



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



**LEONEL GONÇALVES PEREIRA NETO**

**LONGEVIDADE DE SEMENTES DE *Astronium fraxinifolium* Schott:  
ESTUDOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES**

**Botucatu**

**2016**



**LEONEL GONÇALVES PEREIRA NETO**

**LONGEVIDADE DE SEMENTES DE *Astronium fraxinifolium* Schott:  
ESTUDOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP – *Campus* de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Agricultura).

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

Coorientador: Dr. Peter E. Toorop

Botucatu

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Pereira Neto, Leonel Gonçalves, 1961-  
P436L Longevidade de sementes de *Astronium fraxinifolium*  
Schott: estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares /  
Leonel Gonçalves Pereira Neto. - Botucatu : [s.n.], 2016  
134 p. : fots. color., grafs. color., ils. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2016  
Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva  
Coorientador: Peter E. Toorop  
Inclui bibliografia

1. Aroeira. 2. Sementes oleaginosas - Viabilidade. 3. Sementes - Envelhecimento. 4. Transcriptoma. I. Silva, Edvaldo Aparecido Amaral da. II. Toorop, Peter E. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "LONGEVIDADE DE SEMENTES DE *ASTRONIUM FRAXINIFOLIUM* SCHOTT:  
ESTUDOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES"

AUTOR: LEONEL GONÇALVES PEREIRA NETO

ORIENTADOR: EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

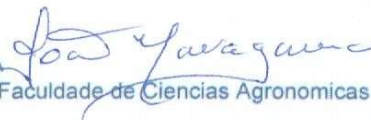
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA  
(AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA  
Dep de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu



Prof. Dr. PETER EDWIN TOOROP  
/ Millennium Seed Bank, Royal Botanic Garden - Kew



Voluntário Livre-Docente JOÃO NAKAGAWA  
Dep de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu



Dra. JULIANA PEREIRA BRAVO  
Pós-doutoranda - Dep Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP



Profa. Dra. MARIA MÁRCIA PEREIRA SARTORI  
Depto de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP

Botucatu, 08 de dezembro de 2016.



Ofereço este trabalho, em especial, à minha esposa Cláudia e aos meus filhos Marcos Filipe e Ana Luíza, à minha família, in memoriam de meu pai Geraldo Pereira e à Embrapa, que me proporcionou a realização desta Tese. Leonel Neto





## **Agradecimentos**

A Jesus, Maria e José nossa sagrada família. Agradeço à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia que financiou este estudo. À minha família – Cláudia, Marcos Filipe, Ana Luiza e Toddy – pela convivência, paciência e amor, e a meus familiares, pelo apoio e oração. Aos meus orientadores Prof. Dr. Edvaldo A. Amaral da Silva, Dr. Peter E. Toorop, Prof<sup>a</sup>. Maria Márcia P. Sartori e meu conselheiro acadêmico Dr. Juliano G. Pádua meu muito obrigado. Aos membros titulares e suplentes da Banca Prof. João Nakagawa, Prof. Edvaldo Amaral, Prof<sup>a</sup>. Márcia Sartori, Dra. Juliana P. Bravo, Dr. Peter E. Toorop, Dr. Marcos A. Gimenes, Dr. Eniel David Cruz e Dr. Pedro B. da Silva minha eterna gratidão. Aos professores e funcionários da FCA e a todos os colegas de mestrado e doutorado com os quais tive o privilégio e a honra de trabalhar, meu carinho e minha amizade. Agradeço ao assistente do Cenargen, Sr. Aécio Amaral Santos, pela coleta das sementes em Goiás. Agradeço as professoras Yule Roberta F. Nunes, Helen L. Araújo e Adriana O. Machado, da Universidade Estadual de Montes Claros, que realizaram a coleta das sementes em Minas Gerais, meu muito obrigado. Agradeço aos técnicos da FCA Valéria Giandoni, Iara Brito, Tiago Gianetti, Fernando José Z. Tamburo e Eliane G. da Silva pelas valiosas colaborações. Agradeço às funcionárias da pós-graduação pelo apoio e atenção, em especial a Regina Prado pela amizade. Aos colegas Júlio Maia, Juliana Bravo e Gilberto Filho pelo auxílio importante na compreensão dos resultados e elaboração do trabalho. Ao técnico do LaCTAD Vagner K. Okura, que nos auxiliou nas análises dos dados de RNA-Seq e a todos os técnicos do LaCTAD, meu muito obrigado. Especial agradecimento aos colegas do Cenargen Rosameres Galvão, Ana Flávia Dias Côrtes, Gladys Bonato e José Cesamildo Magalhães pela colaboração. À amiga Ana Lúcia Kempinas, e demais funcionárias da biblioteca da FCA, meu agradecimento e amizade. Aos amigos José Ricardo Micheletti e Roberto Carlos Pimentel pelo apoio neste trabalho. A todos os colegas da Embrapa que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste estudo, meus sinceros agradecimentos. Especial agradecimento ao meu amigo Breno Kenedy Lima Bezerra, meu procurador em Botucatu. A todos os amigos queridos de Botucatu - SP, nosso carinho, amizade e eterna gratidão.



*“O espírito do Senhor está sobre mim, porque o Senhor me ungiu. Porque, assim como a terra faz brotar a planta, e o jardim faz germinar a semente, assim o Senhor Deus, fará brotar a justiça e o louvor diante de todas as nações” (Isaías 61. 1, 11).*



## RESUMO

Sementes de diferentes espécies, armazenadas na mesma condição em bancos de germoplasma, apresentam respostas distintas quanto à perda de sua viabilidade. Atualmente, somente o teste de germinação é usado para avaliar a qualidade fisiológica de sementes em bancos de germoplasma e outros métodos ainda são necessários para prever a longevidade de sementes. A espécie *Astronium fraxinifolium* Schott é uma árvore das regiões da Amazônia, Cerrado e Caatinga, ameaçada de extinção, que apresenta sementes não dormentes e que germinam rapidamente. O objetivo do presente trabalho foi estudar a longevidade de sementes de *A. fraxinifolium*, coletadas em diversos locais de duas regiões geográficas distintas e avaliar o transcriptoma. Foram avaliadas sementes de dez acessos de *A. fraxinifolium*, sendo seis acessos coletados no estado de Goiás (GO) e quatro em Minas Gerais (MG). Foram realizados pré-testes para determinar a melhor temperatura para germinação e o tempo para iniciar a protrusão da radícula. Testes de envelhecimento, condutividade elétrica, teor de malonaldeído e análise do transcriptoma foram realizados. A temperatura ótima de germinação foi de 30° C e os primeiros eventos de protrusão radicular ocorreram após 20 horas de embebição. Sementes coletadas em Goiás apresentaram maior viabilidade e longevidade após os testes de envelhecimento para todas as condições testadas e os acessos GO 6 e MG 2 apresentaram, respectivamente, a maior e menor longevidade após o envelhecimento. O teste de condutividade elétrica não foi adequado para avaliar a longevidade dos acessos, e o teor de malonaldeído foi considerado um teste promissor para avaliar a longevidade de sementes de *A. fraxinifolium*. Foi realizada análise de RNASeq para avaliar os transcriptomas de eixos embrionários de sementes dos acessos GO 6 e MG 2, com sementes envelhecidas e não envelhecidas. Os genes expressos diferencialmente foram relacionados aos processos de transcrição de RNA, kinases, ubiquitinas, metabolismo de amido, microtúbulos, componentes de membrana, polimerase e transporte de carboidratos e zinco.

**Palavras chaves:** Longevidade de sementes; *Astronium*; Envelhecimento; Malonaldeído; Transcriptoma.



## ABSTRACT

Seeds of different species stored under the same conditions differently lose their viability. Currently, the physiological quality of seeds stored in genebanks is evaluated only by the germination test and other methods are still needed to predict seed viability. The species *Astronium fraxinifolium* Schott is a tree in the Amazonian regions, Cerrado and Caatinga, which presents seeds that are non-dormant and which germinate rapidly. The goal of this work was to study the longevity of seeds *A. fraxinifolium* collected at several sites from two different geographic regions, and assess the transcriptome. For that, seeds from ten accessions of *A. fraxinifolium* were collected (six in the state of Goiás (GO) and four in Minas Gerais (MG) and evaluated. Pre-tests were performed to determine the optimal germination temperature and the onset of the radicle protrusion. Aging tests, electrical conductivity, malonaldehyde content and transcriptome analysis were performed. The optimal germination temperature was 30° C and the first radicle protrusion events occurred after 20 hours of imbibition. Seeds collected in Goiás displayed higher viability and longevity after aging in all tested conditions and seeds from accessions GO 6 and MG 2 showed, respectively, the highest and lowest longevity indexes after aging. The electrical conductivity test was not adequate to evaluate the longevity of the accessions and the assessment of the malonaldehyde content was considered a promising test to assess the longevity of *A. fraxinifolium* seeds. RNASeq analysis was performed to evaluate the transcripts of embryonic axes of seeds of the GO 6 and MG 2 accessions, with aged and unaged seeds. Differentially expressed genes were related to RNA transcription processes, kinases, ubiquitin, starch metabolism, microtubules, membrane components, polymerase, and transport of carbohydrates and zinc.

