



GEOVANE DA SILVA DIAS

**CICLOS DE HIDRATAÇÃO E DESIDRATAÇÃO EM
SEMENTES DE *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos**

LAVRAS-MG

2020

GEOVANE DA SILVA DIAS

**CICLOS DE HIDRATAÇÃO E DESIDRATAÇÃO EM SEMENTES DE *Handroanthus*
heptaphyllus (Vell.) Mattos**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração Crescimento e Desenvolvimento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Prof.^a Dr.^a Elisa Monteze Bicalho

Orientadora

Prof.^a Dr.^a Queila de Souza Garcia

Coorientadora

LAVRAS, MG

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Dias, Geovane da Silva.

Ciclos de hidratação e desidratação em sementes de
Handroanthus heptaphyllus (Vell.) Mattos / Geovane da Silva
Dias. - 2020.

55 p. : il.

Orientador(a): Elisa Monteze Bicalho.

Coorientador(a): Queila de Souza Garcia.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Hidratação descontínua. 2. ipê rosa. 3. tolerância à
dessecação. I. Bicalho, Elisa Monteze. II. Garcia, Queila de Souza.
III. Título.

GEOVANE DA SILVA DIAS

**CICLOS DE HIDRATAÇÃO E DESIDRATAÇÃO EM SEMENTES DE *Handroanthus
heptaphyllus* (Vell.) Mattos**

**HYDRATION AND DEHYDRATION CYCLES IN SEEDS OF *Handroanthus
heptaphyllus* (Vell.) Mattos**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração Crescimento e Desenvolvimento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de julho de 2020

Dr.^a Queila de Souza Garcia UFMG

Dr. Marcos Vinícius Meiado UFS

Prof.^a Dr.^a Elisa Monteze Bicalho

(Orientadora)

Prof.^a Dr.^a Queila de Souza Garcia

(Coorientadora)

LAVRAS-MG

2020

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras - UFLA, ao Setor de Fisiologia Vegetal e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À minha orientadora, Profa. Elisa Monteze Bicalho, por ter aceitado me orientar, pela paciência, conselhos, ensinamentos e esclarecimentos.

À minha coorientadora, Profa. Queila de Souza Garcia, pelo suporte e confiança a mim depositados.

À Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG pela oportunidade da realização das análises bioquímicas no ICB.

Aos professores Queila de Souza Garcia e Marcos Vinicius Meiado, por aceitarem o convite e pelas contribuições nesse trabalho.

Aos funcionários do Setor de Fisiologia Vegetal, em especial Salete.

A todos que fazem o LCDP, Aline, Alisson, Ana Maria, Daniela, Fábio, Isadora, Josyelem, Maria Isabel, Marina, Melina, Moisés, Rafael, Taís, Thaiara, Valdelice, Victor e Vivian. Obrigado pela troca de experiências, vivência, aprendizado e dias de curva de embebição. Em especial, um agradecimento à Josy, por todas as discussões, esclarecimentos, ajuda e por me aturar.

Um agradecimento especial à Talita, pelos ensinamentos, paciência e ajuda na realização das análises bioquímicas.

Aos “guanaxos”, a companhia e ajuda de vocês foram essenciais nessa caminhada, sem vocês seria mais difícil.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o meu crescimento pessoal e profissional e para a realização desse trabalho.

À minha família, aos meus pais, em especial à minha mãe pelo amor e apoio incondicionais.

À minha irmã, pela torcida e apoio de sempre, e pela chegada da minha sobrinha Liz Helena.

A Deus, pelo dom da vida.

Muito agradecido!

RESUMO

Durante a fase final de formação, as sementes ortodoxas adquirem tolerância à dessecação, que as permitem suportar a secagem no processo de maturação. A tolerância à dessecação permite que as sementes passem por ciclos de hidratação e desidratação que podem ou não reduzir sua capacidade germinativa. Esse trabalho teve como objetivo compreender quais os mecanismos bioquímicos e fisiológicos das sementes de *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos, estão envolvidos na tolerância à dessecação em resposta aos ciclos de hidratação e desidratação em diferentes tempos da embebição. Para isso, as sementes foram embebidas durante 10 horas (tempo X) e 35 horas (tempo Y) e posteriormente desidratadas por 12 horas (retorno ao peso inicial fresco) progressivamente durante quatro vezes (constituindo os ciclos de hidratação e desidratação, HD). Foram avaliados parâmetros germinativos (porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação) e bioquímicos (níveis de carboidratos, proteínas, aminoácidos e H_2O_2) e atividade do sistema antioxidante enzimático nas sementes no final da última reidratação de cada ciclo (catalase, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e glutathione redutase). Os mesmos parâmetros bioquímicos, além de parâmetros de acúmulo de biomassa (altura, comprimento da raiz, número de folhas, massa seca da parte aérea e da raiz) e pigmentos fotossintéticos, foram avaliados nas plântulas aos 60 dias. Verificou-se que os ciclos e os tempos influenciam na germinação e na bioquímica das sementes. Sementes que passaram pelo tempo X tiveram sua germinação reduzida até o quarto ciclo, danos à membrana e acúmulo de açúcares solúveis, não redutores, aminoácidos e prolina principalmente após o primeiro ciclo HD (1HD). Ciclos HD aplicados durante o tempo Y uniformizaram e aceleraram a germinação nos dois primeiros ciclos, não apresentando dano à membrana, mas acumulando açúcares solúveis não redutores, aminoácidos e prolina, porém, em menores níveis que os observados nos ciclos do tempo X. As plântulas provenientes de sementes que passaram por algum ciclo apresentaram maior comprimento da raiz, com aumento dos teores de clorofila *a*, total e carotenoides. Maiores concentrações de açúcares solúveis não redutores, com acúmulo de prolina foram observadas após 4HD em ambas os tempos. Conclui-se que ciclos de HD no tempo X são mais prejudiciais à germinação das sementes e se tornam mais severos com a progressão dos ciclos. No entanto, os ciclos HD durante o tempo Y adiantaram e sincronizaram a germinação das sementes. A passagem pelos ciclos, independente do tempo aumentou as concentrações de açúcares solúveis não redutores e de prolina, o que conferiu tolerância à dessecação às sementes. A presença desses metabólitos em elevadas concentrações também nas plântulas sugere que uma resposta ao estresse foi passada das sementes que passaram por ciclos HD para as plântulas.

Palavras-chave: Bignoniaceae, fase de embebição, ipê-rosa, semente ortodoxa, tolerância à dessecação.

ABSTRACT

During the final stage of formation, orthodox seeds acquire tolerance to desiccation, which allows them to withstand drying in the maturation process. Tolerance to desiccation allows the seeds to undergo hydration and dehydration cycles that may or may not reduce their germination capacity. This work aimed to understand the biochemical and physiological mechanisms of the seeds of *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos, are involved in desiccation tolerance in response to hydration and dehydration cycles at different imbibition times. For this, the seeds were soaked for 10 hours (time X) and 35 hours (time Y) and subsequently dehydrated for 12 hours (return to initial fresh weight) progressively for four times (constituting the hydration and dehydration cycles, HD). Germinative parameters (percentage of germination, germination speed index) and biochemical parameters (levels of carbohydrates, proteins, amino acids and H₂O₂) and activity of the enzymatic antioxidant system in the seeds at the end of the last rehydration of each cycle (catalase, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase). The same biochemical parameters, in addition to biomass accumulation parameters (height, root length, number of leaves, dry mass of aerial part and root) and photosynthetic pigments, were evaluated in seedlings at 60 days. It was found that cycles and times influence seed germination and biochemistry. Seeds that passed through time X had their germination reduced until the fourth cycle, damage to the membrane and accumulation of soluble, non-reducing sugars, amino acids and proline mainly after the first HD cycle (1HD). HD cycles applied during time Y standardized and accelerated germination in the first two cycles, showing no damage to the membrane, but accumulating soluble non-reducing sugars, amino acids and proline, however, at lower levels than those observed in the cycles of time X. Seedlings from seeds that have gone through some cycle had a longer root length, with increased levels of chlorophyll a, total and carotenoids. Higher concentrations of soluble non-reducing sugars, with accumulation of proline were observed after 4HD at both times. It is concluded that HD cycles in time X are more harmful to seed germination and become more severe with the progression of the cycles. However, HD cycles during time Y advanced and synchronized seed germination. The passage through the cycles, regardless of time, increased the concentrations of soluble non-reducing sugars and proline, which gave tolerance to desiccation of the seeds. The presence of these metabolites in high concentrations also in the seedlings suggests that a stress response was passed from the seeds that passed through HD cycles to the seedlings.

Key words: Bignoniaceae, imbibition phase, ipê-rosa, orthodox seed, desiccation tolerance.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REFERENCIAL TEÓRICO	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Local de coleta das sementes	17
3.2 Curva de embebição e determinação dos tempos de hidratação e desidratação	17
3.3 Ciclos de hidratação e desidratação (ciclos de HD)	18
3.4 Determinação de parâmetros germinativos	19
3.4.1 Germinabilidade	20
3.4.2 Índice de Velocidade de Germinação	20
3.4.3 T₅₀	20
3.5 Análise da viabilidade das sementes	20
3.6 Coleta e preparo das amostras	21
3.7 Integridade de membranas	21
Extravasamento de eletrólitos	21
Termoestabilidade de membrana	21
3.8 Análises bioquímicas	22
Extração e quantificação de açúcares	22
Proteínas	23
Aminoácidos	23
Peróxido de hidrogênio	23
Enzimas antioxidantes	24
3.9 Estabelecimentos de plântulas pós-tratamentos	25
3.10 Delineamento experimental e Análise estatística	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Respostas germinativas e viabilidade	26
4.2 Integridade de membranas	28
4.3 Análises bioquímicas	29
4.4 Formação de plântulas	35
5. DISCUSSÃO	40
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
6. REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

As sementes de espécies nativas de ambientes tropicais, ao serem dispersas, estão naturalmente sujeitas a períodos de secas sazonais, o que as expõe a ciclos de hidratação e desidratação que ocorrem no solo. A hidratação descontínua é um processo natural que pode induzir uma melhora na germinação das sementes e no estabelecimento das plântulas. A capacidade das sementes de tolerarem desidratação progressiva após a dispersão representa uma adaptação importante na evolução de plantas terrestres, a qual permite a produção de propágulos resilientes e garante a sobrevivência da espécie frente a estresses ambientais (CUMING, 1999).

A hidratação seguida de desidratação pelas quais as sementes passam promovem ajustes metabólicos que confere mudanças bioquímicas e fisiológicas que podem favorecer a longevidade e persistência, garantindo uma germinação mais acelerada, uniforme e sincronizada (BRUCE *et al.*, 2007; LONG *et al.*, 2011). Além disso, ciclos de hidratação e desidratação podem garantir maior tolerância a estresses diversos em sementes e plântulas.

A indústria agrícola desenvolveu uma técnica semelhante aos ciclos de hidratação e desidratação (HD) aos quais as sementes das espécies nativas estão sujeitas no ambiente, denominada *priming*, com o objetivo de induzir artificialmente uma germinação uniforme e otimizada (LÓPEZ-URRUTIA *et al.*, 2014). Dentre as técnicas de *priming* utilizadas, o *hidropriming* é a mais simples e de baixo custo tecnológico, por usar apenas água. No *hidropriming* as sementes são simplesmente embebidas em água antes da semeadura por um determinado período de tempo antes da protrusão radicular, seguido por uma secagem superficial das sementes até seu peso fresco inicial. O *hidropriming* homogeneiza a germinação, o estabelecimento de mudas, o vigor e a produtividade das colheitas em melhorando o desempenho das mudas em condições ótimas e mais resistentes a estresses bióticos e abióticos (SHER *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2020).

Espécies nativas que apresentam ampla distribuição territorial em ambientes tropicais, como *Handroanthus heptaphyllus*, além dos fatores ambientais, estão sujeitas a pressões antrópicas que produzem um cenário em que as sementes estejam sujeitas a passar mais vezes por períodos de hidratação e secagem. A intensidade e a periodicidade da ocorrência de hidratações descontínuas podem causar injúrias na germinabilidade das sementes, viabilidade e longevidade durante o período de permanência no banco de sementes, reduzindo a capacidade de estabelecimento das plântulas (LONG *et al.*, 2015).

O estudo das respostas fisiológicas das sementes após passarem por hidratações descontínuas pode elucidar os eventos metabólicos envolvidos na tolerância à dessecação.

Hipotetizou-se neste trabalho que sementes de *Handroanthus heptaphyllus* ativam mecanismos osmoprotetores e antioxidantes durante ciclos de hidratação e desidratação aplicados nas diferentes fases de embebição, sem afetar a sua germinabilidade e a capacidade de estabelecimento de plântula.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar as respostas fisiológicas das sementes de *Handroanthus heptaphyllus* submetidas à hidratação descontínua. Os resultados aqui obtidos contribuem para a compreensão de quais tipos de mecanismos de proteção estão sendo ativados em resposta aos ciclos de hidratação-desidratação durante diferentes fases de embebição e se essa resposta é mantida durante o estabelecimento das plântulas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Sementes ortodoxas adquirem tolerância à dessecação no final do processo de maturação, quando seu teor de água é reduzido e o embrião se mantém num estado de quiescência metabólica por um período indeterminado entre a dispersão e a retomada do metabolismo durante a embebição (BEWLEY & BLACK, 1985). No processo de pós-dispersão, as sementes ortodoxas apresentam menor conteúdo de água, o que permite sua

persistência no banco de sementes, geralmente por um período de tempo maior do que as recalcitrantes (BARBEDO & FILHO, 1998; MEDEIROS *et al.*, 2006).

A dispersão é um dos eventos mais importantes no ciclo de vida das angiospermas, por ser o vínculo entre o final do ciclo reprodutivo e o estabelecimento da plântula (WANG *et al.*, 2002; COUSENS, DYTHAM & LAW, 2008). As sementes ao serem dispersas no banco, evitam o ataque de patógenos e predadores especializados atraídos ou presentes na planta-mãe, reduzem ou previnem a competição entre plântulas, garantindo sucesso demográfico espacial onde as sementes possam germinar e se estabelecer, colonizando locais propícios por meio do recrutamento de novos indivíduos (ALMEIDA-CORTEZ, 2004; FENNER & THOMPSON, 2005). Após serem liberadas da planta-mãe as sementes podem germinar imediatamente ou permanecerem por um período indeterminado no solo formando bancos de sementes (FENNER & THOMPSON, 2005).

Em condições naturais, as sementes presentes no solo passam por períodos alternados de umidade e secagem ocasionados por eventos intermitentes de precipitação (BASKIN & BASKIN, 1982). Ambientes tropicais possibilitam a ocorrência de microclimas onde há períodos de chuva e estiagem sazonais e ocorrência de precipitação no período seco, expondo as sementes a ciclos de hidratação e desidratação no solo (SKOGLUND, 1992; CAVERS, 1994; CECCON; HUANTE & RINCÓN, 2006) e o estabelecimento das plântulas. Longos períodos de estresse hídrico e fatores bióticos como a competição com espécies exóticas e predação por animais domesticados constituem fatores que reduzem a sobrevivência das plântulas (FAGUNDES *et al.*, 2018).

Espécies nativas de regiões tropicais estão sujeitas à sazonalidade climática. As florestas semidecíduas que se localizam em regiões de transição com o bioma cerrado (formação savânica) são caracterizadas por uma estação seca e outra chuvosa. Nas florestas semidecíduais, tem-se uma estação marcada por intensas chuvas de verão, seguida por estiagem acentuada (*Aw*) e outra subtropical sem período seco (*Cwa*) (SILVA, ASSAD & EVANGELISTA 2008; IBGE, 2012; SNIF. 2019).

