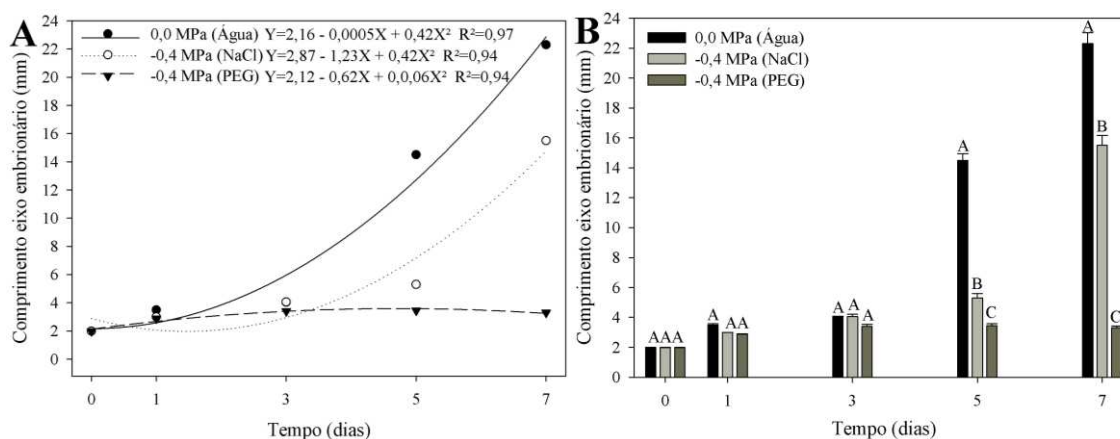


Figura 7. Comprimento de eixos embrionários de sementes de *Melanoxyton brauna* durante a germinação em água e sob estresses hídrico e salino ao longo do tempo (A) e dentro de cada tempo (B). Médias seguidas por mesma letra entre os tratamentos dentro de cada tempo não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Brosowska-Arendt et al. (2014) constataram redução do peso fresco do embrião de sementes de *Pisum sativa* submetidas ao estresse hídrico induzido por PEG a partir de 24 horas, quando comparada com sementes embebidas em água. Ocorreram reduções do comprimento de raiz primária e da germinação de sementes de *Chorisia glaziovii* sob estresse hídrico (Silva et al., 2016). Constatou-se redução da germinação e do IVG e, conseqüentemente, reduções dos crescimentos radicular e do hipocótilo de *Capparis flexuosa* a partir de 200 mM de NaCl (Pacheco et al., 2012).

A retomada do crescimento do eixo embrionário só é possível quando ocorre diminuição da resistência mecânica das estruturas circundantes ao eixo embrionário e aumento do potencial de crescimento do eixo (Nonogaki et al., 2014). Assim, durante a germinação em água ocorre o aumento do potencial de crescimento do eixo embrionário, a diminuição da resistência mecânica da região micropilar, o aumento da atividade de enzimas como poligalacturonase e pectina metilesterase (Borges et al., 2015a). De maneira similar, genes podem codificar proteínas responsáveis pela modificação de parede celular, como xiloglucano endotransglicosilase/hidrolases (XTHs), endo- β -mananase, quitinase, expansinas (EXPs), α -galactosidase, β -1,3-glucanase, α -L-Arabinofuranosidase e celulases que atuam na expansão do eixo embrionário e no enfraquecimento dos tecidos envoltórios das sementes, favorecendo a germinação (Bewley et al., 2013; Dekkers, et al., 2013).

As plantas desenvolveram vários mecanismos de tolerância à salinidade, como as halófitas, que são capazes de se adaptarem à altas concentrações de sal. Entre estes mecanismos, podemos citar a compartimentalização e equilíbrio iônico, transporte e entrada de íons, biossíntese de osmoprotetores e de solutos compatíveis, ativação de enzimas do sistema antioxidante, síntese de compostos antioxidantes e a regulação hormonal (Munns e Tester, 2008; Munns e Gilliam, 2015). Assim, um ou mais mecanismos podem estar presentes em sementes de braúna, promovendo à tolerância ao estresse salino. Sob estresse hídrico, as moléculas de alto peso molecular de PEG são capazes de se ligarem às moléculas de água, reduzindo assim a entrada de água nas células (Michel e Kaufmann, 1973; Henning, 2002). Esta restrição diminui a hidratação das sementes, e conseqüentemente, evita a retomada do crescimento do eixo embrionário.

5.4 Fitohormônios

As concentrações de ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), precursor do etileno, ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA) e ácido salicílico (AS) em eixos embrionários de *M. brauna* são demonstradas na figura 8.

Houve aumento da concentração endógena do ACC em eixo embrionário de sementes embebidas em água, concentração intermediária em estresse salino e baixa concentração em condição de estresse hídrico. Percebe-se relação direta com a disponibilidade hídrica nas condições de cada tratamento e com a germinação de sementes, como discutido anteriormente (Figura 8A). A produção de etileno aumentou

em sementes de tomates expostas ao estresse hídrico e salino (Mayak et al., 2004), que pode ser explicada pelo fato de o etileno suprimir a ação inibitória do ABA durante a germinação de sementes (Kucera et al., 2005).

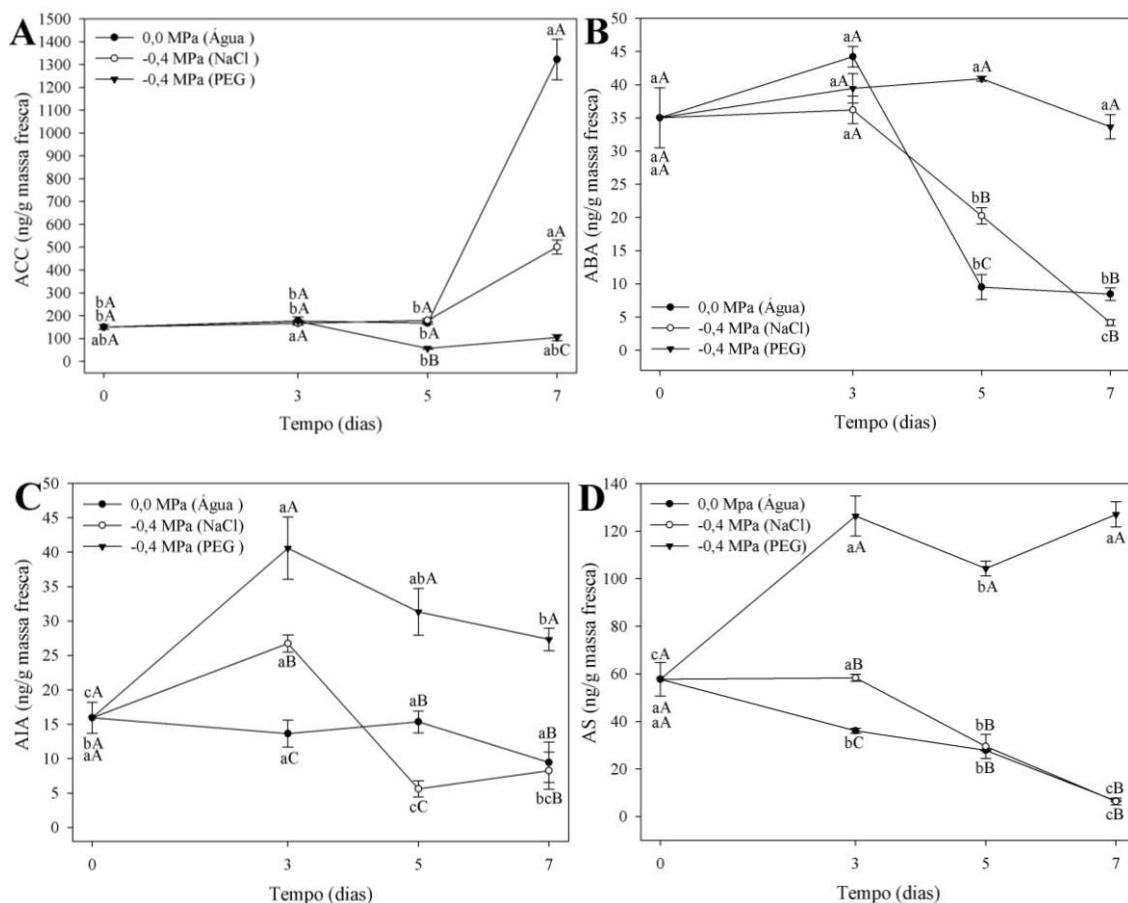


Figura 8. Concentração endógena de ACC (A), ABA (B), AIA (C) e AS (D) em eixos embrionários de sementes de *Melanoxylon brauna* durante a germinação em água e sob estresses hídrico e salino ao longo do tempo. Médias seguidas por mesma letra minúscula ao longo do tempo e maiúscula entre os tratamentos não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Silva et al. (2014) observaram aumentos da produção de ACC e da germinação para *Stylosanthes guianensis* durante estresse salino quando comparado com *S. humilis* e *S. capitata*, evidenciando diferentes respostas ao estresse salino entre espécies do gênero *Stylosanthes*. Além disso, foi observado comportamento similar para o acúmulo de Na^+ nos tecidos das sementes. Estes resultados evidenciam que NaCl inibe a germinação e a síntese de etileno. Diferentes espécies têm capacidade distinta na produção de ACC (precursor imediato do etileno) e na redução de danos em condições de estresse salino. O etileno é um fitohormônio que regula a germinação e a dormência

de várias espécies (Matilla e Matilla-Vasquez, 2008; Arc et al., 2013; Silva et al., 2014). Silva et al. (2014) observaram a produção de etileno durante o início da embebição e aumento durante o tempo em sementes de *Stylosanthes humilis*. El-Maarouf-Bouteau et al. (2015) observaram produção de etileno no início do alongamento celular de embriões de *Helianthus annuus*.

A produção de etileno durante a germinação está relacionada com o enfraquecimento do endosperma (Linkies et al., 2009; Martínez-Andújar et al., 2012). Gianinetti et al. (2007) reportam que esse fitohormônio é resultado da germinação e Matilla e Matilla-Vasquez, (2008) sustentam a ideia de que ele é essencial para que ocorra a germinação de sementes. Para sementes de *M. brauna* foi possível observar aumento da produção de ACC em condições sem estresse após cinco dias de embebição. Em condições de estresse salino há redução significativa dos níveis de ACC quando comparada com sementes embebidas em água, concordando com a redução da germinação. Houve diminuição mais pronunciada dos níveis deste fitohormônio quando as sementes foram expostas ao estresse hídrico, resultando na manutenção dos níveis de ACC ao longo do tempo e inibição da germinação.

Houve redução no conteúdo endógeno de ABA a partir de três dias de embebição em água e sob estresse salino (Figura 8B). Neste sentido, sob condições desfavoráveis, como estresse hídrico, a concentração endógena de ABA é mantida ao longo do tempo, fato que inibe a expansão do eixo embrionário. A permanência nesta condição pode ser caracterizada como a indução de dormência secundária (Lopez-Molina et al., 2001; Lopez-Molina et al., 2002; Bewley et al., 2013). Sob estresse hídrico induzido por PEG no potencial de -0,4 MPa ocorreu a indução de quiescência na maior parte de sementes de braúna. A dormência e a germinação de sementes são controlados por uma relação complexa entre vários fitohormônios. O balanço hormonal entre ABA e giberelinas (GAs) atua na regulação da dormência e germinação de sementes e é uma resposta em função da percepção e estímulos frente as condições ambientais (Nonogaki et al., 2010; Weitbrecht et al., 2011; Rajjou et al., 2012; Arc et al., 2013; Miransari e Smith, 2014). Para sementes de *Eutrema salsugineum* submetidas a estresse salino (200 mM de NaCl) foi observado redução da germinação e a indução de um estado de dormência, sugerido pela redução da concentração de GA/ABA e aumento da expressão dos genes reguladores de dormência, como RGL2, ABI5 e DOG1 (Kazachkova et al., 2016).

Assim, a maior sensibilidade de sementes de braúna ao estresse hídrico induziu resposta osmótica, com a manutenção dos níveis de ácido abscísico (ABA). Sob

condições de estresse hídrico, o crescimento do eixo embrionário é inibido em resposta ao ABA (Figuras 6 e 7), fato que evita o estabelecimento da planta em condições desfavoráveis (Lopez-Molina et al., 2001; Lopez-Molina et al., 2002).

O acúmulo de ABA sob condições de estresse osmótico, como o estresse hídrico e salino, ocorre devido ao aumento da expressão de genes envolvidos na síntese de ABA, como ZEP, NCED, LOS5/ABA3, e AAO (Zhu, 2002). Além disso, fatores de transcrição são induzidos durante estresse abiótico como o MYB2, o MYC2, o NAC e o AREB/ABF atuando de maneira dependente ao ABA e NAC, DREB2 e DREB1/CBF em rotas independentes (Shinozaki et al., 2007).

O conteúdo endógeno de AIA manteve-se ao longo do tempo em sementes embebidas em água (Figura 8C). Sob condições de estresse salino, o nível de AIA aumentou até o terceiro dia e, a partir deste ponto diminuiu no quinto dia, permanecendo estável até o sétimo dia. Já sob estresse hídrico, houve aumento significativo aos três dias, no qual foi superior aos demais tratamentos. Em seguida houve redução até o sétimo dia, mantendo-se superior aos demais.

As auxinas estão envolvidas em praticamente todos os processos relacionados ao desenvolvimento das plantas e também como resposta a flutuações do ambiente (Zhao, 2010). Wang et al. (2011) sugerem que ABA tenha controle do mecanismo que inibe o crescimento de raízes primárias através da divisão celular. Belin et al. (2009) afirmam que ABA inibe o crescimento de mudas pelo controle da sinalização de auxina. A dormência em sementes pode ser controlada por ABA e auxina, pela expressão do fator de transcrição ABI3 (Liu et al., 2013). A auxina tem ação positiva sobre os fatores de transcrição ARF10/16 (Auxin-Responsive Factors) que atuam na expressão do gene ABI3, que é o fator principal referente à dormência. Assim, estes autores concluíram que a auxina é indispensável para a regulação da dormência em sementes. Através de mecanismos evolutivos, as plantas podem criar estratégias para que ocorra a germinação apenas em condições favoráveis. Neste sentido, o controle de auxina sobre ABA na regulação da dormência é um destes mecanismos que contribuem para adaptação ao ambiente e sobrevivência das espécies sobre condições adversas. Segundo Park et al. (2011), auxina atua na sinalização ao estresse salino via gene IAA30, controlado pelo fator de transcrição NTM2, e modula a germinação de sementes de *arabidopsis* em tal condição.

Fatores de transcrição da família AUX-IAA em *Arundo donax* foram 10 vezes mais expressos em raízes do que na parte aérea em condições de estresse hídrico (Fu et al., 2016). Este aumento está relacionado com a interação de proteínas AUX/IAA com o

fator de transcrição ARF, que inibe o crescimento radicular em resposta ao aumento dos níveis intracelulares de AIA (Overvoorde et al., 2010). Logo, estes mecanismos podem atuar em eixos embrionários de braúna, principalmente sob condições de estresse hídrico, e manter os níveis elevados para AIA e ABA, sendo assim, mais um indicativo de resposta ao estresse hídrico e de indução a dormência secundária.

Com relação ao conteúdo de AS, para sementes embebidas em água, foi possível observar redução constante ao longo do tempo (Figura 8D). Comportamento similar foi observado durante o estresse salino, porém, com aumento significativo aos três dias quando comparado com embebição em água. Por outro lado, sob estresse hídrico, observou-se aumento significativo aos três dias, permanecendo superior aos demais tratamentos até o sétimo dia.

Sadeghipour et al. (2012) e Romano et al. (2012) relataram que AS tem papel na tolerância de plantas quando expostas ao estresse hídrico. Bandurska e Stroinski, (2005) observaram que plantas de cevada submetidas à deficiência hídrica tiveram redução dos danos nas membranas celulares e aumento dos níveis de ABA e aumento na tolerância das plantas ao estresse hídrico, pela aplicação exógena de AS. O acúmulo de AS pode atuar como proteção durante condições de estresse hídrico. Nestas condições ocorre a indução de genes PR1 e PR2 através da sinalização de AS (Miura et al., 2013).

Rajjou et al. (2006) observaram a indução de dois genes referentes à SOD, enzima responsável pela primeira linha de defesa do sistema antioxidante, para sementes de arábidoopsis sob estresse salino quando expostas ao AS. De acordo com Alonso-Ramírez et al. (2009), foi observado 50% de germinação em sementes de arábidoopsis submetidas a estresse salino (100-150 mM de NaCl). Porém, na presença de ácido salicílico esta porcentagem aumentou para 80%. Assim, AS pode atuar na reversão de danos oxidativos e favorecer a germinação. Portanto, em eixos embrionários de braúna, o aumento do conteúdo de AS sob estresse hídrico pode ser um mecanismo de proteção contra possíveis danos induzidos pelo estresse, garantindo a viabilidade das sementes até uma possível modificação das condições ambientais.

5.5 Espécies reativas de oxigênio (EROs) e peroxidação de lipídios (MDA)

Não foi possível quantificar o conteúdo de ânion superóxido em eixos embrionários de *M. brauna*. De acordo com estimativas, apenas 1-2% do consumo de O₂ resulta na formação de ânion superóxido (O₂⁻) (Boveris et al., 1973; Turrens, 1982). Além disso, apresenta tempo de meia vida muito curto (1-4 μs) (Møller et al., 2007;

Halliwell e Gutteridge, 2015) e é mais instável que H_2O_2 , o que pode dificultar sua quantificação (Noctor et al., 2016).

Observou-se redução nos níveis de peróxido de hidrogênio ao longo do tempo de germinação em todas as condições testadas e com valores similares entre os tratamentos (Figura 9A). Para verificar tal similaridade, foi realizado o teste de identidade de modelos, conforme sugerido por Leite e Oliveira, (2002). Esta análise estatística confirma se tais modelos são iguais ou não. Observou-se diferença significativa entre as condições de estresse hídrico e salino para os níveis de peróxido de hidrogênio e entre os tratamentos ao longo do tempo (Figura 9B). Os níveis de peróxido de hidrogênio foram superiores em condições de estresse salino entre o primeiro e o terceiro dia de embebição. A partir do quinto dia, os níveis foram significativamente iguais entre o tratamento controle e o estresse salino e menores para a condição de estresse hídrico.