**Keywords:** Seed longevity; *Astronium*; Aging; Malondialdehyde; Transcriptome.





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 –</b>	Árvore de <i>A. fraxinifolium</i> localizada no Km 227 da Rodovia BR – 414, no município de Niquelândia – GO.....	29
<b>Figura 2 –</b>	Estrutura do fruto (A), do cálice com as 5 sépalas das flores (B) e sementes dos dez acessos selecionados (C) de <i>A. fraxinifolium</i> . A barra escura representa 1 cm .....	29
<b>Figura 3 –</b>	Representação esquemática dos principais parâmetros interativos que determinam a longevidade de sementes (RAJJOU e DEBEAUJON, 2008) .....	45
<b>Figura 4 –</b>	Denominação, identificação, local de coleta e coordenadas geográficas dos dez acessos de <i>A. fraxinifolium</i> avaliados.....	47
<b>Figura 5 –</b>	Identificação dos locais de coleta das sementes de <i>A. fraxinifolium</i> nos Estados de Goiás e Minas Gerais. A – Mapa do Brasil com os biomas e o local de coletas. B – Local de coleta nos Estados de Goiás e Minas Gerais. C – Detalhe do local de coleta em Goiás com as coordenadas geográficas. D – Detalhe do local de coleta em Minas Gerais com as coordenadas geográficas.....	48
<b>Figura 6 –</b>	Curva de embebição de sementes de <i>A. fraxinifolium</i> , em temperatura de 30° C e fotoperíodo de 8 horas de luz e 16 horas de escuro, expressa em peso fresco (g) .....	57
<b>Figura 7 –</b>	Evolução do processo germinativo de sementes de <i>A. fraxinifolium</i> , em horas (hs), até a formação da plântula com os primeiros folíolos .....	58
<b>Figura 8 –</b>	Efeito do tempo de envelhecimento (dias) a 45° C nas UR de 60%, 65% e 70%, na germinação de sementes de <i>A. fraxinifolium</i> de acessos de Goiás (GO) e Minas Gerais (MG) .....	60
<b>Figura 9 –</b>	Comportamento dos dez acessos de <i>A. fraxinifolium</i> quanto a perda de viabilidade em <i>sigma</i> nas UR de 60%, 65% e 70% .....	63
<b>Figura 10 –</b>	Comportamento dos acessos de <i>A. fraxinifolium</i> de Goiás (GO) e Minas Gerais (MG) quanto a longevidade em <i>sigma</i> , em relação as UR (60%, 65% e 70%) no envelhecimento a 45°C .....	63

<b>Figura 11 –</b>	Comportamento dos dez acessos de <i>A. fraxinifolium</i> quanto à perda de viabilidade ( $P_{50}$ ), em dias, nas UR (60%, 65% e 70%) .....	65
<b>Figura 12 –</b>	Sementes de <i>A. fraxinifolium</i> dos acessos de Goiás GO 6 e GO 7 sem envelhecimento (0 dias) e submetidas ao envelhecimento durante 100 dias a 45°C e UR de 60% ....	66
<b>Figura 13 –</b>	Teor de água das sementes (%) em peso fresco de <i>A. fraxinifolium</i> com sementes sem envelhecimento e com envelhecimento a 45° C e UR de 60% em 21 dias.....	68
<b>Figura 14 –</b>	Análise de componente principal dos resultados dos testes de envelhecimento ( <i>sigma</i> 60%, 65% e 70% UR), condutividade elétrica (sem e com envelhecimento aos 21 dias) e teor de MDA (sem e com envelhecimento aos 21 e 31 dias) .....	72
<b>Figura 15 –</b>	Análise de componente principal dos resultados dos testes de envelhecimento ( <i>sigma</i> ), condutividade elétrica (CE) e teor de MDA, com os respectivos vetores.....	72
<b>Figura 16 –</b>	Análise do Diagrama de <i>Venn</i> dos 217 DEG <i>Up</i> regulados entre os tratamentos de sementes de <i>A. fraxinifolium</i> dos acessos MG 2 x GO 6 com sementes envelhecidas.....	79
<b>Figura 17 –</b>	Análise do Diagrama de <i>Venn</i> dos 181 DEG <i>Down</i> regulados entre os tratamentos de sementes de <i>A. fraxinifolium</i> dos acessos MG 2 e GO 6 com sementes envelhecidas.....	82
<b>Figura 18 –</b>	<i>Heatmap</i> da comparação do transcriptoma de <i>A. fraxinifolium</i> de sementes GO 6 com envelhecimento (7) x sem envelhecimento (1) .....	87
<b>Figura 19 –</b>	<i>Heatmap</i> da comparação do transcriptoma de <i>A. fraxinifolium</i> de sementes MG 2 com env. (10) x sem envelhecimento (5) .....	88

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 –</b>	Porcentagem de germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de plântulas normais (PN) e comprimento de plântulas (CP) de sementes de <i>A. fraxinifolium</i> nas diferentes temperaturas.....	56
<b>Tabela 2 –</b>	Valores de <i>sigma</i> , em dia, na interação entre os 10 acessos de <i>A. fraxinifolium</i> com três níveis de UR (%).....	62
<b>Tabela 3 –</b>	Valor de P <sub>50</sub> (dias), na interação entre os 10 acessos de <i>A. fraxinifolium</i> com três níveis de UR (60%, 65% e 70%) durante o envelhecimento a 45°C.....	64
<b>Tabela 4 –</b>	Valor de CE ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ), na interação entre os 10 acessos de <i>A. fraxinifolium</i> com sementes sem envelhecimento e com envelhecimento, durante 21 dias, a 45° C e UR de 60%.....	67
<b>Tabela 5 –</b>	Resultado do teor de malonaldeído (nmol g <sup>-1</sup> de MF) das sementes de <i>A. fraxinifolium</i> , sem envelhecimento e com envelhecimento aos 21 e 31 dias.....	70
<b>Tabela 6 –</b>	Análise de componente principal de <i>sigma</i> 60% UR, <i>sigma</i> 65% UR, <i>sigma</i> 70% UR, CE sem e com 21 dias de envelhecimento e MDA sem e com 21 e 31 dias de envelhecimento.....	71
<b>Tabela 7 –</b>	Número de <i>Reads</i> mapeados obtidos no sequenciamento na plataforma <i>Illumina HiSeq2500</i> <sup>®</sup> de eixos embrionários de sementes de <i>A. fraxinifolium</i> de sementes sem e com envelhecimento (E) .....	74
<b>Tabela 8 –</b>	Número de genes diferencialmente expressos (DEG) em sementes de <i>A. fraxinifolium</i> na comparação entre os tratamentos.....	74
<b>Tabela 9 –</b>	Análise de enriquecimento <i>Gene Ontology</i> de DEG que foram <i>Up</i> e <i>Down</i> expressos na comparação dos tratamentos MG 2 com envelhecimento x sem envelhecimento.....	75
<b>Tabela 10 –</b>	Análise de enriquecimento <i>Gene Ontology</i> de DEG que foram <i>Up</i> expressos na comparação dos tratamentos sementes GO 6 com envelhecimento x sem envelhecimento.....	76

<b>Tabela 11 –</b>	Análise de enriquecimento <i>Gene Ontology</i> de DEG que foram <i>Up</i> e <i>Down</i> expressos na comparação de sementes GO 6 com envelhecimento x MG 2 com envelhecimento.....	77
<b>Tabela 12 –</b>	Seleção de genes <i>Up</i> regulados GO 6 com possível relação ao envelhecimento das sementes de <i>A. fraxinifolium</i> .....	80
<b>Tabela 13 –</b>	Seleção de genes <i>Up</i> regulados MG 2 com possível relação ao envelhecimento das sementes de <i>A. fraxinifolium</i> .....	81
<b>Tabela 14 –</b>	Genes <i>Down</i> regulados ambos para GO 6 e MG 2 com possível relação ao envelhecimento das sementes de <i>A. fraxinifolium</i> .....	83
<b>Tabela 15 –</b>	Seleção de genes <i>Down</i> regulados GO 6 com possível relação ao envelhecimento das sementes de <i>A. fraxinifolium</i> .....	84
<b>Tabela 16 –</b>	Seleção de genes <i>Down</i> regulados MG 2 com possível relação ao envelhecimento das sementes de <i>A. fraxinifolium</i> .....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE Condutividade elétrica  
DAP Diâmetro na altura do peito  
DEG Genes diferencialmente expressos  
hs Horas  
m Metro  
cm Centímetro  
nm Nanômetro  
km Quilometro  
ml Mililitros  
µl Microlitros  
UR Umidade relativa  
MDA Malonaldeído  
PVPP Polivinilpirrolidona  
MSR Metionina sulfóxido redutase  
ROS Espécie reativa de oxigênio  
DNA Ácido desoxirribonucleico  
RNA Ácido ribonucleico  
ATP Trifosfato de adenosina  
TBA Ácido tiobarbitúrico  
TCA Ácido tricloroacético  
TD Tolerância à dessecação  
GO Goiás  
MG Minas Gerais  
® Marca registrada



## Sumário

1	Introdução.....	23
2	Revisão de literatura.....	26
2.1	A Espécie.....	26
2.2	Desenvolvimento da semente e aquisição da qualidade.....	30
2.3	Tolerância à dessecação.....	34
2.4	Longevidade de sementes.....	35
2.5	Deterioração de sementes.....	40
3	Material e Métodos.....	45
3.1	Obtenção das sementes.....	45
3.2	Experimentos preliminares.....	49
3.2.1	Germinação de sementes.....	49
3.2.2	Curva de embebição de sementes.....	49
3.3	Envelhecimento.....	50
3.4	Condutividade elétrica .....	51
3.5	Teor de malonaldeído (MDA) .....	52
3.6	Análise do transcriptoma.....	52
3.6.1	Extração de RNATotal.....	52
3.6.2	Sequenciamento e construção de biblioteca de cDNA.....	54
3.6.3	Análise de bioinformática.....	55
3.6.4	Delineamento experimental e análise estatística.....	55
4	Resultados.....	56
4.1	Germinação de sementes.....	56
4.2	Curva de embebição de sementes.....	57
4.3	Envelhecimento.....	58
4.4	Condutividade elétrica.....	66

4.5	Teor de malonaldeído.....	69
4.6	Análise do transcriptoma.....	72
4.6.1	Sequenciamento e construção de bibliotecas de cDNA.....	72
4.6.2	Análise dos transcritos.....	73
4.7	Discussão.....	87
4.8	Conclusões.....	98
	Referências.....	99
	Anexos.....	109



## 1 INTRODUÇÃO

A conservação da biodiversidade em âmbito mundial é uma preocupação constante de todos os povos. Em muitas regiões do planeta a perda dos ecossistemas tem sido quase total e irreversível. A biodiversidade, tanto terrestre como marinha, vem sendo ameaçada por diversos fatores. O principal impacto dessa perda é a extinção das espécies, que as vezes são irrecuperáveis.

No Brasil, extensas áreas de vegetação nativa foram devastadas na Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado Central e Amazônia. Devido as pressões da ocupação humana na zona costeira, a Mata Atlântica ficou reduzida aproximadamente, a 7% da sua vegetação original (CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE DO CERRADO E CAATINGA, 2016). Atualmente, o Cerrado do Brasil Central é o bioma que sofre o maior processo de destruição dos ecossistemas, com diversas espécies ameaçadas de extinção, sendo estimado pelos órgãos governamentais e não governamentais uma perda superior a 52% do seu *habitat* natural.

Sementes de diferentes espécies e cultivares, conservadas em bancos de germoplasma, sob as mesmas condições de temperatura e umidade, apresentam respostas distintas quanto à perda da sua viabilidade, que decorre de diversos fatores tais como: constituição genética e química, teor de água, qualidade inicial das sementes, dentre outros fatores. O envelhecimento natural que ocorre com os seres vivos sempre foi assunto de muitos estudos e pesquisas, realizados com o objetivo de compreender os diversos aspectos relacionados a este processo e, principalmente, encontrar mecanismos que possam retardar ou até mesmo reverter o envelhecimento.