A família Bignoniaceae, pertencente à ordem Lamiales, com 827 espécies alocadas em 82 gêneros (LOHMANN & ULLOA, 2007), possui distribuição predominantemente neotropical com seu centro de diversidade no Brasil (GENTRY, 1980). Algumas espécies desta família, como as do gênero *Handroanthus*, apresentam distribuição em áreas sujeitas à sazonalidade climática. A espécie *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos (ipê-rosa) encontra-se na Lista Vermelha da flora brasileira como pouco preocupante (CNCFlora, 2012), e apresenta dispersão das sementes do final da estação seca ao início da estação chuvosa (GRINGS &

BRACK, 2011). A intensificação da utilização e exploração de sua madeira pode levar a um declínio populacional da espécie. (GRINGS & BRACK, 2011; CNCFlora, 2012), o que a torna um tema potencial para estudos de preservação. O ipê-rosa é uma árvore nativa, cujo florescimento exuberante é uma das características desejáveis no paisagismo, particularmente para a arborização de ruas e avenidas. É utilizada também para o reflorestamento em terrenos secos e pedregosos por ser uma espécie secundária inicial (GRINGS & BRACK, 2011). Espécies do gênero *Handroanthus* têm potencialidade para o reflorestamento (LORENZI, 1992), restauração (ZAMITH & SCARANO, 2006) recuperação de áreas degradadas (BARROSO *et al.*, 2018) e fitoestabilização de áreas contaminadas por zinco (GAI, SANTOS & VIEIRA, 2017).

Os representantes dessa família ocorrem em vários ambientes, desde savanas abertas a florestas úmidas e perenes (LOHMANN, 2015). Dessa forma, as sementes de *H. heptaphyllus*, após serem dispersas podem estar sujeitas a condições naturais de déficit hídrico, bem como por chuvas ocasionais. Assim, é possível que a longevidade das sementes seja negativa ou positivamente influenciada por ciclos de hidratação-desidratação resultantes de eventos intermitentes de hidratação e secagem (KRANNER & BIRTIC¹, 2005; LONG *et al.*, 2015).

A água tem importante papel durante a fase de embebição das sementes, pois possibilita a reidratação dos tecidos e reativação do metabolismo da semente, iniciando, dessa forma o processo germinativo (POPINIGIS, 1985; BEWLEY *et al.*, 2013). No processo de embebição de sementes ortodoxas, a entrada de água obedece a um modelo trifásico. Na Fase I há uma absorção rápida de água influenciada pelo potencial mátrico da semente, até que todos os tecidos estejam hidratados. A absorção inicial de água durante a Fase I é principalmente um processo físico, mas as atividades fisiológicas como respiração, síntese de proteínas e reparo de DNA são iniciadas antes de todos os tecidos estarem completamente hidratados (BEWLEY *et al.*, 2013; DEKKERS *et al.*, 2015; NONOGAKI, CHEN & BRADFORD, 2018).

Na Fase II da embebição, a entrada da água é promovida pelo potencial osmótico até a estabilização pela pressão de turgor ou potencial de pressão, atingindo um platô. Nessa etapa ocorre o reparo dos danos ocasionados durante a dispersão e armazenamento e início de degradação de reservas e alongamento da radícula ou eixo embrionário. Alguns mRNAs armazenados são traduzidos, mas a maioria é degradado à medida que novos genes são transcritos. Reservas de armazenamento no endosperma micropilar são mobilizadas e enzimas associadas ao enfraquecimento do endosperma e ao crescimento do embrião são sintetizadas.

O embrião desenvolve pressão de turgor necessária para romper os tecidos que o revestem (NONOGAKI; BASSEL & BEWLEY, 2010; BEWLEY *et al.*, 2013).

Com o avanço do processo germinativo, à medida que o metabolismo das sementes se intensifica e as reservas são consumidas, os mecanismos de tolerância à dessecação são progressivamente desativados (DEKKERS *et al.*, 2015). A perda da tolerância à dessecação das sementes vai depender da espécie e da fase de embebição onde houve a secagem (NONOGAKI; BASSEL & BEWLEY, 2010; BEWLEY *et al.*, 2013) , podendo acontecer antes da protrusão radicular (PEREIRA *et al.*, 2014) ou após protrusão radicular (BUITINK *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2016).

A emergência da radícula através do endosperma e da testa marca o final da germinação *sensu stricto* e o início do crescimento da plântula. O último estágio (crescimento), a Fase III, é marcado pela reabsorção da água pela semente, associada com o alongamento do eixo embrionário (resultado das divisões e expansões celulares), promovendo a emergência da plântula. Na Fase III, em certo estágio de desenvolvimento após a germinação, as sementes ortodoxas perdem completamente a capacidade de tolerar a secagem extrema e tornam-se sensíveis à dessecação (BEWLEY *et al.*, 2013; DEKKERS *et al.*, 2015; NONOGAKI, CHEN & BRADFORD, 2018).

A passagem das sementes por ciclos de hidratação e desidratação funciona como um *priming* natural, podendo aumentar sua tolerância às condições de estresse hídrico através da impressão de estresse ("memória à hidratação") por meio de duas estratégias (CHEN & ARORA, 2013; WOJTYLA *et al.*, 2016). Na primeira estratégia, denominada "ponto inicial da germinação", as sementes que passaram pelo *priming* ativam processos fisiológicos relacionados à germinação, levando a uma melhora na germinação (CHEN & ARORA, 2013; WOJTYLA *et al.*, 2016). A segunda estratégia é a de "impressão/tolerância cruzada ao estresse" e está relacionada à exposição ao estresse pré-germinativo (CHEN & ARORA, 2013). Essas duas estratégias juntas constituem a "memória do *priming*" que pode ser recrutada após uma exposição subsequente ao estresse e medeia maior tolerância ao estresse durante a germinação (WOJTYLA *et al.*, 2016). O *priming* de sementes consiste no controle da hidratação das sementes em água ou em solução de baixo potencial osmótico para iniciar o metabolismo de germinação sem a protrusão radicular (SHER *et al.*, 2019). Existem vários tipos de *priming* de semente, e várias as substâncias que podem ser utilizadas incluindo *hidropriming*, *halopriming*, *osmopriming*, *priming* de matriz sólida, *biopriming*, *nutripriming*, *hormopriming*, *nanopriming* entre outros (LUTTS *et al.*, 2015; SHER *et al.*, 2019).

A técnica de *hidropriming* é utilizada na indústria em várias espécies de interesse agrônômico e florestal (LÓPEZ-URRUTIA *et al.*, 2014). No *hidropriming*, as sementes são embebidas em água pura sob temperatura ideal, com ou sem aeração e novamente secas para teor de umidade original antes da semeadura. Este método é econômico e ecológico, pois não há uso de compostos químicos adicionais. O *hidropriming* é usado desde a antiguidade para preparação de sementes, e seus benefícios são conhecidos por um muito tempo na pré-semeadura; no entanto, foi aplicado menos em comparação a outras metodologias de tratamento de sementes (SINGH *et al.*, 2020).

A aquisição da tolerância à dessecação é estabelecida durante a hidratação descontínua (*hidropriming* natural) onde as sementes apresentam um estágio fisiológico avançado do desenvolvimento, que confere capacidade de reter alterações bioquímicas e fisiológicas após exposição subsequente ao estresse. Assim, a aplicação do *priming* desencadeia maior tolerância ao estresse, o que ocorre naturalmente na hidratação descontínua (BRUCE *et al.*, 2007; CHEN & ARORA, 2013). A tolerância à dessecação pode ser recrutada posteriormente quando as sementes são expostas a estresses durante a germinação e/ou no estabelecimento de plântulas garantindo um aumento, velocidade e uniformidade da germinação bem como a produção de plântulas mais vigorosas (CHEN & ARORA, 2013; LIMA *et al.*, 2018).

A capacidade de tolerar a secagem até um estado mínimo de hidratação e depois recuperar a função normal após a reidratação, é encontrada em alguns animais, plantas e microrganismos, o que permite sua sobrevivência por longos períodos em condições ambientais estressantes (ALPERT, 2005). Quando a água está restrita, juntamente com pequenas moléculas intracelulares e solutos (açúcares e proteínas) formam uma matriz vítrea intracelular, assumindo um estado vítreo, no qual a mobilidade de componentes celulares é interrompida, garantindo a sobrevivência (PAGNOTTA & BRUNI, 2006).

Durante a dessecação, em sementes quiescentes secas, várias alterações podem ocorrer visando preservar a homeostase celular. O acúmulo de açúcares fornece tolerância aos estresses abióticos para as plantas (SAMI *et al.*, 2016). Entre os açúcares solúveis, os não redutores mais abundantes são a sacarose ou oligossacarídeos da família da rafinose (WANG, PATRICK; RUAN & 2017). O aumento dos oligossacarídeos da família da rafinose durante a maturação associa-se à aquisição da longevidade das sementes (VERDIER *et al.*, 2013). A presença de monossacarídeos redutores é negativamente correlacionada com a longevidade. Eles são considerados prejudiciais para a vida útil da semente, porque os grupos carbonila desses açúcares redutores podem reagir com os aminoácidos (reação de Maillard) e liberar moléculas tóxicas durante o armazenamento das sementes (LEPRINCE *et al.*, 2017). Os

açúcares livres ocupam o lugar das moléculas de água na célula, juntamente com as proteínas *LEA* (*Late Embryogenesis Abundant*), impedindo a desintegração das membranas (VICRÉ; FARRANT & DRIOUICH, 2004). Em condições de estresse abiótico, os açúcares funcionam como osmoprotetores e na estabilização das membranas (SAMI *et al.*, 2016).

Além do acúmulo de açúcares na fase final de maturação, as sementes ortodoxas apresentam atividade das enzimas *LEA*. A síntese de novas proteínas *LEA*, após a maturação, pode estar envolvida na proteção das sementes contra o estresse durante os ciclos de hidratação-desidratação. Dentre as suas funções, tem-se a de antioxidante e de estabilização de membrana durante o déficit hídrico, prevenindo, assim, o colapso das membranas devido à baixa disponibilidade de água nas células (TUNNACLIFFE; WISE, 2007). Durante o tempo de permanência no solo as sementes exibem uma resposta metabólica para lidar com condições estressantes como a síntese de proteínas *LEA* envolvida na proteção das sementes do estresse durante os ciclos de hidratação e desidratação (BUITINK *et al.*, 2006; ALVARADO-LÓPEZ *et al.*, 2017).

O acúmulo de solutos osmoprotetores, como o aminoácido prolina, nas sementes durante a germinação contribui para a tolerância delas e das plântulas a ambientes de escassez hídrica, a estresses diversos e auxilia na manutenção da integridade celular de proteínas, enzimas e membranas (VERBRUGGEN & HERMANS, 2008; ASHRAF *et al.*, 2011, ASHRAF *et al.*, 2018). Estressores ambientais e a dessecação podem ocasionar acúmulo de prolina, que tem papel de substância osmoprotetora, reduzindo os danos causados pelos diversos tipos de estresses (MATTIOLI; COSTANTINO & TROVATO, 2009; ASHRAF *et al.*, 2018).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produtos naturais do metabolismo aeróbico formadas durante o desenvolvimento da planta durante todo o seu ciclo de vida, e aumentadas por uma resposta da planta a fatores estressantes bióticos e abióticos (APEL & HIRT, 2004; KUMAR *et al.*, 2015). Em sementes hidratadas, as EROs são geradas em todo compartimento celular metabolicamente ativo como os glioxissomos (catabolismo lipídico), mitocôndrias (atividade respiratória), peroxissomos (catabolismo da purina) e membrana plasmática (NADPH-oxidase) (BAILLY, 2004). Sistemas de transporte de elétrons geralmente produzem EROs em virtude do O₂ ser um poderoso aceptor de elétron. Os radicais livres, como ânion superóxido (O₂•⁻) e radical hidroxila (OH) e moléculas não radicais como o hidrogênio peróxido (H₂O₂), oxigênio singlete (¹O₂) são produtos de reações de oxidação-redução, ou derivados ativados de O₂, continuamente gerados em compartimentos celulares apresentam duplo papel no metabolismo das plantas (SHARMA *et al.*, 2012; SUZUKI *et al.*,

2012; SANDALIO *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2015a, 2015b). Existe um balanço homeostático nas células em relação as EROs. Há uma janela oxidativa na qual a produção controlada de EROs comanda o metabolismo da homeostase redox. Acima do limiar superior de produção de EROs da janela oxidativa, as elevadas concentrações são indutoras do estresse oxidativo. Porém, em níveis basais, elas têm a função de sinalizadoras e manutenção da homeostase redox (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008). Dessa forma, os eventos do desenvolvimento e sinalização mediados por EROs ocorrem dentro dessa janela oxidativa e o excesso deve ser controlado pelo sistema antioxidante. Mecanismos antioxidantes são de imensa importância para a longevidade das sementes no banco de sementes do solo ao serem expostas a ciclos de hidratação e desidratação (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU & CORBINEAU, 2008; KRANNER *et al.*, 2010).

O sistema antioxidante enzimático constitui uma importante linha de defesa contra os radicais livres gerados em condições de estresse, como a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 . Essa reação, de fato, elimina a possibilidade de geração de OH pela reação de Haber-Weiss. A catalase (CAT) é responsável por catalisar a dismutação de H_2O_2 em H_2O e O_2 , sendo a única entre as enzimas degradadoras de H_2O_2 que não necessita de qualquer equivalente redutor para a reação (SAINI & GANI, 2018; RASHEED & RASHEED, 2019). A ascorbato peroxidase (APX) é um componente integral do ciclo ascorbato-glutationa (ASC-GSH) e reduz H_2O_2 para H_2O e dehidroascorbato (DHA), usando ácido ascórbico (AA) como agente redutor (SHARMA & DUBEY, 2004; BHATTACHARJEE, 2019). A glutatona redutase (GR) atua como sensor redox das alterações ambientais e está envolvida em muitos processos metabólicos reguladores e antioxidantes, que podem desmembrar o H_2O_2 em H_2O e O_2 tornando-o menos tóxico (GREGGAINS *et al.*, 2000).

A capacidade de ativar o sistema antioxidante garante às sementes reativar seu metabolismo em condições naturais favoráveis, quando a maioria dos processos de proteção pode operar totalmente (CARTA; BOTTEGA & SPANÒ, 2017). Juntamente com as alterações bioquímicas no conteúdo de açúcares e componentes osmoprotetores, ajustes no sistema antioxidante podem conferir tolerância à dessecação durante ciclos de hidratação e desidratação nas sementes. Espera-se que esse conjunto de alterações possa conferir maior longevidade às sementes sob condições estressantes do ambiente, garantindo a sobrevivência da espécie durante o período de residência no banco de sementes e no recrutamento de plântulas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de coleta das sementes

Frutos de *Handroanthus heptaphyllus* foram coletados no *campus* da Universidade Federal de Lavras (UFLA), entre os meses de outubro e novembro de 2019, de 20 árvores matrizes. As sementes então foram armazenadas em sacos de papel kraft e condicionadas em câmara fria para se evitar influência da luz, temperatura e umidade até o início dos testes.

As árvores matrizes foram georreferenciadas e amostras da espécie coletadas e depositadas no Herbário ESAL, da Universidade Federal de Lavras. A pesquisa foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), segundo a Lei 13.123 de 2015, e os dados disponibilizados conforme a portaria SECEX/CGEN nº 1, de 3 de outubro de 2017.