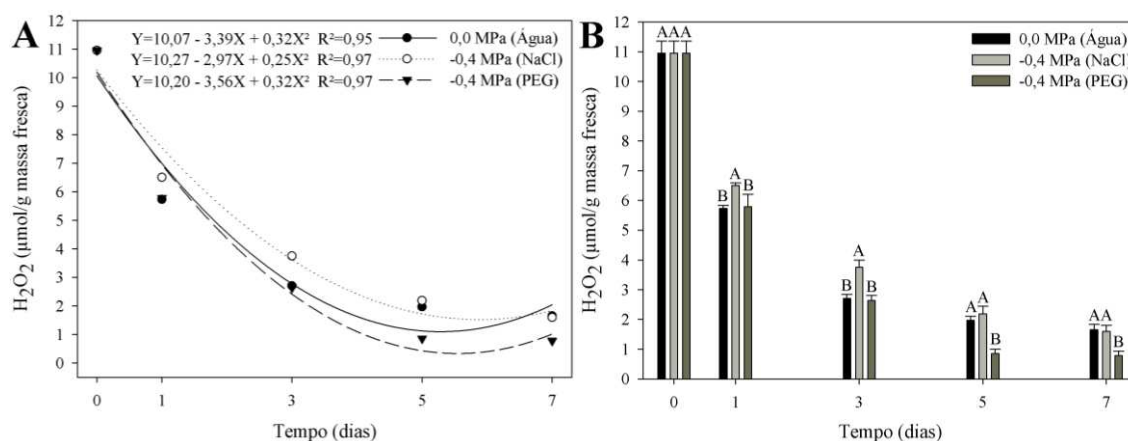


Figura 9. Níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em eixos embrionários de sementes de *Melanoxyton brauna* durante a germinação em água e sob estresses hídrico e salino ao longo do tempo (A) e dentro de cada tempo (B). Médias seguidas por mesma letra entre os tratamentos dentro de cada tempo não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Em eixos embrionários do controle (tempo zero) observou-se os maiores níveis de peróxido de hidrogênio. Devido ao baixo conteúdo de água, o metabolismo nessas sementes é reduzido e os sistemas enzimáticos são ineficientes, fato que favorece a formação de EROs (Bewley et al., 2013). A presença de H_2O_2 em sementes secas pode ser resultado de reações de Amadori, Maillard (Priestley, 1986; Sun e Leopold, 1995) e a partir da peroxidação de lipídios (McDonald, 1999). Níveis elevados de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio foram observados em eixos embrionários de

sementes secas de *Dalbergia nigra*, outra espécie arbórea nativa do Brasil. Porém, após a embebição das sementes em água na faixa de temperatura ótima de germinação da espécie, a formação destas EROs reduziu até 120 horas (Matos et al., 2014).

Borges et al. (2015a) observaram altos níveis de peróxido de hidrogênio em eixos embrionários isolados de *M. brauna* no tempo zero, sendo que durante a hidratação em água os níveis reduziram-se em 24 horas. O mesmo comportamento foi observado neste trabalho, mesmo em condições de estresse salino e hídrico. De forma similar, durante a embebição de sementes de *Pisum sativum* em água não houve alterações dos níveis endógenos de peróxido de hidrogênio (Barba-Espín et al., 2011). A produção e acúmulo de EROs ocorre em sementes e plantas submetidas a estresses bióticos e abióticos (Hossain e Fujita, 2013; Gomes e Garcia, 2013; Das e Roychoudhury, 2014; You e Chan, 2015). Em excesso, estas moléculas podem causar danos oxidativos em membranas (peroxidação de lipídios), proteínas, RNA, DNA, alterar a homeostase e levar a morte celular (Mittler, 2002; Apel e Hirt, 2004; Foyer e Noctor, 2005; Gomes e Garcia, 2013). Ou seja, em altas concentrações podem ser o principal motivo para a deterioração e perda de vigor de sementes (Kumar et al., 2015). Porém, em baixa concentração, a principal função das EROs é sinalização e regulação de vários processos biológicos (Bailly, 2004; Møller et al., 2007).

Gomes e Garcia, (2013), Kumar et al. (2015) e Wojtyla, et al. (2016) destacam o papel chave das EROs na sinalização durante o processo de germinação e em resposta a diferentes condições de estresse. A partir da sinalização de EROs, eventos de enfraquecimento do endosperma micropilar (Zhang et al., 2014), a superação de dormência (El-Maarouf-Boateau e Bailly, 2008), a regulação hormonal (El-Maarouf-Boateau, et al., 2015), a ativação de cascata de sinais através de quinases - *Mitogen Activated Protein Kinases* (MAPKs), que regulam o crescimento, o desenvolvimento e as repostas a estresses (Barba-Espín, et al., 2011). A carbonilação de proteínas (Job et al., 2005; Barba-Espín, et al., 2011) e mobilização de reservas (Verma et al., 2015) são ativados durante o progresso da germinação. Sob estresse, mecanismos de proteção contra patógenos (Morkunas et al., 2004), interação com outras moléculas de sinalização, como óxido nítrico (Arc et al., 2013) e ativação de enzimas do sistema antioxidante (Kibinza, et al., 2011) são acionados durante a germinação de sementes.

A aplicação de H₂O₂ exógeno aumentou a tolerância ao estresse salino em *Triticum aestivum*, e promoveu o crescimento das plântulas, devido a eficiência do sistema antioxidante. Assim, H₂O₂ pode ter papel fundamental na indução de tolerância ao estresse salino (Wahid et al., 2007; Houssain et al., 2015). Em sementes de

arabidopsis, Lee et al. (2010) observaram atuação de ácido salicílico (AS) na sinalização de giberelina e aumento da eficiência do sistema antioxidante, que favoreceram a germinação de sementes sob esse tipo de estresse.

Observou-se em eixos embrionários de sementes braúna níveis de AS iguais ou superiores ao controle durante o tempo de exposição ao NaCl. Esse padrão pode estar relacionado a mecanismos de sinalização, como por exemplo para AS que foi superior aos três dias de embebição (Figura 8D) e enzimas do sistema antioxidante, a fim de promover a germinação mesmo sob estresse salino.

Em todas as condições testadas, nota-se que não houve acúmulo do H_2O_2 durante a embebição de sementes de braúna. A aplicação exógena de ABA inibiu o acúmulo de EROs em sementes de várias espécies como cevada (Ishibashi et al., 2012), arroz (Ye et al., 2012) e girassol (El-Maarouf-Bouteau et al., 2015). Assim, como mostrado anteriormente, a manutenção dos níveis de ABA em eixos embrionários de sementes de *M. brauna*, até os três primeiros dias de embebição, em todas as condições, e até sete dias sob estresse hídrico (Figura 8B) pode controlar a formação de EROs sob condições de estresse hídrico, diminuindo os níveis de H_2O_2 e, conseqüentemente, de MDA.

A ausência de estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio em eixos embrionários de sementes de *M. brauna* pode ser confirmado pela quantificação de MDA (Figura 10). O seu conteúdo foi decrescente ao longo do tempo de germinação para sementes de *M. brauna* em todas as condições testadas, similar ao comportamento observado para H_2O_2 (Figura 10A). O teste de identidade modelo foi aplicado, conforme sugerido por Leite e Oliveira, (2002). Foi verificado que os conteúdos de MDA em eixos embrionários de sementes de *M. brauna* embebidas em água ou submetidas a estresse hídrico e salino são iguais entre os tratamentos. Assim, foi possível gerar apenas um modelo para MDA, representando todas as condições testadas (Figura 10B).

De acordo com Munné-Bosch et al. (2011), sementes de *Vellozia alata* expostas as condições naturais de ocorrência da espécie tiveram redução drástica do conteúdo de MDA principalmente nos primeiros três meses. A germinação diminuiu pela metade nos seis primeiros meses, permanecendo constante até completar um ano. Mesmo em condições naturais, com variações ambientais ocorrendo durante todo período, os autores não observaram dano oxidativo. Os autores sugerem ainda que a ausência de peroxidação de lipídios pode ter sido evitada pela presença de tocotrienol e tocoferol, que podem atuar contra o estresse oxidativo.

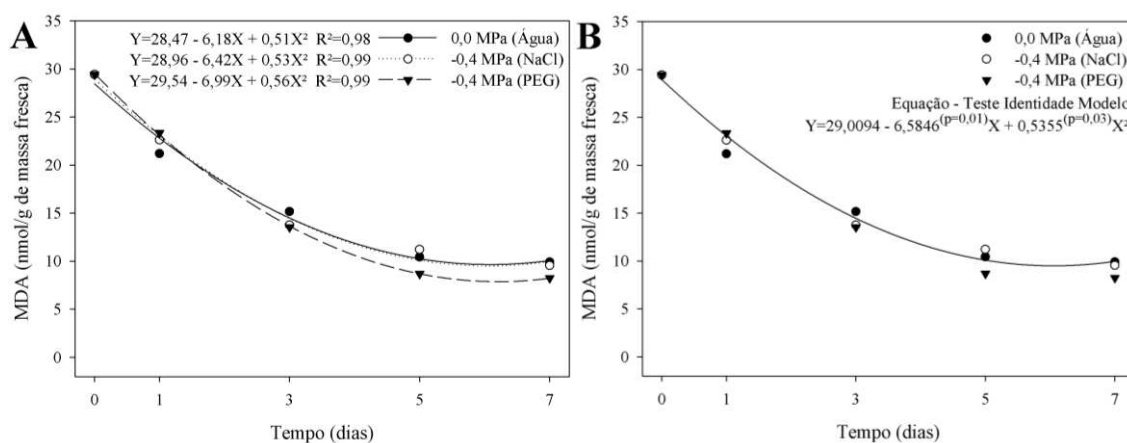


Figura 10. Conteúdo de malonaldeído (MDA) em eixos embrionários de sementes de *Melanoxylon brauna* durante a germinação em água e sob estresses hídrico e salino ao longo do tempo (A) e equação de regressão do teste de identidade modelo para MDA (B).

Chen e Arora (2011) também observaram reduções dos níveis de MDA em sementes de *Spinacia oleracea* durante germinação em água devido a atuação do sistema antioxidante. Por outro lado, Barba-Espín et al. (2011) relataram aumento da peroxidação de lipídios em sementes de *Pisum sativum* tanto na condição controle quanto em sementes embebidas em H₂O₂. Porém, estes autores não encontraram relação entre os padrões de MDA e H₂O₂.

5.6 Enzimas do sistema antioxidante

Houve aumento significativo na atividade das enzimas do sistema antioxidante ao longo do tempo de germinação sem estresse. Sob condições de estresse salino observou-se comportamento intermediário. Sob estresse hídrico as atividades das enzimas foram menores dentre os tratamentos ao longo do tempo (Figura 11). Houve diferença significativa entre os tratamentos na atividade da enzima SOD apenas no sétimo dia, sendo superior para tratamento controle, seguido do estresse salino e menor atividade foi observada para estresse hídrico (Figura 11A). A atividade da enzima CAT foi estatisticamente superior em eixos embrionários de sementes embebidas em água a partir do quinto dia, seguido pelo estresse salino, e com valores menores para estresse hídrico (Figura 11B). A atividade da enzima APX foi superior estatisticamente em eixos embrionários de sementes embebidas em água e estresse salino no quinto dia quando comparado com estresse hídrico. Já no sétimo dia foi possível estratificar os

tratamentos, sendo que a atividade foi superior no tratamento controle, seguido pelo estresse salino, e por último sob estresse hídrico (Figura 11C). Estatisticamente, a atividade da enzima POX foi superior em eixos embrionários de sementes embebidas em água, seguido pelo estresse salino, e por último sob estresse hídrico a partir do quinto dia de embebição (Figura 11D).

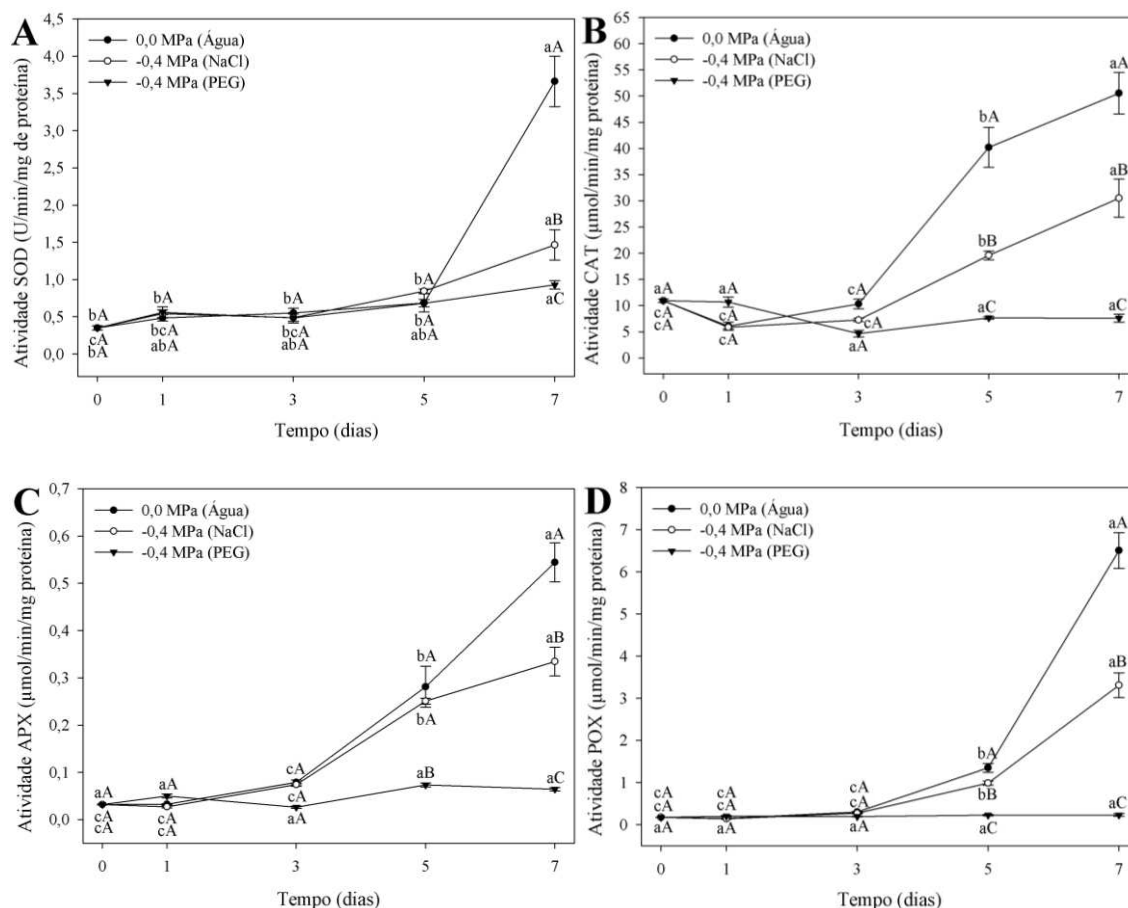


Figura 11. Atividade das enzimas SOD (A), CAT (B), APX (C) e POX (D) em eixos embrionários de sementes de *Melanoxylon brauna* durante a germinação em água e sob estresses hídrico e salino ao longo do tempo. Médias seguidas por mesma letra minúscula ao longo do tempo e maiúscula entre os tratamentos não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Plantas sob condições normais de crescimento e principalmente expostas a estresses abióticos, causadas por temperatura, metais pesados, deficiência de nutrientes, salinidade e seca podem aumentar a formação de EROs (Apel e Hirt, 2004; Mittler et al., 2004; Gill e Tuteja, 2010; Miller et al., 2010). Para evitar que estas moléculas se acumulem nas células e causem danos oxidativos, as plantas possuem sistema de defesa antioxidante (Mittler et al., 2004; Bailly et al., 2008). Existem também mecanismos

antioxidantes não enzimáticos, tais como vitamina C, vitamina E, glutathione, tocoferol, flavonoides, alcaloides e carotenoides capazes de regular os níveis de EROs (Apel e Hirt, 2004; Miller et al., 2010; Das e Roychoudhury, 2014). Entretanto, não houve aumento das atividades das enzimas SOD, CAT, APX e POX em eixos embrionários de sementes de *M. brauna* sob condições de estresse hídrico. Nesta condição foi possível observar a manutenção de altos níveis de ABA durante a exposição a solução de PEG. De forma similar, durante embebição de sementes em ABA, foi observada redução da expressão de proteínas relacionadas ao sistema antioxidante, como para CAT em *Arabidopsis thaliana* (Chibani et al., 2006) e para APX em eixos embrionários de *Fagus sylvatica* (Pawłowski, 2007) e embriões de *Oryza sativa* (Kim et al., 2008).

Para estresse salino a atividade das enzimas do sistema antioxidante foi reduzida quando comparada com a condição controle. Em condições de estresse salino e hídrico esperava-se que os níveis de MDA e EROs fossem elevados em eixos embrionários de *M. brauna*, e conseqüentemente, a atuação das enzimas do sistema antioxidante fosse efetiva no controle dos possíveis danos oxidativos. Sob estresse hídrico, condição em que a germinação foi nula, outros mecanismos podem reduzir os níveis de MDA e EROs, já que a atividade enzimática foi mantida a níveis reduzidos. Por outro lado, sob estresse salino observa-se atuação das enzimas do sistema antioxidante, assim como observado para sementes embebidas em água. Além disso, neste trabalho foi possível observar a tolerância de sementes de *M. brauna* a altas concentrações de NaCl, sendo que as enzimas do sistema antioxidante podem compor os mecanismos de tolerância referentes ao estresse salino. Para que ocorra a germinação e o estabelecimento das mudas, é necessário a atuação do sistema antioxidante robusto e integrado, capaz de reduzir possíveis danos oxidativos durante o crescimento, o estabelecimento da muda, em resposta ao estresse e relacionado também ao potencial de reparo e ao desenvolvimento de organelas (Bailly, 2004; Ma et al., 2007; Chen e Arora, 2011).

SOD atua na primeira linha de defesa contra EROs, na conversão de $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 (Mittler et al., 2004; Gill e Tuteja, 2010; Halliwell e Gutteridge, 2015). Porém, nem sempre está diretamente relacionada a resposta ao estresse, como observado por Chen e Arora (2011) para *Spinacia oleracea*. Estes autores verificaram que a atividade da enzima SOD diminuiu durante a germinação em condições controle, sob desidratação e sob estresse por frio. Por outro lado, as atividades das enzimas CAT e APX aumentaram durante a germinação sem estresse, assim como observado para eixos embrionários de *M. brauna*. Borges et al. (2015a) relataram aumento das atividades das enzimas SOD e POX em eixos isolados de *M. brauna* submetidos a embebição em

água. Em sementes de *Zea mays* sob desidratação houve redução da atividade de SOD durante a germinação (Huang et al., 2012). Para *Medicago truncatula*, também houve aumentos nas expressões dos genes SOD e APX durante as fases iniciais da embebição (Balestrazzi et al., 2011). Em sementes armazenadas de *M. brauna*, o aumento do teor de água durante o armazenamento de sementes reduziu a atividade de SOD e CAT ao longo do tempo (Borges et al., 2015b). Além disso, a peroxidação de lipídios não foi alterada ao longo do tempo. Assim, outros mecanismos podem estar envolvidos em sementes da espécie para evitar danos oxidativos em diversas condições ambientais já testadas. Estes resultados estão de acordo com a redução de MDA em eixos embrionários de *M. brauna* durante a germinação sob condições do tratamento controle, estresse salino e hídrico, como discutido anteriormente.

CAT, APX e POX atuam na conversão de H_2O_2 em H_2O , sendo que CAT apresenta a maior taxa de conversão por minuto entre as demais (Mittler et al., 2004; Gill e Tuteja, 2010; Halliwell e Gutteridge, 2015). Houve redução da enzima CAT em eixos embrionários isolados de sementes de *M. brauna* durante as primeiras 24 horas de embebição em água (Borges et al., 2015a). Fatores de transcrição, como WRKY, atuam em resposta ao estresse (Nam et al., 2017). A superexpressão de NbWRKY79 em plantas transgênicas de *Nicotina benthamiana* teve efeito positivo sob a tolerância ao estresse salino, sendo que houve aumento da atividade das enzimas SOD, CAT, APX e POX. O condicionamento de sementes de *Vigna radiata* com NaCl foi avaliado em condições de estresse hídrico e salino (Jisha e Puthur, 2013). Para *V. radiata* variedade Pusa Vishal as mudas oriundas do condicionamento fisiológico tiveram maior atividade da enzima peroxidase, sendo relacionado à tolerância ao estresse abiótico. Em condições sem estresse houve aumento da enzima CAT durante a germinação de sementes de *Hordeum vulgare* (Potokina et al., 2012) e *Triticum aestivum* (Cakmak et al., 1993). Fercha et al. (2016), a partir da análise proteômica de eixos embrionários de *Glycine max* durante a germinação sob estresse salino, verificaram aumentos de compostos antioxidantes, como a SOD, a glutathione transferase e a aldose redutase. Em transgênicos de *Nicotina tabacum* com o gene StAPX a superexpressão do gene StAPX aumentou a germinação, a atividade de APX, a redução de H_2O_2 e o aumento das taxas fotossintéticas e do crescimento das plantas sob condições de estresse hídrico e salino (Sun et al., 2010). De forma geral, nota-se que a atividade enzimática em eixos de *M. brauna* não responde de forma positiva ao estresse hídrico. Para o tratamento controle e sob estresse salino, condições nas quais foi possível observar germinação de sementes de *M. brauna*, a atuação conjunta das enzimas SOD, CAT, APX e POX é essencial para

germinação de sementes, sendo que a partir da protrusão radicular a atividade foi ainda maior. Assim, esta retomada da atividade enzimática pode estar envolvida na proteção para as plântulas, que estarão expostas a diversas condições ambientais, podendo assim preparar o sistema de defesa mais eficiente durante os próximos estádios de desenvolvimento.