A longevidade de sementes se refere ao período máximo de tempo que uma semente pode permanecer viável, quando armazenada em condições ambientais favoráveis, para cada espécie. A longevidade é afetada por diversos fatores como a constituição química da semente, estágio de maturação, viabilidade inicial, umidade e temperatura do ar e grau de infecção por microrganismos e insetos (BEWLEY et al., 2013). Vários estudos têm sido realizados para explicar os fatores relacionados à longevidade de sementes ortodoxas. Inúmeros estudos genéticos têm sido realizados para identificar e avaliar genes que estejam relacionados à longevidade de sementes.

Modelos matemáticos têm sido desenvolvidos para prever o tempo que uma semente pode permanecer viável, as chamadas equações de viabilidade (KEW ROYAL BOTANIC GARDENS, 2016). As equações de viabilidade levam em conta, principalmente, a temperatura e umidade de armazenamento e a qualidade inicial das sementes. Alguns modelos exigem experimentos complexos e demorados (ANDREOLI, 2004). No início da década de 1960, o professor E. H. Roberts iniciou estudos sobre as equações de viabilidade de sementes, avaliando o efeito da umidade e temperatura na viabilidade de sementes de cereais, como arroz e trigo.

O processo de deterioração de sementes é definido como a redução da qualidade fisiológica, relacionada a um complexo de mudanças que ocorrem com o passar do tempo e que acarreta danos aos sistemas e funções vitais, resultando na diminuição ou perda do grau de capacidade e desempenho da semente na germinação (DELOUCHE, 2002). Vários eventos podem ocorrer na semente antes da perda da viabilidade total, como a desestruturação do sistema de membranas, o decréscimo da atividade de enzimas respiratórias, a redução na eficiência dos mecanismos de reparo do DNA, dentre outros (McDONALD, 1999; BAILLY, 2004; HU et al., 2012; CORBINEAU, 2012). Além disso, a deterioração de sementes durante o armazenamento leva a progressiva fragmentação do DNA e mudanças em mRNA, que são armazenados na semente seca (LEPRINCE e BUITINK, 2010). Assim, testes bioquímicos, fisiológicos e moleculares poderão ser usados como ferramentas úteis para indicar possíveis danos causados às sementes, de forma mais rápida e em estágios iniciais, permitindo um melhor manejo das coleções de germoplasma.

A capacidade de germinar, suportar a dessecação a um baixo conteúdo de umidade e permanecer viável durante o armazenamento subsequente são características biológicas das sementes, que são adquiridas ao longo do processo de desenvolvimento e maturação (PROBERT et al., 2007). O conhecimento sobre o processo de tolerância à dessecação é muito importante para se definir qual o melhor método de conservação das sementes. Dependendo do comportamento das sementes em tolerar o processo de dessecação, elas podem ser classificadas como sementes ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias (ROBERTS, 1973; ELLIS et al., 1990)

Atualmente, nos bancos de germoplasma a avaliação da viabilidade das sementes é feita somente por meio do teste de germinação, no entanto, esse teste

não permite detectar o progresso da deterioração, indicando apenas os estádios finais do processo (DONA et al., 2013). Estádios iniciais da deterioração poderiam ser detectados ao longo do armazenamento das sementes, contribuindo positivamente para elucidar as diferenças de comportamento entre as espécies com sementes de diferentes qualidades, durante o período de conservação. Os principais desafios na manutenção da viabilidade das sementes, em bancos de germoplasma, estão em prever quando os acessos devem ser regenerados e detectar fases iniciais de deterioração das sementes, sem consumir as amostras em ensaios repetitivos para avaliar a viabilidade no processo de monitoração (DONA et al., 2013). A monitoração dos acessos armazenados em bancos de germoplasma é uma prática de rotina dos bancos, e se refere a avaliação da qualidade fisiológica das sementes no decorrer do armazenamento (FAIAD, et al. 2001).

A utilização de testes complementares aos tradicionalmente empregados, na avaliação da qualidade das sementes, poderão agregar informações que permitirão conhecer mais detalhes sobre o processo de envelhecimento e deterioração de sementes, e conseqüentemente, melhorarem de forma considerável o manejo das coleções em bancos de germoplasma.

Estudos moleculares para avaliação da deterioração de sementes têm sido cada vez mais usados. Diversas metodologias estão sendo usadas com esse objetivo, como perfis de expressão gênica, análise do transcriptoma, avaliação de danos na estrutura do DNA, estudo de rotas metabólicas de enzimas e proteínas, degradação de lipídeos, atividade de compostos antioxidantes, alongamento de telômeros, dentre outros.

Para as espécies florestais quase não há estudos específicos quanto aos processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares envolvidos com a deterioração das sementes, durante o armazenamento, principalmente, relacionados à conservação em longo prazo, o que dificulta o estabelecimento de técnicas adequadas para a conservação dessas espécies. Assim, desta forma, os testes de envelhecimento e de germinação, bem como análises moleculares do transcriptoma poderão ser bastante úteis no estudo dos aspectos relacionados à perda da viabilidade de sementes de espécies florestais em bancos de germoplasma.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a longevidade de sementes de *Astronium fraxinifolium* Schott, coletadas em diversos locais de duas regiões geográficas distintas e avaliar o transcriptoma.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A ESPÉCIE

O nome do gênero *Astronium* deriva do grego *astron*, que significa estrela, referindo-se ao cálice com 5 sépalas, que é acrescente e persistente ao fruto (SANTIN, 1989). A espécie *Astronium fraxinifolium* foi descrita pelo botânico austríaco Heinrich Wilhelm Schott, em 1827. A espécie foi citada na obra *Flora Brasiliensis* de Carl Friedrich Philipp Von Martius. O gênero *Astronium* está representado nas Américas por 8 espécies, sendo que o Brasil concentra 7 das 8 espécies, portanto, é considerado o centro de origem e diversidade do gênero (CARMELLO-GUERREIRO, 1996).

A espécie *Astronium fraxinifolium* Schott, da família Anacardiaceae, é uma árvore dos trópicos americanos, com ocorrência no México, parte da América Central, Argentina, Bolívia, Brasil e Paraguai (IBGE, 2002; LORENZI, 2014). No Brasil ocorre nas regiões do Cerrados do Brasil Central, Nordeste e na Amazônia, sendo conhecida como gonçalo-alves, aroeira, aroeira do campo, chibatã, sete cascas, aroeira vermelha e ubatã (LORENZI, 2014; SALOMÃO e SILVA, 2006).

A árvore de *A. fraxinifolium* Schott tem porte arbóreo médio, com altura de 8 - 12 m, com tronco cilíndrico e reto, de 60 - 80 cm de diâmetro (DAP) e de casca esbranquiçada (Figura 1). Folhas compostas, com 7 a 11 folíolos, de 6 - 13 cm de comprimento por 4 - 5 cm de largura (LORENZI, 2014). As folhas exalam odor similar ao de terebintina, semelhante ao da folha da mangueira, que é da mesma família. É uma espécie rústica que apresenta desenvolvimento rápido na produção e formação de mudas e desenvolvimento no campo. É uma planta dioica, apícola e apresenta disseminação pelo vento (anemocoria).

Ecologicamente é classificada como planta decídua, heliófila, pioneira e seletiva xerófila, sendo encontrada em terrenos rochosos e secos, onde forma agrupamentos descontínuos (LORENZI, 2014). Floresce durante os meses de julho

e agosto e apresenta frutos maduros de setembro a outubro, com a árvore despida de sua folhagem (IBGE, 2002). Anualmente produz grande quantidade de sementes, que são facilmente disseminadas pela ação do vento, devido a estrutura de dispersão das sementes formado pelo cálice (Figura 2B). Segundo Carmello-Guerreiro (1996), “o fruto é uma pseudo-sâmara, com exocarpo unisseriado, suberificado e aderido ao mesocarpo. O mesocarpo é parenquimático, com grandes canais secretores associados aos feixes vasculares. O endocarpo parenquimático é bisseriado, sendo a camada que reveste o lóculo ligeiramente alongada radialmente. O óvulo é anátropo, unitegumentado, crassinucelado, com rafe dorsal evidente e hipóstase tanífera. A testa é fortemente adnata ao pericarpo. O embrião ocupa posição axial e é do tipo *investing*” (Figura 2A).

Sua madeira é muito pesada, compacta, rija, incorruptível e brilhante. A cor de seu cerne varia muito, desde o vermelho claro até o vermelho cor de brasa, sempre com listas negras de forma variada, daí a denominação de *zebrawood*. É própria para construção civil e naval, marcenaria, confecção de dormentes, corrimãos, balaústres, esteios, móveis de luxo e portas de fino acabamento (LORENZI, 2014).

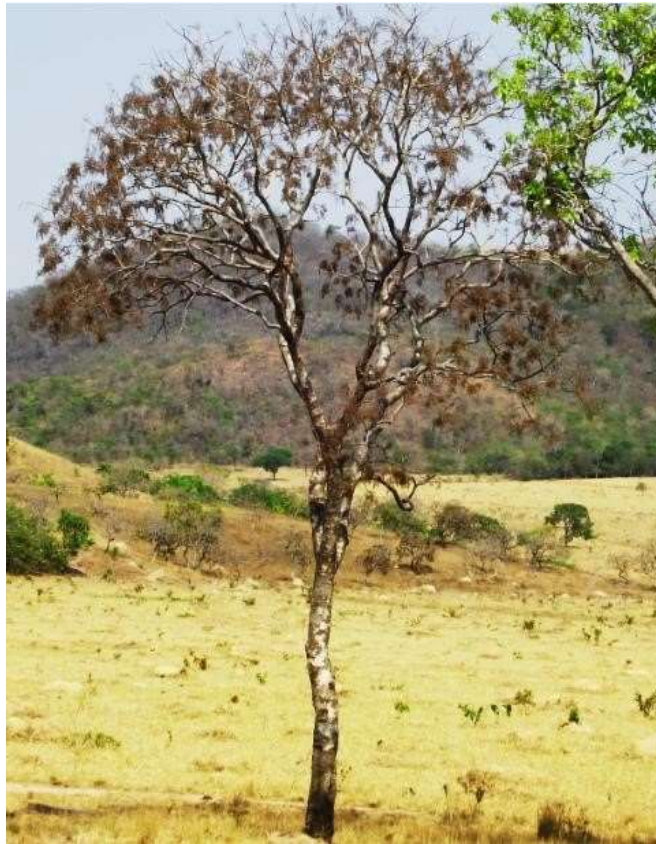
Segundo Aguiar et al. (2001), a espécie não tem sido usada em programas de reflorestamento e as populações naturais foram, na sua maioria, destruídas pela exploração predatória do homem, o que restringe a sua ocorrência a pequenos fragmentos florestais e na vegetação que ocorre às margens de rodovias, principalmente, na região do Cerrado do Brasil Central. Assim, espécies como o *A. fraxinifolium*, que se encontram nessa última situação, sofrem com a concentração de poluentes emitidos pelos veículos que trafegam nessas rodovias (LORENZI, 2014; AGUIAR et al., 2001). A espécie está incluída na lista de espécies da flora brasileira com deficiência de dados da lista de espécies ameaçadas de extinção (IBAMA, 2008).