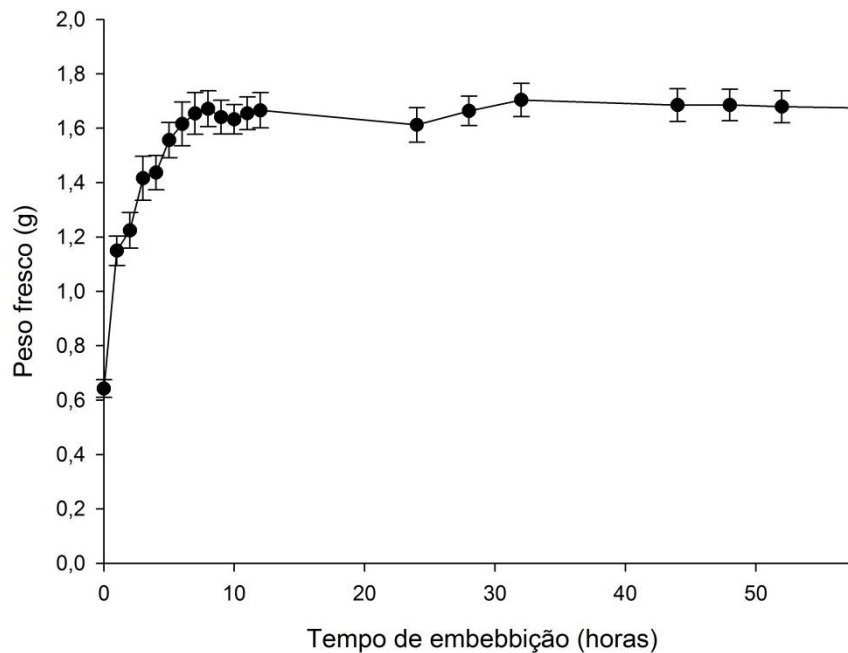
O clima da região é temperado com inverno seco e verão quente (*Cwa*, segundo a classificação de Köppen), com média mensal de precipitação superior a 110 mm, distribuída principalmente de outubro a março. A temperatura média anual é de 22 °C e as temperaturas médias para o inverno e o verão de 19,7 °C e 22,7 °C, respectivamente (SÁ JÚNIOR *et al.*, 2012; BECK *et al.*, 2018).

3.2 Curva de embebição e determinação dos tempos de hidratação e desidratação

A umidade das sementes foi determinada pelo método da estufa a $105\pm 3^{\circ}$ C, por 24 horas utilizando quatro repetições de 10 sementes cada e o valor final expresso na base úmida (BRASIL, 2009). O teor médio de água das sementes de *H. heptaphyllus* foi de 4,47%. Para o desenho da curva de embebição, as sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 1,0% acrescida de duas gotas de Tween 20 (detergente) por 10 minutos e enxaguadas três vezes em água deionizada. A massa fresca das sementes foi aferida utilizando cinco repetições de 20 sementes. Após a desinfestação e determinação do peso inicial, as sementes foram colocadas em placas de Petri sobre papel filtro umedecido, sendo cada placa uma repetição. As placas foram mantidas à temperatura ambiente ($25 \pm 2^{\circ}$ C) e pesadas a cada uma hora durante as 12 primeiras horas; após as 12 horas a pesagem foi feita a cada 4 horas. A curva resultante foi utilizada como parâmetro para a identificação das fases I e II. O tempo obtido para estabilização do peso fresco marcou as fases da embebição que foram utilizadas na aplicação dos tratamentos. Pela caracterização da curva de embebição das sementes (Figura1) foram demarcados dois tempos, o tempo X- 10 horas de embebição - e tempo Y -

35 horas de embebição. Estes tempos foram utilizados como demarcadores para a imposição dos tratamentos de interrupção do fornecimento de água e posterior secagem.

Figura 1: Curva de embebição de sementes de *Handroanthus heptaphyllus*.



3.3 Ciclos de hidratação e desidratação (ciclos de HD)

A duração dos ciclos de hidratação-desidratação (HD) foi calculada com base nos resultados obtidos com a curva de embebição, no qual os tempos X e Y da curva de embebição foram utilizados. A secagem das sementes foi realizada à temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$), com as placas de Petri abertas, em papel de germinação, pesadas a cada hora até que as sementes retornassem ao peso fresco inicial (equivalente a 4,5% de umidade, conforme mencionado). Sementes dos dois tempos (X e Y) levaram em torno de 12 horas de secagem para atingirem o peso fresco inicial. Um ciclo de hidratação-desidratação corresponde ao processo em que as sementes foram hidratadas (até o tempo pré-estabelecido na curva, X ou

Y) e desidratadas, até retornarem ao seu peso inicial, e em seguida colocadas para germinar (Figura 2). Dessa forma, foram determinados quatro ciclos de hidratação-desidratação:

- **1 Ciclo de hidratação-desidratação (1HD):** sementes no tempo X ou Y secas até o peso inicial (conforme pesagem antes da curva de embebição) e direcionadas para a germinação;
- **2 Ciclos de hidratação-desidratação (2HD):** sementes no tempo X ou Y desidratadas até o peso inicial, reidratadas até os tempos X ou Y, desidratadas até o peso inicial e postas para germinar;
- **3 Ciclos de hidratação-desidratação (3HD):** Repetiram-se os mesmos processos para 1HD três vezes;
- **4 Ciclos de hidratação-desidratação (4HD):** Repetiu -se os mesmos processos para 1HD quatro vezes.

Figura 2: Esquema dos ciclos de hidratação-desidratação. Cada ciclo foi realizado nos tempos X ou Y.



3.4 Determinação de parâmetros germinativos

As sementes desinfestadas foram dispostas em placas de Petri conforme descrito no item anterior. O teste de germinação foi conduzido tomando-se cinco repetições com 20 sementes em cada placa. As placas foram distribuídas ao acaso em câmaras de germinação

sob fotoperíodo de 12 horas ($40 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e em temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, considerada \u00f3tima para germina\u00e7\u00e3o (AZEVEDO, 2008).

3.4.1 Germinabilidade

Ap\u00f3s cada ciclo de HD, as sementes foram colocadas para germinar, sendo utilizado como crit\u00e9rio de avalia\u00e7\u00e3o a protrus\u00e3o da rad\u00edcula ($> 2\text{mm}$), onde a germina\u00e7\u00e3o (G): foi calculada pela f\u00f3rmula

$$G = \frac{N}{100} \cdot 100$$

em que: N = n\u00famero de sementes germinadas ao final do teste. A porcentagem de germina\u00e7\u00e3o foi expressa pela germina\u00e7\u00e3o acumulada ao longo do tempo de avalia\u00e7\u00e3o ap\u00f3s a imposi\u00e7\u00e3o dos tratamentos.

3.4.2 \u00cdndice de Velocidade de Germina\u00e7\u00e3o

O \u00cdndice de Velocidade de Germina\u00e7\u00e3o (IVG) foi calculado segundo Maguire (1962), onde G= n\u00famero de sementes germinadas, e N= dias da instala\u00e7\u00e3o do teste.

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

3.4.3 T_{50}

O T_{50} corresponde ao tempo necess\u00e1rio para que 50% do lote germine, de acordo com a f\u00f3rmula

$$T_{50} = t_i + \frac{(\frac{N}{2} - n_i)(t_i - t_j)}{(n_j - n_i)}$$

sendo N o n\u00famero total de pl\u00e2ntulas germinadas; n_i e n_j , o n\u00famero de sementes de acordo com: $n_i < N/2 < n_j$; e t_i e t_j s\u00e3o os dias em que n_i e n_j ocorreram (FAROOQ *et al.*, 2005).

3.5 An\u00e1lise da viabilidade das sementes

As sementes remanescentes nas placas (n\u00e3o germinadas) de cada ciclo foram avaliadas quanto \u00e0 viabilidade pelo teste de tetraz\u00f3lio. As sementes tiveram o tegumento retirado e os embri\u00f5es removidos foram colocados em frascos, sendo totalmente submersos em solu\u00e7\u00e3o de tetraz\u00f3lio (pH 7,0) na concentra\u00e7\u00e3o de 1% e mantidos no escuro \u00e0 temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 3 horas (ABBADE & TAKAKI, 2014).

Decorridas as 3 h de submersão na solução, os embriões foram lavados em água deionizada e mantidos em recipiente úmido até o momento da avaliação para então serem seccionados no sentido longitudinal, expondo os cotilédones. As duas metades dos cotilédones foram individualmente examinadas a olho nu e classificadas como inviáveis os embriões que apresentavam intensidade dos tons avermelhados e necrose nos tecidos.

3.6 Coleta e preparo das amostras

A coleta das sementes para as análises bioquímicas foi realizada após a última reidratação de cada ciclo, exceto para os controles que foram embebidos até o tempo selecionado e em seguida coletadas. Para a realização das análises bioquímicas os tegumentos foram removidos das sementes e os embriões armazenados a -80 °C até a realização das análises. Foi feito um *pool* de cada repetição (20 sementes) de cada tratamento e pesado 0,1g de massa fresca do mesmo *pool* para realizar todas as análises da mesma repetição. Nas análises realizadas com matéria seca os embriões foram secos em estufa a 60°C e feito o *pool*, como mencionado anteriormente.

3.7 Integridade de membranas

Extravasamento de eletrólitos

As sementes de cada amostra, um total de 50 sementes, por tratamento foram imersas em recipientes contendo 10 ml de água deionizada à temperatura ambiente durante 24 horas. Decorrido esse tempo, a condutividade elétrica da solução foi determinada com o uso de um condutivímetro e os valores obtidos no aparelho expressos em $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de sementes.

Termoestabilidade de membrana

A determinação da termoestabilidade de membranas das sementes foi medida usando condutivímetro, em frascos contendo 10 ml de água deionizada a 25 °C por 4 h de 10 sementes por repetição, totalizando 5 repetições por tratamento. E após autoclavagem das amostras por 15 minutos a 120°C a 1 atm e resfriadas à temperatura ambiente, foi realizada outra medição.

A permeabilidade da membrana foi aferida pelo índice de estabilidade da membrana celular (CMS) de acordo com Sullivan & Ross (1979) e calculada usando a seguinte fórmula:

$$\%CMS = \frac{1 - \frac{T1}{T2}}{1 - \frac{C1}{C2}} * 100$$

As letras T e C são as condutividades das amostras dos tratamentos e controle, respectivamente. T1 e T2 correspondem a primeira e segunda condutividade da solução determinada para amostras tratadas, e C1 e C2 são os respectivos valores para o controle. Os resultados foram expressos em % em relação ao controle.

3.8 Análises bioquímicas

Para as análises bioquímicas os tegumentos foram removidos das sementes e os embriões armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises. Foi realizado o *pool* de cada repetição (20 sementes) de cada tratamento e pesado 0,1g de massa fresca do mesmo *pool* para realizar todas as análises da mesma repetição.

Nas análises realizadas com matéria seca os embriões foram secos em estufa a 60°C e feito o *pool*, como mencionado anteriormente.

Extração e quantificação de açúcares

Para a quantificação açúcares solúveis totais (AST) e açúcares redutores (AR) a extração foi realizada a partir da homogeneização de 0,1 g massa seca de sementes em 5 mL de solução de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, seguido de banho-maria por 30 minutos a 40°C (ZANANDREA *et al.*, 2009). Após a centrifugação, o pellet foi armazenado para a quantificação de amido e o sobrenadante retirado, onde as alíquotas foram armazenadas em *eppendorfs* de 1,5 mL, os quais foram mantidos em freezer, a -5°C , até a quantificação. Os açúcares solúveis totais (AST) foram quantificados segundo a metodologia descrita por (YEMM & WILLIS, 1954), os resultados foram calculados com base na curva padrão de glicose e expressos em $\mu\text{mol AST. g MS}^{-1}$. Os açúcares redutores (AR) foram quantificados de acordo com a metodologia de (MILLER, 1959), e os resultados foram calculados com base na curva padrão de glicose e expressos em $\mu\text{mol AR. g MS}^{-1}$. Para a extração do amido, o precipitado da extração anterior foi ressuscitado em 4mL do tampão acetato de potássio 200 mM, pH 4,8 e colocado em banho-maria ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 5 minutos, sendo em seguida adicionados 1mL de uma solução contendo a enzima amiloglucosidase e calculados os resultados com base na curva padrão de glicose e expressos em $\mu\text{mol de glicose g MS}^{-1}$ (DISCHE, 1962). Os açúcares não-redutores (ANR) foram obtidos pela diferença entre AST e AR.

Proteínas

Para a quantificação de proteínas solúveis totais, 0,1 g de sementes foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas com 1 mL de tampão fosfato (100 mM pH 7,8) contendo 100 mM de ácido etilenodiaminatetracético (EDTA), 1 mM de ácido ascórbico e 5% de polivinilpirrolidona (PVP) (GOMES; SOARES & GARCIA, 2014). O sobrenadante foi coletado e uma alíquota do extrato foi retirada e misturada com o reagente de Bradford. As proteínas solúveis totais foram determinadas em espectrofotômetro com absorvância de 595 nm, de acordo com o método descrito por (BRADFORD, 1976) e os resultados foram expressos em mg g^{-1} de matéria fresca.

Aminoácidos

Foi utilizado o método de Yemm & Cocking (1955) para quantificar as variações na concentração de aminoácidos solúveis totais presentes nas sementes após passagem pelos diferentes ciclos.

Após a obtenção do extrato no volume de 1 ml, juntou-se 500 μl tampão citrato de sódio 0,2 M, pH= 5,8, 200 μl solução ninhidrina 5% em éter monometílico de etilenoglicol + 1 ml de solução KCN 0,0002 M. O ensaio foi aquecido a 100° C em banho-maria por 20 minutos e, após, resfriado por 10 minutos acrescentou-se 1 ml de álcool etílico 60%, seguindo-se leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 570$ nm. A concentração de aminoácidos solúveis totais foi avaliada utilizando-se curva padrão de solução de glicina (de 0 a 0,6 μmoles).

Acúmulo de soluto compatível – Prolina

O método utilizado foi o descrito por (TORELLO & RICE, 1986). Amostras com 0,1 g de material fresco foram homogeneizadas com 5 ml de ácido sulfosalicílico a 3% e centrifugadas a 5000 rpm durante 20 minutos. Em tubo de ensaio contendo 1 ml do sobrenadante, foi adicionado 1 ml de ninhidrina ácida (BATES; WALDREN & TEARE, 1973) e 1 ml de ácido acético glacial. Em seguidas as amostras foram mantidas 1 hora em banho-maria a 100° C. Após o resfriamento, por imersão em banho de gelo, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 520 nm. As absorvâncias obtidas foram comparadas com a curva-padrão de prolina e, os resultados obtidos expressos em microgramas de prolina por g de material fresco.

Peróxido de hidrogênio

Os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram quantificados pelo método de Velikova; Yordanov & Edreva (2000), onde cinco repetições de 0,1 g de sementes foram

maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%. As amostras foram centrifugadas e a reação realizada com tampão fosfato de potássio (KH_2PO_4) 10mM, pH 7,0 e iodeto de potássio (KI) a 1M. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro com leitura da absorbância à 390 nm e os níveis de H_2O_2 quantificados por meio de curva padrão.

Enzimas antioxidantes

- Extração: para a extração enzimática (catalase – CAT, superóxido dismutase – SOD, ascorbato peroxidase – APX e glutatona redutase – GR), 0,1 g de sementes foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas com 1 mL de tampão fosfato (100 mM pH 7,8) contendo 100 mM de ácido etilenodiaminatetracético (EDTA), 1 mM de ácido ascórbico e 5% de polivinilpirrolidona (PVP) (GOMES; SOARES & GARCIA, 2014). A dosagem de proteínas foi feita pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

- Catalase (CAT): o meio de reação para CAT foi composto por tampão fosfato de potássio 67 mM (pH 7), 10 mM de H_2O_2 e extrato enzimático. O consumo de H_2O_2 foi mensurado a 240 nm conforme descrito por Anderson, Prasad & Stewart (1995).

- Superóxido dismutase (SOD): a atividade da SOD foi medida em meio de reação contendo 50 mM de tampão fosfato (pH 7,8), 13 mM de L-metionina, 0,1 mM de EDTA, 0,002 mM de riboflavina e 0,075 mM de NBT, segundo descrito por Giannopolitis & Ries (1977). A reação foi conduzida em luz fluorescente (15 W) por 10 minutos enquanto o controle (sem amostra) foi mantido no escuro à temperatura ambiente. A formação do azul de formazan, derivado da redução do NBT, foi medida espectrofotometricamente a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a redução do NBT.

- Ascorbato peroxidase (APX): a atividade da APX foi aferida em meio composto por 50 mM de tampão fosfato (pH 7), 0,5 mM de ácido ascórbico, 2 mM de H_2O_2 e quantidade adequada de extrato enzimático. A oxidação do ascorbato foi feita na leitura de 290 nm seguindo Nakano & Asada (1981).