Avanços recentes sobre o entendimento da regulação e da sinalização evidenciam a importância das EROs nos diferentes processos fisiológicos no ciclo de vida de uma semente, como bem discutido nos trabalhos de Bailly et al. (2008), Barba-Espín et al. (2011), Diaz-Vivancos et al. (2013), El-Maarouf-Bouteau et al. (2015), Verma et al. (2015) e Wojtyla et al. (2016). Da mesma forma, a regulação de fitohormônios é essencial para inúmeros processos durante o ciclo de vida das plantas, principalmente durante o controle da germinação, da dormência e em condições de estresse (Nonogaki et al., 2010; Bewley et al., 2013; Llanes et al., 2016). Assim, ABA parece ter papel fundamental no controle da germinação de sementes de *M. brauna*. Os níveis de ABA mantiveram-se elevados até os três primeiros dias de embebição em todas as condições testadas. A manutenção dos níveis de ABA pode sinalizar para redução das EROs como observado por Ishibashi et al. (2012), Ye et al. (2012), Lariguet et al. (2013) e El-Maarouf-Bouteau et al. (2015) e ativar os mecanismos de defesa antioxidante, como o aumento da atividade de catalase em sementes de *Hordeum vulgare* (Bahin et al., 2011). Neste sentido, a partir dos três dias de embebição sob estresse hídrico, os níveis de ABA são mantidos elevados, o que mantém a redução dos níveis de H₂O₂ e MDA até o sétimo dia. E assim, não sendo necessário a ativação do sistema antioxidante. Porém, durante a embebição em água e estresse salino, ocorrem reduções dos níveis de ABA e ao mesmo tempo aumentos das atividades da CAT, da APX, da POX e da SOD de forma mais tardia no quinto dia. Estes resultados indicam que até os três primeiros dias o controle dos níveis de H₂O₂ e MDA é regulado por ABA. A partir deste ponto, após redução dos níveis de ABA, o sistema antioxidante se encarrega de controlar os níveis de H₂O₂ e MDA até o sétimo dia, controlando possíveis danos oxidativos.

5.7 Análise proteômica

Foram realizadas análises comparativas do perfil de proteínas presentes em eixos embrionários de sementes de *M. brauna* sem embebição (sementes secas-controle),

embebidas em água, em solução osmótica induzida por NaCl (-0,4 MPa) e em solução osmótica induzida por PEG (-0,4 MPa) por 3, 5 e 7 dias, totalizando 10 tratamentos.

A comparação entre os 10 tratamentos revelou que 64 proteínas foram significativamente diferentes em abundância (% de volume normalizado, $p \leq 0,05$ de acordo com a ANOVA e pelo menos 3,5 x de diferença com relação ao controle), as quais foram excisados dos géis 2-DE (Figura 12) e analisados por espectrometria de massa (MALDI-TOF-TOF MS/MS).

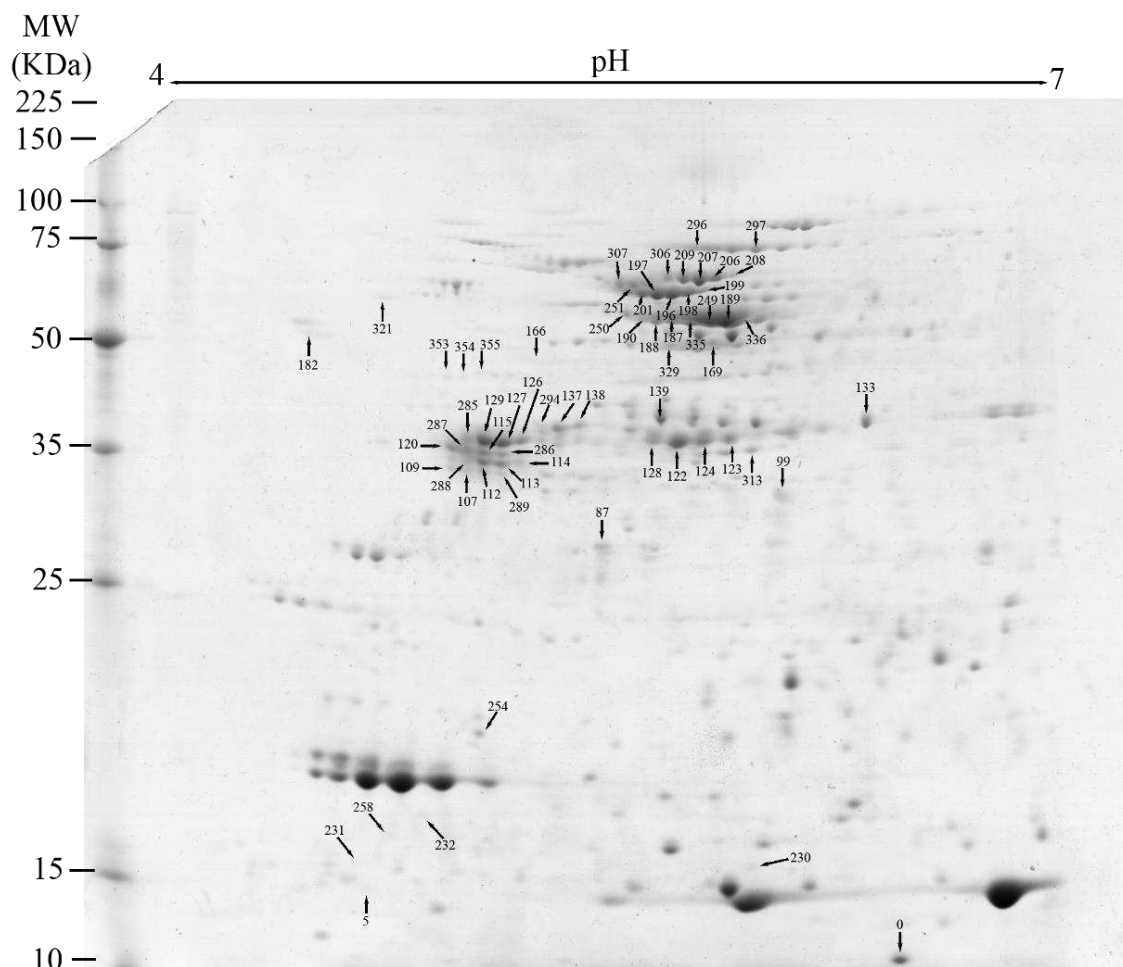


Figura 12. Imagem de um gel 2-DE representativo de proteínas de eixos embrionários de sementes de *Melanoxylon brauna*, mostrando a posição dos 64 spots excisados para análise de espectrometria de massa (MALDI-TOF-TOF MS/MS).

Foram identificados nove spots a partir dos espectros obtidos. Liu et al. (2009) também tiveram baixa cobertura na identificação de proteínas extraídas de embrião e endosperma de sementes de *Jatropha curcas* usando MADI-TOF-MS e José et al. (2011) em sementes de *Magnolia ovata*. Balbuena et al. (2011b) destacam que em tecidos de espécies tropicais são frequentemente encontrados elevados níveis de

metabólitos secundários, principalmente compostos fenólicos (Carpentier et al., 2005) e parede celular rica em carboidratos, fatos que podem interferir na eletroforese.

Dentre os 64 spots, 10 deles (15,6%) foram positivamente regulados durante a embebição em água, nenhum exclusivo para estresse salino, 4 spots (6,3%) positivamente regulados para sementes secas e estresse hídrico, 2 spots (3,1%) regulados positivamente durante a embebição em água e estresse salino e 48 spots (75%) regulados positivamente em sementes secas e durante estresse hídrico e salino. As proteínas identificadas são apresentadas com suas respectivas abundâncias na figura 13. Os spots foram associados estatisticamente com a entrada no banco de dados Uniprot (Tabela 3). As abundâncias dos spots não identificados são apresentadas nas figuras 14, 15, 16 e 17 do Anexo.

O spot 133 (*Phosphoglycerate kinase*) manteve a abundância até o terceiro dia de embebição em água e redução significativa durante o restante do tempo de germinação. Sob condições de estresses salino e hídrico houve manutenção da abundância de proteína durante o tempo de germinação, sendo iguais ao tratamento controle (sementes secas). Estes resultados coincidem com o atraso da hidratação das sementes encontrado nas curvas de embebição em PEG e em NaCl, representadas pelas figuras 1 e 2. A abundância da proteína PGK, encontrada em níveis superiores em sementes seca e sob condições de estresse, sugere que a glicólise ainda não foi completada, mantendo os níveis elevados até que a condição ambiental seja favorável para a germinação. Para a embebição em água, houve redução de PGK no momento da protrusão radicular, indicando que o fornecimento de energia foi eficiente, promovendo a germinação.

O início da embebição de sementes é acompanhado pela ativação de rotas respiratórias, tais como glicólise, via das pentoses-fosfato e ciclo do ácido cítrico (Bewley et al., 2013). Durante a glicólise, a primeira reação de formação de ATP, através da transferência do grupo fosforil de 1,3-bifosfoglicerato para o ADP, é mediada pela enzima fosfoglicerato quinase, na qual forma ATP e 3-fosfoglicerato (Taiz e Zeiger, 2013; Zeeman, 2015).

Desta forma, fosfoglicerato quinase (PGK) tem papel fundamental no fornecimento de energia na forma de ATP durante a glicólise para a retomada do crescimento de eixos embrionários de *M. brauna*. Em eixos embrionários de sementes secas foi possível observar abundância de PGK. De forma similar, esta enzima foi encontrada em eixos embrionários de sementes secas de *Oryza sativa* (Han et al., 2014), *Acer pseudoplatanus* (Pawłowski e Staszak, 2016) e em *Arabidopsis thaliana*

(Weitbrecht et al., 2011). Estes autores afirmam que enzimas relacionadas à glicólise são originadas através da tradução durante a fase de maturação, sendo degradadas após a embebição, justificando a presença de PGK em sementes secas. Assim como neste trabalho, durante a embebição de sementes em água a abundância foi mantida até o terceiro dia, ponto que antecede a protrusão radicular. A partir do quinto dia ocorre redução significativa até o sétimo dia. O embrião obtém energia principalmente através da glicólise, que ocorre nas fases iniciais da embebição, sendo que após a germinação o consumo de reservas diminui, reduzindo também a glicólise (Han et al., 2014; He et al., 2015).

Sob estresses hídrico e salino houve manutenção da abundância de PGK durante todo o tempo. Sob condições de estresse ocorreu inibição temporária da atividade da enzima, bloqueando a rota da glicólise. Por outro lado, sob estresse hídrico a germinação não ocorre, sugerindo que a retomada do crescimento de eixos embrionários de *M. brauna* pode ser relacionada com alguns fatores, como a sinalização de ABA. A aplicação exógena de ABA induziu a atividade de enzimas glicolíticas, como frutose-bifosfato aldolase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase em sementes de *Arabidopsis thaliana* (Chibani et al., 2006) e a fosfoglicerato quinase em sementes de *Fagus silvatica* (Pawłowski, 2007).

Para outras enzimas relacionadas ao fornecimento de energia como 6-fosfogluconato desidrogenase, relacionada com a via das pentoses-fosfato, foram observadas aumento da abundância desta proteína sob estresse osmótico em sementes de *Pisum sativa*, sendo que esta enzima pode estar relacionada com a regulação desta via sob condições de estresse (Brosowska-Arendt et al., 2014). Pawłowski e Staszak (2016) observaram redução da enzima fosfoglicerato quinase em eixos embrionários de sementes de *Acer pseudoplatanus* embebidas em solução de ABA quando comparada com embebição em água e giberelina. Diante disso, a glicólise e o padrão de ação desta enzima variam de acordo com os diferentes estresses e espécies (Tan et al., 2013).

Tabela 3. Identificação de proteínas de eixo embrionário de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ou não aos estresses hídrico e salino. As proteínas foram separadas por eletroforese bidimensional, identificadas por MALDI TOF/TOF, algoritmo MASCOT e software SCAFFOLD.

Spot	Nome da Proteína / (Organismo)	Banco de dados / Entradas	Número de acesso	Score de identificação (MS/MS)	Prob. (1)	Cobertura da sequência (%)	Teórico		Experimental		NPIV (3)	Sequência dos peptídeos	Prob. (2)
							Massa molecular (kDa)	Ponto isoelétrico	Massa molecular (kDa)	Ponto isoelétrico			
133	Phosphoglycerate kinase [<i>Glycine soja</i>]	Uniprot / Viridiplantae	A0A0B2QJ60	168	100%	9	42,366	6,28	36,006	6,36	2	(K)LVAQLPEGGVLLLENVR(F)	99%
												(K)LASLADLYVNDAFGTAHR(A)	98%
139	Alpha-L-arabinofuranosidase-like protein [<i>Medicago truncatula</i>]	Uniprot / Fabaceae	G7L4R6	48	92%	2	71,420	6,53	37,041	5,70	1	(K)SGGILGSSQIHK(R)	92%
196	Uncharacterized protein [<i>Cucumis sativus</i>]	Uniprot / Viridiplantae	A0A0A0L4Q9	60	92%	1	113,608	8,43	54,614	5,73	1	(R)LVGFGINAENNK(R)	92%
197	Uncharacterized protein [<i>Cucumis sativus</i>]	Uniprot / Viridiplantae	A0A0A0L4Q9	60	93%	1	113,608	8,43	54,463	5,69	1	(R)LVGFGINAENNK(R)	93%
201	Uncharacterized protein [<i>Cucumis sativus</i>]	Uniprot / Viridiplantae	A0A0A0L4Q9	60	93%	1	113,608	8,43	55,220	5,64	1	(R)LVGFGINAENNK(R)	93%
207	Uncharacterized protein [<i>Cucumis sativus</i>]	Uniprot / Viridiplantae	A0A0A0L4Q9	61	93%	1	113,608	8,43	58,674	5,82	1	(R)LVGFGINAENNK(R)	93%
209	Uncharacterized protein [<i>Cucumis sativus</i>]	Uniprot / Viridiplantae	A0A0A0L4Q9	64	95%	1	113,608	8,43	58,836	5,77	1	(R)LVGFGINAENNK(R)	95%
249	Annexin [<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i>]	Uniprot / Viridiplantae	A0A103ST37	61	95%	5	28,929	6,79	50,975	5,85	1	(K)QLKEEEEEQQWR(H)	95%
251	Uncharacterized protein [<i>Cucumis sativus</i>]	Uniprot / Viridiplantae	A0A0A0L4Q9	57	90%	1	113,608	8,43	56,452	5,61	1	(R)LVGFGINAENNK(R)	90%

Legenda: (1) Probabilidade de identificação para proteína (Scaffold); (2) Probabilidade de identificação para peptídeo (Scaffold); (3) NPIV – Número de peptídeos identificados e validados (Scaffold).

Para o spot 139 (*α -L-arabinofuranosidase-like protein*) houve a manutenção da abundância da proteína até o terceiro dia de embebição de sementes em água e a redução significativa durante o restante do tempo de germinação. Sob condições de estresse salino a abundância foi mantida até o quinto dia, sendo que no sétimo dia houve redução significativa. Em condição de estresse hídrico a abundância de proteína foi mantida constante ao longo do tempo de germinação, sendo igual ao tratamento controle (sementes seca).

Para que ocorra a protrusão radicular é necessário que ocorra aumento do crescimento potencial do eixo embrionário e redução da resistência mecânica dos tecidos circundantes da semente. Além disso, a atividade de enzimas capazes de atuar na modificação de parede celular do eixo embrionário e na ponta da radícula para que ocorra expansão celular, no endosperma lateral e na região micropilar, para reduzir a resistência dos tecidos envoltórios é fundamental para garantir a germinação (Bewley et al., 2013). Para sementes de braúna, Borges et al. (2015a) relataram vários mecanismos que atuam para o crescimento do eixo embrionário, como a atividade de enzimas poligalacturonase e pectina metilesterase, paralelamente com incremento da massa fresca e do comprimento do eixo embrionário. Juntamente com estas modificações, estes autores observaram enfraquecimento da região micropilar após 24 horas de embebição.

A parede celular primária de células vegetais é constituída por microfibrilas de celulose, (1 \rightarrow 4)- β -D-glucano, inseridas em uma matriz de polissacarídeos, proteínas estruturais, fenilpronanóides e uma zona de junção com cálcio. Essa matriz é composta por hemiceluloses (xiloglucano, xilano, glucomanano, arabinoxilano e calose) que se ligam à celulose. As pectinas (homogalacturonano, ramnogalacturonano, arabinano, galactano e arabinogalactano) formam a fase gel onde está inserida a rede celulose-hemicelulose. Entre os polissacarídeos pécnicos, um dos mais abundantes é o ramnogalacturonano I (RG I), que transporta cadeias longas e curtas de arabinanos, galactanos e arabinogalactanos ligados à resíduos de ramnose. (Wolf et al., 2012; Taiz e Zeiger, 2013; Carpita et al., 2015). Em arabinoxilano ou arabinano são encontrados L-arabinofuranoses como substituintes da cadeia lateral (Gomez et al., 2009). Arabinano (L-arabinose) está presente na parede celular de endosperma de sementes de *Arabidopsis thaliana* e *Lepidium sativum* (Minic et al. 2006; Lee et al. 2012). Para que ocorra a hidrólise da cadeia desses polissacarídeos é necessário que a enzima α -L-arabinofuranosidase atue na clivagem de terminações não redutores de α -L-

arabinofuranosil e, juntamente com α -L-arabinanase, complete a degradação (Minic et al., 2006).