O Cerrado é um dos maiores biomas do território brasileiro, localizado na região Centro-Oeste, e parte das regiões Norte, Nordeste e Sudeste. É também a região que sofre o processo de desmatamento mais acentuado na atualidade. Segundo dados de diversas organizações ambientais e do próprio governo federal, aproximadamente, 48% da vegetação nativa se encontra total ou parcialmente conservada, sendo que a agropecuária, a exploração mineral de carvão vegetal e a expansão dos centros urbanos são as principais causas da degradação ambiental. As principais consequências do desmatamento são a extinção de diversas espécies

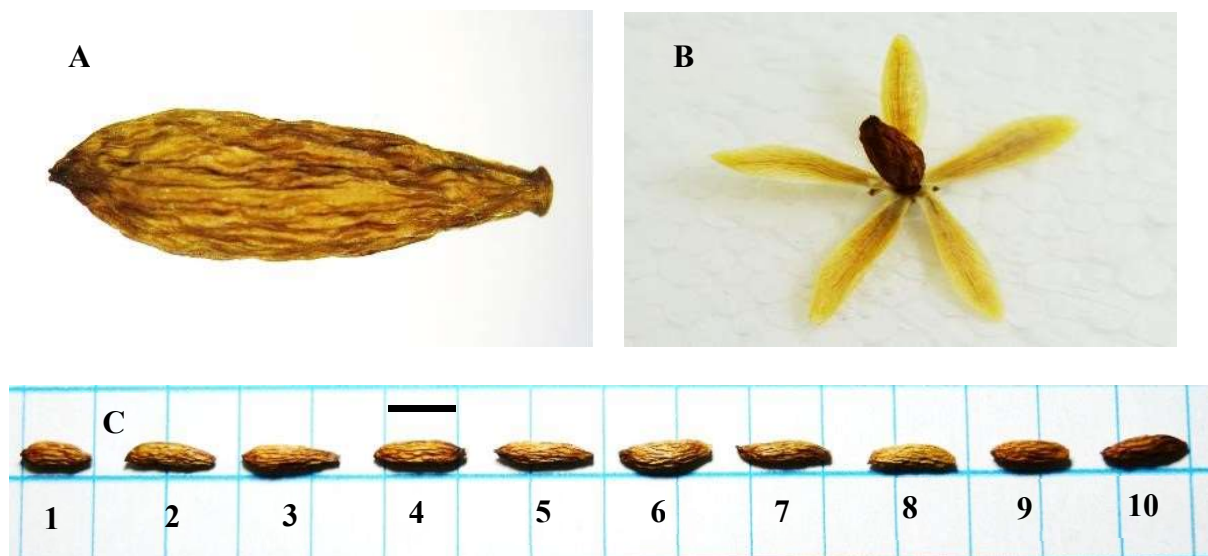
de animais e plantas, com perda da biodiversidade, além do impacto sobre os leitos dos rios e das nascentes. O Cerrado tem vegetação típica de savana, adaptado a pouca umidade e até mesmo um ciclo de queimadas, sendo que a casca do tronco das árvores é uma característica típica dessa adaptação. Atualmente, as regiões do Cerrado e da Mata Atlântica são consideradas *hotspot*, termo que se refere ao conjunto de áreas do planeta com alta biodiversidade e que estão ameaçadas de extinção (CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE DO CERRADO E CAATINGA, 2016).

O *Astronium fraxinifolium* é uma das 692 espécies que compõem a Coleção de Base de Germoplasma Sementes (Colbase) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília - DF. A Colbase tem como objetivo, garantir por muitas décadas, a sobrevivência das sementes de espécies ortodoxas, de interesse atual e potencial, assegurando a manutenção das fontes básicas para a alimentação e agricultura (WETZEL et al., 2005). Na Colbase, as sementes são desidratadas a um teor de água variando de 3 a 7% (base úmida), embaladas em envelopes aluminizados da empresa *Barrier Foil Products Co*<sup>®</sup>, Manchester, UK, mantidas em câmaras frias, com temperatura de -20° C (FAIAD et al., 2001). Atualmente, a Colbase conta com 72 acessos de *A. fraxinifolium*.

**Figura 1** – Árvore de *A. fraxinifolium* localizada no Km 227, da Rodovia BR – 414, no município de Niquelândia - GO



**Figura 2** – Estrutura do fruto (A), do cálice com as 5 sépalas das flores (B) e sementes dos dez acessos selecionados (C) de *A. fraxinifolium*. A barra escura representa 1 cm



Na figura 2C os números de 1 a 10 representam, respectivamente, as sementes dos acessos GO 2, GO 3, GO 4, GO 5, GO 6, GO 7, MG 1, MG 2, MG 3 e MG 4.

## **2.2 DESENVOLVIMENTO DA SEMENTE E AQUISIÇÃO DA QUALIDADE**

A qualidade de sementes é o somatório das características físicas, fisiológicas, genéticas e sanitárias que vão contribuir para o desempenho esperado. O que se espera de uma semente é que tenha germinação rápida e uniforme, pureza genética, pureza física, livre de pragas e doenças e maior tolerância às condições de estresses (DELOUCHE, 1971).

Nas angiospermas, em uma flor completa, as sépalas e as pétalas que formam o cálice e a corola, respectivamente, são a parte estéril, enquanto que os estames e os carpelos são a parte reprodutora (CARVALHO e NAKAGAWA, 2012). Os gametas sexuais masculinos, chamados grãos de pólen, são produzidos nas anteras dos estames e os gametas femininos, são produzidos no saco embrionário do óvulo como célula ovo, nos carpelos. Após os processos de polinização e fecundação, inicia-se a formação da semente. A polinização é a transferência do grão de pólen de um estame a um carpelo, podendo ser da mesma flor ou de outra flor da mesma planta (autopolinização) ou da flor de outra planta (polinização cruzada).

Após a fecundação da célula ovo haploide, do saco embrionário, pela fusão de um núcleo haploide do grão de pólen, que dará origem a um zigoto diploide e da fusão dos dois núcleos polares do saco embrionário com o outro núcleo haploide do grão de pólen, que formará um núcleo triploide, que dará origem ao endosperma, estes conjuntos de células passarão por diversas divisões mitóticas que formarão o embrião e os tecidos de reserva. Do óvulo fecundado se desenvolve a semente, que está contida no interior de um fruto resultante do desenvolvimento do ovário, nas angiospermas (CARVALHO e NAKAGAWA, 2012).

O processo de formação e desenvolvimento da semente, desde a fecundação do óvulo até a maturidade, pode ser dividido em quatro fases (MARCOS-FILHO, 2015). As fases I e II são caracterizadas pela divisão, expansão e diferenciação celulares, com aumento no tamanho das sementes e no grau de umidade que permanece alto. A fase III é caracterizada por aumento progressivo na deposição de



reservas, com teor de água ainda relativamente alto, que passa a decrescer com o acúmulo de reservas nas sementes. A fase IV, etapa final do processo de maturação, as sementes perdem água com maior intensidade, sem que ocorra mudança significativa no teor de massa seca (MARCOS-FILHO, 2015).

A morfologia das sementes varia enormemente entre as diferentes classes, famílias e espécies de plantas, com diferentes tecidos de reservas e diferentes quantidades e formas do tegumento, embora alguns mecanismos do seu desenvolvimento são comuns entre as espécies (BEWLEY et al., 2013). No estudo do desenvolvimento de sementes são considerados de forma geral as seguintes características de natureza física e fisiológica: teor de água, tamanho, massa de matéria seca, germinação e vigor. Durante o processo de formação de sementes ortodoxas a água desempenha papel fundamental em todas as etapas envolvidas na maturação das sementes, desde o estado metabolicamente ativo no desenvolvimento, para um estado inativo pós-maturação, retornando posteriormente ao estado metabolicamente ativo na germinação (CASTRO et al., 2004).

Na fecundação o teor de água do óvulo é de no mínimo 80% (base úmida). Durante a maturação esse valor tende a decrescer, embora permaneça relativamente alto em todo o processo de formação da semente. A desidratação é lenta durante as fases I a III do desenvolvimento. A partir do momento que a semente atinge o máximo de massa de matéria seca a desidratação aumenta, atingindo teor de água de 35% a 55% para as mono e dicotiledôneas ortodoxas, respectivamente (MARCOS-FILHO, 2015). A desidratação continua até a semente entrar em ponto de equilíbrio com a umidade relativa do ar, ficando com 12% a 15% de teor de água. O processo de desidratação varia entre as espécies e os cultivares, e logicamente depende das condições ambientais. O tamanho da semente cresce rapidamente no comprimento e largura (fases I e II) até atingir o máximo de tamanho com o acúmulo de matéria seca. Em seguida, com o aumento da perda de água, pode ocorrer redução do tamanho e até alteração no seu formato. No início da formação da semente (fases I e II) o acúmulo de matéria seca se faz de forma lenta, sendo, em geral, um período de curta duração. Após essa etapa, o acúmulo de matéria seca é intensificado até atingir o máximo, sendo que a semente apresenta ainda elevado teor de água. Nesse momento cessa a transferência vascular da planta mãe para a semente. Em seguida acentua-se a desidratação da semente, característica do processo de maturação de

sementes ortodoxas. O peso de matéria seca tem sido considerado como o melhor índice do estágio de maturação de sementes (CARVALHO e NAKAGAWA, 2012).

Durante o processo de formação da semente, de forma geral, após a desidratação, a capacidade da semente para germinar se desenvolve antes do máximo peso seco, seguido pelo desenvolvimento da tolerância à dessecação, vigor e longevidade (BEWLEY et al., 2013). Este comportamento varia entre as espécies agrícolas e, principalmente, entre as espécies arbóreas e arbustivas.

Grande número de mudanças na expressão de genes e no metabolismo resultante ocorre nas sementes antes e durante o processo de desidratação. Nesta fase, a semente termina seu desenvolvimento, mantém o estado seco e preserva os componentes celulares requeridos para dar continuidade no seu metabolismo após a secagem na germinação ou conferir um estado de dormência (BEWLEY et al., 2013). Diversos eventos celulares e bioquímicos parecem estar associados com a maturação da semente e, conseqüentemente, com a aquisição da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas. A tolerância à dessecação é uma das propriedades mais fundamentais das sementes, adquirida na fase final do seu desenvolvimento, e é considerada necessária para a conclusão do ciclo de vida da planta, como estratégia adaptativa para permitir a sobrevivência das sementes durante o armazenamento ou estresse ambiental, e também para permitir uma melhor disseminação das espécies (LEPRINCE, et al., 1993). Síntese de proteínas LEA, proteínas de choque térmico, acúmulo de oligossacarídeos da família rafinose e a ativação dos sistemas de defesa antioxidantes parecem estar relacionados com a aquisição da tolerância à dessecação (VERTUCCI e FERRANT, 1995; BAILLY, 2004; LEPRINCE e BUITINK, 2010).