- Glutationa Redutase (GR): a atividade da glutatona redutase foi determinada em meios contendo tampão fosfato 100 mM (pH 7,8), glutatona oxidada 50 mM, NADPH 5 mM e quantidades adequadas do extrato enzimático, com a oxidação do NADPH sendo monitorada a 340 nm (CAKMAK & HORST, 1991).

3.9 Estabelecimentos de plântulas pós-tratamentos

Após a germinação, 10 plântulas tomadas aleatoriamente de cada tratamento foram colocadas em substrato solo + areia na proporção 2:1 e avaliados após 60 dias os parâmetros de acúmulo de biomassa quanto à altura, número de folhas e comprimento da raiz e matéria seca total. Foram tomadas 5 plântulas para os parâmetros biométricos e de acúmulo de massa. Para as análises bioquímicas uma plântula inteira foi macerada por repetição (5 repetições por tratamento), ao final dos 60 dias de experimento. As análises bioquímicas realizadas - proteínas totais, açúcares, aminoácidos e prolina - seguiram os mesmos protocolos e métodos conforme anteriormente explicitado para as sementes.

A extração da clorofila foi realizada em acetona 80% utilizando-se 0,1g de matéria fresca do primeiro par de eófilos. A quantificação dos teores de clorofila *a*, *b*, clorofila total e carotenoides (mg L^{-1}) foi realizada por espectrofotometria de emissão a 470 nm, 647 nm e 663 nm, conforme metodologia de Arnon (1949). Os resultados obtidos foram expressos em miligramas de clorofila por grama de matéria fresca.

3.10 Delineamento experimental e Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições, sendo uma placa uma unidade experimental com 20 sementes. Para as plântulas, adotou-se o esquema em fatorial 2x4 (dois tempos de embebição x 4 ciclos de HD) A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram verificadas através dos testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente e submetidos à análise de variância fatorial, com dois fatores (nível de significância 5%), utilizando-se o software livre R versão 3.6.1. As análises bioquímicas seguiram o mesmo desenho experimental e os dados foram analisados da mesma forma descrita para os parâmetros germinativos.

4. RESULTADOS

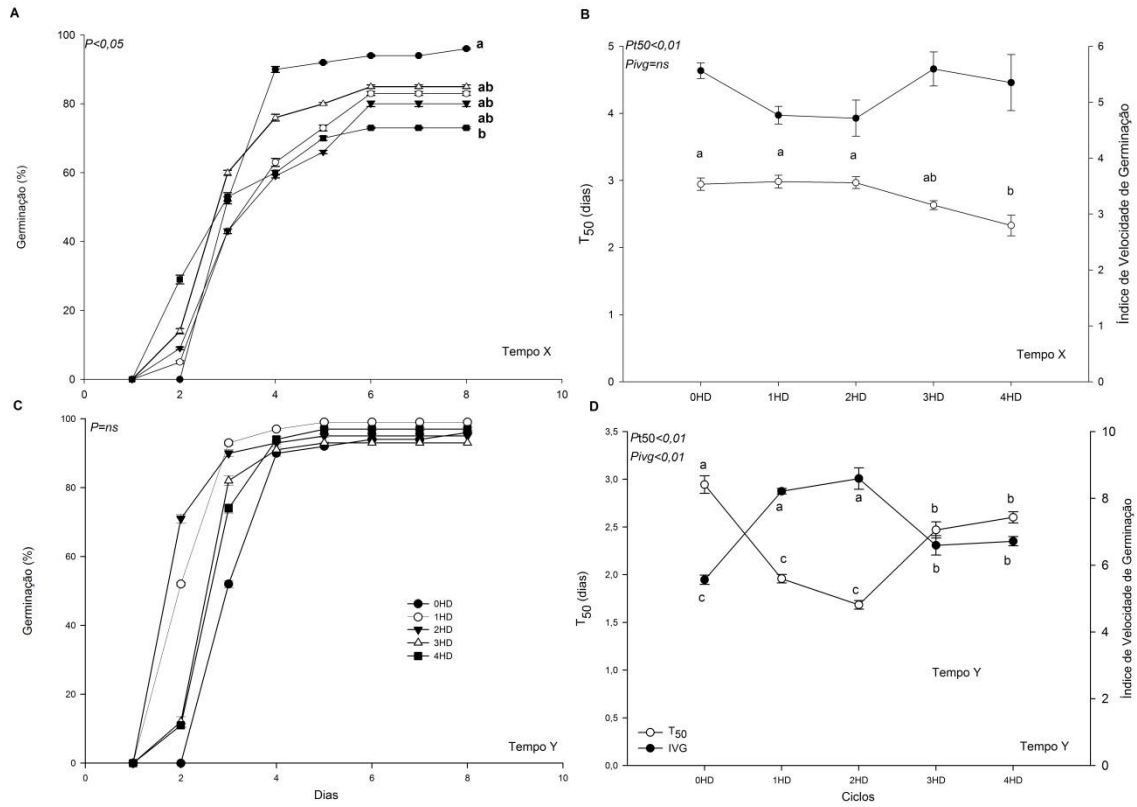
4.1 Respostas germinativas e viabilidade

A germinação das sementes de *H. heptaphyllus* foi influenciada pelo tempo de embebição e não pelos ciclos HD. Em relação à porcentagem de germinação houve um decréscimo no tempo X (10 horas) em relação ao tempo Y (35 horas), enquanto com a periodicidade dos ciclos no tempo X, houve uma diminuição da porcentagem de germinação no 4HD (Figura 3A).

A curva de germinação acumulada mostra que o tempo de estabelecimento da germinação é diminuído, independente do ciclo de HD na FI em relação ao controle (Figura 3A). Nas sementes desidratadas no tempo Y, as sementes dos ciclos 1 e 2HD apresentaram em torno de 50% e 70% de germinação, respectivamente, no segundo dia. A estabilização da germinação ocorreu no quarto dia para as sementes de todos os ciclos (Figura 3C). No geral, sementes que passaram pelos ciclos de HD no tempo Y, obtiveram a estabilização da germinação mais precocemente em comparação às do tempo X, independente do número de ciclos (Figuras 3A e C).

Para o parâmetro índice de velocidade de germinação (IVG), as sementes que foram embebidas até o tempo X apresentaram um adiantamento na germinação, nos ciclos 1 e 2HD (Figura 3D), enquanto nas embebidas até o tempo Y, independente do ciclo, houve uma redução do IVG (Figura 3B). O T_{50} diminuiu com a progressão dos ciclos para as sementes que passaram por 10 horas de embebição-tempo X (Figura 3C), enquanto nas sementes que passaram por 35 horas de embebição-tempo Y foi observada uma diminuição nos dois primeiros ciclos (1 e 2HD). Nos 3 e 4HD houve um aumento nos valores de IVG (Figura 3D).

Figura 3: Porcentagem de germinação acumulada, índice de velocidade de germinação - IVG e T_{50} de sementes de *Handroanthus heptaphyllus* submetidas a 0, 1, 2, 3 e 4 ciclos de hidratação e desidratação (0HD, 1HD, 2HD, 3HD e 4HD) em diferentes tempos da curva de embebição (A e B – Tempo X: 10 horas; C e D – Tempo Y: 35 horas).



As barras são médias \pm erro padrão. As letras minúsculas comparam os resultados estatísticos em cada parâmetro. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns = não significativo.

Os resultados obtidos mostram que as sementes que foram desidratadas após o tempo X apresentaram menor viabilidade do que as desidratadas após o tempo Y, com redução progressiva com o aumento do número de ciclos HD (Tabela 1).

Tabela 1: Porcentagem de germinação e viabilidade de sementes de *Handroanthus heptaphyllus* submetidas a 0, 1, 2, 3 e 4 ciclos de hidratação e desidratação (0HD, 1HD, 2HD, 3HD e 4HD) em diferentes tempos da curva de embebição (Tempo X: 10 horas; Tempo Y: 35 horas).

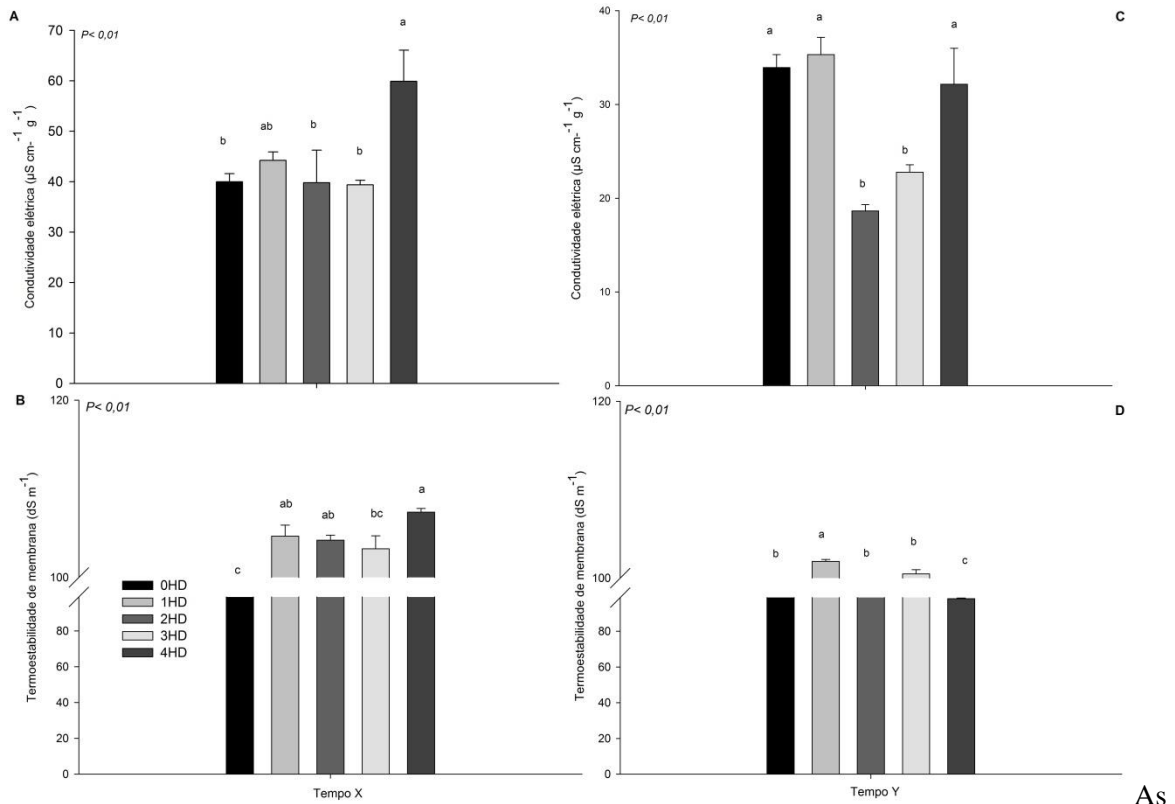
Tempo	Ciclo	Germinação (%)	Viabilidade (%)
X	0HD	96a	3e
	1HD	83ab	17c
	2HD	80ab	20b
	3HD	85ab	15d
	4HD	73b	27a
Y	0HD	96a	3b
	1HD	99a	0d
	2HD	95a	2c
	3HD	94a	5a
	4HD	98a	2c

As letras minúsculas comparam os resultados estatísticos em cada parâmetro e em cada tempo. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2 Integridade de membranas

Os tempos e os ciclos influenciaram negativamente à estabilidade das membranas, demonstrando que uma maior passagem por ciclos de hidratação e desidratação durante o tempo X da embebição causou dano à integridade das membranas (Figura 4A e B). Para as sementes no tempo Y, houve maior termoestabilidade de membranas apesar de os valores de condutividade de 1HD e 3HD apresentados estarem acima do normal (100 dS m^{-1}) (Figura 4B).

Figura 4: Condutividade elétrica e termoestabilidade de membrana em sementes de *Handroanthus heptaphyllus* submetidas a 0, 1, 2, 3 e 4 ciclos de hidratação e desidratação (0HD, 1HD, 2HD, 3HD e 4HD) em diferentes tempos da curva de embebição (A e B – Tempo X: 10 horas; C e D – Tempo Y: 35 horas). Quanto maiores os valores acima de 100 (padrão), maior o dano associado à membrana (Sullivan & Ross, 1979).

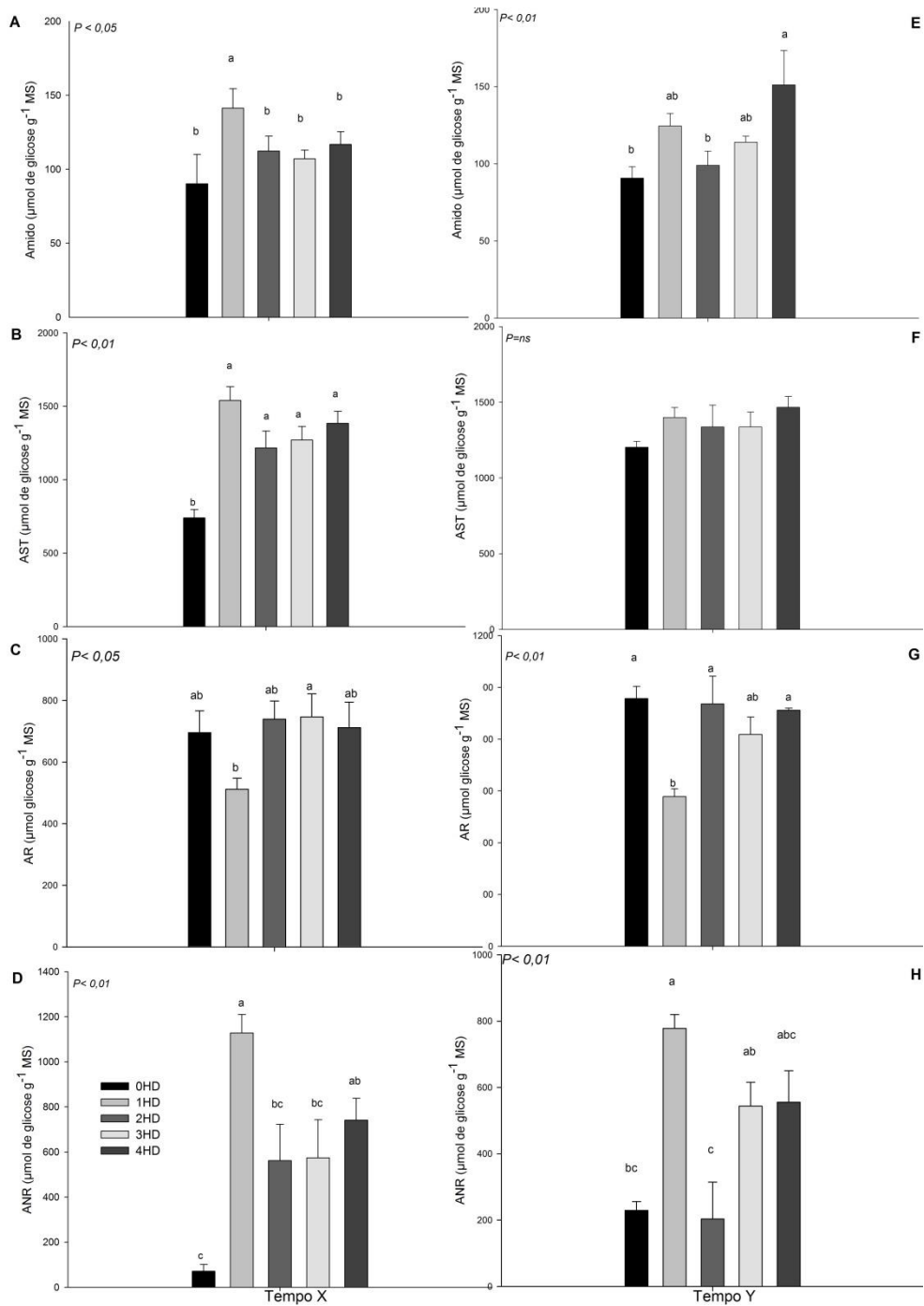


barras são médias \pm erro padrão. As letras minúsculas comparam os resultados estatísticos em cada parâmetro. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3 Análises bioquímicas

O metabolismo dos carboidratos foi influenciado significativamente tanto pelos tempos quanto pelos ciclos. Os teores de amido apresentaram diferença significativa em ambos os tempos, mostrando valores maiores em 1HD para os dois tempos e também no 4HD do tempo Y (Figura 5A e E). Os níveis de açúcares solúveis totais (AST) não apresentaram diferença estatística entre os tempos, somente no 0HD do tempo X houve valores menores que os demais ciclos (Figura 5B e F). Em relação aos açúcares redutores (AR), independente do tempo, o ciclo 1HD apresentou valores inferiores aos outros tratamentos (Figura 5C e G). Os níveis de açúcares não redutores (ANR) foram maiores no tempo X em relação ao Y, sendo o 1HD o tratamento com maiores valores em ambas os tempos (Figura 5D e H).