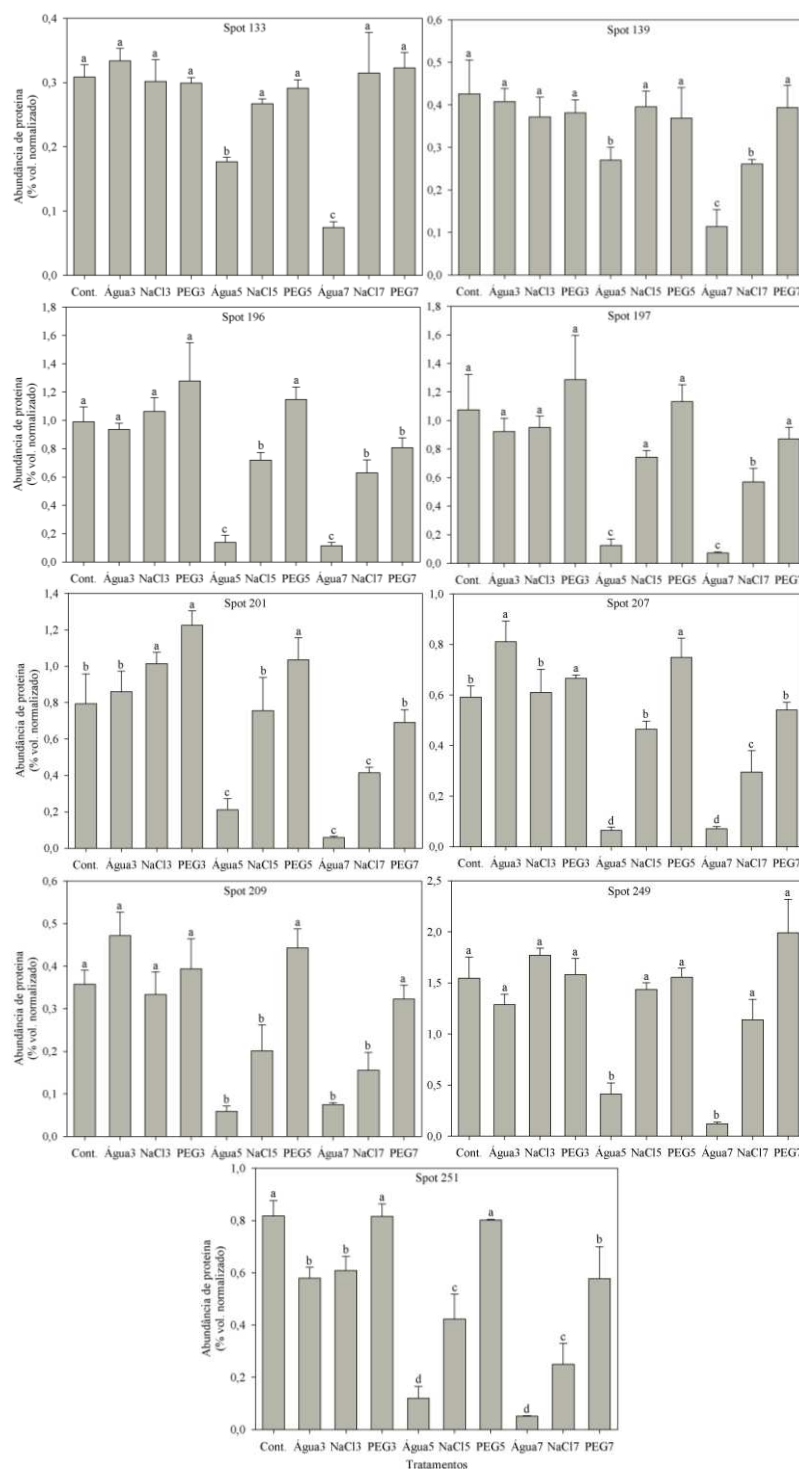


Figura 13. Quantidade de proteína (% volume normalizado) associada com os *spots* identificados (133, 139, 196, 197, 201, 207, 209, 249 e 251) e que tiveram maior diferença de abundância entre sementes secas (controle) e as sementes submetidas a embebição em água e sob estresse salino e hídrico por 3, 5 e 7 dias. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

A atividade de α -L-arabinofuranosidase no endosperma micropilar, envolvida no enfraquecimento do tecido, e na radícula, participa do alongamento celular em sementes de *Lactuca sativa* (Liu et al., 2015). Estes mesmos autores verificaram a atividade desta enzima em sementes secas, o que sugere que ela pode atuar nas fases iniciais da germinação, já que houve aumento da atividade e da abundância de genes que codificam esta enzima (LsARAF2 e LsARAF7) antes da protrusão radicular e redução após a germinação.

A atuação de α -L-arabinofuranosidase em eixos embrionários de *M. brauna* ocorre de forma similar à descrita por Liu et al. (2015). A abundância da proteína em eixos embrionários de sementes secas sugere a regulação desta enzima nas fases iniciais da germinação. Além disso, durante a embebição em água, a abundância foi mantida até o terceiro dia, ponto que antecede a protrusão radicular. Assim, a enzima atuou de forma efetiva na hidrólise de polissacarídeos presentes no eixo embrionário, facilitando o enfraquecimento da parede celular, o que facilitou a expansão celular e, conseqüentemente, a retomada da expansão do eixo embrionário.

O comportamento sob estresse salino foi similar quando comparado com a embebição em água, porém, com atraso na redução da abundância da proteína, coincidindo com a germinação nesta condição, já que houve retardo da germinação. O aumento dos níveis de pectina em cultivar de soja tolerante ao sal quando comparado com a cultivar sensível, sugere-se que esta resposta é positiva para crescimento radicular sob estresse salino (An et al., 2014). Em contrapartida, sob estresse hídrico, houve manutenção da abundância da proteína em eixos embrionários de sementes de *M. brauna* durante os setes dias de embebição. Desta forma, a atividade constante de α -L-arabinofuranosidase em eixos embrionários de *M. brauna* sob estresse hídrico sugere proteção celular, relacionada à regulação osmótica e ao controle do crescimento.

Os spots 196, 197, 201, 207, 209 e 251 foram identificados como *Uncharacterized protein*, porém com função molecular referente a reserva nutricional. A partir da ferramenta BLAST do site Uniprot, foi encontrada proteína similar à *conglutin beta 5 (Cucumis melo)*, com 75,8% de identidade, sendo esta uma proteína de reserva. De maneira geral, houve manutenção da abundância até o terceiro dia e redução significativa destes spots a partir deste ponto para embebição em água. Por outro lado, sob condição de estresse hídrico, a manutenção da abundância de proteína, foi semelhante ao tratamento controle (sementes secas). Sob condição de estresse salino, o comportamento foi intermediário, sendo que a redução foi significativa, porém com redução mais gradativa ao longo do tempo quando comparada com sementes embebidas

em água. Estes resultados confirmam que a abundância destas proteínas está relacionada ao atraso da hidratação das sementes, encontrado nas curvas de embebição em PEG e em NaCl, representadas pelas figuras 1 e 2. Logo, a abundância da proteína está relacionada à disponibilidade hídrica de cada tratamento.

Durante a germinação de sementes de *M. brauna* em água, a abundância de conglutina em eixos embrionários decresce durante o tempo. Entre o terceiro e quarto dia de embebição ocorre o início da protrusão radicular, sendo que a partir do quinto dia a abundância decresceu significativamente, sugerindo que as reservas do eixo embrionário foram utilizadas, acumuladas durante as fases de desenvolvimento das sementes. A partir deste ponto a fonte de aminoácidos provem dos cotilédones. A mobilização de reservas ocorre de forma ordenada pelo tempo e espaço, sendo essencial para a biossíntese de metabólitos energéticos durante a germinação (Gu et al., 2016). Durante o estresse salino, o comportamento foi similar, porém, como ocorre atraso na germinação o consumo de conglutinas é menos efetivo quando comparado com a água. Em contrapartida, sob estresse hídrico ocorre manutenção da abundância de conglutina, sendo então inibida nesta condição.

A ocorrência de múltiplos *spots* relacionados à mesma proteína, principalmente proteínas de reserva como vicilina, legumina, cruciferina, globulina, entre outras formas, é relatada em vários trabalhos de análise proteômica em sementes (José et al., 2011; Balbuena et al., 2011a; Huang et al., 2012; Martins et al., 2016; Gu et al., 2016). Todos estes autores relatam que modificações pós-transducionais podem gerar novos *spots*, podendo alterar o ponto isoelétrico, tamanho e a massa destas proteínas. Balbuena et al. (2011a) refere-se também à possibilidade de existência de isoformas de vicilina e ao catabolismo de proteínas. Além disso, nota-se variação dos pontos isoelétricos (PI) e massas moleculares destas proteínas (Tabela 3). Esta variação também verificada por Martins et al. (2016), ocorre devido a proteólise de proteínas ou ao *splicing* alternativo (Gallardo et al., 2002; Farinha et al., 2011). Além disso, a heterogeneidade da composição de vicilinas pode ser devido às diferentes subunidades que as formam (O’Kane et al., 2004). Outro fator referente às variações entre massa molecular teórica e prática é a possibilidade da proteína identificada pelo banco ser apenas um fragmento de proteína, como é o caso da proteína annexina, identificada neste trabalho.

As conglutinas são membros da família das vicilinas ou 7S globulinas, presentes em várias espécies de Fabaceae, representam uma das mais abundantes e principais fontes de reservas em sementes de dicotiledôneas (Duranti e Gius, 1997; Sheoran et al., 2005; Foley et al., 2015). Proteínas de reserva em sementes tem papel fundamental

durante a germinação e o estabelecimento de plântulas, como fonte de aminoácidos e nitrogênio (Yacoubi et al., 2011). Os aminoácidos são destinados ao desenvolvimento do eixo embrionário e utilizados para síntese de outras enzimas e proteínas estruturais, sendo que a mobilização de reservas pode ser alterada de acordo com as flutuações ambientais (Tan et al., 2013). Em condições de estresse, há aumento da abundância de proteínas de reserva, como legumina para sementes dormentes de *Arabidopsis thaliana* (Chibani et al., 2006) e vicilina e globulina para sementes de *Zea mays* submetidas à dessecação (Huang et al., 2012). Segundo os autores há redução de enzimas proteases, responsáveis pelo metabolismo de proteína e responsivas ao estresse biótico e abiótico.

Para o spot 249 (*Annexin*) houve manutenção da abundância de proteína até o terceiro dia de embebição de sementes em água e redução significativa durante o restante do tempo de germinação. Sob condições de estresse salino e hídrico a abundância de proteína foi mantida constante ao longo do tempo de germinação, sendo semelhante ao tratamento controle (sementes seca).

Anexinas são proteínas capazes de interagir de forma seletiva e não covalente com fosfolipídios, na presença de íons de cálcio (Ca^{2+}) e estão presentes em todos os eucariotos (Gerke et al. 2005; Clark et al., 2012). Apresenta multifunções celulares como divisão celular, transporte celular, interações entre membranas, endo e exocitose, reparo de membrana, sinalização celular para diversos processos de crescimento, desenvolvimento e em resposta a diferentes estresses (Mortimer et al., 2008; Konopka-Postupolska, et al., 2011; Clark et al., 2012). Na associação com membranas plasmáticas as anexinas têm a capacidade de serem solúveis, periféricas e integrais (Ladokhin e Haigler, 2005). Podem ainda ser encontradas em diversos compartimentos celulares, como o cloroplasto, a parede celular, no complexo de golgi, nas mitocôndrias, no núcleo celular, no peroxissomo, nos retículos endoplasmático rugoso e liso e no vacúolo (Mortimer et al., 2008).

Acúmulo de EROs pode causar danos oxidativos em membranas (peroxidação de lipídios), proteínas e DNA (Mittler, 2002; Apel e Hirt, 2004; Foyer e Noctor, 2005). Sob estresses hídrico e salino ocorrem a produção de EROs e, conseqüentemente, aumento da peroxidação de lipídios (Neill et al. 2002). A membrana plasmática pode ser uma fonte de EROs por meio do NADPH oxidase, na qual produz ânion superóxido pela transferência de elétrons de NADPH citoplasmático para oxigênio, sendo dismutado posteriormente em H_2O_2 e O_2 (Marino et al., 2012). Anexina forma canais de cálcio que são ativados pelos níveis extracelulares de EROs (Konopka-Postupolska et al., 2009; Laohavisit et al., 2010; Laohavisit et al., 2012). Além disso, anexina pode ter

papel na modulação de H₂O₂ via sistema antioxidante, por meio do aumento da atividade das enzimas SOD e CAT e por proteínas dependentes de cálcio (CDPK24), em resposta ao estresse abiótico (Qiao et al., 2015). De forma a evitar o estresse oxidativo, anexinas também têm atividade similar à enzima peroxidase, que atua na manutenção dos níveis de H₂O₂ (Gorecka et al., 2005; Clark et al., 2012)

Eixos embrionários de sementes secas de *M. brauna* possuem abundância de anexina. Após embebição em água a manutenção de anexina ocorreu até o terceiro dia, com redução posterior. Ela atua no controle dos níveis de EROs nas fases iniciais da germinação, principalmente antes da protrusão radicular, até que o sistema de defesa antioxidante seja ativado, como indicado pela redução dos níveis de H₂O₂ e MDA e aumento das enzimas SOD, CAT, APX e POX após a embebição de sementes. Semelhante à *M. brauna*, Han et al. (2014) detectaram abundância de anexina em sementes secas de *Oryza sativa* e posterior redução durante a germinação de sementes. Por outro lado, em condições de estresses hídrico e salino houve manutenção da abundância de anexina em eixos embrionários de *M. brauna*. Sugere-se que a exposição de sementes ao estresse hídrico e salino pode gerar produção de EROs. Porém, como o sistema de defesa antioxidante não é ativado, os níveis de anexina são mantidos elevados para manter a homeostase celular desde o início da embebição, prevenindo o estresse oxidativo. Fato que pode ser confirmado pelos níveis de H₂O₂ e MDA, que reduziram sob condições de estresse hídrico e salino. Desta forma, anexina pode ter papel fundamental no controle de EROs, sendo importante na sinalização celular durante a germinação e em resposta ao estresse hídrico e salino. Yan et al. (2016) estudaram a expressão de quatro genes de anexina (BrANNEXIN) durante a germinação de sementes de *Brassica rapa* submetidas a estresse térmico, frio, ABA, NaCl, PEG e desidratação, havendo regulação positiva em todas as condições testadas, sendo que BrANNEXIN2 e 4 tiveram aumento da expressão em todas as condições testadas, sugerindo que anexinas tem papel importante na adaptação de plantas frente as variações ambientais.

Em plantas transgênicas de *Solanum tuberosum*, a expressão do gene STANN1 sinalizou a relação entre o cálcio e as EROs, podendo classificar a anexina como uma nova ferramenta para ser introduzida no melhoramento genético de plantas a fim de aumentar a tolerância ao estresse abiótico (Szalonek et al., 2015). Xu et al. (2016) também identificaram a expressão de genes de anexina em *T. aestivum*, *T. urartu*, *A. tauschii* and *H. vulgare* juntamente com elementos cis, como DRE e ABRE, envolvidos na regulação de estresse abiótico, induzidos por PEG, ABA, NaCl e frio.

Sob condições de estresse hídrico ou após aplicação de ABA, ocorreu a superexpressão do gene *AnnAt1* em *Arabidopsis thaliana*, conferindo maior tolerância ao estresse, sendo importante mecanismo de resposta aos estímulos ambientais. Já para mutantes de *AnnAt1* ocorreu sensibilidade das plantas ao estresse (Konopka-Postupolska et al., 2009). Sementes de linhas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* (*35S:AnnAt4*) tiveram maiores taxas de germinação do que de plantas do tipo silvestre, mutantes simples (*annAt1* e *annAt4*) ou duplos mutantes (*annAt1annAt4*) quando submetidas ao estresse salino (NaCl) ou exposição ao ABA, sugerindo ação cooperativa de *AnnAt1* e *AnnAt4* na resposta ao estresse (Huh et al., 2010). Zhang et al. (2014) relataram a superexpressão do gene *GhAnn1* em plantas transgênicas de *Gossypium hirsutum* submetidas à exposição ao ácido salicílico, metil jasmonato, ABA, PEG, NaCl e H₂O₂. Estes autores sugerem relação entre a anexina e os fitohormônios em resposta a múltiplos estresses, aumentando a tolerância das plantas à seca e à salinidade, visto que tais respostas evitaram o estresse oxidativo pela redução dos níveis de MDA e promoveram o acúmulo de prolina e de açúcares, importantes reguladores do controle osmótico.

A partir da correlação de Spearman entre as variáveis testadas, sugere-se a integração de rotas durante a germinação de sementes de braúna sem estresse ou em sob estresse hídrico e salino (Tabelas 4, 5 e 6 - Anexo 1). Todas as proteínas identificadas foram responsivas principalmente ao estresse hídrico, sendo possível usá-las como marcadores em resposta ao estresse em sementes de braúna. Destaca-se a anexina, proteína multifuncional que tem atuação importante na tolerância às variações ambientais. Assim, pode desempenhar papel chave na sinalização e regulação de tolerância ao estresse em eixos embrionários de *M. brauna*. Entre os fitohormônios, ABA é uma molécula também multifuncional presente em eixos embrionários de *M. brauna*, principalmente em resposta ao estresse hídrico, sugerindo que o ABA pode cooperar com as rotas de várias proteínas identificadas na regulação do crescimento e em resposta ao estresse, como anexina, sendo fundamental na sinalização e sobrevivência de sementes de braúna sob estresse.

Nota-se a integração de diferentes mecanismos envolvidos durante a germinação. Para EROs, ABA, AIA, PGK, α -L-arabinofuranosidase, conglutina e anexina, em condições sem estresse, a regulação é coordenada por mecanismos pré-formados. Após a mobilização de reservas, as modificações de parede, a divisão e a expansão celular, que são reduzidos/desativados durante a embebição até a protrusão radicular, a fase de transição entre semente e plântula é mediada pela atividade de

enzimas do sistema antioxidante e pelo ACC. Já sob estresse hídrico, ABA, AIA e AS juntamente com PGK, α -L-arabinofuranosidase, conglutina e anexina fazem a regulação de funções como a divisão celular, fornecimento de energia, modificações de parede, mobilização de reservas e sinalização para controle dos níveis de EROs e manutenção do redox celular sob estresse. Em algum momento destas rotas ocorre a interrupção de um dos reguladores destas rotas, evitando que o eixo embrionário cresça em condições de estresse. Sob estresse salino, estas enzimas e moléculas têm padrão de atuação intermediário para a maioria das variáveis avaliadas, provavelmente porque a espécie foi classificada como moderadamente tolerante ao NaCl, pois ocorre a germinação, porém em menores porcentagens.

6. CONCLUSÕES

Sementes embebidas em água apresentam padrão trifásico, maiores porcentagens de germinação e taxas de crescimento do eixo embrionário em relação aos tratamentos sob estresse hídrico e salino.

Sob estresse salino ocorre atraso do ganho de peso de sementes, reduções da germinação e do crescimento do eixo embrionário, sendo classificada como halófito.

Sob estresse hídrico a redução do ganho de peso de sementes é mais pronunciada, a germinação é inibida, assim como as taxas de crescimento do eixo embrionário.

Sementes de *M. brauna* são mais sensíveis ao estresse hídrico induzido por PEG do que por estresse salino induzido por NaCl.

Os níveis endógenos de ACC são relacionados com a germinação de sementes, enquanto ABA, AIA e AS são responsivos principalmente ao estresse hídrico;

ABA e AIA atuam de forma conjunta sob estresse hídrico, induzindo estado de quiescência;

Não há dano oxidativo sob estresses hídrico e salino, mas a atividade das enzimas do sistema antioxidante é reduzida nestas condições;

O proteoma de sementes de braúna evidencia várias rotas atuando de forma integrada em função da disponibilidade hídrica e do tempo de germinação.

PGK, α -L-arabinofuranosidase e conglutinas são temporariamente inibidos sob estresses hídrico e salino.

Anexina pode estar relacionada ao controle dos estresses hídrico e salino, prevenindo o estresse oxidativo.