Mudanças nos transcritos dos genes em sementes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh ocorreram durante a maturação e dessecação das sementes, sendo que as principais mudanças são: aumento na regulação de proteínas LEA e de choque térmico, reparo de DNA, síntese das proteínas em organelas e vias respiratórias, diminuição na regulação do metabolismo de carboidratos, aminoácidos e ácido nucleicos, transportes de açúcares, estresse abiótico, síntese de amido e paredes celulares, síntese de proteínas de armazenamento e síntese de hormônios (BEWLEY et al., 2013). Proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*) são sintetizadas na fase final da formação da semente e estão envolvidas na proteção da planta a danos

causados por estresse ambientais, especialmente seca, frio e salinidade. São particularmente relacionadas à proteção das membranas da mitocôndria contra danos de desidratação. As proteínas de choque térmico (HSP) são chaperonas moleculares produzidas pelas células que se opõem à desnaturação induzida por estresse de outras proteínas (FEDER e HOFMANN, 1999).

Outras mudanças no metabolismo são associadas com a aquisição da tolerância à dessecação. Danos a tecidos intolerantes devido a dessecação é frequentemente associado com dano oxidativo, como a peroxidação de lipídios e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). O aumento na taxa de respiração de tecidos intolerantes pode resultar no aumento da produção de ROS e subsequente injúrias oxidativas. Entender os mecanismos envolvidos na aquisição da qualidade durante o desenvolvimento, na perda da qualidade no envelhecimento e no processo de germinação de sementes, pode permitir a identificação de três principais grupos de marcadores para avaliação do vigor de sementes: (1) indicadores de deterioração celular (danos de membrana, acúmulo de ROS, carbonilação de proteínas, oxidação de RNA, etc.); (2) indicadores eficazes do sistema de proteção/defesa (açúcares solúveis, proteínas específicas, enzimas de defesa antioxidante, como a catalase, etc.); (3) indicadores do processo de germinação (atividade respiratória, indução do ciclo celular, atividade hidrolítica, etc.) (CORBINEAU, 2012).

A maturação de sementes é um conjunto de complexos processos de desenvolvimento que ocorrem simultaneamente, a partir do fim da embriogênese, até que a semente esteja fisiologicamente independente da planta-mãe. Esta fase é composta pela deposição de reservas de armazenamento e de uma fase menor caracterizada pela secagem na maturação. Estas características dependem da capacidade notável da semente de sofrer uma dessecação completa, sem perder a viabilidade e permanecer viável por longos períodos de tempo, quando armazenadas em estado seco (LEPRINCE e BUITINK, 2010). Para Sun et al., (2007), as mais recentes pesquisas sobre os mecanismos fisiológicos em vigor de sementes, mostraram que na fase final de maturação, o desenvolvimento do vigor envolve algumas substâncias resistentes ao estresse, incluindo as proteínas LEA, oligossacarídeos e o ácido abscísico (ABA). Para estes pesquisadores, o vigor de sementes é um caráter quantitativo, controlado por múltiplos genes.

Compreender melhor os mecanismos celulares, bioquímicos e moleculares envolvidos na aquisição do vigor, durante o desenvolvimento das sementes, na germinação e na deterioração, poderia sugerir vários marcadores de qualidade de sementes. Entre estes marcadores, a perda de eletrólitos e a produção de etileno, durante a embebição, marcadores do ciclo celular (replicação de DNA,  $\beta$ -tubulina), metabolismo de açúcares solúveis (família rafinoses), proteínas (LEA e de choque térmico) e a eficiência de espécies reativas de oxigênio (ROS) têm potencial para a avaliação do estado de maturidade das sementes (CORBINEAU, 2012).

### **2.3 TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO**

As sementes seguem três padrões conhecidos quanto ao comportamento no armazenamento: ortodoxo, recalcitrante e intermediário (ROBERTS, 1973; ELLIS et al., 1990). As sementes ortodoxas são tolerantes à dessecação a teores de água em torno de 5% e suportam temperaturas subzero. As sementes recalcitrantes são sensíveis à redução do teor de água abaixo de 15% e não suportam temperaturas baixas de armazenamento. As sementes de comportamento intermediário não toleram desidratação abaixo de 10% a 12,5% de teor de água e suportam temperatura de armazenamento em torno de 10° C. A capacidade de suportar a dessecação a baixos conteúdos de água, permanecer viável durante o armazenamento e germinar são características das sementes que são adquiridas durante o seu desenvolvimento e maturação para sementes ortodoxas (PROBERT et al., 2007). O tempo relativo de desenvolvimento destas características, em relação ao tempo que as sementes obtêm o máximo de peso seco e o momento de sua dispersão, varia entre as espécies.

Em algumas espécies, as sementes maduras, adquirem a capacidade de germinar antes de adquirirem a tolerância à dessecação. Em algumas espécies de plantas silvestres, a qualidade da semente continua a aumentar até, possivelmente, além da dispersão (PROBERT et al., 2007). Em muitas espécies, a capacidade da semente de tolerar a dessecação para os níveis utilizados na conservação em longo prazo (abaixo de 7%) é adquirida na época da maturidade de massa, também chamada maturidade fisiológica, ao contrário de outras espécies, como os cereais, em que a tolerância à dessecação é adquirida antes da maturidade de massa

(PROBERT et al., 2007). A maturidade fisiológica é o ponto durante o desenvolvimento quando o peso seco da semente alcançou o valor máximo (BEWLEY et al., 2013).

Em vários trabalhos sobre tolerância à dessecação, o foco principal sobre os mecanismos envolvidos tem sido relacionado à função dos carboidratos e das proteínas (LEOPOLD, 1990; SINNIH et al., 1998; BUITINK e LEPRINCE, 2008). Os carboidratos desempenham papel essencial na aquisição da tolerância à dessecação, estando envolvidos na proteção das membranas e nos mecanismos de formação do estado vítreo durante a desidratação. A tolerância à dessecação é a capacidade que as sementes ortodoxas possuem de perder umidade até teores de água próximos de 10%, no final do processo de maturação das sementes, permanecendo viáveis após um período de quiescência. O conhecimento das fases de intolerância e de resistência à dessecação é fundamental para o entendimento dos mecanismos controladores dos processos de formação/maturação de sementes e dos processos relacionados à germinação (BARBEDO e MARCOS-FILHO, 1998).

Estudos detalhados realizados com algumas culturas e espécies de plantas selvagens mostraram que, embora as sementes possam ser armazenadas a partir do momento que adquirem a tolerância à dessecação, a longevidade das sementes aumenta acentuadamente durante os estádios finais do desenvolvimento. Estudos mais aprofundados e detalhados devem ser realizados para entender os processos de aquisição da tolerância à dessecação e longevidade de sementes, pois existe uma grande variabilidade de comportamento entre as espécies quando ao comportamento no armazenamento.

## **2.4 LONGEVIDADE DE SEMENTES**

A longevidade corresponde ao período máximo de tempo que as sementes permanecem viáveis, quando armazenadas sob condições ambientais ideais, sendo que as espécies apresentam variabilidade natural quanto à longevidade. A longevidade das sementes pode variar de poucos dias a centenas de anos (SUTHERLAND et al, 2002). Diversos fatores afetam a longevidade das sementes durante o armazenamento, como a composição química da semente, estágio de maturação, viabilidade inicial, umidade das sementes, temperatura e umidade do ar

e grau de infecção por microrganismos e insetos (SUTHERLAND et al, 2002). O professor Ellis H. Roberts, da Universidade de Reading, na Inglaterra, foi um dos primeiros pesquisadores a analisar quantitativamente o padrão de perda da viabilidade de sementes durante o armazenamento, verificando que a perda da viabilidade geralmente seguia um padrão sigmoide e reconheceu que isto poderia estar relacionado com a distribuição normal do tempo de vida de uma população de sementes (BEWLEY et al., 2013).

A pesquisa para o conhecimento dos mecanismos que regulam a longevidade das sementes é um dos objetivos antigos da agricultura por causa de seu impacto sobre o rendimento das culturas, especialmente em condições de estresse, e sua importância como um meio para preservar os recursos genéticos vegetais (RIGHETTI et al., 2015). A longevidade das sementes é uma característica importante relacionada aos bancos de germoplasma, e o aspecto genético da longevidade vem sendo estudado por diversos grupos de pesquisadores.

Várias teorias têm sido invocadas para explicar a longevidade de sementes ortodoxas no armazenamento sob condições de baixa temperatura e de teor de água. A longevidade das sementes é uma característica relevante do ponto de vista ecológico, desempenhando um papel fundamental para garantir que espécies de plantas vulneráveis sejam conservadas *ex situ* em bancos de germoplasma (LI e PRITCHARD, 2009; PROBERT et al., 2009).

Os chineses há 535 anos antes da era cristã fizeram a primeira publicação sobre o comportamento das sementes no armazenamento e propuseram dois tipos de comportamento diferentes das sementes (BEWLEY et al., 2013).

O estudo sobre sementes anciãs sempre despertou muito interesse na comunidade científica. Inúmeros estudos já foram realizados com sementes encontradas em fósseis em diversos locais do mundo para avaliar sua longevidade e viabilidade. Sementes armazenadas em museus também foram estudadas com esse objetivo. No Museu de História Natural de Paris, na França, espécies como *Cassia multijuga*, coletadas em 1776 apresentaram germinação de 100%, feitas em 1934, com uma longevidade de 158 anos, assim como *Cassia bicapsularia*, com 115 anos, *Mimosa glomerata*, com 81 anos, dentre outras (BEWLEY et al., 2013).

Algumas espécies são conhecidas como de longevidade natural maior e menor do que outras. Espécies que apresentam longevidade de poucos dias, como

*Avicennia marina*, até centenas de anos como *Malva rotundifolia* e *Verbascum blattaria* são exemplos apresentados na literatura (BEWLEY et al., 2013).

Durante o processo de desenvolvimento da semente, a longevidade é adquirida geralmente após a aquisição da tolerância à dessecação. O padrão geral de desenvolvimento dos componentes da qualidade de semente ortodoxa são primeiro a capacidade de germinar, seguido da tolerância à dessecação, em seguida o vigor e o potencial de longevidade no armazenamento, que aumenta nos estádios finais do desenvolvimento (BEWLEY et al., 2013).