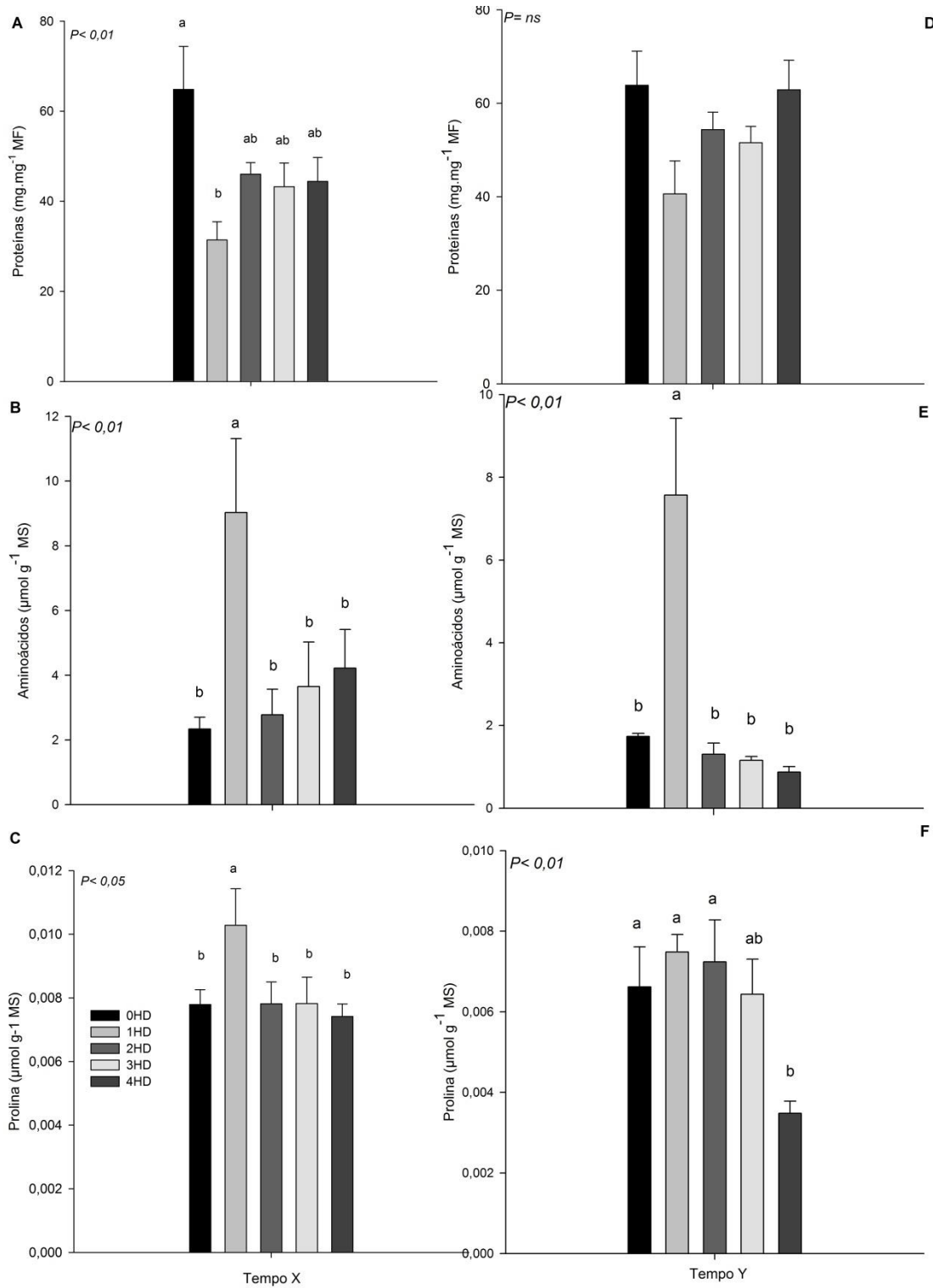
Figura 5: Teores de amido, açúcares solúveis totais - AST, açúcares redutores - AR e açúcares não redutores - ANR em sementes de *Handroanthus heptaphyllus* submetidas a 0, 1, 2, 3 e 4 ciclos de hidratação e desidratação (0HD, 1HD, 2HD, 3HD e 4HD) em diferentes tempos da curva de embebição (A, B, C e D – Tempo X: 10 horas; E, F, G e H – Tempo Y: 35 horas).



As barras são médias \pm erro padrão. As letras minúsculas comparam os resultados estatísticos em cada parâmetro. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns = não significativo.

Os níveis de proteína foram menores no tempo X e em ambas os tempos o ciclo 1HD apresentou menores valores (Figura 6A e D). A concentração de aminoácidos foi maior no ciclo 1HD em ambas os tempos, com valores significativamente superiores em todos os ciclos do tempo X em comparação ao Y (Figura 6B e E). Houve um aumento significativo para prolina no 1HD do tempo X, onde apresentou maior acúmulo (Figura 6C e F).

Figura 6: Proteínas solúveis totais, aminoácidos e prolina em sementes de *Handroanthus heptaphyllus* submetidas a 0, 1, 2, 3 e 4 ciclos de hidratação e desidratação (0HD, 1HD, 2HD, 3HD e 4HD) em diferentes tempos da curva de embebição (A, B e C – Tempo X: 10 horas; D, E e F – Tempo Y: 35 horas).

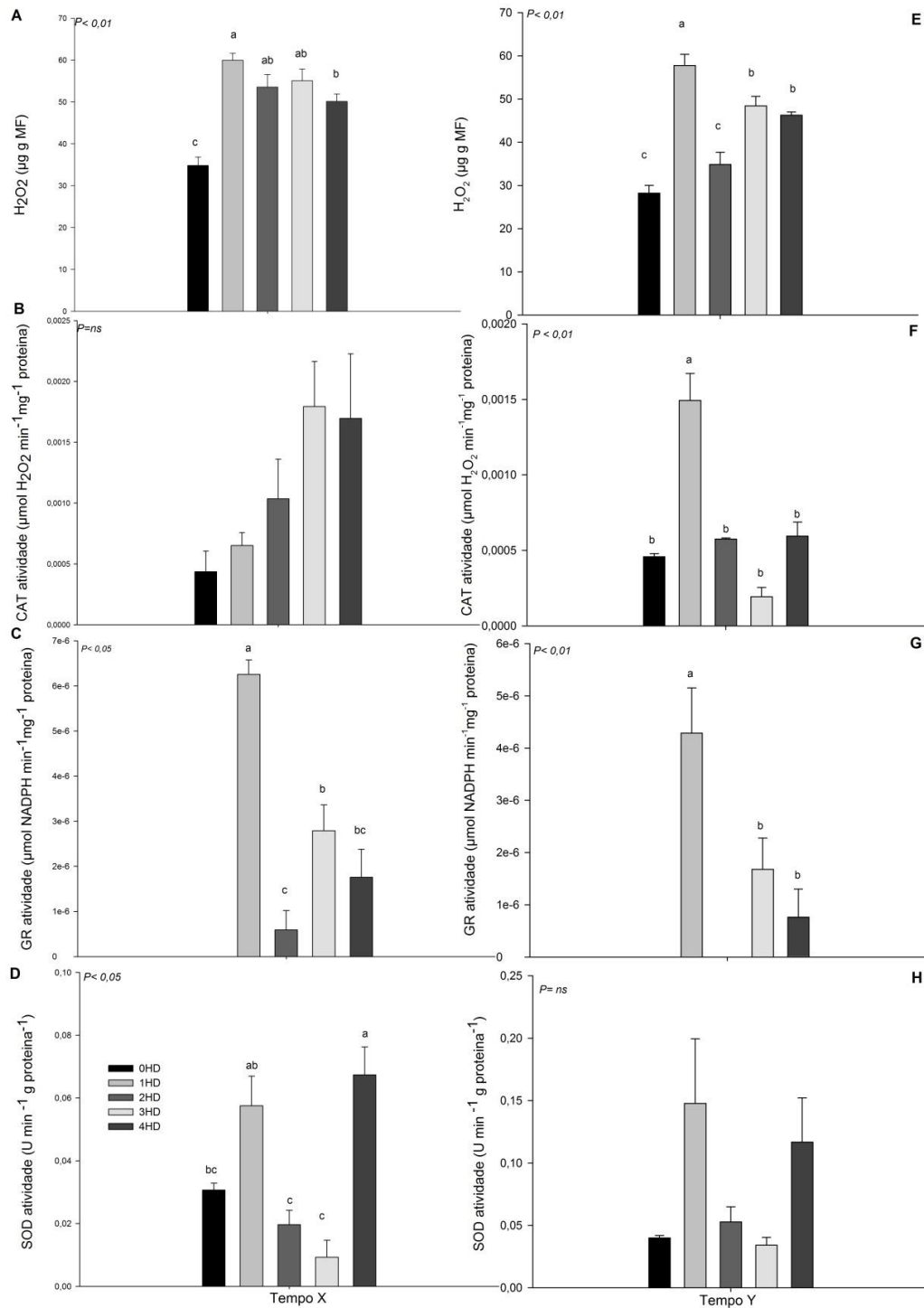


As

barras são médias \pm erro padrão. As letras minúsculas comparam os resultados estatísticos em cada parâmetro. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns = não significativo.

As concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram significativamente diferentes entre os tratamentos ($p < 0,05$, Figura 7A e E). A atividade da CAT apresentou valores maiores com a progressão dos ciclos no tempo X (Figura 7B). Foi também verificado aumento de atividade da CAT em 1HD de sementes do tempo Y em relação aos demais ciclos do mesmo tempo (Figura 7F). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi maior nas sementes do tempo X nos ciclos 1 e 4HD (Figura 7D). A atividade da APX não apresentou diferença estatística entre os ciclos e tempos (dados não mostrados).

Figura 7: Níveis de peróxido de Hidrogênio - H_2O_2 e atividade das enzimas do sistema antioxidante catalase - CAT , glutaciona redutase – GR e superóxido dismutase - SOD em sementes de *Handroanthus heptaphyllus* submetidas a 0, 1, 2, 3 e 4 ciclos de hidratação e desidratação (0HD, 1HD, 2HD, 3HD e 4HD) em diferentes tempos da curva de embebição (A, B, C e D – Tempo X: 10 horas; E, F, G e H – Tempo Y: 35 horas).



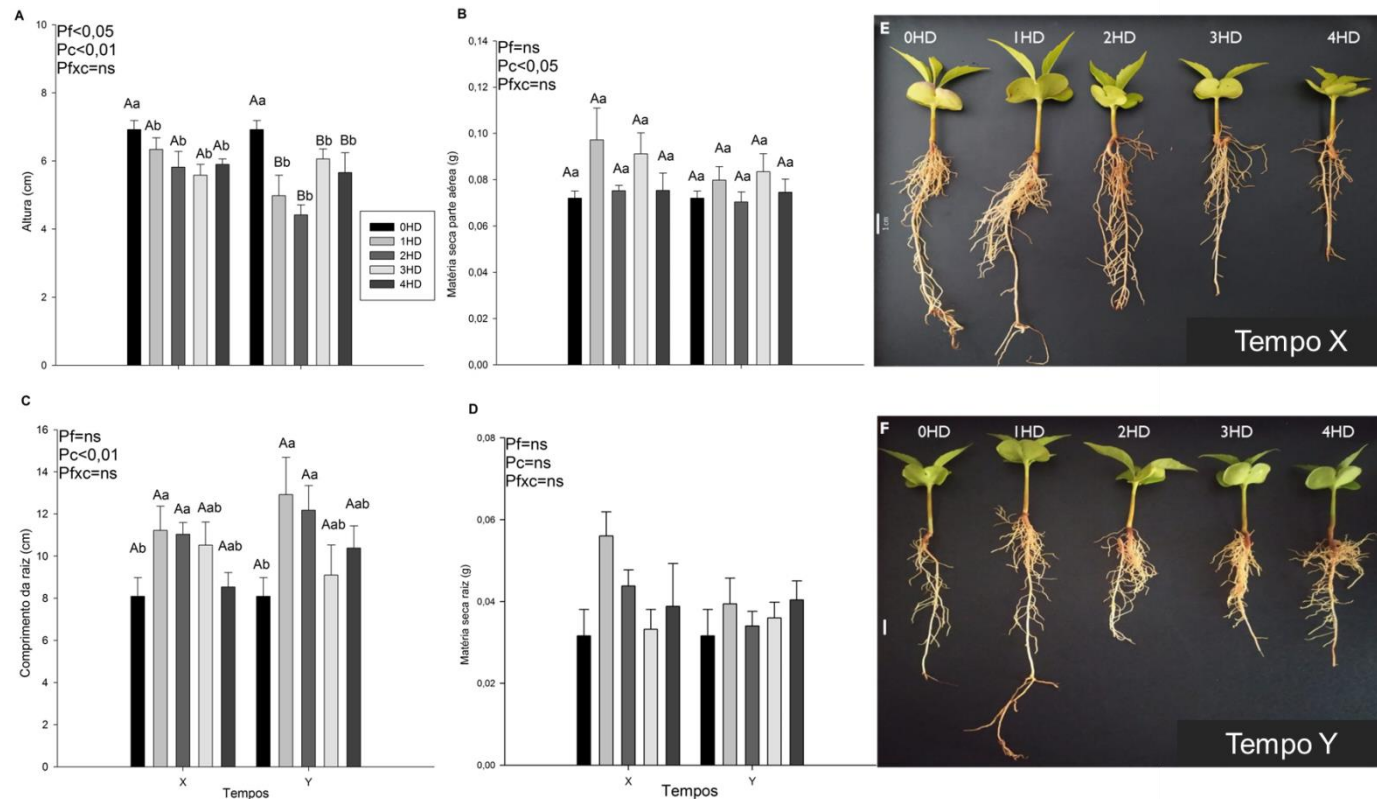
As barras são médias \pm erro padrão. As letras minúsculas comparam os resultados estatísticos em cada parâmetro. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns = não significativo.

4.4 Formação de plântulas

O estabelecimento das plântulas foi influenciado pelos tempos e os ciclos, havendo interação significativa entre o tempo e o ciclo apenas no parâmetro de altura para os parâmetros de crescimento. Tanto os ciclos quanto os tempos tiveram papel negativo na altura das plântulas, tendo no tempo Y plântulas menores comparado com o X. Em relação aos ciclos, as sementes que não passaram por nenhum ciclo (0HD) geraram plântulas maiores (Figura 8A).

Em relação a variável comprimento da raiz, independente do tempo, os ciclos 1HD e 2HD apresentaram maiores médias se comparado aos demais ciclos (Figura 8C). Para os parâmetros massa seca da parte aérea (Figura 8B) e do sistema radicular (Figura 8D) e número de folhas (não mostrado) os dados não diferiram estatisticamente entre si.