Mecanismos fisiológicos e moleculares atuam de forma conjunta e coordenada em sementes de braúna, sendo fundamentais para regular a germinação e explicar as diferentes respostas sob condições de estresse.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABASS, S. M.; MOHAMED, H. I. Alleviation of adverse effects of drought stress on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by exogenous application of hydrogen peroxide. **Bangladesh Journal of Botany**, v. 41, p.75–83, 2011.
- AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS - ANA. Encarte especial sobre a crise hídrica. **Conjuntura dos Recursos Hídricos no Brasil, Informe 2014**. 2014. 28p.
- AGARWAL, P. K.; SHUKLA, P. S.; GUPTA, K.; JHA, B. Bioengineering for salinity tolerance in plants: state of the art. **Molecular Biotechnology**, v.54, p.102-123, 2013.
- AGRAWAL, P. K.; BABU, B. K.; SAINI, N. Omics of model plants. In: BARH, D.; KHAN, M. S.; DAVIES, E. **PlantOmics: The Omics of Plant Science**, Springer, India, 2015, p.1-32.
- ALMAGRO, L.; GÓMES ROS, L. V.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; ROS BARCELÓ, A.; PEDREÑO, M. A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v.60, p.377-390, 2009.
- ALMEIDA, J. P. N.; PINHEIRO, C. L.; LESSA, B. F. T.; GOMES, F. M.; FILHO, S. M. Estresse hídrico e massa de sementes na germinação e crescimento de plântulas de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith. **Revista Ciência Agronômica**, v.45, p.777-787, 2014.
- ALONSO-RAMÍREZ, A.; RODRÍGUEZ, D.; REYES, D.; ANGEL JIMÉNEZ, J.; NICOLÁS, G.; LÓPEZ-CLIMENT, M.; GÓMEZ-CADENAS, A.; NICOLÁS, C. Crosstalk between gibberellins and salicylic acid in early stress responses in *Arabidopsis thaliana* seeds. **Plant Signaling & Behavior**, v.48, p.750–751, 2009.
- AN, P.; LI, X.; ZHENG, T.; MATSUURA, A.; ABE, J.; ENEJI, A. E. Effects of NaCl on root growth and cell wall composition of two soya bean cultivars with contrasting salt tolerance. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.200, p.212–218, 2014.
- ANDERSON, M. D; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, p.1247-1257, 1995.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373–399, 2004.
- ARC, E.; SECHET, J.; CORBINEAU, F.; RAJJOU, L.; MARION-POLL, A. ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. **Frontiers in Plant Science**, v.4, n.63, 2013.
- ASADA, K. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v.85, p.235-241, 1992.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p.601-639, 1999.

BAHIN, E.; BAILLY, C.; SOTTA, B.; KRANNER, I.; CORBINEAU, F.; LEYMARIE, J. Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathways regulates grain dormancy in barley. **Plant, Cell & Environment**, v.34, p.980-993, 2011.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v.14, p.93-107, 2004.

BAILLY, C.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **Comptes Rendus Biologies**, v.331, p.806–814, 2008.

BALBUENA, T. S.; DIAS, L. L. C.; MARTINS, M. L. B. Challenges in proteome analyses of tropical plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.23, p.91-104, 2011b.

BALBUENA, T. S.; JO, L. PIERUZZI, F. P.; DIAS, L. L. C.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; JUNQUEIRA, M.; THELEN, J. J.; SHEVCHENKO, A.; GLOH, E. I. S. Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, v.72, p.302-311, 2011a.

BALESTRAZZI, A.; CONFALONIERI, M.; MACOVEI, A.; CARBONERA, D. Seed imbibition in *Medicago truncatula* Gaertn.: expression profiles of DNA repair genes in relation to PEG-mediated stress. **Journal of Plant Physiology**, v.168, p.706–713, 2011.

BANDURSKA, H.; STROINSKI, A. The effect of salicylic acid on barley response to water deficit. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.27, p.379-386, 2005.

BARBA-ESPÍN, G.; DIAZ-VIVANCOS, P.; JOB, D.; BELGHAZI, M.; JOB, C.; HERNÁNDEZ, J. A. Understanding the role of H₂O₂ during pea seed germination: a combined proteomic and hormone profiling approach. **Plant, Cell & Environment**, v.34, p.1907-1919, 2011.

BEAUCHAMP C, FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, p.276-287, 1971.

BEECH, E.; RIVERS, M.; OLDFIELD, S.; SMITH, P. P. GlobalTreeSearch – the first complete global database of tree species and country distributions. **Journal of Sustainable Forestry**, v.36, p.454-489, 2017.

BELIN, C.; MEGIES, C.; HAUSEROVÁ, E.; LOPEZ-MOLINA, L. Abscisic acid represses growth of the *Arabidopsis* embryonic axis after germination by enhancing auxin signaling. **The Plant Cell**, v21, p.2253-2268, 2009.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. New York: Springer, 2013. 392p.

BORGES, E. E. L.; ATAÍDE, G. M.; MATOS, A. C. B. Micropilar and embryonic events during hydration of *Melanoxylon brauna* Schott seeds. **Journal of Seed Science**, v.37, p.192-201, 2015a.

BORGES, E. E. L.; FLORES, A. V.; ATAÍDE, G. M.; MATOS, A. C. B. ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM SEMENTES ARMAZENADAS DE *Melanoxylon brauna* Schott. **Cerne**, v.21, p.75-81, 2015b.

BOVERIS, A. **Methods in enzymology**. v.105, p.429-435, 1984.

BOVERIS, A. CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **The Biochemical Journal**, v.134, p.707-716, 1973.

BRACCINI, A. L. RUIZ, H. A.; BRACCINI, M. C. L.; REIS, M. S. Germinação e vigor de sementes de soja sob estresse hídrico induzido por soluções de cloreto de sódio, manitol e polietilenoglicol. **Revista Brasileira de Sementes**, v.18, p.10-16, 1996.

BRADFORD, K. J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **HotScience**, v.21, p.1105-1112, 1986.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

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

BROSOWSKA-ARENDT, W., GALLARDO, K., SOMMERER, N., AND WEIDNER, S. Changes in the proteome of pea (*Pisum sativum* L.) seeds germinating under optimal and osmotic stress conditions and subjected to post-stress recovery. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.36, p.795-807, 2014.

BRUNNER, E.; HERZOG, C.; DAWES, M. A.; AREND, M.; SPERISEN, C. How tree roots respond to drought. **Frontiers in Plant Science**, v.6, n.547, 2015.

CAKMAK, I.; STRBAC, D.; MARSCHNER, H.; Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, v.44, p.127-132, 1993.

CARILLO, P.; ANNUNZIATA, M. G.; PONTECORVO, G.; FUGGI, A.; WOODROW, P. Salinity stress and salt tolerance, abiotic stress in plants – mechanisms and adaptations. In: SHANKER, A. K.; VENKATESWARLU, B. **Abiotic stress in plants – mechanisms and adaptations**. InTech, p.21-38, 2011.

CARPENTIER, S.C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v.5, p.2497-2507, 2005.

CARPITA, N. C.; RALPH, J.; McCAN, M. C. The Cell Wall. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Second Edition, 2015, 1280p.

CARVALHO, F. A.; NASCIMENTO, M. T.; BRAGA, J. M. A. Estrutura e composição florística do estrato arbóreo de um remanescente de Mata Atlântica submontana no município de Rio Bonito, RJ, Brasil (Mata Rio Vermelho). **Revista Árvore**, v.31, p.717-730, 2007.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**, v. 4. Brasília, DF: Embrapa Florestas, 2010, 644p.

CAVUSOGLU, K.; KABAR, K. Effects of hydrogen peroxide on the germination and early seedling growth of barley under NaCl and high temperature stresses. **Eurasia Journal of Biosciences**, v.4, p.70-79, 2010.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v.2, p.764-775, 1955.

CHEN, K.; ARORA, R. Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). **Plant Science**, v.180, p.212-220, 2011.

CHIBANI, K.; ALI-RACHEDI, S.; JOB, C.; JOB, D.; JULLIEN, M.; GRAPPIN, P. Proteomic analysis of seed dormancy in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.142, p.1493-1510, 2006.

CLARK, G. B.; MORGAN, R. O.; FERNANDEZ, M. P.; ROUX, S. J. Evolutionary adaptation of plant annexins has diversified their molecular structures, interactions and functional roles. **New Phytologist**, v.196, p.695-712, 2012.

COCHRANE, A. Can sensitivity to temperature during germination help predict global warming vulnerability? **Seed Science Research**, v.26, p.14-29, 2016.

CORBINEAU F.; GAY-MATHIEU C.; VINEL D.; CÔME, D. Decrease in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed viability caused by high temperature as related to energy metabolism, membrane damage and lipid composition. **Physiologia Plantarum**, v.116, p.489-496, 2002.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; LEITE, H. G.; LEITE, I. T. D. Qualidade fisiológica de sementes de *Melanoxylon brauna* envelhecidas natural e artificialmente. **Scientia Forestalis**, v.38, p.181-189, 2010.

COSIO, C.; DUNDAND, C. Specific functions of individual class III peroxidase genes. **Journal of Experimental Botany**, v.60, p.391-408, 2009.

DAS, K. ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v.2, n.53, 2014.

DAS, S.; KAR, R. Reactive Oxygen Species-Mediated Promotion of Root Growth Under Mild Water Stress During Early Seedling Stage of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.36, p.338-347, 2017.

DASZKOWSKA-GOLEC, A. Arabidopsis Seed Germination Under Abiotic Stress as a Concert of Action of Phytohormones. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v.15, p.763-774, 2011.

DAWSON, T. P.; JACKSON, S. T.; HOUSE, J. I.; PRENTICE, I. C.; MACE, G. M. Beyond Predictions: Biodiversity Conservation in a Changing Climate. **Science**, v.332, p.53-58, 2011.

DEKKERS, B. J.; PEARCE, S.; VAN BOLDEREN-VELDKAMP, R. P.; MARSHALL, A.; WIDERA, P.; GILBERT, J., DROST, H-G.; BASSEL, G. W.; MÜLLER, K.; KING, J. R.; WOOD, A. T. A.; GROSSE, I.; QUINT, M.; KRASNOGOR, N.; LEUBNER-METZGER, G.; HOLDSWORTH, M. J.; BENTSINK, L. Transcriptional dynamics of two seed compartments with opposing roles in Arabidopsis seed germination. **Plant Physiology**, v.163, p.205-215, 2013.

DEL LONGO, O. T.; GONZÁLEZ, A.; PASTORI, G. .; TRIPPI, V. S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensivity to drought. **Plant Cell Physiology**, v.34, p.1023-1028, 1993.

DIAS, L. L. C.; BALBUENA, T. S.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; SCHEVCHENKO, A.; FLOH, E. I. S. Two-dimensional gel electrophoretic protein profile analysis during seed development of *Ocotea catharinensis*: a recalcitrant seed species. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.22, p.23-33, 2010.

DIAZ-VIVANCOS, P.; BARBAESPÍN, G.; HERNÁNDEZ, J. A. Elucidating hormonal/ROS networks during seed germination: insights and perspectives. **Plant Cell Reports**, v.32, p.1491-1502, 2013.

DOGRA, V.; SHARMA, R.; YELAM, S. Xyloglucan endo transglycosylase/hydrolase (XET/H) gene is expressed during the seed germination in *Podophyllum hexandrum*: a high altitude Himalayan plant. **Planta**, v.244, p.505-515, 2016.

DURANTI, M.; GIUS, C. Legume seeds: protein content and nutritional value. **Field Crops Research**, v.53, p.31-45, 1997.

EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; SAJJAD, Y.; BAZIN, J.; LANGLADE, N.; CRISTESCU, S. M.; BALZERGUE, S.; BALDOUIN, E.; BAILLY, C. Reactive oxygen species, abscisic acid and ethylene interact to regulate sunflower seed germination. **Plant, Cell & Environment**, v.38, p.364-374, 2015.

EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; BAILLY, C. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. **Plant Signaling & Behavior**, v.3, p.175–182. 2008.

FAO. Global Forest Resources Assessment 2010 – main report. **FAO Forestry Paper No. 163**. Rome. 2010. In:

FARINHA, A. P.; IRAR, S.; DE OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, M. M.; PAGÉS, M. Novel clues on abiotic stress tolerance emerge from embryo proteome analyses of rice varieties with contrasting stress adaptation. **Proteomics**, v.11, p.2389-2405, 2011.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA, S. M. A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, v.29, p.185-212, 2009.

FATMA, M.; IQBAL, M.; KHAN, R.; MASOOD, A.; KHAN, N. A. Coordinate changes in assimilatory sulfate reduction are correlated to salt tolerance. Involvement of phytohormones. **Annual Review of Research Biology**, v.3, p.267-295, 2013.

FLERCHA, A.; CAPRIOTTI, A. L.; CARUSO, G.; CAVALIERE, C.; STAMPACHIACCHIERE, S.; CHIOZZI, R. Z.; LAGANÀ, A. Shotgun proteomic analysis of soybean embryonic axes during germination under salt stress. **Proteomics**, v.16, p.1537-1546, 2016.

FLOWERS, T. J.; COLMER, T. D. Salinity tolerance in halophytes. **New phytologist**, v.179: p.945–963, 2008.

FLOWERS, T. J. GALAL, H. K. BROMHAM, L. Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. **Functional Plant Biology**, v.37, p.604-612, 2010.

FOLEY, R. C.; JIMENEZ-LOPEZ, J. C.; KAMPHUIS, L. G.; HANE, J. K.; MELSER, S.; SINGH, K. B. Analysis of conglutin seed storage proteins across lupin species using transcriptomic, protein and comparative genomic approaches. **BMC Plant Biology**, v.15, n.106, 2015.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, v.17, p.1866-1875, 2005.

FREIRE, M. B. G. S.; FREIRE, F. J. Fertilidade do solo e seu manejo em solos afetados por sais. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. **Fertilidade do Solo**. 1.ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.1. 929-954p, 2007.

FU, Y.; POLI, M.; SABLOK, G.; WANG, B.; LIANG, Y.; LA PORTA, N.; VELIKOVA, V.; LORETO, F.; LI, M.; VAROTTO, C. Dissection of early transcriptional responses to water stress in *Arundo donax* L. by unigene-based RNA-seq. **Biotechnology for Biofuels**, v.9, n.54, 2016.

FUJITA, M; FUJITA, Y; NOUTOSHI, Y; TAKAHASHI, F; NARUSAKA, Y; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K; SHINOZAKI, K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. **Currents Opinion Plant Biology**, v.9, p.436-442, 2006.

GALLAND, M.; HUGUET, R.; ARC, E.; CUEFF, G.; JOB, D.; RAJJOU, L. Dynamic proteomics emphasizes the importance of selective mRNA translation and protein turnover during Arabidopsis seed germination. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.13, p.252-268, 2014.

GALLARDO, K.; JOB, C.; GROOT, S. P.; PUYPE, M.; DEMOL, H.; VANDEKERCKHOVE, J.; JOB, D. Proteomics of Arabidopsis seed germination: a

comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. **Plant Physiology**, v.129, p.823-837, 2002.

GALLARDO, K.; LE SIGNOR, C.; VANDEKERCKHOVE, J.; THOMPSON, R.; BUSTIN, J. Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. **Plant Physiology**, v.133, p.664-682, 2003.

GAY, C.; GEBICKI, J.M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylene orange hydroperoxide assay. **Analytical Biochemistry**, v.284, p.217-220, 2000.

GERKE, V.; CREUTZ, C. E.; MOSS, S. E. Annexins; linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. **Nature Reviews in Molecular and Cell Biology**, v.6, p.449-461, 2005.

GIANINETTI, A.; LAARHOVEN, L. J. J.; PERSIJN, S. T.; HARREN, F. J. M.; PETRUZZELLI, L. Ethylene production is associated with germination but not seed dormancy in red rice. **Annals of Botany**, v.99, p.735-745, 2007.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.909-930, 2010.

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

GOMEZ, L. D.; STEELE-KING, C.; JONES, L.; FOSTER, J. M.; VUTTIPONGCHAIKIJ, S.; McQUEEN-MASON, S. J. Arabin metabolism during seed development and germination in *Arabidopsis*. **Molecular Plant**, v.2, p.966-976, 2009.

GONZAGA, A.L. **Madeira: uso e conservação**. Brasília, DF: IPHAN/Monumenta (Cadernos Técnicos 6), 2006. 246p.

GORECKA, K. M.; KONOPKA-POSTUPOLSKA, D.; HENNIG, J.; BUCHET, R.; PIKULA, S. Peroxidase activity of AnnAt1 from *Arabidopsis thaliana*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.336, p.868-875, 2005.

GU, J.; CHAO, H.; GAN, L.; GUO, L.; ZHANG, K.; LI, Y.; WANG, H.; RABOANATAHIRY, N.; LI, M. Proteomic dissection of seed germination and seedling establishment in *Brassica napus*. **Frontiers in Plant Science**, v.7, n.1482, 2016.

GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; VIANA, J. S.; GONÇALVES, E. P.; LIMA, C. R.; SANTOS, S. R. N. Germinação e vigor de sementes de *Apeiba tibourbou* submetidas ao estresse hídrico e diferentes temperaturas. **Ciência Florestal**, v.23, p.45-53, 2013.

GUL, B.; ANSARI, R.; FLOWERS, T. J.; KHAN, M. A. Germination strategies of halophyte seeds under salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v.92, p.4-18, 2013.

GUPTA, D. B.; SHEKHAR, S.; AGRAWAL, L. Plant Proteomics: Technologies and Applications. In: BARH, D.; KHAN, M. S.; DAVIES, E. **PlantOmics: The Omics of Plant Science**, Springer, India, 2015, p.213-256.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**, 5th ed. Oxford: Oxford University Press, 2015, 851p.

HAN, C.; HE, D.; LI, M.; YANG, P. In-depth proteomic analysis of rice embryo reveals its important roles in seed germination. **Plant Cell Physiology**, v.55, p.1826-1847, 2014.

HAVIR, E. A.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v.84, p.450-455, 1987.

HE, M.; ZHU, C.; DONG, K.; ZHANG, T.; CHENG, Z.; LI, J.; YAN, Y. Comparative proteome analysis of embryo and endosperm reveals central differential expression proteins involved in wheat seed germination. **BMC Plant Biology**, v.15, 97, 2015.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photo peroxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v.125, p.189-198, 1968.

HENNING, T. Polyethylene glycols (PEGs) and the pharmaceutical industry. **Fine, Speciality & Performance Chemicals**, v.1, p.57-59, 2002.

HOSSAIN M. A.; FUJITA M. Hydrogen peroxide priming stimulates drought tolerance in mustard (*Brassica juncea* L.). **Plant Gene and Trait**, v.4, p.109-123, 2013.

HOSSAIN, M. A.; BHATTACHARJEE, S.; ARMIN, S-M.; QIAN, P.; XIN, W.; LI, H-Y.; BURRITT, D. J.; FUJITA, M.; TRAN, L-S. P. Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. **Frontiers in Plant Science**, v.6, n.420, 2015.

HUANG, H.; MØLLER, I. M.; SONG, S-Q. Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos. **Journal of Proteomics**, v.75, p.1247-1262, 2012.

HUH, S. M.; NOH, E. K.; KIM, H. G.; JEON, B. W.; BAE, K.; HU, H-C.; KWAK, J. M.; PARK, O. K. Arabidopsis Annexins AnnAt1 and AnnAt4 Interact with Each Other and Regulate Drought and Salt Stress Responses. **Plant & Cell Physiology**, v.51, p.1499-1514, 2010.

HUTYRA, L. R.; MUNGER, J. W.; NOBRE, C. A.; SALESKA, S. R.; VIEIRA, S. A. "Climatic variability and vegetation vulnerability in Amazônia". **Geophysical Research Letters**, v.32, 2005.

IBAMA/MMA – Instrução Normativa n° 6, de 23 de setembro de 2008. **Lista Oficial da Flora Brasileira ameaçada de extinção**. 2008.

IPCC. **Climate Change 2013: The Physical Science Basis**. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A.