Tem sido demonstrado que a síntese de proteínas LEA e proteínas de choque térmico (HSP) estão associadas com a longevidade (PRIETO e DAPENA, 2006; ROSNOBLET et al., 2007; HUNDERTMARK et al., 2011; RIGHETTI et al., 2015). Além disso, antioxidantes como glutatona (KRANNER et al., 2006), tocoferóis (SATTLER et al., 2004) e flavonoides, presentes no tegumento (DEBEAUJON et al., 2000) também desempenham um papel na longevidade, ao aliviar a oxidação que ocorre durante o armazenamento.

Sinniah et al., (1998) estudando sementes de *Brassica campestris*, demonstraram uma relação entre o potencial de longevidade e teores de açúcares totais, oligossacarídeos e proteínas de choque térmico. Vandecasteele et al., (2011), avaliando sementes de *Medicago truncatula*, também demonstrou uma forte correlação entre a longevidade e o nível de sacarose, estaquiose e algumas proteínas. Os oligossacarídeos, principalmente, aqueles da família da rafinose, que se acumulam na planta-mãe, durante a maturação das sementes, são considerados importantes na estabilização dos “vidros” intracelulares e no aumento da viscosidade citoplasmática na transição do estado vítreo para o líquido (SUN, 1997). O acúmulo de açúcares solúveis, durante a maturação das sementes, depende da taxa de desidratação das sementes, e pode ser utilizada como indicador das condições de secagem. Diversos estudos têm demonstrado que o acúmulo de sacarose pode ser usado como um indicador da capacidade de armazenamento das sementes (SUN e LEOPOLD, 1994; SUN, 1997, SINNIAH et al., 1998).

Châtelain et al., (2012) avaliando a ação da enzima metionina sulfóxido redutase (MSR) no sistema de reparo sobre a longevidade, em sementes de *M. truncatula* e *A. thaliana*, propuseram que o sistema de reparo de MSR desempenha um papel decisivo no estabelecimento e preservação da longevidade em sementes.

O papel da oxidação da metionina em sulfóxido de metionina e seu reparo pela enzima MSR ainda não tinha sido documentado em sementes, apesar de várias evidências no possível envolvimento de MSR no processo de maturação e germinação. A oxidação da metionina está ligada ao processo de envelhecimento de vários organismos, inclusive humanos.

Fatores importantes relacionados à longevidade de sementes são os níveis de danos e as respostas de reparação no DNA, a quantidade de antioxidantes não enzimáticos e as atividades de enzimas reparadoras de ROS (RAJJOU e DEBEAUJON, 2008; VENTURA et al., 2012). Para Dona et al., (2013), o teste de germinação representa atualmente, o método mais utilizado para avaliar a viabilidade de sementes em bancos de germoplasma, apesar das dificuldades apresentadas com as sementes que possuem dormência. Dona et al., (2013), avaliaram perfis de DNA, análises de telômeros e propriedades antioxidantes, como ferramentas para a monitoração da longevidade das sementes *ex situ*. Foram avaliadas sementes de *Silene vulgaris* e *Silene acaulis* provenientes de baixas e altas altitudes do Norte da Itália, respectivamente, com o objetivo de identificar marcadores moleculares confiáveis no monitoramento da deterioração de sementes. Os resultados obtidos pelos pesquisadores nos perfis de RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) apresentaram diferentes capacidades para superar os danos induzidos ao DNA, pelo envelhecimento artificial, em ambas as espécies de *Silene*. Os perfis antioxidantes de sementes secas e reidratadas revelaram que a espécie *Silene acaulis* apresentou menor atividade específica de antioxidante. Uma regulação positiva significativa dos genes antioxidantes MT2 (metalotioneína tipo 2) e SOD (superóxido dismutase) foi observada apenas nas sementes reidratadas de *Silene vulgaris*. A reidratação das sementes resultou no alongamento dos telômeros em ambas as espécies de *Silene* avaliadas. O alongamento de telômeros é uma ferramenta promissora para distinguir espécies de plantas de curta e longa duração (KILIAN et al., 1995).

A atividade de monitoramento da deterioração de sementes é uma prática comum nos bancos de germoplasma. El-Maarouf-Bouteau et al., (2011) avaliando a alteração de DNA e morte programada de células, durante o envelhecimento de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L), identificaram que a viabilidade das sementes é afetada pelo teor de umidade das sementes e está relacionada com o acúmulo de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e alterações no metabolismo de energia.



El-Maarouf-Bouteau et al., (2011) propõem que a perda de viabilidade de sementes está relacionada ao ataque oxidativo, a disfunção mitocondrial e a morte programada de células.

A vida útil de uma população de sementes, ou o tempo até que todas as sementes percam a viabilidade, depende do comportamento de armazenamento das sementes, das condições ambientais, da qualidade inicial ou a proporção das sementes que são viáveis no início do armazenamento e da própria espécie em questão (KEW ROYAL BOTANIC GARDENS, 2016). Numa população de sementes, algumas sementes perdem a viabilidade mais cedo do que as outras, algumas mais tarde, mas a maioria perde a viabilidade em torno do ponto médio no tempo de armazenamento. Traçando os dados num gráfico se obtém uma distribuição normal, ou seja, a curva na forma de sino. Com o objetivo de facilitar as análises estatísticas, os valores de viabilidade das sementes em percentuais são linearmente transformados em *probit*. Uma unidade de *probit* é equivalente a um desvio padrão da distribuição normal do número de sementes mortas ao longo do tempo. Os valores *probit* ainda são comumente usados em modelagem de viabilidade (KEW ROYAL BOTANIC GARDENS, 2016).

Para predizer o tempo de viabilidade das sementes no tempo, em diferentes ambientes, foram desenvolvidas, a partir da década de 1960, as equações de viabilidade. São modelos matemáticos que tem sido desenvolvido para apoiar as práticas de conservação de sementes. Elas preveem a proporção de sementes que são viáveis em uma população, após qualquer período de armazenamento, em uma ampla gama de ambientes. As equações de viabilidade são úteis na concepção e gestão de bancos de sementes. Com esse objetivo foram publicadas três equações básicas de viabilidade para trigo (ROBERTS, 1960) arroz (ROBERTS, 1961) e posteriormente foram publicadas para serem aplicadas a uma ampla variedade de espécies (ROBERTS, 1972). Esta última equação apresenta duas grandes desvantagens. A primeira é que não leva em conta a variação no potencial de longevidade entre os lotes de sementes da mesma espécie, resultantes da diferença nos genótipos ou na diferença entre a qualidade das sementes devido a variação nos fatores ambientais, os quais afetam as sementes antes do armazenamento. A segunda desvantagem é que a extrapolação para ambientes de armazenamento extremos pode ser imprecisa (ELLIS e ROBERTS, 1980).

Para corrigir as falhas apresentadas nas equações anteriormente desenvolvidas, Ellis e Roberts (1980) propuseram uma nova equação de viabilidade, que leva em conta a variação no potencial de longevidade devido ao genótipo e às condições de pré-armazenamento. A nova equação proposta por Ellis e Robert (1980), levando em consideração as correções nas equações anteriormente propostas, é:

$$v = Ki - p/10^{K_E - C_W \log m - C_H t - C_Q t^2} \quad (1)$$

onde  $v$  é a porcentagem de viabilidade em *probit*;  $p$  é o período de armazenamento em dias;  $m$  é o grau de umidade das sementes (% em base úmida);  $t$  é a temperatura de armazenamento ( $^{\circ}$  C);  $K_i$  é a porcentagem da viabilidade em *probit*, no início do armazenamento;  $K_E$  é uma constante para cada espécie;  $C_W$  indica a resposta logarítmica da longevidade das sementes para o grau de umidade;  $C_H$  e  $C_Q$  são constante linear e quadrática do termo temperatura, respectivamente, descrevendo o efeito da temperatura de armazenamento na longevidade das sementes.

Para obtenção das constantes  $K_E$ ,  $C_W$  e  $C_H$ , que são específicas para cada espécie, é necessária a realização de diversos experimentos de armazenamento, levando em consideração a combinação de diversas temperaturas e graus de umidade. Estes experimentos são complexos e demorados e necessitam de grandes quantidades de sementes, que para algumas espécies, em bancos de germoplasma, não é possível ser realizado, devido à pequena quantidade de sementes conservadas, principalmente, no caso de espécies florestais. O objetivo principal das equações de viabilidade é ter um modelo matemático que possa ser usado para prever o tempo de viabilidade das sementes, ou seja, o período de tempo que uma semente é capaz de permanecer viável.

## 2.5 DETERIORAÇÃO DE SEMENTES

A deterioração de sementes trata-se de um complexo de mudanças que ocorrem com o passar do tempo, causando diversos prejuízos aos sistemas e funções vitais, resultando na diminuição ou perda no grau de capacidade e desempenho das sementes. O envelhecimento da semente armazenada é um fenômeno natural e as sementes tendem a perder viabilidade, mesmo sob condições ideais de armazenamento (MARCOS-FILHO, 2015). A deterioração que causa a queda

gradativa da viabilidade e/ou do vigor, também é conhecida como envelhecimento da semente.

Delouche (2002) definiu deterioração como um "processo determinado por uma série de alterações fisiológicas, bioquímicas, físicas e citológicas, com início a partir da maturidade, em ritmo progressivo, determinando a queda do potencial de desempenho e culminando com a morte da semente". A deterioração da semente se inicia a partir da maturidade fisiológica, chamada de deterioração zero e continua até a perda da sua capacidade de germinar. A semente incapaz de alguma germinação visível é considerada morta (BEWLEY et al., 2013).

A intensidade e velocidade de deterioração das sementes são inerentes às espécies. Varia de acordo com as espécies, o cultivar, entre lotes do mesmo cultivar, entre sementes do mesmo lote e partes da mesma semente. A deterioração em sementes tem forte influência do genótipo, da composição química, grau de umidade, práticas de manejo, longevidade natural, etc. (MARCOS-FILHO, 2015).

O processo de deterioração tem sido objeto de vários estudos científicos, sendo destacados os trabalhos realizados por Robert, (1973), Ellis e Robert, (1980), Priestley, (1986), Smith e Berjak, (1995), Bewley e Black, (1994), Walters, (1998), McDonald, (1999), Bailly, (2004), Corbineau e Côme, (2006), Buitink e Leprince, (2008); Leprince e Buitink, (2010), Mira et al., (2011). Não obstante a realização desses estudos, ainda não existe uma compreensão clara de todos os processos envolvidos, suas causas e sequências, os mecanismos de reparo e principalmente, uma forma de evitar ou reverter o processo. A partir da década de 1990, trabalhos referentes aos processos relacionados à deterioração de sementes se intensificaram, sendo que, após 25 anos ainda não se tem definido nenhum padrão específico relacionado ao envelhecimento, embora muitos estudos têm apresentado diversas manifestações bioquímicas e mais recentemente da biologia molecular, relacionadas à perda da qualidade fisiológica das sementes.