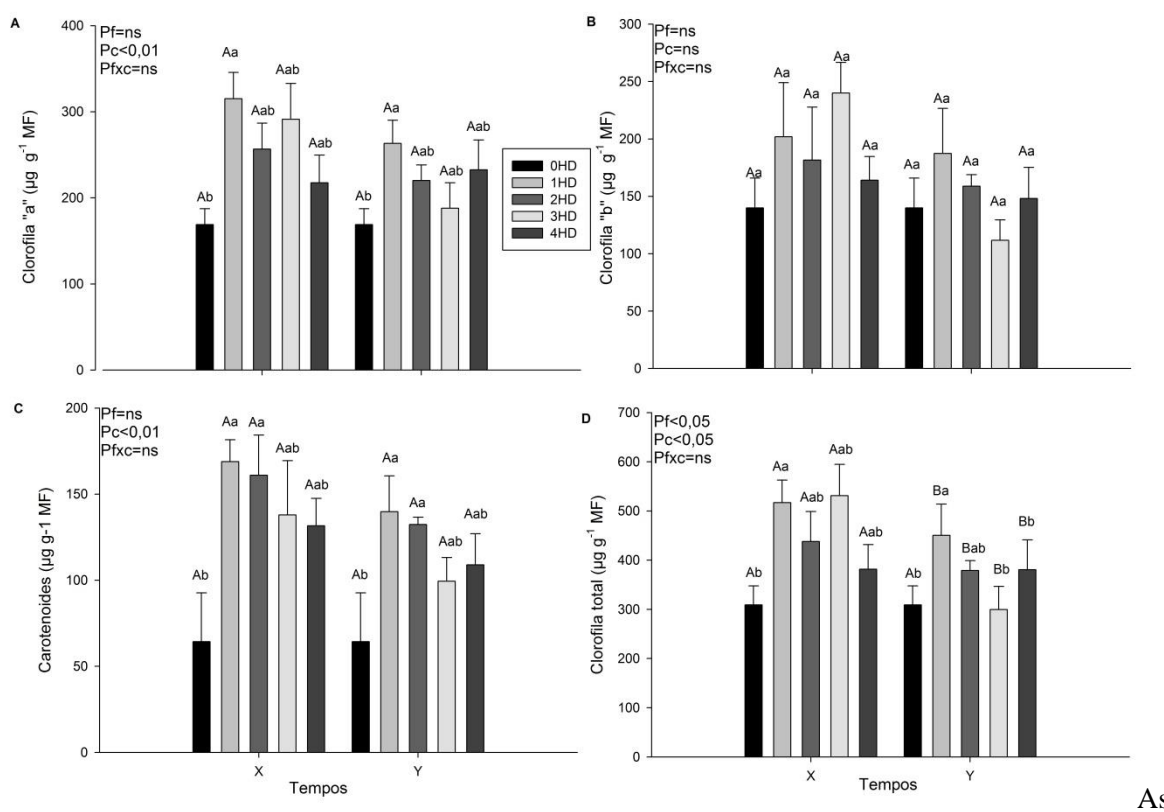
Figura 8: Parâmetros de acúmulo de biomassa, altura (A) matéria seca da parte aérea (B) comprimento da raiz (C) e massa seca da raiz (D), no estabelecimento de plântulas de *Handroanthus heptaphyllus* oriundas de sementes submetidas a 0, 1, 2,3 e 4 ciclos de hidratação e desidratação (0HD, 1HD, 2HD, 3HD e 4HD) em diferentes tempos da curva de embebição (Tempo X - 10 horas; Tempo Y – 35 horas).



As barras são médias \pm erro padrão. Letras maiúsculas comparam o mesmo ciclo nos diferentes tempos. Letras minúsculas comparam os ciclos dentro do mesmo tempo. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. P_f = valor de p entre os tempos; P_c = valor de p entre os ciclos; P_{fxc} = valor de p da interação entre os tempos e ciclos.

Os pigmentos fotossintéticos mostraram diferença significativa entre os ciclos, exceto clorofila *b*, e para os tempos apenas para clorofila total (Figura 9). A clorofila *a* e total o ciclo 1HD, independente do tempo de embebição, teve teores maiores (Figuras 9A e D), enquanto para clorofila *b* não houve diferença significativa entre tempo e ciclo (Figura 9B). Os carotenoides nos ciclos 1e 2HD apresentaram maiores níveis independentes do tempo (Figura 9C).

Figura 9: Clorofila *a* (A), clorofila *b* (B) clorofila total (C) e carotenoides (D) em plântulas de *Handroanthus heptaphyllus* oriundas de sementes submetidas a 0, 1, 2,3 e 4 ciclos de hidratação e desidratação (0HD, 1HD, 2HD, 3HD e 4HD) em diferentes tempos da curva de embebição (Tempo X - 10 horas; Tempo Y – 35 horas).

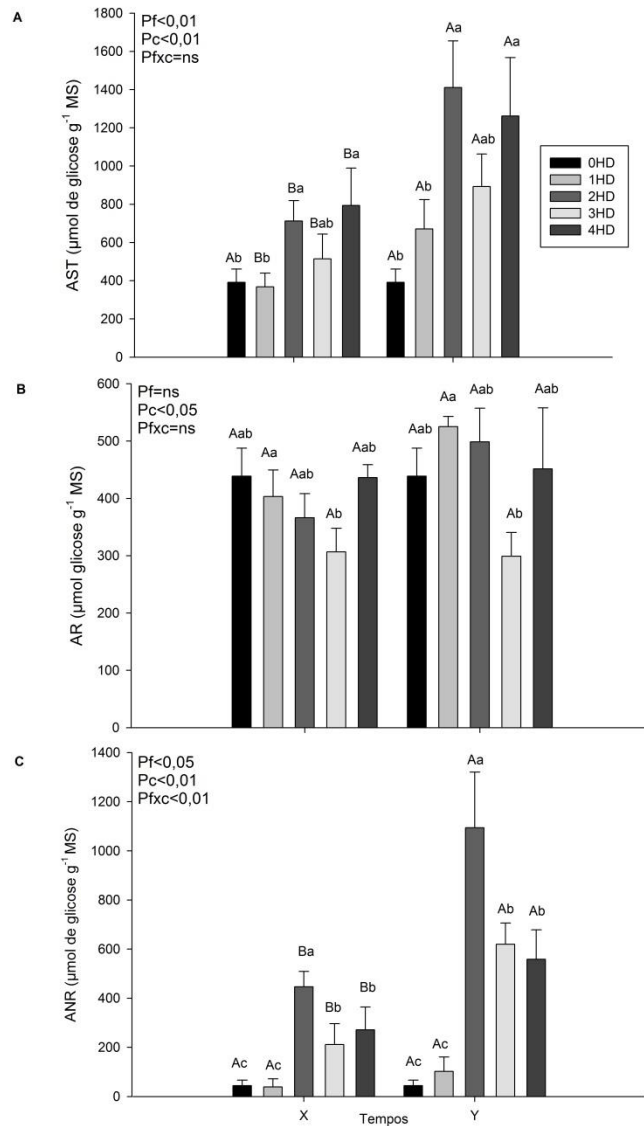


barras são médias \pm erro padrão. Letras maiúsculas comparam o mesmo ciclo nos diferentes tempos. Letras minúsculas comparam os ciclos dentro do mesmo tempo. Às médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. P_f = valor de p entre os tempos; P_c = valor de p entre os ciclos; P_{fxc} = valor de p da interação entre os tempos e ciclos.

Os parâmetros bioquímicos das plântulas tiveram a influência tanto dos tempos quanto dos ciclos. Apenas proteínas e ANR apresentaram interação significativa entre tempos e ciclos. AST apresentaram maiores teores nos 2 e 4HD e ambos os tempos, e todos os ciclos do tempo Y foram superiores aos do tempo X (Figura 10A). Com relação aos AR, independente do tempo, o 3HD mostrou valores menores entre os ciclos (Figura 10B). Foram

verificados valores maiores de ANR em todos os ciclos do tempo Y comparados aos do X, e dentro dos dois tempos o 2HD apresentou os maiores valores (Figura 10C).

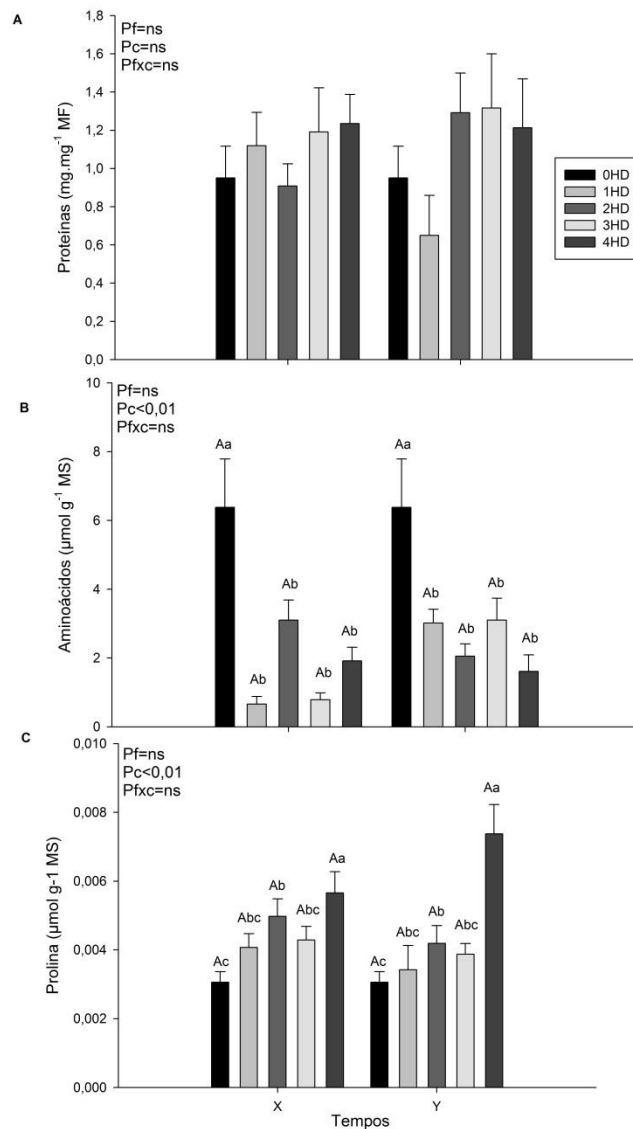
Figura 10: Concentrações de açúcares solúveis totais – AST (A), açúcares redutores (B) e açúcares não redutores - ANR (C) em plântulas de *Handroanthus heptaphyllus* oriundas de sementes submetidas a 0, 1, 2, 3 e 4 ciclos de hidratação e desidratação (0HD, 1HD, 2HD, 3HD e 4HD) em diferentes tempos da curva de embebição (Tempo X - 10 horas; Tempo Y – 35 horas).



As barras são médias \pm erro padrão. Letras maiúsculas comparam o mesmo ciclo nos diferentes tempos. Letras minúsculas comparam os ciclos dentro da mesma F. Às médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. P_f = valor de p entre os tempos; P_c = valor de p entre os ciclos; P_{fxc} = valor de p da interação entre os tempos e ciclos.

Os níveis de proteínas não diferiram entre os ciclos e tempos (Figura 11A). Porém, os níveis de aminoácidos foram menores que o controle em todos os tratamentos que passaram por algum ciclo HD nos dois tempos (Figura 11B). Para prolina o 4HD apresentou maiores concentrações em ambos os ciclos independente do tempo (Figura 11C).

Figura 11: Acúmulo de proteínas solúveis totais (A), aminoácidos (B) e prolina (C) em plântulas de *Handroanthus heptaphyllus* oriundas de sementes submetidas a 0, 1, 2,3 e 4 ciclos de hidratação e desidratação (0HD, 1HD, 2HD, 3HD e 4HD) em diferentes tempos da curva de embebição (Tempo X - 10 horas; Tempo Y – 35 horas).



As barras são médias \pm erro padrão. Letras maiúsculas comparam o mesmo ciclo nos diferentes tempos. Letras minúsculas comparam os ciclos dentro da mesma F. Às médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. P_F = valor de p entre os tempos; P_C = valor de p entre os ciclos; P_{FC} = valor de p da interação entre os tempos e ciclos.

5. DISCUSSÃO

A simulação em laboratório dos ciclos de hidratação e desidratação é uma importante ferramenta para os estudos de mecanismos de tolerância à dessecação, técnica denominada *hidropriming*. Os resultados aqui mostrados indicam maiores prejuízos às sementes que passaram por hidratação seguida por desidratação durante o tempo X da embebição, o que se intensifica com o número de ciclos. Por outro lado, sementes que foram embebidas até o tempo Y apresentaram maior tolerância à dessecação em relação ao tempo X. Tal constatação foi evidenciada pela ausência de mortalidade das sementes após os ciclos de HD no tempo Y, provavelmente devido ao um maior tempo para ajustes metabólicos.

As respostas relatadas para os parâmetros germinativos avaliados para as sementes de *H. heptaphyllus* que passaram pela hidratação descontínua até o tempo Y corroboram o que foi relatado para outras espécies não cultivadas submetidas à hidratação durante a Fase II da curva de embebição como *Calligonum* sp., a *C. junceum* e *C. leucocladum* (REN & TAO, 2003), *Tecoma stans* (ALVARADO-LÓPEZ *et al.*, 2014), *Senna spectabilis* var. *excelsa* (LIMA *et al.*, 2018) *Enterolobium cyclocarpum* (PERAZA-VILLARREAL *et al.*, 2018) e na emergência de plântulas de *Handroanthus chrysotrichus* (HORA, SANTOS & MEIADO, 2018). A redução dos parâmetros germinativos aqui verificados quando as sementes foram submetidas à dessecação no tempo X, pode ser explicado pelo metabolismo ser menos intenso o que explica a manutenção da tolerância à dessecação nesse estágio para algumas espécies (CASTRO & HILHORST, 2004; BEWLEY & BLACK, 2013). Seria uma estratégia de “escape” à dessecação; para algumas espécies há o investimento no adiantamento da germinação ou no acúmulo de solutos osmoprotetores como proteção contra a dessecação.

A periodicidade dos ciclos pelos quais as sementes passam, a depender da fase na qual ocorre a hidratação, funciona como um *priming* natural e influencia positivamente na germinabilidade das sementes, como é caso de espécies em que os ciclos favorecem e adiantam a germinação, como em *Calligonum junceum* e *C. leucocladum* (REN & TAO, 2003), *Senna spectabilis* var. *excelsa* (LIMA *et al.*, 2018), *Handroanthus chrysotrichus* (HORA, SANTOS & MEIADO, 2018). Este estudo mostrou que, para *H. heptaphyllus*, o tempo de embebição que as sementes atingem antes da desidratação cíclica, é crucial para ativação do seu metabolismo de reparo contra os danos da dessecação, e não os ciclos em si. A embebição por 35 horas (tempo Y) favorece um maior ajustamento e regulação do metabolismo no preparo das sementes contra a dessecação.

O T_{50} é um parâmetro germinativo que prediz o tempo necessário para que 50% da população germine (FAROOQ *et al.*, 2005). O T_{50} para as sementes que passaram pelo tempo X apresentou uma redução a partir do 3HD, sendo menor no 4HD. Sementes que passaram pelo tempo Y, nos dois primeiros ciclos, diminuíram o tempo de germinação, se comparado ao controle. Cinco espécies de cactos mexicanos (*Echinocactus platyacanthus* e *Ferocactus pilosus*), e argentinos (*Gymnocalycium monvillei*, *G. capillens* e *G. quehlianum*) apresentaram menor tempo médio de germinação (T_{50}) quando expostas a ciclos HD (CONTRERAS-QUIROZ *et al.*, 2016). Sementes de *Mimosa tenuiflora* que passaram por até 3 ciclos HD durante $\frac{1}{2}$ da fase I tiveram redução em 50% os valores de T_{50} (LIMA & MEIADO, 2018). A hidratação descontínua estimula mudanças no embrião, as quais a semente “memoriza” durante os períodos de secagem e, quando são expostas novamente a condições de umidade, é promovida uma germinação mais rápida (DUBROVSKY, 1996).