Nauels, Y. Xia, V. Bex, P.M. Midgley (eds.)). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535p.

IQBAL, N.; MASOOD, A.; KHAN, N. A. Phytohormones in Salinity Tolerance: Ethylene and Gibberellins Cross Talk. In: KHAN, N. A.; NAZAR, R.; IQBAL, N.; ANJUM, N. A. (Eds). **Phytohormones and Abiotic Stress Tolerance in Plants**. Berlin, Springer-Verlag, 2013, 306p.

ISHIBASHI, Y.; TAWARATSUMIDA, T.; KONDO, K.; KASA, S.; SAKAMOTO, M.; AOKI, N.; ZHENG, S.-H.; YUASA, T.; IWAYA-INOUE, M. Reactive Oxygen Species Are Involved in Gibberellin/Abscisic Acid Signaling in Barley Aleurone Cells. **Plant Physiology**, v.158, p.1705-1714, 2012.

JISHA, K. C.; VIJAYAKUMARI, K.; PUTHUR, J. T. Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. **Acta Physiologia Plantarum**, v.35, p.1381-1396, 2013.

JOB, C.; RAJJOU, L.; LOVIGNY, Y.; BELGHAZI, M.; JOB, D. Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. **Plant Physiology**, v.138, p.790-802, 2005.

JOSÉ, A. C.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C.; TOOROP, P. Protein expression upon desiccation and imbibition of *Magnolia ovata* A. St.-Hil seeds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, p.465-476, 2011.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v.57, p.315-319, 1976.

KAZACHKOVA, Y.; KHAN, A.; ACUÑA, T.; LÓPEZ-DIAZ, I.; CARRERA, E.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; FAIT, A.; BARAK, S. Salt induces features of a dormancy-like state in seeds of *Eutrema (Thellungiella) salsaugineum*, a halophytic relative of *Arabidopsis*. **Frontiers in Plant Science**, v.7, n.1071, 2016.

KHAN, M. A. Comparative influence of salinity and temperature on the germination of subtropical halophytes. In: LIETH, H.; MOSCHENKO, M.; LOHMAN, M.; KOYRO, J.; HAMDY, A. (Eds) **Halophyte uses in different climates I: Ecological and ecophysiological studies. Progress in Biometeriology**. Leiden, Backhuys Publishers, 1999, 258p.

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

KIM, S. T.; KANG, S. Y.; WANG, Y.; KIM, S. G.; HWANG du, H.; KANG, K. Y. Analysis of embryonic proteome modulation by GA and ABA from germinating rice seeds. **Proteomics**, v.8, p.3577-3587, 2008.

KONOPKA-POSTUPOLSKA, D.; CLARK, G.; GOCH, G.; DEBSKI, J.; FLORAS, K.; CANTERO, A.; FIJOLEK, B.; ROUX, S.; HENNIG, J. The role of annexin1 in drought stress in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.150, p.1394-1410, 2009.

- KONOPKA-POSTUPOLSKA, D.; CLARK, G.; HOFMANN, A. Structure, function and membrane interactions of plant annexins: an update. **Plant Science**, v.181, p.230-241, 2011.
- KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedling and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant Cell Physiology**, v.34, p.713-721, 1993.
- KOYRO, H-W.; EISA, S. S. Effect of salinity on composition, viability and germination of seeds of *Chenopodium quinoa* Willd. **Plant Soil**, v.302, p.79-90, 2008.
- KRANNER, I.; MINIBAYEVA, F. V.; BECKETT, R. P.; SEAL, C. E. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, v.108, p.665-673, 2010.
- KUCERA, B.; COHN, M. A.; LUBNER-METZGER, G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. **Seed Science Research**, v.15, p.281-307, 2005.
- KUMAR, S. P. J.; PRASAD, S. R.; BANERJEE, R.; THAMMINENI, C. Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. **Annals of Botany**, v.116, p.663-668, 2015.
- KUO, M.C.; KAO, C.H. Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biologia Plantarum**, v.46, p.149-152, 2003.
- LADOKHIN, A. S.; HAIGLER, H. T. Reversible transition between the surface trimer and membrane-inserted monomer of annexin 12. **Biochemistry**, p.44, p.3402-3409, 2005.
- LAOHAVISIT, A.; BROWN, A. T.; CICUTA, P.; DAVIES, J. M. Annexins: components of the calcium and reactive oxygen signaling network. **Plant Physiology**, v.152, p.1824-1829, 2010.
- LAOHAVISIT, A.; SHANG, Z.; RUBIO, L.; CUIN, T. A.; VÉRY, A. A.; WANG, A.; MORTIMER, J. C.; MACPHERSON, N.; COXON, K. M.; BATTEY, N. H.; BROWNLEE, C.; PARK, O. K.; SENTENAC, H.; SHABALA, S.; WEBB, A. A. R.; DAVIES, J. M. Arabidopsis annexin1 mediates the radical-activated plasma membrane Ca^{2+} - and K^{+} - permeable conductance in root cells. **The Plant Cell**, v.24, p.1522-1533, 2012.
- LARIGUET, P.; RANOCHA, P.; DE MEYER, M.; BARBIER, O.; PENEL, C.; DUNAND, C. Identification of a hydrogen peroxide signalling pathway in the control of light-dependent germination in *Arabidopsis*. **Planta**, v.238, p.381-395, 2013.
- LATA, C.; PRASAD, M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.62, p.4731-4748, 2011.
- LEE, K. J.; DEKKERS, B. J.; STEINBRECHER, T.; WALSH, C. T.; BACIC, A.; BENTSINK, L.; LEUBNER-METZGER, G.; KNOX, J. P. Distinct cell wall architectures in seed endosperms in representatives of the Brassicaceae and Solanaceae. **Plant Physiology**, v.160, p.1551-1566, 2012.

- LEE, S.; KIM, S.-G.; PARK, C.-M. Salicylic acid promotes seed germination under high salinity by modulating antioxidant activity in *Arabidopsis*. **New Phytologist**, v.188, p.626-637, 2010.
- LEITE, H. G; OLIVEIRA, F. H. T. Statistical procedure to test the identity of analytical methods. **Communication Soil Science Plant Analytical**, v.33, p.1105-1118, 2002.
- LINKIES, A.; MULLER, K.; MORRIS, K.; TURECKOVA, V.; WENK, M. CADMAN, C. S. C.; CORBINEAU, F.; STRNAD, M.; LYNN, J. R.; FINCH-SAVAGE, W. E.; LEUBNER-METZGER, G. Ethylene interacts with abscisic acid to regulate endosperm rupture during germination: A comparative approach using *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**, v.21, p.3803–3822, 2009.
- LIU, C.; LI, L.; CHEN, B.; WANG, X. Suppression of α -L arabinofuranosidase in the endosperm and atypical germination of lettuce seeds induced by sodium dichloroisocyanurate. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.37, n.10, 2015.
- LIU, H.; LIU, Y.-J.; YANG, M.-F.; SHEN, S.-H. A comparative analysis of embryo and endosperm proteome from seeds of *Jatropha curcas*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.51, p.850-857, 2009.
- LIU, X.; ZHANG, H.; ZHAO, Y.; FENG, Z.; LI, Q.; UANG, H. -Q.; LUAN, S.; LI, J.; HE, Z. -H. Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in *Arabidopsis*. **PNAS**, v.110, p.15485-15490, 2013.
- LLANES, A. ANDRADE, A.; MASCIARELLI, P. O.; ALEMANO, S.; LUNA, V. Drought and salinity alter endogenous hormonal profiles at the seed germination phase. **Seed Science Research**, v.26, p.1-13, 2016.
- LOPEZ-MOLINA, L.; MONGRAND, S.; CHUA, N.H. A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. **PNAS**, v.98, p.4782-4787, 2001.
- LOPEZ-MOLINA, L.; MONGRAND, S.; McLACHLIN, D. T.; CHAIT, B. T.; CHUA, N.H. ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. **The Plant Journal**, v.32, p.317-328, 2002.
- LUNA, B.; CHAMORRO, D. Germination sensitivity to water stress of eight Cistaceae species from the Western Mediterranean. **Seed Science Research**, v.26, p.101-110, 2016.
- MA, B.; WAN, J.; SHEN, Z. H₂O₂ production and antioxidant responses in seeds and early seedling of two different rice varieties exposed to aluminum. **Plant Growth Regulation**, v.52, p.91-100, 2007.
- MAGRIN, G. O.; MARENGO, J. A.; BOULANGER, J.-P.; BUCKERIDGE, M. S.; CASTELLANOS, E.; POVEDA, G. SCARANO, F. R.; VICUÑA, S. Central and South America. In: **Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part B: Regional Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change** [BARROS, V.R.; FIELD, C.B.; DOKKEN, D. J.; MASTRANDREA, M.D.; MACH, K.J.; BILIR, T.E.;

CHATTERJEE, M.; EBI, K.L.; ESTRADA, Y.O.; GENOVA, R.C.; GIRMA, B.; KISSEL, E.S.; LEVY, A.N.; MacCRACKEN, S.; MASTRANDREA, P.R.; WHITE, L. L. (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, p.1499-1566, 2014.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection aid evolution for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176-177, 1962.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.246, p.6886-6890, 1971.

MARINO, D.; DUNAND, C.; PUPPO, A.; PAULY, N. A burst of plant NADPH oxidases. **Trends in Plant Science**, v.17, p.9-15, 2012.

MARTINS, C. C.; PEREIRA, M. R. R.; LOPES, M. T. G. Germinação de sementes de eucalipto sob estresse hídrico e salino. **Bioscience Journal**, v.30, p.318-329, 2014.

MARTINS, R. S.; JOSÉ, A. C.; FARIA, J. M. R.; OLIVEIRA JÚNIOR, L. C. Proteomic analysis of osmoprimed and heat shock-treated *Eucalyptus urophylla* seeds. **Trees**, v.31, p.313-324, 2016.

MATILLA, A. J.; MATILLA-VAZQUEZ, M. A. Involvement of ethylene in seed physiology. **Plant Science**, v.175, p.87-97, 2008.

MATOS, A. C. B.; BORGES, E. E. L.; SEKITA, M. C. Production of reactive oxygen species in *Dalbergia nigra* seeds under thermal stress. **Journal of Seed Science**, v.36, p.282-289, 2014.

MARTÍNEZ-ANDÚJAR, C.; PLUSKOTA, W. E.; BASSEL, G. W.; ASAHINA, M.; PUPEL, P.; NGUYEN, T. T.; TAKEDA-KAMIYA, N.; TOUBIANA, F. BAI, B; GÓRECKI, R. J.; FAIT, A.; YAMAGUCHI, S. NONOGAKI, H. Mechanisms of hormonal regulation of endosperm cap-specific gene expression in tomato seeds. **Plant Journal**, v.71, p.575-586, 2012.

MARTINS, C. C.; PEREIRA, M. R. R.; LOPES, M. T. G. Germinação de sementes de eucalipto sob estresse hídrico e salino. **Bioscience Journal**, v.30, p.318-329, 2014.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, p.565-572, 2004.

MCDONALD, M. B. Seed deterioration: Physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, v.27, p.177-237, 1999.

MICHEL, B.E.; KAUFMANN, M.R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. **Plant Physiology**, v.51, p.914-916, 1973.

MILLER, A. F. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. **FEBS Letters**, v.586, 585-595, 2012.

MILLER, G.; SUZUKI, N. CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen

species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell & Environment**, v.33, p.453-467, 2010.

MINIC, Z.; DO, C.-T.; RIHOUEY, C.; MORIN, H.; LEROUGE, P.; JOUANIN, L. Purification, functional characterization, cloning, and identification of mutants of a seed-specific arabinan hydrolase in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p.2339–2351, 2006.

MIRANSARI, M.; SMITH, D. L. Plant hormones and seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, v.99, p.110-121, 2014.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, p.405-410, 2002.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Science**, v.9, p.490-498, 2004.

MIURA, K.; OKAMOTO, H.; OKUMA, E.; SHIBA, H.; KAMADA, H.; HASEGAWA, P. M.; MURATA, Y. SIZ1 deficiency causes reduced stomatal aperture and enhanced drought tolerance via controlling salicylic acid-induced accumulation of reactive oxygen species in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v.73, p.91-104, 2013.

MOHAMMADI, M.; KARR, A. L. Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. **Journal of Plant Physiology**, v.158, p.1023-1029, 2001.

MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.459-4581, 2007.

MORKUNAS, I.; BEDNARSKI, W.; KOZŁOWSKA, M. Response of embryo axes of germinating seeds of yellow lupine to *Fusarium oxysporum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, p.493-499, 2004.

MORTIMER, J. C.; LAOHAVISIT, A.; MACPHERSON, N.; WEBB, A.; BROWNLEE, C.; BATTEY, N. H.; DAVIES, J. M. Annexins: multifunctional components of growth and adaptation. **Journal of Experimental Botany**, v.59, p.533-544, 2008.

MULLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Plant Methods**, v.7, n.37, 2011.

MUNNÉ-BOSH, S.; OÑATE, M. OLIVEIRA, P. G.; GARCIA, Q. S. Changes in phytohormones and oxidative stress markers in buried seeds of *Vellozia alata*. **Flora**, v.206, p.704-711, 2011.

MUNNS, R.; GILLIHAM, M. Salinity tolerance of crops - what is the cost? **New Phytologist**, v.208, p.668-673, 2015.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.651-681, 2008.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-858, 2000.

NAN, T. N.; THIA, L. H.; MAI, D. S.; TUAN, N. V. Overexpression of NbWRKY79 enhances salt stress tolerance in *Nicotiana benthamiana*. **Acta Physiologia Plantarum**, v.39, n.121, 2017.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v.22, p.867-880, 1981.

NEALE, D. B.; KREMER, A. Forest tree genomics: growing resources and applications. **Nature Reviews Genetics**, v.12, p.111-122, 2011.

NEILL, S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.388-395, 2002.

NONOGAKI, H. Seed dormancy and germination – emerging mechanisms and new hypotheses. **Frontiers in Plant Science**, v.5, n.233, 2014.

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

NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; FOYER, C. H. Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation. **Plant, Cell & Environment**, v.39, p.1140-1160, 2016.

OGAWA M, HANADA A, YAMAUCHI Y, KUWAHARA A, KAMIYA Y, YAMAGUCHI S. Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. **The Plant Cell**, v.15, p.1591-1604, 2003.

OKAMOTO, M.; KUWAHARA, A.; SEO, M.; KUSHIRO, T.; ASAMI, T.; HIRAI, N.; KAMIYA, Y.; KOSHIBA, T.; NAMBARA, E. CYP707A1 and CYP707A2, which encode ABA 8'-hydroxylases, are indispensable for a proper control of seed dormancy and germination in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.141, p.97-107, 2006.

O'KANE, F. E.; HAPPE, R. P.; VEREIJKEN, J. M.; GRUPPEN, H.; VANBOEKEL, M. A. J. S. Characterization of pea vicilin. 2. Consequences of compositional heterogeneity on heat-induced gelation behavior. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.3149-3154, 2004.

OLIVEIRA-FILHO, A. T. **Catálogo das árvores nativas de Minas Gerais - Mapeamento e inventário da flora nativa e dos reflorestamentos de Minas Gerais**. UFLA, 2006. v.1. 423p.

OVERVOORDE, P.; FUKAKI, H.; BEECKMAN, T. Auxin control of root development. **Cold Spring harbor Perspectives in Biology**, v.2, a001537, 2010.

PACHECO, M. V.; FERRARI, C. S.; BRUNO, R. L. A.; ARAÚJO, F. S.; SILVA, G. Z.; ARRUDA, A. A. Germinação e vigor de sementes de *Capparis flexuosa* L. submetidas ao estresse salino. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.7, p.301-305, 2012.

PARK, J. KIM, Y-S.; KIM, S-G.; JUNG, J-H.; WOO, J-C.; PARK, C-M. Integration of auxin and salt signals by the NAC transcription factor NTM2 during seed germination in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.156, p.537-549, 2011.

PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports**, v.24, p.255-265, 2005.

PAWŁOWSKI, T. A. Proteomics of European beech (*Fagus sylvatica* L.) seed dormancy breaking: influence of abscisic and gibberellic acids. **Proteomics**, v.7, p.2246-2257, 2007.

PAWŁOWSKI, T. A.; STASZAK, A. M. Analysis of the embryo proteome of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) seeds reveals a distinct class of proteins regulating dormancy release. **Journal of Plant Physiology**, v.195, p.9-22, 2016.

PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANTANA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, p.137-143, 1999.

PELEGRINI, L. L.; BORCIONI, E.; NOGUEIRA, A. C.; KOEHLER, H. S.; QUOIRIN, M. G. G. Efeito do estresse hídrico simulado com NaCl, manitol e PEG (6000) na germinação de sementes de *Erythrina falcata* Benth. **Ciência Florestal**, v.23, p.511-519, 2013.

PEREIRA, E. P. L.; RIBEIRO, P. R.; LOUREIRO, M. B.; de CASTRO, R. D.; FERNANDEZ, L. G. Effect of water restriction on total phenolics and antioxidant properties of *Amburana cearensis* (Fr. Allem) A.C. Smith cotyledons during seed imbibition. **Acta Physiologia Plantarum**, v.36, p.1293-1297, 2014b.

PEREIRA, M. R. R.; MARTINS, C. C.; MARTINS, D.; SILVA, R. J. N. Estresse hídrico induzido por soluções de PEG e de NaCl na germinação de sementes de nabiça e fedegoso. **Bioscience Journal**, v.30, p.687-696, 2014a.

POTOKINA, E.; SREENIVASULU, N.; ALTSCHMIED, L.; MICHALEK, W.; GRANER, A. Differential gene expression during seed germination in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Functional & Integrative Genomics**, v.2, p.28-39, 2002.

PRIESTLEY, D. A. **Seed aging: Implications for Seed Storage and Persistence in the Soil**. Ithaca: Cornell University Press, 1986, 304p.

QADIR, M.; TUBEILEH, A.; AKHTAR, J.; LARBI, A.; MINHAS, P. S.; KHAN, M. Productivity enhancement of salt-affected environments through crop diversification. **Land degradation & development**, v.19, p.429-453, 2008.

QIAO, B.; ZHANG, Q.; LIU, D.; WANG, H.; YIN, J.; WANG, R.; HE, M.; CUI, M.; SHANG, Z.; WANG, D.; ZHU, Z. A calcium-binding protein, rice annexin OsANN1, enhances heat stress tolerance by modulating the production of H₂O₂. **Journal of Experimental Botany**, v.66, p.5853-5866, 2015.