As pesquisas sobre deterioração de sementes, de modo geral, são realizadas nos processos durante a germinação, principalmente, nas fases I e II da embebição, relacionadas às atividades bioquímicas preparatórias para a germinação, como a síntese de ATP e respiração (MARCOS-FILHO, 2015). O ataque de radicais livres, provenientes da peroxidação lipídica, como o radical superóxido, promove alterações

nas membranas celulares e consequente decréscimo na produção de ATP durante a germinação (SHARMA et al, 2012).

A oxidação de lipídios ou autooxidação se inicia com a formação de radicais livres, os hidroperóxidos, que podem desencadear o processo de peroxidação. A peroxidação lipídica é o processo por meio do qual as espécies reativas de oxigênio (ROS) reagem com os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolipídios das membranas celulares, desintegrando-as e permitindo a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares, sendo que a enzima fosfolipase, ativada pelas espécies tóxicas, desintegra os fosfolipídios, liberando os ácidos graxos não saturados (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Estes processos resultam nas seguintes ações deletérias dos peróxidos lipídicos: ruptura das membranas celulares; mutações do DNA; oxidação dos lipídios insaturados, formação de resíduos químicos e comprometimento dos componentes da matriz extracelular. Os componentes celulares são todos susceptíveis à ação de ROS; porém, a membrana é um dos mais prejudicados devido à peroxidação lipídica, que provoca alterações na sua estrutura e permeabilidade, causando perda da seletividade na troca iônica, liberação de exsudados e formação de produtos tóxicos como o malonaldeído e causando a morte celular (EL-MAAROUFBOUTEAU et al., 2011).

Para Moller et al., (2007), o acúmulo de ROS leva a disfunção de mitocôndrias, inativação de enzimas, rupturas de membranas, oxidação de lipídios, proteínas e material genético (DNA e RNA).

Estudos realizados por Mira et al., (2011) com quatro espécies selvagens de *Brassicaceae*, para avaliar a perda da capacidade de germinação e vigor em sementes durante o envelhecimento acelerado, mostrou que a perda de viabilidade das sementes não foi associada com o acúmulo de malonaldeído (MDA), sugerindo que a peroxidação lipídica não provocou a deterioração de sementes sob as condições estudadas. Não obstante, o teste de condutividade elétrica efetivamente detectou a deterioração de sementes nas quatro espécies selvagens de *Brassicaceae*, e a permeabilidade da membrana foi correlacionada com a germinação e a perda de vigor. Para Mira et al., (2011), o teste de condutividade elétrica poderá ser uma boa medida para avaliar precocemente a perda da viabilidade das sementes em bancos de germoplasma.

A perda da viabilidade de sementes, durante o envelhecimento acelerado, foi associada ao acúmulo de MDA em girassol (BAILLY et al., 1996; KIBINZA et al., 2006), ao contrário dos trabalhos com trigo (LEHNER et al., 2008), milho (LINN e PEARCE, 1990), amendoim (PEARCE e ABDELSAMAD, 1980) e soja (PRIESTLEY e LEOPOLD, 1979) que também demonstraram que a peroxidação lipídica, avaliada pela concentração de MDA, não foi associada com a deterioração das sementes. Em sementes de girassol, foi mostrado que a perda de viabilidade durante o envelhecimento acelerado está associada ao acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e a peroxidação lipídica, com uma diminuição na atividade de enzimas antioxidantes (BAILLY et al., 1996; KIBINZA et al., 2006). A oxidação de lipídios e o aumento de ácidos graxos livres, durante o armazenamento, são as razões mais citadas para acelerar os danos de sementes de espécies de plantas oleaginosas. Em sementes de trigo, armazenadas a 45° C e 100% de umidade relativa, a perda de viabilidade foi atribuída tanto a produção de espécies reativas de oxigênio, como a um comprometimento progressivo do sistema antioxidante de defesa, sem acúmulo de MDA (LEHNER et al., 2008). Estes estudos indicam que a redução da capacidade antioxidante tem uma contribuição significativa na perda da viabilidade de sementes durante o envelhecimento.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são conhecidas por reagir com outras moléculas além de lipídios, tais como proteínas e ácidos nucleicos, e este ataque oxidativo pode levar a danos nas membranas (BECKMAN e AMES, 1997). Para Priestley, (1986), as ROS têm sido amplamente citadas como sendo o principal fator que causa o envelhecimento das sementes, durante o armazenamento em longo prazo. Os radicais livres e a peroxidação de lipídios são amplamente considerados importantes contribuidores para a deterioração de sementes, incluindo a perda da integridade da membrana, redução do metabolismo de energia, deficiência de RNA, síntese de proteínas e degradação de DNA (PRIESTLEY, 1986; HENDRY, 1993, BAILLY et al., 1996; McDONALD, 1999; BAILLY, 2004). Metabólitos antioxidantes e mecanismos enzimáticos de deterioração como catalase, glutathione redutase e superóxido dismutase, limitam a oxidação de lipídeos e danos oxidativo para proteínas e ácidos nucleicos (McDONALD, 1999; BAILLY, 2004; RAJJOU e DEBEAUJON, 2008, SHARMA et al, 2012).

Estudos com mutantes duplos de *Arabidopsis* foram realizados para avaliar o efeito do ácido abscísico insensível 3 (*ABI3*), bem como do ácido abscísico deficiente 1 (*ABA1*) na longevidade de sementes. Os mutantes apresentaram reduzida longevidade, que pode ser parcialmente relacionada com o fenótipo da dormência de sementes destes mutantes. Mutantes com alterações no tegumento também apresentaram reduzida percentagem de germinação, indicando a grande importância funcional do tegumento na longevidade (CLERKX et al, 2004).

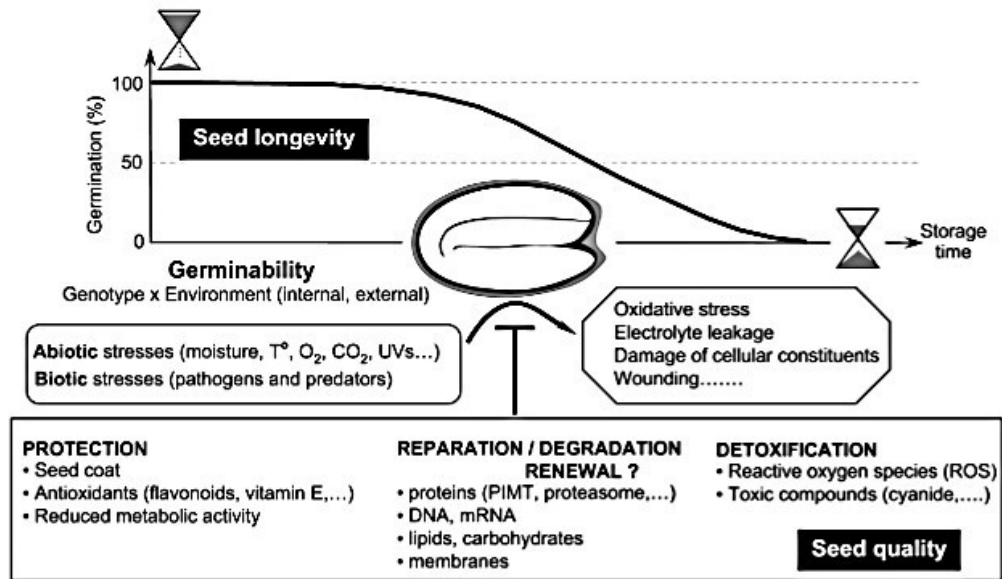
Righetti et al., (2015), usaram uma abordagem de biologia de sistemas para identificar genes-chaves que regulamentam a aquisição da longevidade durante a maturação de sementes de *M. truncatula*. Para Long et al., (2008) abordagens de biologia de sistemas estão sendo utilizadas cada vez mais para monitorar a dinâmica global de todo o circuito biológico, em vez de avaliar o papel de poucos genes.

A eficiência da "limpeza" de espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio da atividade de enzimas antioxidantes foram demonstradas com o aumento dessas enzimas durante o desenvolvimento de sementes de feijão (BAILLY et al., 2001) e de girassol (BAILLY et al., 2004). Catusse et al., (2008), usando sementes de beterraba como modelo, foram capazes de reconstruir em detalhes as vias metabólicas envolvidas nos processos de germinação e vigor, para demonstrar que ambos os processos são construídos durante a maturação da semente ainda na planta mãe. Esses autores identificaram 759 proteínas e suas expressões em tecidos específicos na radícula, cotilédones e perisperma.

Para Marcos-Filho, (2015), a deterioração de sementes é um “termo utilizado rotineiramente, para indicar o declínio da viabilidade e/ou do vigor, porém é um processo mais complexo, cujo progresso é verificado sob diferentes velocidades e intensidades, impossíveis de serem mensuradas exclusivamente com base na idade cronológica, numa sequência variável de acordo com as condições às quais as sementes permanecem expostas”.

Rajjou e Debeaujon (2008) propuseram uma representação esquemática que apresenta os principais parâmetros relacionados ao processo de longevidade de sementes. Esta representação auxilia o processo de compreensão dos resultados dos estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares realizados neste trabalho (Figura 3).

**Figura – 3** Representação esquemática dos principais parâmetros interativos que determinam a longevidade de sementes (RAJJOU e DEBEAUJON, 2008)



O tegumento da semente, enzimas antioxidantes e a redução da atividade metabólica estão relacionados à proteção do embrião e dos tecidos de reservas, de estresses bióticos e abióticos durante o armazenamento. A reparação e degradação de DNA, mRNA, proteínas, lipídios, carboidratos, membranas e substâncias desintoxicantes estão relacionadas à longevidade de sementes (RAJJOU e DEBEAUJON, 2008).

A desintoxicação é um processo importante na atividade biológica da célula. Inúmeros trabalhos têm apresentado que danos causados de ROS apresenta um papel importante no processo de envelhecimento de sementes. Sementes secas podem tolerar um processo de autooxidação, levando ao acúmulo progressivo de ROS, durante o armazenamento. As ROS são altamente reativas e podem modificar e inativar proteínas, lipídios, DNA, RNA e induzir a uma disfunção celular (RAJJOU e DEBEAUJON, 2008).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DAS SEMENTES

Foram coletadas sementes da espécie *Astronium fraxinifolium* Schott, em setembro e outubro de 2013, nos municípios de Alto Paraíso, Cavalcante, Colinas do

Sul e Niquelândia, no estado de Goiás, e nos municípios de Montes Claros, Mirabela e Lontra, no estado de Minas Gerais.

Para a coleta das sementes foi obtido Autorização para Atividades com Finalidade Científica, de Número 41166-1, junto ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), ligado ao Ministério do Meio Ambiente (MMA).