No presente trabalho, assume-se que houve danos às das sementes de *H. hepthaphyllus* devido aos níveis de lixiviação de solutos observados em todos os ciclos do tempo Y (Figura 4A e B) mostrados pelo teste de termoestabilidade e condutividade elétrica (Figura 4Ae B). As maiores liberações de lixiviados foram observados em todos os tratamentos do tempo X (Figura 5A) possivelmente influenciaram negativamente a porcentagem de germinação e o IVG das sementes, independente dos ciclos. Em sementes de *Solanum melongena* o *hidropriming* reduziu sete vezes o conteúdo de íons lixiviados (ADHIKARY & MANDAL, 2019). A passagem das sementes pelo tempo Y é menos prejudicial à integridade das membranas induzindo uma menor lixiviação de eletrólitos. O modo de ação dos ciclos no tempo Y pode estar envolvido com um sistema de reparo celular na correção de lesões a membrana induzidas durante a hidratação e desidratação (BHATTACHARYA, CHOWDHURY & MANDAL, 2015; ADHIKARY & MANDAL, 2019). O dano foi causado pelo tempo X e com a progressão dos ciclos, as hidratações e desidratações seguidas levaram a injúrias na membrana plasmática, e elas são consideradas o primário alvo de lesão por desidratação (CROWE, 1998).

Mudanças nas concentrações de carboidratos foram promovidas pelos ciclos HD, tendo sido observado um padrão de redução dos AR no 1HD em ambas os tempos, porém mais elevadas no tempo X, o que possivelmente tenha influenciado negativamente na tolerância à dessecação. Em contrapartida, os níveis de açúcares solúveis totais (AST) foram maiores em todos os ciclos nos dois tempos, em relação ao controle os quais, juntamente com os elevados níveis de ANR indicam que o acúmulo desses açúcares promoveram um ajuste osmótico que contribuíram para a proteção das sementes contra à dessecação imposta pelos ciclos. Alto teor

de ANR é inversamente proporcional à tolerância à dessecação (LEPRINCE *et al.*, 2017), enquanto os ANR, principalmente os oligossarídeos da família da rafinose, atuam como osmorreguladores na manutenção do potencial osmótico da célula durante a dessecação (KRANNER & BIRTIC, 2005; HOEKSTRA, GOLOVINA & BUITINK, 2001; BEWLEY *et al.*, 2013. Esse acúmulo de açúcares já foi notificado para algumas espécies como *Erythrina speciosa* (HELL *et al.*, 2019). O contrário foi observado em sementes de *Solanum melongena* submetidas à hidratação e desidratação, mostrando redução dos níveis de açúcares solúveis e aumento dos açúcares redutores (ADHIKARY & MANDAL, 2019) e para *Peltophorum dubium* (GUIMARÃES *et al.*, 2016) onde os açúcares solúveis diminuíram durante a germinação. Os açúcares solúveis atuam na proteção da membrana plasmática, mantendo a estabilidade da membrana impedindo que os fosfolídeos colapsem, especialmente os dissacarídeos não redutores, mas também os tri-tetrassacarídeos e frutanos que se acumulam nos anidrobiontes, possam substituir a água em dissipação (CROWE, 1988).

As sementes que passaram por apenas um ciclo HD apresentaram maiores teores de aminoácidos e prolina, do que as que passaram por mais ciclos (Figura 6B e C). O mesmo é observado em sementes de *T. stans*, a porcentagem de aminoácidos livres aumentou após os tratamentos de *priming* e após a germinação (ALVARADO-LOPEZ *et al.*, 2014). Sementes de *Periploca sepium* que passaram por hidratação e posterior desidratação apresentaram aumento nas concentrações de aminoácidos e prolina (AN & LIANG, 2013). Os resultados de aminoácidos e prolina indicam que a passagem por uma hidratação seguida por uma desidratação está relacionada à manutenção dos processos fisiológicos germinativos, e também numa resposta de defesa contra a desidratação. O aumento no acúmulo de aminoácidos e prolina tem sido relatado em muitas espécies submetidas a déficit hídrico, atuando na manutenção do turgor sob condições de restrições hídricas (ASHRAF & FOOLAD, 2007, BEWLEY & BLACK, 2013) e facilitando a rápida recuperação após imposição do estresse, sendo fontes de carbono e nitrogênio (VERBRUGGEN & HERMANS 2008; SZABADOS & SAVOURE, 2010). A prolina por ser um soluto compatível, também desempenha um papel importante na eliminação de espécies reativas de oxigênio produzidas em condições de seca (ASHRAF & FOOLAD, 2007, VERBRUGGEN & HERMANS 2008).

Em relação ao sistema antioxidante, no presente trabalho, a atividade da CAT aumentou com a progressão dos ciclos no tempo Y. O aumento da atividade da SOD em sementes que desidrataram após o tempo Y pode ter relação com os baixos níveis de H_2O_2 encontrados, uma vez que H_2O_2 é o produto final da desmutação. A GR mesmo apresentando

baixa atividade, seus valores maiores na FI demonstram que a embebição até a Fase I (10 horas) induz maior produção de EROs. Entretanto, apesar de terem sido verificadas alterações nas atividades enzimáticas em decorrências dos tempos e ciclos de HD, não houve aumento expressivo destas atividades em relação aos níveis de H_2O_2 , o que indica que outros mecanismos podem ter sido utilizados para a manutenção da homeostase redox. O equilíbrio entre a produção e a eliminação das EROs ao nível intracelular deve ser rigidamente regulado de forma eficiente. Isso é necessário para evitar danos potenciais causados pelas EROs em componentes celulares, bem como para manter o crescimento, o metabolismo, o desenvolvimento e a produtividade das plantas (MITTLER *et al.*, 2004).

O sistema de defesa antioxidante é um dos principais mecanismos de defesa adaptativo das plantas (MITTLER, 2002). No processo de hidratação e desidratação há uma aumento na produção de EROs devido ao burst oxidativo durante a entrada da água na célula. As NADPH-oxidase é a fonte principal de O_2^- , que é posteriormente metabolizado em H_2O_2 pela superóxido dismutase (MARINO *et al.*, 2012; MITTLER, 2017, CHOUDHARY, KUMAR & KAUR, 2020). O aumento da atividade da SOD no tempo X, nos ciclos 1 e 4HD foi devido possivelmente aos danos causado às membranas, aumentando a produção de EROs. A SOD, por ser a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos de níveis elevados de EROs, removem o O_2^- catalisando sua dismutação, um O_2^- sendo reduzido a H_2O_2 e outro oxidado a O_2 diminuindo o risco de formação de OH por meio da reação do tipo Haber-Weiss (GILL & TUTEJA, 2010). A baixa atividade enzimática se deve possivelmente pela atividade de alguns osmoprotetores como os açúcares e prolina que tiveram papel antioxidante. Não sendo necessário a ativação do sistema antioxidante para a remoção das EROs, possivelmente estando as enzimas do sistema antioxidante regulando os níveis e mantendo a homeostase redox.

As plântulas de *H. heptaphyllus* oriundas de sementes que passaram por pelo menos dois ciclos de HD tiveram um incremento no comprimento do sistema radicular. Enquanto para a altura, os ciclos influenciaram negativamente com plantas menores do que o controle nos dois tempos, sendo as plântulas cujas sementes passaram pelo tempo Y apresentaram menores alturas. Em *Mimosa tenuiflora*, sementes que passaram por um ciclo de HD, durante ½ da Fase I, produziram mudas com caules, diâmetro do caule e massa seca da folha, caule e raiz maiores (LIMA & MEIADO, 2018). Amostras de sementes de *Beta vulgaris* L. cultivar Kawejana, com baixo vigor apresentaram aumento significativo do índice de vigor, avaliado pelo comprimento das plântulas (SLVI; de 40% para 60-68%), após apenas um ciclo de hidratação-desidratação, independentemente da duração do período de hidratação

(SLIWINSKA & JENDRZEJCZAK, 2002). Eventos de disponibilidade de água descontínua durante a embebição podem induzir uma memória da hídrica nas sementes, de forma que plântulas originárias de sementes submetidas a ciclos de HD apresentam maior vigor em comparação com as oriundas de sementes que passaram por hidratação contínua (LIMA & MEIADO, 2018).

Os ciclos HD, nos dois tempos, mostraram-se eficientes para o aumento do conteúdo de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila total e carotenoides). Isso possivelmente foi devido à influência positiva dos ciclos de hidratação em diferentes tempos na biossíntese de pigmentos fotossintéticos ou à redução na sua degradação. *Hidropriming* também aumentou o teor dos pigmentos fotossintéticos clorofila *a*, *b* total e carotenoides das plântulas de três variedades de *Vigna radiata* submetidas a diferentes estresses (JISHA & PUTHUR, 2018).

As plântulas provenientes das sementes que passaram pelos ciclos, em ambos os tempos, apresentaram aumento em açúcares solúveis totais, açúcares não redutores e prolina. A presença desses metabólitos osmoprotetores, tanto nas sementes quanto nas plântulas, conferiram a “impressão de estresse”. Esta frase denota alterações epigenéticas ou bioquímicas na plântula que ocorrem após a imposição do estresse (ciclos de hidratação e desidratação) e faz com que as respostas a estresses futuros sejam diferentes quando comparadas às sementes que não passaram por nenhum fator estressante (BRUCE *et al.*, 2007).

Estudos com espécies de ambientes tropicais relatam que o início da perda da tolerância à dessecação se dá ao final das fases I e II da embebição das sementes e é totalmente perdida durante a fase III, após a protrusão da radícula (BEWLEY *et al.*, 2013; DEKKERS *et al.*, 2015). No entanto, com base nos resultados encontrados no presente trabalho, as plântulas também apresentam características bioquímicas semelhantes às sementes que passaram pelos ciclos, o que sugere que há uma transferência da resposta ao estresse das sementes para as plântulas.

Conclui-se que as sementes de *H. heptaphyllus* toleram ciclos de HD ao longo do tempo por meio de mecanismos de osmoproteção e ajustes metabólicos de açúcares e aminoácidos, em especial a prolina, e que a reativação do metabolismo antioxidante enzimático é um fator secundário na tolerância. Ademais, o tempo de embebição na qual as sementes são desidratadas interfere nos parâmetros fisiológicos tanto das sementes quanto das plântulas. E conforme a periodicidade dos ciclos HD há um ajuste osmótico que confere às sementes tolerância à dessecação. Ademais, plântulas oriundas de sementes que passaram por

ciclos de HD apresentaram mecanismos de defesa metabólicos contra a dessecação que são acionados durante a passagem das sementes pelos ciclos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fase de embebição na qual os ciclos de hidratação e desidratação são aplicados é um fator crucial para as sementes de *H. heptaphyllus*. Tendo em vista que no tempo Y da embebição as sementes reativaram seu metabolismo e houve síntese de novo de metabólitos, como AST, ANR e prolina, e que estes estão envolvidos na tolerância à dessecação, pode-se garantir maior probabilidade de sobrevivência das sementes aos diversos estresses ambientais. As sementes que foram hidratadas até o tempo Y apresentaram tanto um adiantamento e sincronismo da germinação, quanto à produção de plântulas mais vigorosas, características que são importantes para a manutenção e sobrevivência das espécies naturais. Possivelmente, a reativação do sistema antioxidante enzimático é um mecanismo secundário na tolerância à dessecação por ser um investimento altamente custoso energeticamente.

Plântulas oriundas de sementes que passaram por mais eventos de ciclos de hidratação e desidratação tiveram maiores acúmulos de AST, ANR e prolina, o que indica que certa forma essas plântulas sejam mais resistentes a prováveis estresses durante o seu estabelecimento. Tanto sementes quanto plântulas mais vigorosas podem ser utilizadas em programas de revegetação, recuperação ou reflorestamento de áreas degradadas. A utilização dos ciclos HD pode ser aplicada como uma técnica de *hidropriming* natural, por ser simples econômica e ecológica, podendo ser adotado por cooperativas de mudas florestais, pois garantem uma maior uniformidade da germinação e plântulas resistentes.

REFERÊNCIAS

- ABBADE, L. C.; TAKAKI, M. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith-Bignoniaceae, submetidas ao armazenamento. **Revista Árvore**, v. 38, n. 2, p. 233-240, 2014.
- ADHIKARY, R.; MANDAL, V. Hydro-Priming and Hydration-Dehydration Treatment Improve Seed Invigoration and Biotic Stress Tolerance. **Russian Agricultural Sciences**, v. 45, n. 1, p. 35-42, 2019.
- ALMEIDA-CORTEZ, J. S. de. Dispersão e banco de sementes. In. BORGHETTI, F.; FERREIRA, A. G. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p. 225-235, 2004.
- ALPERT, P. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, n. 5, p. 685–695, 2005.
- ALVARADO-LÓPEZ, S. *et al.* Priming effects on seed germination in *Tecoma stans* (Bignoniaceae) and *Cordia megalantha* (Boraginaceae), two tropical deciduous tree species. **Acta oecologica**, v. 61, p. 65-70, 2014.
- ALVARADO-LÓPEZ, S. *et al.* Mobilization and synthesis of seed storage and LEA proteins during natural priming of *Buddleja cordata* and *Opuntia tomentosa*. **Botanical Sciences**, v. 96, n. 1, p. 76–83, 2017.
- AN, Y.; LIANG, Z. Drought tolerance of *Periploca sepium* during seed germination: antioxidant defense and compatible solutes accumulation. **Acta physiologiae plantarum**, v. 35, n. 3, p. 959-967, 2013.
- 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, n. 4, p. 1247–1257, 1995.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 373–399, 2004.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant physiology**, v. 24, n. 1, p. 1, 1949.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Pre-sowing seed treatment—A shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions. **Advances in agronomy**, v. 88, p. 223-271, 2005.
- ASHRAF, M. F. M. R.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and experimental botany**, v. 59, n. 2, p. 206-216, 2007.
- ASHRAF, M. *et al.* Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. In: **Advances in Agronomy**. Academic Press, 2011. p. 249-296.
- ASHRAF, M. A. *et al.* Dynamic proline metabolism: importance and regulation in water-limited environments. In: **Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress**. Academic Press, 2018. p. 323-336.

- AZEVEDO, V. K. D. **Efeito da temperatura e do substrato na germinação de sementes de *Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo (ipê - roxo)**. 2008. Monografia (Engenharia Florestal) - Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2008.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, n. 2, p. 93–107, 2004.
- BAILLY, C.; EL-MAAROUF-BOUATEAU, 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, n. 10, p. 806–814, 2008.
- BARBEDO, C. J.; FILHO, J. M. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botânica Brasileira**, v. 12, n. 2, p. 145–164, 1998.
- BARROSO, D. G. *et al.* Growth of atlantic forest trees and their influence on topsoil fertility in the Southeastern Brazil. **Cerne**, v. 24, n. 4, p. 352–359, 2018.
- BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. Effects of Wetting and Drying Cycles on the Germination of Seeds of *Cyperus Inflexus*. **Ecology**, v. 63, n. 1, p. 248–252, 1982.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. SHORT COMMUNICATION Rapid determination of free proline for water - stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205–207, 1973.
- BECK, H. E. *et al.* Present and future Köppen-Geiger climate classification maps at 1-km resolution. **Scientific data**, v. 5, p. 180214, 2018.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. **Annals of botany**, v. 101, n. 2, p. 213-228, 2008.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1985. 367p.
- BEWLEY, J.D. *et al.* **Seeds Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3rd. ed. New York: Springer, 2013.
- BHATTACHARYA, S.; CHOWDHURY, R.; MANDAL, A. K. Seed invigoration treatments for improved germinability and field performance of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Indian Journal of Agricultural Research**, v. 49, n. 1, p. 32-38, 2015.
- BHATTACHARJEE, S. **Reactive Oxygen Species in Plant Biology**. Springer India, 2019.
- 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, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRADFORD, K. J. A Water Relations Analysis of Seed Germination Rates. **Plant Physiology**, v. 94, n. 2, p. 840–849, 1990.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. REGRAS PARA ANÁLISE DE SEMENTES. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E A. S. DE D. A. **Regras para Análise de Sementes**. 2. ed. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 395 p.
- BRUCE, T. J. A. *et al.* Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, v. 173, n. 6, p. 603-608, 2007.