RAJJOU, L.; BELGHAZI, M.; HUGUET, R.; ROBIN, C.; MOREAU, A.; JOB, C.; JOB, D. Proteomic Investigation of the Effect of Salicylic Acid on Arabidopsis Seed

- Germination and Establishment of Early Defense Mechanisms. **Plant Physiology**, v.141, p.910-923, 2006.
- RAJJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; CATUSSE, J.; BALLY, J.; JOB, C.; JOB, D. Seed Germination and Vigor, **Annual Review of Plant Biology**, v.63, p.507-33, 2012.
- ROMANO, A.; SORGONÀ, A.; LUPINI, A.; ARANITI, F.; STEVANATO, P.; CACCO, G.; ABENAVOLI, M. R. Morpho-physiological responses of sugar beet (*Beta vulgaris*) genotypes to drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.35, p.853-865, 2013.
- SADEGHIPOUR, O.; AGHAEI, P. Impact of exogenous salicylic acid application on some traits of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under water stress conditions. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v.4, p.685-690, 2012.
- SANTO, A.; MATTANA, E.; FRIGAU, L.; PASTOR, A. M.; MORELLÓ, M. C. P.; BACCHETTA, G. Effects of NaCl stress on seed germination and seedling development of *Brassica insularis* Morris (Brassicaceae). **Plant Biology**, v.19, p.368-376, 2017.
- SANTOS, C. A.; SILVA, N. V.; WALTER, L. S.; SILVA, E. C. A.; NOGUEIRA, R. J. M. C. Germinação de sementes de duas espécies da caatinga sob déficit hídrico e salinidade. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.36, p.219-224, 2016.
- SEO, M.; HANADA, A.; KUWAHARA, A.; ENDO, A.; OKAMOTO, M.; YAMAUCHI, Y.; NORTH, E.; MARION-POLL, A.; SUN, T.-P.; KOSHIBA, T.; KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, S.; NAMBARA, E. Regulation of hormone metabolism in Arabidopsis seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. **The Plant Journal**, v.48, p.354-366, 2006.
- SHABALA, S. Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. **Annals of Botany**, v.112, p.1209-1221, 2013.
- SHEORAN, I. S.; OLSON, D. J.; ROSS, A. R.; SAWHNEY, V. K. Proteome analysis of embryo and endosperm from germinating tomato seeds. **Proteomics**, v.5, p.3752-3764, 2005.
- SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v.1, p.2856-2860, 2006.
- SHINOZAKI, K.; UEMURA, M.; BAILEY-SERRES, J.; BRAY, E. A.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stress. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Eds.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 2th ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2015, p.1051-1100.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.221-227, 2007.
- SIEGEL, B. Z. Plant peroxidases – an organismic perspective. **Plant Growth**

Regulation, v.12, p.303-312, 1993.

SILVA, M. L. M.; ALVES, E. U.; BRUNO, R. L. A.; SANTOS-MOURA, S. S.; NETO, A. P. S. Germinação de sementes de *Chorisia glaziovii* O. Kuntze submetidas ao estresse hídrico em diferentes temperaturas. **Ciência Florestal**, v.26, p.999-1007, 2016.

SILVA, P. O.; MEDINA, E. F.; BARROS, R. S.; RIBEIRO, D. M. Germination of salt-stressed seeds as related to the ethylene biosynthesis ability in three *Stylosanthes* species. **Journal of Plant Physiology**, v.171, p.14-22, 2014.

SPECIESLINK, 2017 - rede *speciesLink* (<http://www.splink.org.br>). Acesso em 22 de Maio de 2017.

SUN, W.-H.; DUAN, M.; LI, F.; SHU, D.-F.; YANG, S.; MENG, Q.-W. Overexpression of tomato tAPX gene in tobacco improves tolerance to high or low temperature stress. **Biologia Plantarum**, v.54, p.614-620, 2010.

SUN, W. Q.; LEOPOLD, A. C. The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. **Physiologia Plantarum**, v.94, p.94-104, 1995.

SZALONEK, M.; SIERPIEN, B.; RYMASZEWSKI, W.; GIECZEWSKA, K.; GARSTKA, M.; LICHOCKA, M.; SASS, L.; PAUL, K.; VASS, I.; VANKOVA, R.; DOBREV, P.; SZCZESNY, P.; MARCZEWSKI, W.; KRUSIEWICZ, D.; STRZELCZYK-ZYTA, D.; HENNIG, J.; KONOPKA-POSTUPOLSKA, D. ANN1 Promotes Drought Tolerance and Mitigates Light Stress in Transgenic *Solanum tuberosum* L. Plants. **PLoS One**, v.10, e0132683, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5.ed. - Porto Alegre: Artmed, 2013, 918p.

TAN, L.; CHEN, S.; WANG, T. DAI, S. Proteomic insights into seed germination in response to environmental factors. **Proteomics**, v.13, p.1850-1870, 2013.

TESTER, M.; LANGRIDGE, P. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. **Science**, v.327, p.818-822, 2010.

TURRENS, J. F.; FREEMAN, B. A.; LEVITT, J. G.; CRAPO, J. D. The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.217, p.401-410, 1982.

VALLEJO, A. J.; YANOVSKY, M. J.; BOTTO, J. Germination variation in *Arabidopsis thaliana* accessions under moderate osmotic and salt stresses. **Annals of Botany**, v.106, p.833-842, 2010.

VAN DONGEN, J. T.; GUPTA, K. J.; RAMÍREZ-AGUILAR, S. J.; ARAÚJO, W. L.; NUNES-NESE, A. FERNIE, A. R. Regulation of respiration in plants: a role for alternative metabolic pathways. **Journal of Plant Physiology**, v.168, p.1434-1443, 2011.

VERMA, G.; MISHRA, S.; SANGWAN, N.; SHARMA, S. Reactive oxygen species mediate axis-cotyledon signaling to induce reserve mobilization during germination and

- seedling establishment in *Vigna radiata*. **Journal of Plant Physiology**, v.184, p.79-88, 2015.
- VERMA, V.; RAVINDRAN, P.; KUMAR, P. P. Plants hormone-mediated regulation of stress responses. **BMC Plant Biology**, v.16, n.86, 2016.
- WAHID, A.; PERVEEN, M.; GELANI, S.; BASRA, S. M. A. Pretreatment of seed with H₂O₂ improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.283-294, 2007.
- WANG, L.; HUA, D.; HE, J.; DUAN, Y.; CHEN, Z.; HONG, X.; GONG, Z. Auxin response factor2 (ARF2) and its regulated homeodomain gene HB33 mediate abscisic acid response in *Arabidopsis*. **PLoS Genetics**, v.7, e1002172, 2011.
- WANG, W-Q.; LIU, S-J.; SONG, S-Q.; MØLLER, I. M. Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.86, p.1-15, 2015.
- WEITBRECHT, K.; MULLER, K.; LEUBNER-METZGER, G. First off the mark: early seed germination. **Journal of Experimental Botany**, v.62, p.3289-3309, 2011.
- WELINDER, K. G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. **Current Opinion in Structural Biology**, v.2, p.388-393, 1992.
- WILLEKENS, H.; INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M.; VAN CAMP, W. Catalases in plants. **Molecular Breeding**, v.1, p.207-228, 1995.
- WOJTYLA, Ł.; LECHOWSKA, K.; KUBALA, S.; GARNCZARSKA, M. Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. **Frontiers in Plant Science**, v.7, n.66, 2016.
- WOLF, S.; HÉMATY, K.; HOFTE, H. Growth control and cell wall signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.63, p.381-407, 2012.
- WONG, P-F.; ABUBAKAR, S. Post-germination changes in *Hevea brasiliensis* seeds proteome. **Plant Science**, v.169, p.303-311, 2005.
- XU, L.; TANG, Y.; GAO, S.; SU, S.; HONG, L.; WANG, W.; FANG, Z.; LI, X.; MA, J.; QUAN, W.; SUN, H.; LI, X.; WANG, Y.; LIAO, X.; GAO, J.; ZHANG, F.; LI, L.; ZHAO, C. Comprehensive analyses of the annexin gene family in wheat. **BMC Genomics**, v.17, n.415, 2016.
- YACOUBI, R.; JOB, C.; BELGHAZI, M.; CHAIBI, W.; JOB, D. Toward characterizing seed vigor in alfalfa through proteomic analysis of germination and priming. **Journal of Proteome Research**, v.10, p.3891-3903, 2011.
- YAN, H.; LUO, Y.; JIANG, Z.; WANG, F.; ZHOU, B.; XU, Q. Cloning and Expression Characterization of Four Annexin Genes During Germination and Abiotic Stress in *Brassica rapa* subsp. *rapa* 'Tsuda'. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 34, p.467-482, 2016.

- YE, N. JIA, L.; ZHANG, J. ABA signal in rice under stress conditions. **Rice**, v.5, n.1, 2012.
- YOU, J.; CHAN, Z. ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. **Frontiers in Plant Science**, v.6, n.1092, 2015.
- ZEEMAN, S. C. Carbohydrate metabolism. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Second Edition, 2015, 1280p.
- ZHAO, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. **Annual Review of Plant Biology**, v.61, p.49-64, 2010.
- ZHANG, X. -H.; RAO, X. -L.; SHI, H. -T.; LI, R. -J.; LU, Y. -T. Overexpression of a cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene *OsGAPC3* confers salt tolerance in rice. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, p.1-11, 2011.
- ZHANG, Y.; CHEN, B.; XU, Z.; SHI, Z.; CHEN, S.; HUANG, X.; CHEN, J.; WANG, X. Involvement of reactive oxygen species in endosperm cap weakening and embryo elongation growth during lettuce seed germination. **Journal of Experimental Botany**, 65, p.3189-3200, 2014.
- ZHU, J. K. Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.53, p.247-273, 2002.
- ZHU, Q.; ZHANG, J.; GAO, X.; TONG, J.; XIAO, L.; LI, L.; ZHANG, H. The Arabidopsis AP2/ERF transcription factor RAP2.6 participates in ABA, salt and osmotic stress responses. **Gene**, v.457, p.1-12, 2010.

ANEXO

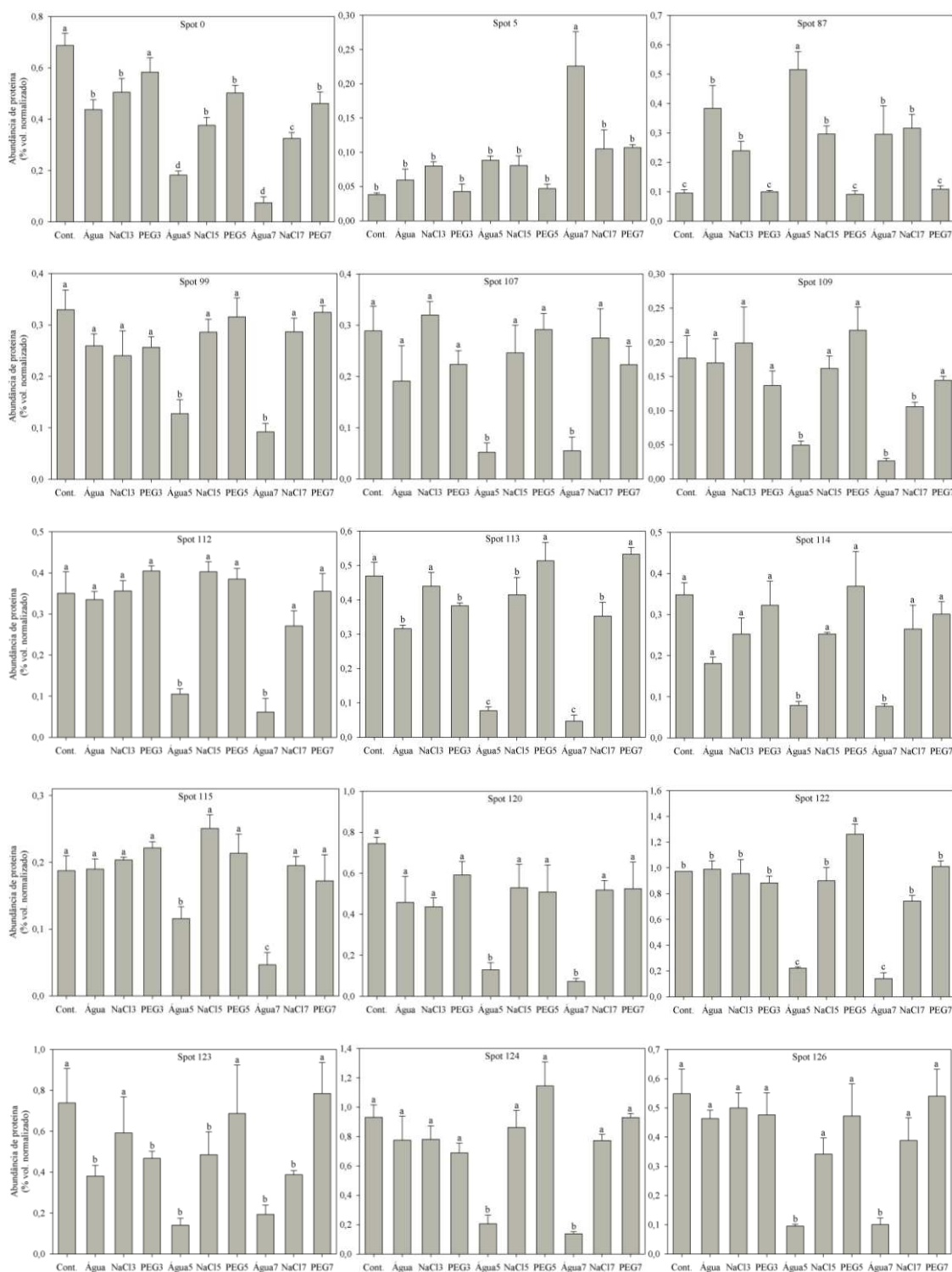


Figura 14. Quantidade de proteína (% volume normalizado) associada com os *spots* não identificados (0, 5, 87, 99, 107, 109, 112, 113, 114, 115, 120, 122, 123, 124 e 126) e que tiveram maior diferença de abundância entre sementes secas (controle) e as sementes submetidas a embebição em água e sob estresse salino e hídrico por 3, 5 e 7 dias. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$), sendo que *spots* com tratamentos sem letras não diferem entre si.

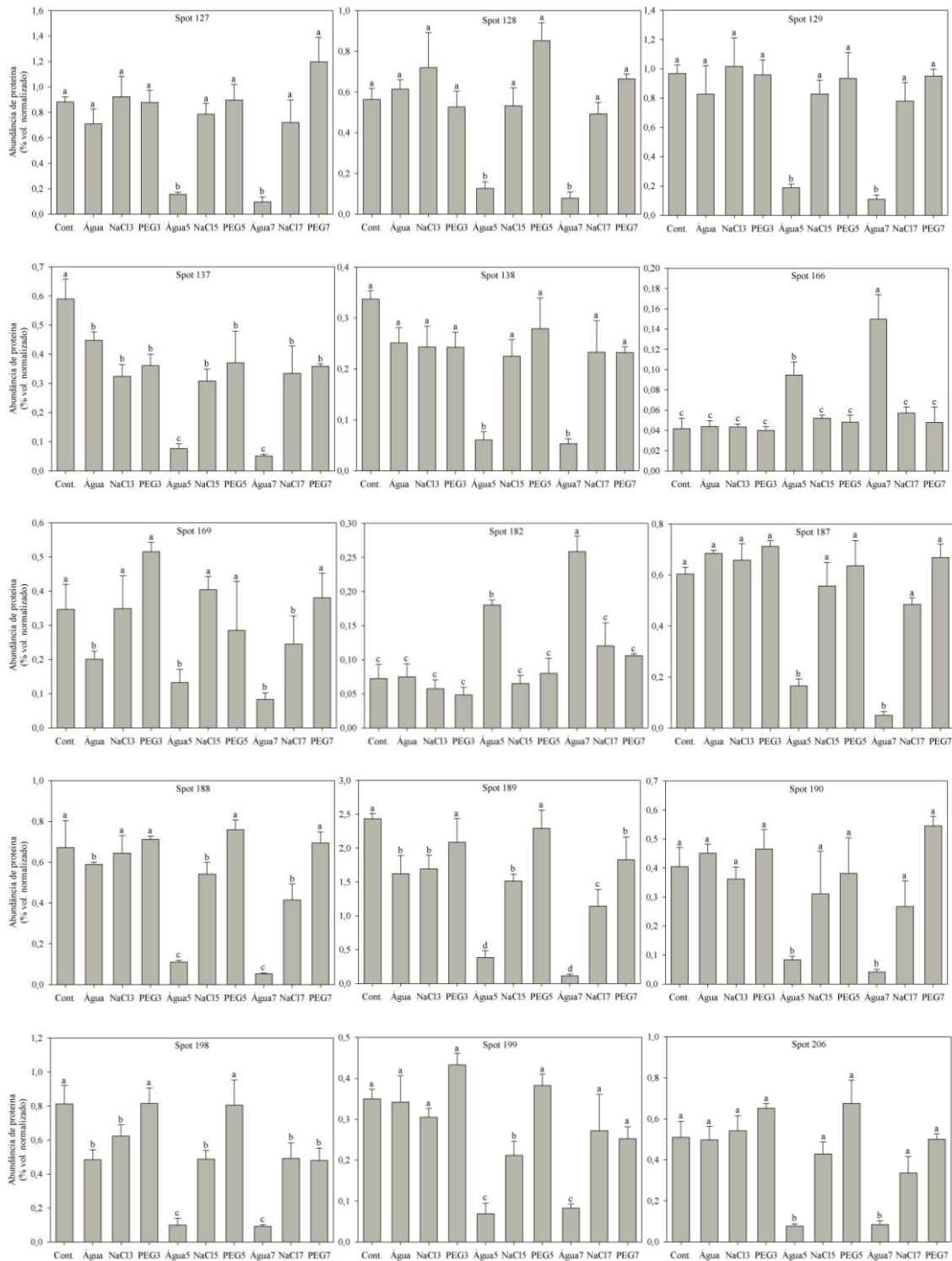


Figura 15. Quantidade de proteína (% volume normalizado) associada com os *spots* não identificados (127, 128, 129, 137, 138, 166, 169, 182, 187, 188, 189, 190, 198, 199 e 206) e que tiveram maior diferença de abundância entre sementes secas (controle) e as sementes submetidas a embebição em água e sob estresse salino e hídrico por 3, 5 e 7 dias. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$), sendo que spots com tratamentos sem letras não diferem entre si.

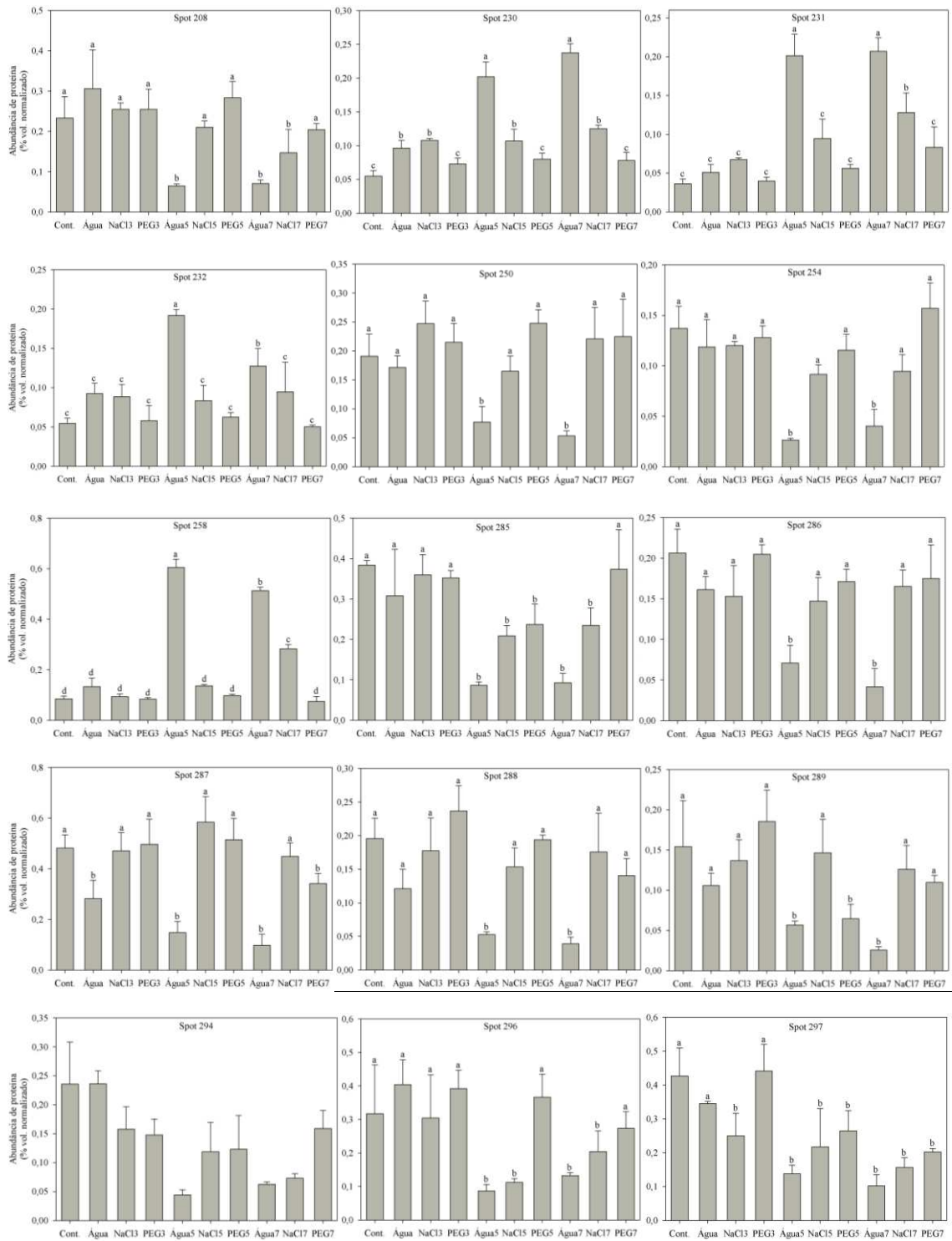


Figura 16. Quantidade de proteína (% volume normalizado) associada com os *spots* não identificados (208, 230, 231, 232, 250, 254, 258, 285, 286, 287, 288, 289, 294, 296 e 297) e que tiveram maior diferença de abundância entre sementes secas (controle) e as sementes submetidas a embebição em água e sob estresse salino e hídrico por 3, 5 e 7 dias. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$), sendo que *spots* com tratamentos sem letras não diferem entre si.