BUITINK, J. *et al.* Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. **The Plant Journal**, v. 47, n. 5, p. 735-750, 2006.

CARTA, A.; BOTTEGA, S.; SPANÒ, C. Aerobic environment ensures viability and anti-oxidant capacity when seeds are wet with negative effect when moist: Implications for persistence in the soil. **Seed Science Research**, v. 28, n. 1, p. 16–23, 2017.

CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v. 83, n. 3, p. 463-468, 1991.

CASTRO, R. D. de; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. **Germinação: Do básico ao aplicado (Ferreira, A. G.; Borghetti, F. eds.)**. Artmed, Porto Alegre, p. 149-162, 2004.

CAVERS, P. B. Seed banks: Memory in soil. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 75, n. 1, p. 11–13, 1994.

CECCON, E.; HUANTE, P.; RINCÓN, E. Abiotic factors influencing tropical dry forests regeneration. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. March, p. 305–312, 2006.

CHEN, K.; ARORA, R. Priming memory invokes seed stress-tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 94, p. 33-45, 2013.

CHOUDHARY, A.; KUMAR, A.; KAUR, N. ROS and oxidative burst: Roots in plant development. **Plant Diversity**, v. 42, n. 1, p. 33-43, 2020.

CNCFlora. *Handroanthus heptaphyllus* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Handroanthus heptaphyllus](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Handroanthus%20heptaphyllus)>. Acesso em 28 maio 2020.

CONTRERAS-QUIROZ, M. *et al.* Is seed hydration memory dependent on climate? Testing this hypothesis with Mexican and Argentinian cacti species. **Journal of Arid Environments**, v. 130, p. 94-97, 2016.

COSTA, M. C. D. *et al.* Desiccation tolerance and longevity of germinated *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. seeds. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 1, p. 50-56, 2016.

COUSENS, R.; DYTHAM, C.; LAW, R. **Dispersal in Plants**. 1. ed. United States: Oxford University Press, 2008.

CROWE, J. H.; CARPENTER, J. F.; CROWE, L. M. The role of vitrification in anhydrobiosis. **Annual review of physiology**, v. 60, n. 1, p. 73-103, 1998.

CUMING, A. C. LEA proteins. In: **Seed proteins**. Springer, Dordrecht,. p. 753-780, 1999.

DEKKERS, B. J. W. *et al.* Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. **Planta**, v. 241, n. 3, p. 563–577, 2015.

DISCHE, Z. **General color reactions** In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Ed.s) **Methods in carbohydrate chemistry**. Academic Press, New York, v. 1, n. 1,

p.478-512, 1962.

DUBROVSKY, J. G. Seed hydration memory in Sonoran Desert cacti and its ecological implication. **American Journal of Botany**, v. 83, n. 5, p. 624-632, 1996.

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

FAGUNDES, N. C. A. *et al.* Survival of saplings in recovery of riparian vegetation of pandeiros river (MG). **Floresta e Ambiente**, v. 25, n. 2, p. 1–11, 2018.

FARRANT, J. M.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Proteins in development and germination of a desiccation sensitive (recalcitrant) seed species. **Plant Growth Regulation**, v. 11, n. 3, p. 257–265, 1992.

FAROOQ, M. *et al.* Thermal hardening: a new seed vigor enhancement tool in rice. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 47, n. 2, p. 187-193, 2005.

FENNER, M.; THOMPSON, K. **The ecology of seeds. Cambridge University Press, 2005.**

FINCH-SAVAGE, W. E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, v. 171, n. 3, p. 501–523, 2006.

GAFF, D. F.; OLIVER, M. The evolution of desiccation tolerance in angiosperm plants: a rare yet common phenomenon. **Functional Plant Biology**, v. 40, n. 4, p. 315-328, 2013.

GAI, A. P. C.; DOS SANTOS, D. S.; VIEIRA, E. A. Effects of zinc excess on antioxidant metabolism, mineral content and initial growth of *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos and *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith. **Environmental and Experimental Botany**, v. 144, n. September, p. 88–99, 2017.

GENTRY, A. H. Bignoniaceae: Part I (Crescentieae and Tourrettieae). **Flora Neotropica**, v. 25, n. 1, p. 1–130, 1980.

GIANNOPOLITIS, CONSTANTINE N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, 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, n. 12, p. 909–930, 2010.

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

GOMES, M. P.; SOARES, A. M.; GARCIA, Q. S. Phosphorous and sulfur nutrition modulate antioxidant defenses in *Myracrodruom urundeuva* plants exposed to arsenic. **Journal of Hazardous Materials**, v. 276, p. 97–104, 2014.

GREGGAINS, V. *et al.* Metabolism-induced free radical activity does not contribute significantly to loss of viability in moist-stored recalcitrant seeds of contrasting species. **New Phytologist**, v. 148, n. 2, p. 267–276, 2000.

GRINGS, M.; BRACK, P. *Handroanthus heptaphyllus* (ipê-roxo). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro-Região sul.** Ministério do Meio Ambiente - MMA,. Brasília, Brasil. 461-464, 2011.

- GUIMARÃES, C. C. *et al.* Evaluation of the loss of desiccation tolerance and nuclear dna content in seeds of *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert during and after germination. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 2, p. 207-215, 2011.
- HELL, A. F. *et al.* Metabolic changes on the acquisition of desiccation tolerance in seeds of the brazilian native tree *Erythrina speciosa*. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 1356, 2019.
- HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 9, p. 431–438, 2001.
- HORA, I. S. da; SANTOS, L. S.; MEIADO, M. V. Emergência de plântulas de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos (Bignoniaceae) sob a influência da hidratação descontínua das sementes. **Informativo Abrates**, v. 28, n. 1, 2018.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Manual técnico da vegetação brasileira. 212 p., 2012.
- JISHA, K. C.; PUTHUR, J. T. Seed hydropriming enhances osmotic stress tolerance potential in *Vigna radiata*. **Agricultural research**, v. 7, n. 2, p. 145-151, 2018.
- KRANNER, I.; BIRTIC, S. A Modulating Role for Antioxidants in Desiccation Tolerance. **Integrative and comparative biology**, v. 45, n. 5, p. 734–740, 2005.
- KRANNER, I. *et al.* Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 10, p. 805–811, 2010.
- KUMAR, S. P. J. *et al.* Seed birth to death: Dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. **Annals of Botany**, v. 116, n. 4, p. 663–668, 2015.
- LEPRINCE, O. *et al.* Late seed maturation: Drying without dying. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 4, p. 827–841, 2017.
- LEUBNER-METZGER, G. B-1,3-Glucanase Gene Expression in Low-Hydrated Seeds As a Mechanism for Dormancy Release During Tobacco After-Ripening. **Plant Journal**, v. 41, n. 1, p. 133–145, 2005.
- LIMA, A. T.; MEIADO, M. V. Effect of hydration and dehydration cycles on *Mimosa tenuiflora* seeds during germination and initial development. **South African Journal of Botany**, v. 116, p. 164-167, 2018.
- LIMA, A. T. *et al.* Does discontinuous hydration of *Senna spectabilis* (DC.) HS Irwin & Barneby var. *excelsa* (Schrad.) HS Irwin & Barneby (Fabaceae) seeds confer tolerance to water stress during seed germination?. **Journal of Seed Science**, v. 40, n. 1, p. 36-43, 2018.
- LIMA, A. T.; OLIVEIRA, D. M. de; MEIADO, M. V. Effect of hydration and dehydration cycles on *Macropitilium atropurpureum* seeds germination under water deficit conditions. **Communications in Plant Sciences**, vol 8, p. 55-61, 2018.
- LOHMANN, L.G. **Bignoniaceae** in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB112305>>. Acesso em 3 novembro 2019.

- LOHMANN, L.G.; ULLOA ULLOA, C. 2007. **Bignoniaceae**. In iPlants Prototype Checklist. Disponível em: www.iplants.org . Acesso em 3 novembro 2019.
- LONG, R. L. *et al.* Wet-dry cycling extends seed persistence by re-instating antioxidant capacity. **Plant and Soil**, v. 338, n. 1-2, p. 511-519, 2011.
- LONG, R. L. *et al.* The ecophysiology of seed persistence: A mechanistic view of the journey to germination or demise. **Biological Reviews**, v. 90, n. 1, p. 31–59, 2015.
- LÓPEZ-URRUTIA, E. *et al.* Differential RNA-and protein-expression profiles of cactus seeds capable of hydration memory. **Seed Science Research**, v. 24, n. 2, p. 91, 2014.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras. **Editora Plantarium**, v. 1, p. 384, 1992.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176–177, 1962.
- MARINO, D. *et al.* A burst of plant NADPH oxidases. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 1, p. 9–15, 2012.
- MARQUES, A. *et al.* Evolutionary ecophysiology of seed desiccation sensitivity. **Functional Plant Biology**, v. 45, n. 11, p. 1083-1095, 2018.
- MATTIOLI, R.; COSTANTINO, P.; TROVATO, M. Proline accumulation in plants: not only stress. **Plant signaling & behavior**, v. 4, n. 11, p. 1016–1018, 2009.
- MEDEIROS, A. C. D. S.; EIRA, M. T. S. da. Comportamento Fisiológico, Secagem e Armazenamento de Sementes Florestais Nativas. **Embrapa Florestas-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, p. 1–13, 2006.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. May, p. 867–880, 1981.
- NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination-still a mystery. **Plant Science**, v. 179, n. 6, p. 574–581, 2010.
- NONOGAKI, H.; CHEN, F.; BRADFORD, K. J. Mechanisms and genes involved in germination sensu stricto. **Annual Plant Reviews online**, p. 264-304, 2018.
- PAGNOTTA, S. E.; BRUNI, F. Chapter 4 the Glassy State of Water : a ‘ Stop and Go ’. p. 93–112, 2006.
- PERAZA-VILLARREAL, H. *et al.* Seed Priming Effects on Germination and Seedling Establishment of Useful Tropical Trees for Ecological Restoration. **Tropical Conservation Science**, v. 11, p. 1940082918817886, 2018.
- PEREIRA, W. V. S. *et al.* Loss of desiccation tolerance in *Copaifera langsdorffii* Desf. seeds

- during germination. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 2, p. 501-508, 2014.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2.ed. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.
- PUKACKA, S.; MALEC, M. ROS production and antioxidative system activity in embryonic axes of *Quercus robur* seeds under different desiccation rate conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 6, p. 2219–2227, 2011.
- RASHEED, N.; RASHEED, Z. Oxidative biomolecular damage : A possible mechanism for systemic autoimmunity. v. 13, n. 5, p. 25–27, 2019.
- REN, J.; TAO, L.. Effect of hydration–dehydration cycles on germination of seven *Calligonum* species. **Journal of Arid Environments**, v. 55, n. 1, p. 111-122, 2003.
- SÁ JÚNIOR, A. de *et al.* Application of the Köppen classification for climatic zoning in the state of Minas Gerais, Brazil. **Theoretical and Applied Climatology**, v. 108, n. 1-2, p. 1-7, 2012.
- SAINI, P.; GANI, M. Reactive Oxygen Species (ROS): A Way to Stress Survival in Plants. In: **Abiotic Stress-Mediated Sensing and Signaling in Plants: An Omics Perspective**. Springer. p. 127–153, , 2018.
- SAMI, F. *et al.* Role of sugars under abiotic stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 109, p. 54–61, 2016.
- SANDALIO, L. M. *et al.* Peroxisomes and their Key Role in Cellular Signaling and Metabolism. **Sub-cellular biochemistry**, v. 69, n. L, p. 1–352, 2013.
- SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Ascorbate peroxidase from rice seedlings : properties of enzyme isoforms , effects of stresses and protective roles of osmolytes. **Plant Science**, v. 167, n. 3, p. 541–550, 2004.
- SHARMA, P. *et al.* Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1–26, 2012.
- SHER, A. *et al.* Methods of Seed Priming. In: HASANUZZAMAN, M.; FOTOPOULOS, V. **Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings**. Springer, Singapore, 2019. p. 1-10.
- SILVA, F. A. M. da; ASSAD, E. D.; EVANGELISTA, B. A. **Caracterização climática do bioma Cerrado**. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de; RIBEIRO, J. F. (Ed.). *Cerrado: ecologia e flora*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. cap. 3, p. 71-88.
- SINGH, V. P. *et al.* Hydrogen sulfide alleviates toxic effects of arsenate in pea seedlings through up-regulation of the ascorbate-glutathione cycle: Possible involvement of nitric oxide. **Journal of Plant Physiology**, v. 181, p. 20–29, 2015a.
- SINGH, V. P. *et al.* Investigating the roles of ascorbate-glutathione cycle and thiol metabolism in arsenate tolerance in ridged *Luffa* seedlings. **Protoplasma**, v. 252, n. 5, p. 1217–1229, 2015b.
- SINGH, V. K. *et al.* Seed priming: state of the art and new perspectives in the era of climate change. In: **Climate Change and Soil Interactions**. Elsevier, 2020. p. 143-170.
- SKOGLUND, J. The role of seed banks in vegetation dynamics and restoration of dry tropical

ecosystems. **Journal of Vegetation Science**, v. 3, n. 3, p. 357–360, 1992.

SLIWINSKA, E.; JENDRZEJCZAK, E. Sugar-beet seed quality and DNA synthesis in the embryo in relation to hydration-dehydration cycles. **Seed Science and Technology**, v. 30, n. 3, p. 597-608, 2002.

SULLIVAN, C.; ROSS, W. **Selecting for drought and heat resistance sorghum** H. MUSSELL, T. TAPLES (Eds.), *Stress Physiology in Crops Plants*, John Willey and Sons, USA, pp. 264-281, 1979.

SUZUKI, N. *et al.* ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 35, n. 2, p. 259–270, 2012.

SZABADOS, L.; SAVOURE, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in plant science**, v. 15, n. 2, p. 89-97, 2010.

TORELLO, W. A.; RICE, L. A. Effects of NaCl stress on proline and cation accumulation in salt sensitive and tolerant turfgrasses. **Plant and Soil**, v. 93, n. 2, p. 241–247, 1986.

TUNNACLIFFE, A.; WISE, M. J. The continuing conundrum of the LEA proteins. **Naturwissenschaften**, v. 94, n. 10, p. 791–812, 2007.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, n. 1, p. 59–66, 2000.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: A review. **Amino Acids**, v. 35, n. 4, p. 753–759, 2008.

VERDIER, J. *et al.* A regulatory network-based approach dissects late maturation processes related to the acquisition of desiccation tolerance and longevity of medicago truncatula seeds. **Plant Physiology**, v. 163, n. 2, p. 757–774, 2013.

VICRÉ, M.; FARRANT, J. M.; DRIOUICH, A. Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species. **Plant, Cell and Environment**, v. 27, n. 11, p. 1329–1340, 2004.

WANG, B. C.; SMITH, T. B.; WANG, B. C. Closing the seed dispersal loop. **TRENDS in Ecology & Evolution**, v. 17, n. 8, p. 8–10, 2002.

WANG, L.; PATRICK, J. W.; RUAN, Y. L. Live Long and Prosper: Roles of Sugar and Sugar Polymers in Seed Vigor. **Molecular Plant**, v. 11, n. 1, p. 1–3, 2017.

WOJTYLA, Ł. *et al.* Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 66, 2016.

YEMM, E. W., & WILLIS, A. The Estimation of Carbohydrates in Plant Extracts by Anthrone. **Biochemical journal**, v. 57, n. 3, p. 508–514, 1954.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, n. 948, p. 209-214, 1955.

ZAMITH, L. R.; SCARANO, F. R. Restoration of a restinga sandy coastal plain in Brazil: survival and growth of planted woody species. **Restoration Ecology**, v. 14, n. 1, p. 87-94,

2006.

ZANANDREA, I. *et al.* Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding. **Australian Journal of Botany**, v. 57, n. 8, p. 661–669, 2009.