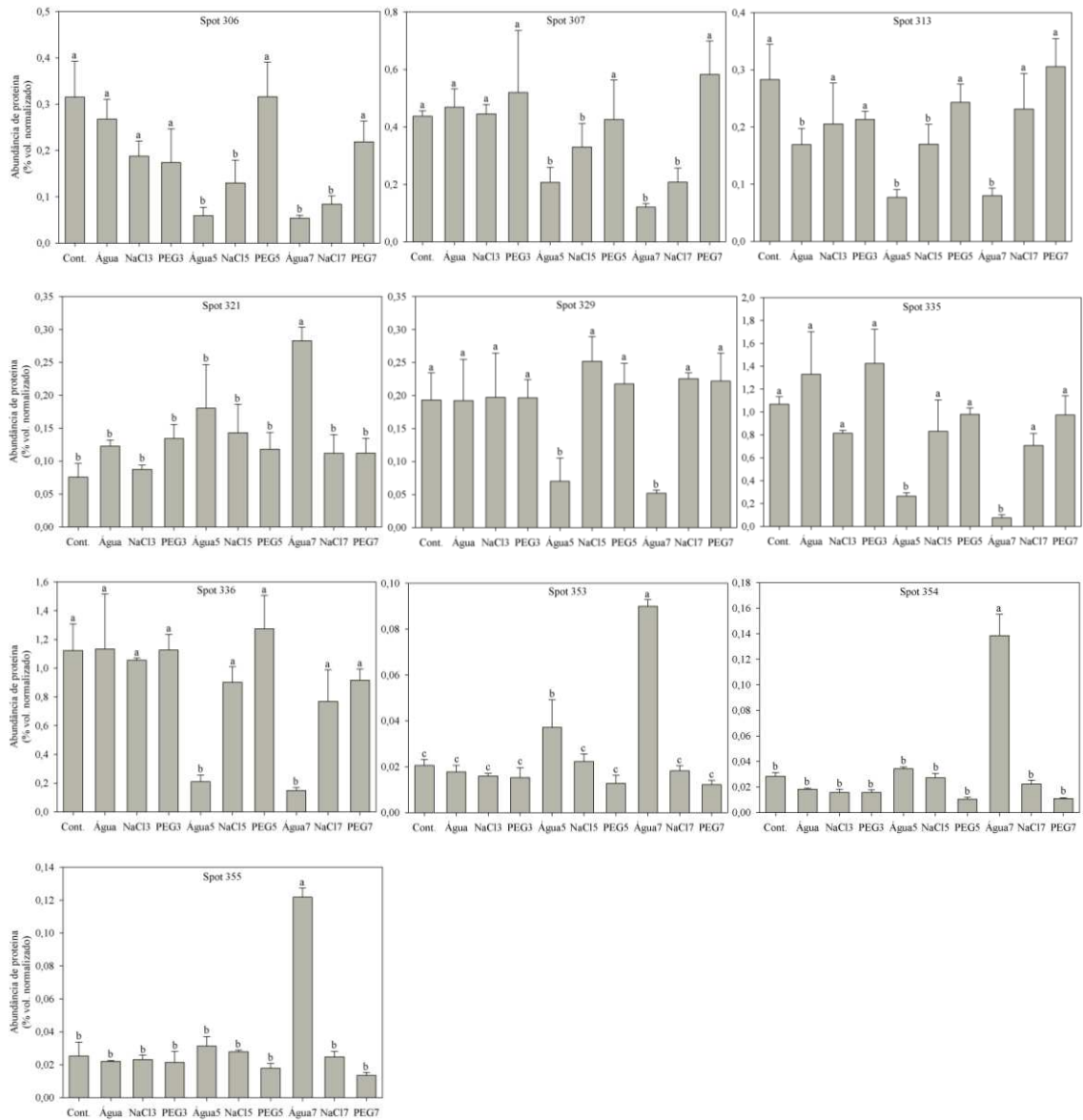


Figura 17. Quantidade de proteína (% volume normalizado) associada com os *spots* não identificados (306, 307, 313, 321, 329, 335, 336, 353, 354 e 355) e que tiveram maior diferença de abundância entre sementes secas (controle) e as sementes submetidas a embebição em água e sob estresse salino e hídrico por 3, 5 e 7 dias. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$), sendo que spots com tratamentos sem letras não diferem entre si.

Tabela 4. Coeficientes de correlação de sperman (r_s) entre os valores médios de tempo, ganho de peso (GP), germinação (G), peso do embrião (PE), comprimento do embrião (CE), MDA, peróxido de hidrogênio (PERO), SOD, CAT, APX, POX, ACC, AIA, AS, ABA, Fosfoglicerato quinase (PGK), α -L-Arabinofuranosidase (ARAB), conglutina (CONG) e anexina (ANEX) em sementes de *Melanoxylon brauna* durante germinação em água.

	TEMPO	GP	G	PE	CE	MDA	PERO	SOD	CAT	APX	POX	ACC	AIA	AS	ABA	PGK	ARAB	CONG	ANEX
TEMPO		1,0	0,9	1,0	1,0	-1,0	-1,0	1,0	0,8	1,0	1,0	0,2	-0,8	-1,0	-0,8	-0,8	-1,0	-0,6	-1,0
GP	1,0		0,9	1,0	1,0	-1,0	-1,0	1,0	0,8	1,0	1,0	0,2	-0,8	-1,0	-0,8	-0,8	-1,0	-0,6	-1,0
G	0,9	0,9		0,9	0,9	-0,9	-0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,3	-0,6	-0,9	-0,9	-0,9	-0,9	-0,7	-0,9
PE	1,0	1,0	0,9		1,0	-1,0	-1,0	1,0	0,8	1,0	1,0	0,2	-0,8	-1,0	-0,8	-0,8	-1,0	-0,6	-1,0
CE	1,0	1,0	0,9	1,0		-1,0	-1,0	1,0	0,8	1,0	1,0	0,2	-0,8	-1,0	-0,8	-0,8	-1,0	-0,6	-1,0
MDA	-1,0	-1,0	-0,9	-1,0	-1,0		1,0	-1,0	-0,8	-1,0	-1,0	-0,2	0,8	1,0	0,8	0,8	1,0	0,6	1,0
PERO	-1,0	-1,0	-0,9	-1,0	-1,0	1,0		-1,0	-0,8	-1,0	-1,0	-0,2	0,8	1,0	0,8	0,8	1,0	0,6	1,0
SOD	1,0	1,0	0,9	1,0	1,0	-1,0	-1,0		0,8	1,0	1,0	0,2	-0,8	-1,0	-0,8	-0,8	-1,0	-0,6	-1,0
CAT	0,8	0,8	0,9	0,8	0,8	-0,8	-0,8	0,8		0,8	0,8	0,4	-0,4	-0,8	-1,0	-1,0	-0,8	-0,8	-0,8
APX	1,0	1,0	0,9	1,0	1,0	-1,0	-1,0	1,0	0,8		1,0	0,2	-0,8	-1,0	-0,8	-0,8	-1,0	-0,6	-1,0
POX	1,0	1,0	0,9	1,0	1,0	-1,0	-1,0	1,0	0,8	1,0		0,2	-0,8	-1,0	-0,8	-0,8	-1,0	-0,6	-1,0
ACC	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	-0,2	-0,2	0,2	0,4	0,2	0,2		-0,4	-0,2	-0,4	-0,4	-0,2	0,2	-0,2
AIA	-0,8	-0,8	-0,6	-0,8	-0,8	0,8	0,8	-0,8	-0,4	-0,8	-0,8	-0,4		0,8	0,4	0,4	0,8	0,0	0,8
AS	-1,0	-1,0	-0,9	-1,0	-1,0	1,0	1,0	-1,0	-0,8	-1,0	-1,0	-0,2	0,8		0,8	0,8	1,0	0,6	1,0
ABA	-0,8	-0,8	-0,9	-0,8	-0,8	0,8	0,8	-0,8	-1,0	-0,8	-0,8	-0,4	0,4	0,8		1,0	0,8	0,8	0,8
PGK	-0,8	-0,8	-0,9	-0,8	-0,8	0,8	0,8	-0,8	-1,0	-0,8	-0,8	-0,4	0,4	0,8	1,0		0,8	0,8	0,8
ARAB	-1,0	-1,0	-0,9	-1,0	-1,0	1,0	1,0	-1,0	-0,8	-1,0	-1,0	-0,2	0,8	1,0	0,8	0,8		0,6	1,0
CONG	-0,6	-0,6	-0,7	-0,6	-0,6	0,6	0,6	-0,6	-0,8	-0,6	-0,6	0,2	0,0	0,6	0,8	0,8	0,6		0,6
ANEX	-1,0	-1,0	-0,9	-1,0	-1,0	1,0	1,0	-1,0	-0,8	-1,0	-1,0	-0,2	0,8	1,0	0,8	0,8	1,0	0,6	

Tabela 5. Coeficientes de correlação de sperman (r_s) entre os valores médios de tempo, ganho de peso (GP), germinação (G), peso do embrião (PE), comprimento do embrião (CE), MDA, peróxido de hidrogênio (PERO), SOD, CAT, APX, POX, ACC, AIA, AS, ABA, Fosfoglicerato quinase (PGK), α -L-Arabinofuranosidase (ARAB), cong lutina (CONG) e anexina (ANEX) em sementes de *Melanoxylon brauna* durante germinação sob estresse hídrico.

	TEMPO	GP	G	PE	CE	MDA	PERO	SOD	CAT	APX	POX	ACC	AIA	AS	ABA	PGK	ARAB	CONG	ANEX
TEMPO		1,00		0,20	0,40	-1,00	-1,00	1,00	-0,40	0,60	1,00	-0,80	0,40	0,80	-0,80	0,20	-0,40	-0,20	0,80
GP	1,00			0,20	0,40	-1,00	-1,00	1,00	-0,40	0,60	1,00	-0,80	0,40	0,80	-0,80	0,20	-0,40	-0,20	0,80
G																			
PE	0,20	0,20			0,80	-0,20	-0,20	0,20	-0,80	-0,20	0,20	-0,40	0,80	0,40	-0,40	-0,60	-0,80	0,60	0,40
CE	0,40	0,40		0,80		-0,40	-0,40	0,40	-0,40	0,40	0,40	-0,80	1,00	0,20	-0,20	-0,80	-1,00	0,80	0,20
MDA	-1,00	-1,00		-0,20	-0,40		1,00	-1,00	0,40	-0,60	-1,00	0,80	-0,40	-0,80	0,80	-0,20	0,40	0,20	-0,80
PERO	-1,00	-1,00		-0,20	-0,40	1,00		-1,00	0,40	-0,60	-1,00	0,80	-0,40	-0,80	0,80	-0,20	0,40	0,20	-0,80
SOD	1,00	1,00		0,20	0,40	-1,00	-1,00		-0,40	0,60	1,00	-0,80	0,40	0,80	-0,80	0,20	-0,40	-0,20	0,80
CAT	-0,40	-0,40		-0,80	-0,40	0,40	0,40	-0,40		0,40	-0,40	0,20	-0,40	-0,80	0,80	0,00	0,40	0,00	-0,80
APX	0,60	0,60		-0,20	0,40	-0,60	-0,60	0,60	0,40		0,60	-0,80	0,40	0,00	0,00	-0,20	-0,40	0,20	0,00
POX	1,00	1,00		0,20	0,40	-1,00	-1,00	1,00	-0,40	0,60		-0,80	0,40	0,80	-0,80	0,20	-0,40	-0,20	0,80
ACC	-0,80	-0,80		-0,40	-0,80	0,80	0,80	-0,80	0,20	-0,80	-0,80		-0,80	-0,40	0,40	0,40	0,80	-0,40	-0,40
AIA	0,40	0,40		0,80	1,00	-0,40	-0,40	0,40	-0,40	0,40	0,40	-0,80		0,20	-0,20	-0,80	-1,00	0,80	0,20
AS	0,80	0,80		0,40	0,20	-0,80	-0,80	0,80	-0,80	0,00	0,80	-0,40	0,20		-1,00	0,40	-0,20	-0,40	1,00
ABA	-0,80	-0,80		-0,40	-0,20	0,80	0,80	-0,80	0,80	0,00	-0,80	0,40	-0,20	-1,00		-0,40	0,20	0,40	-1,00
PGK	0,20	0,20		-0,60	-0,80	-0,20	-0,20	0,20	0,00	-0,20	0,20	0,40	-0,80	0,40	-0,40		0,80	-1,00	0,40
ARAB	-0,40	-0,40		-0,80	-1,00	0,40	0,40	-0,40	0,40	-0,40	-0,40	0,80	-1,00	-0,20	0,20	0,80		-0,80	-0,20
CONG	-0,20	-0,20		0,60	0,80	0,20	0,20	-0,20	0,00	0,20	-0,20	-0,40	0,80	-0,40	0,40	-1,00	-0,80		-0,40
ANEX	0,80	0,80		0,40	0,20	-0,80	-0,80	0,80	-0,80	0,00	0,80	-0,40	0,20	1,00	-1,00	0,40	-0,20	-0,40	

Tabela 6. Coeficientes de correlação de sperman (r_s) entre os valores médios de tempo, ganho de peso (GP), germinação (G), peso do embrião (PE), comprimento do embrião (CE), MDA, peróxido de hidrogênio (PERO), SOD, CAT, APX, POX, ACC, AIA, AS, ABA, Fosfoglicerato quinase (PGK), α -L-Arabinofuranosidase (ARAB), cong lutina (CONG) e anexina (ANEX) em sementes de *Melanoxylon brauna* durante germinação sob estresse salino.

	TEMPO	GP	G	PE	CE	MDA	PERO	SOD	CAT	APX	POX	ACC	AIA	AS	ABA	PGK	ARAB	CONG	ANEX
TEMPO		1,00	0,95	1,00	1,00	-1,00	-1,00	1,00	0,80	1,00	1,00	0,40	-0,60	-1,00	-1,00	-1,00	-0,80	-1,00	-0,80
GP	1,00		0,95	1,00	1,00	-1,00	-1,00	1,00	0,80	1,00	1,00	0,40	-0,60	-1,00	-1,00	-1,00	-0,80	-1,00	-0,80
G	0,95	0,95		0,95	0,95	-0,95	-0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,63	-0,74	-0,95	-0,95	-0,95	-0,63	-0,95	-0,95
PE	1,00	1,00	0,95		1,00	-1,00	-1,00	1,00	0,80	1,00	1,00	0,40	-0,60	-1,00	-1,00	-1,00	-0,80	-1,00	-0,80
CE	1,00	1,00	0,95	1,00		-1,00	-1,00	1,00	0,80	1,00	1,00	0,40	-0,60	-1,00	-1,00	-1,00	-0,80	-1,00	-0,80
MDA	-1,00	-1,00	-0,95	-1,00	-1,00		1,00	-1,00	-0,80	-1,00	-1,00	-0,40	0,60	1,00	1,00	1,00	0,80	1,00	0,80
PERO	-1,00	-1,00	-0,95	-1,00	-1,00	1,00		-1,00	-0,80	-1,00	-1,00	-0,40	0,60	1,00	1,00	1,00	0,80	1,00	0,80
SOD	1,00	1,00	0,95	1,00	1,00	-1,00	-1,00		0,80	1,00	1,00	0,40	-0,60	-1,00	-1,00	-1,00	-0,80	-1,00	-0,80
CAT	0,80	0,80	0,95	0,80	0,80	-0,80	-0,80	0,80		0,80	0,80	0,80	-0,80	-0,80	-0,80	-0,80	-0,40	-0,80	-1,00
APX	1,00	1,00	0,95	1,00	1,00	-1,00	-1,00	1,00	0,80		1,00	0,40	-0,60	-1,00	-1,00	-1,00	-0,80	-1,00	-0,80
POX	1,00	1,00	0,95	1,00	1,00	-1,00	-1,00	1,00	0,80	1,00		0,40	-0,60	-1,00	-1,00	-1,00	-0,80	-1,00	-0,80
ACC	0,40	0,40	0,63	0,40	0,40	-0,40	-0,40	0,40	0,80	0,40	0,40		-0,40	-0,40	-0,40	-0,40	-0,20	-0,40	-0,80
AIA	-0,60	-0,60	-0,74	-0,60	-0,60	0,60	0,60	-0,60	-0,80	-0,60	-0,60	-0,40		0,60	0,60	0,60	0,00	0,60	0,80
AS	-1,00	-1,00	-0,95	-1,00	-1,00	1,00	1,00	-1,00	-0,80	-1,00	-1,00	-0,40	0,60		1,00	1,00	0,80	1,00	0,80
ABA	-1,00	-1,00	-0,95	-1,00	-1,00	1,00	1,00	-1,00	-0,80	-1,00	-1,00	-0,40	0,60	1,00		1,00	0,80	1,00	0,80
PGK	-1,00	-1,00	-0,95	-1,00	-1,00	1,00	1,00	-1,00	-0,80	-1,00	-1,00	-0,40	0,60	1,00	1,00		0,80	1,00	0,80
ARAB	-0,80	-0,80	-0,63	-0,80	-0,80	0,80	0,80	-0,80	-0,40	-0,80	-0,80	-0,20	0,00	0,80	0,80	0,80		0,80	0,40
CONG	-1,00	-1,00	-0,95	-1,00	-1,00	1,00	1,00	-1,00	-0,80	-1,00	-1,00	-0,40	0,60	1,00	1,00	1,00	0,80		0,80
ANEX	-0,80	-0,80	-0,95	-0,80	-0,80	0,80	0,80	-0,80	-1,00	-0,80	-0,80	-0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,40	0,80	