Cada acesso obtido corresponde às sementes de uma árvore matriz. A relação dos acessos, dos locais de coleta e com as respectivas coordenadas geográficas estão descritas nas Figuras 4 e 5. Os acessos foram identificados com as denominações GO para os seis acessos de Goiás, e MG para os quatro acessos de Minas Gerais.

Foram percorridos de carro mais de 400 km de estrada, na coleta de sementes de *A. fraxinifolium*, de Brasília - DF à região da Chapada dos Veadeiros, em Goiás, retornando a Brasília, sendo encontradas apenas oito matrizes ao longo desse trajeto, próximo das rodovias.



**Figura 4** – Denominação, identificação, local de coleta e coordenadas geográficas dos dez acessos de *A. fraxinifolium* avaliados

DENOMINAÇÃO DO ACESSO	ID.	LOCAL DE COLETA	COORDENADAS GEOGRÁFICAS
LGPNETO 02 & AASANTOS	GO 2	Rod. GO - 132, de Cavalcante para Colinas do Sul - GO, lado direito, na Fazenda 3 Bois.	14°00'50.00"S 47°46'51.00"O
LGPNETO 03 & AASANTOS	GO 3	Rod. GO - 239, de Alto Paraíso para Colinas do Sul, lado esquerdo, em frente ao Parque Águas Termais, na entrada da Fazenda M. S. Lúcia.	14°13'38.00"S 47°55'23.00"O
LGPNETO 04 & AASANTOS	GO 4	Rod. GO - 132 de Colinas do Sul para Niquelândia, Km 06, lado direito.	14°11'45.00"S 48°05'41.00"O
LGPNETO 05 & AASANTOS -	GO 5	Rod. BR - 414 de Niquelândia para Brasília, lado esquerdo, 01 km após o Povoado Quebra Linha, na Fazenda Boa Esperança.	14°59'05.00"S 48°40'42.00"O
LGPNETO 06 & AASANTOS	GO 6	Rod. BR - 414 de Niquelândia para Brasília, lado direito no Km 29.	14°39'32.00"S 48°35'21.00"O
LGPNETO 07 & AASANTOS	GO 7	Rodovia BR - 414 de Niquelândia para Brasília, lado esquerdo no km 92.	14°57'58.00"S 48°39'49.00"O
MC 1	MG 1	Município de Mirabela - MG	16°16'48,8"S 44°09'14,5"O
MC 2	MG 2	Município de Montes Claros - MG.	16°45'38,8"S 43°53'02,1"O
MC 3	MG 3	Município de Montes Claros - MG	16°51'15,2"S 44°03'45,8"O
MC 4	MG 4	Município de Lontra - MG	15°52'23,0"S 44°18'07,8"O

O tipo climático das regiões onde foram realizadas as coletas em Goiás e Minas Gerais é tipo climático Aw, segundo Köppen. Este tipo climático é caracterizado como tropical, com diminuição das chuvas no inverno que são secos e amenos, e verões chuvosos com temperaturas altas.



Os acessos coletados em Goiás e Minas Gerais foram transferidos para o Laboratório de Sementes da FCA e foram acondicionadas em sacos de panos dentro de frascos de vidros herméticos, com sílica gel, com umidade relativa de 18% no interior do frasco e armazenadas em refrigerador a 5° C.

As análises foram realizadas no Laboratório de Sementes do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – *Campus* de Botucatu - SP.

## **3.2 EXPERIMENTOS PRELIMINARES**

### **3.2.1 GERMINAÇÃO DE SEMENTES**

Para determinar a melhor temperatura para germinação de *A. fraxinifolium* foram avaliadas as temperaturas de 20° C, 25° C, 30° C, 35° C e 40° C. No teste, foram determinadas a porcentagem de germinação, o índice de velocidade de germinação, a porcentagem de plântulas normais e comprimento de plântulas. Para cada temperatura foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes. As sementes foram germinadas em rolos de papel filtro tipo *Germitest*<sup>®</sup> umedecido com água destilada e deionizada na proporção de três vezes o peso do papel não hidratado. Os rolos de papel foram colocados em sacos plásticos transparentes para manter a umidade e mantidos em germinador com fotoperíodo de oito horas de luz e dezesseis horas de escuro, sendo a primeira contagem realizada 24 horas após a semeadura e a última no décimo dia após a semeadura. O teste foi realizado em germinador tipo *Biological Oxygen Demand* (BOD). Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram protrusão de radícula com comprimento mínimo de 2 mm e, as plântulas normais, que apresentaram as estruturas essenciais de acordo com a RAS (Regras de Análise de Sementes – Brasil, 2009). Na avaliação da germinação de sementes foi utilizado somente o acesso de Goiás GO 4.

### 3.2.2 CURVA DE EMBEBIÇÃO DE SEMENTES

Para acompanhar o processo germinativo, foi obtida a curva de embebição que foi utilizada para determinar o teor de água até a protrusão da radícula das sementes de *A. fraxinifolium*. Para obtenção da curva foram utilizadas quatro amostras com quatro repetições de 12 sementes. As sementes foram submetidas à embebição em rolos de papel conforme o item 3.2.1 e pesadas em balança digital com precisão de 0,001g durante o período do teste. As pesagens foram realizadas a cada hora durante as primeiras quatro horas, a cada duas horas durante as 18 horas seguintes e a cada quatro horas durante as 24 seguintes. No total foram realizadas 21 pesagens. No momento que as sementes apresentavam 50% de germinação as medições foram encerradas. Na avaliação da curva de embebição de sementes foi utilizado o acesso de Goiás GO 4.

### 3.3 ENVELHECIMENTO

Os dez acessos de *A. fraxinifolium* que estavam acondicionados em refrigerador a 5° C e 18% de umidade relativa, foram colocados para serem envelhecidos artificialmente durante o período de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60, 80, 90 e 100 dias, em câmara de germinação, em frascos de vidro com tampa hermética, contendo solução salina de cloreto de lítio, a uma temperatura constante de 45° C e umidades relativas (UR) de 60%, 65% e 70%. As sementes foram colocadas em sacos de tecido tipo tule para serem envelhecidas dentro dos frascos de vidros, sendo que, para cada acesso, foi usado um período de tempo, em dia, de avaliação distinto.

Para determinar a umidade relativa e a temperatura dentro dos frascos de vidro, foi utilizado um determinador tipo *Datalogger*. Após cada período de envelhecimento as sementes foram submetidas ao teste de germinação, conforme descrito no item 3.2.1.

Os dados de germinação em porcentagem foram transformados em *probit*, conforme proposto por Ellis e Robert (1980). Foram calculados os valores de *sigma* e P<sub>50</sub> nos testes de germinação, em *probit*, para todas as umidades relativas estudadas. Os valores de *sigma* e P<sub>50</sub> foram calculados nas equações de ajuste linear obtidas nos gráficos para cada tratamento. Os valores do eixo x representam o tempo,

em dias, e os valores do eixo y são a viabilidade em porcentagem para o ajuste sigmoidal ou a viabilidade em *probit* para o ajuste linear.

Para o cálculo dos valores de *sigma* e  $P_{50}$  são necessários que sejam determinadas as equações de ajuste linear para cada um dos tratamentos realizados, como por exemplo, em uma das equações encontradas  $Y = -0,256x + 9,604$ , onde o valor do coeficiente linear (9,604) representa o valor da viabilidade inicial ( $K_i$ ); o *sigma* representa o valor de 1/coeficiente angular de x (0,256) e para o cálculo do  $P_{50}$  foi aplicado a equação de viabilidade de Ellis e Robert (1980):  $V = K_i - p(1/\sigma)$ , em que V é a viabilidade das sementes em *probit* após p dias de envelhecimento;  $K_i$  é a germinação inicial em *probit* e  $\sigma$  é a taxa de deterioração da semente para cada espécie (ELLIS e ROBERTS, 1980).

O valor de *sigma* representa o declínio da curva de sobrevivência ou “*slope*”, sendo que, quanto menor o valor de *sigma*, mais rápido ocorre a deterioração das sementes. O *sigma* se refere ao tempo necessário para a viabilidade cair por um *probit*.

### 3.4 CONDUTIVIDADE ELÉTRICA

Os testes de condutividade elétrica foram realizados com os dez acessos selecionados, com sementes não envelhecidas e sementes envelhecidas em temperatura de 45° C e umidade relativa de 60%, durante 21 dias, conforme descrito no item 3.3. O teste foi realizado utilizando-se quatro repetições de 25 sementes de cada acesso. As sementes foram pesadas e colocadas em copo de plástico descartável de 200 ml com 75 ml de água destilada e deionizada e mantidas em germinador tipo BOD, regulado para temperatura constante de 25° C, durante 24 horas. Após esse período procedeu-se a leitura da condutividade elétrica da solução em condutivímetro de massa, marca DIGIMED®, modelo CD-21, sendo efetuada a leitura em  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$  e os resultados foram divididos pelo peso de cada amostra, sendo expressos com base no peso da amostra em  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Foram feitas a determinação do teor de água das sementes antes e após o envelhecimento das sementes do teste de condutividade elétrica. Para esta determinação foram usadas duas repetições de 10 sementes cada, e após a pesagem, em balança de precisão de 0,001g, as amostras foram colocadas em estufa

a 105° C (+-3°) durante 24 horas. A determinação do teor de água das sementes foi baseada no peso úmido das amostras, em porcentagem.

### 3.5 TEOR DE MALONALDEÍDO (MDA)

A peroxidação lipídica foi avaliada nos dez acessos por meio da medição do teor de malonaldeído (MDA), de sementes inteiras de *A. fraxinifolium*, não envelhecidas e sementes envelhecidas a 45° C, 60% de UR por 21 e 31 dias, de acordo protocolo de extração proposto por CAKMAK e HORST (1991).

Foram pesadas aproximadamente 200 mg de sementes de cada acesso com duas repetições. As sementes foram moídas em almofariz com uso de nitrogênio líquido e homogeneizadas com 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (P/V) e 20% de polivinilpirrolidona PVPP (m/m). As amostras foram centrifugadas a 14.000 g por 20 minutos a 4° C. O sobrenadante foi retirado. O material foi colocado em microtubo para fazer a determinação de MDA. Foi retirada uma alíquota de 0,5 ml do sobrenadante e adicionado 1,5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,5% preparado com 20% de TCA. Foi preparado o branco com 2,0 ml de TBA a 0,5%. As amostras foram incubadas a 90° C por 20 minutos em tubo de ensaio. A reação foi parada em banho de gelo e em seguida centrifugada a 1.000 g por 5 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro ABS de 532 nm e 660 nm. A concentração de MDA foi calculada pela seguinte equação:  $[MDA] = (A_{532} - A_{660}) .3 / (\epsilon . b . m)$ , sendo  $\epsilon$  o coeficiente de extinção molar:  $\epsilon = 1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$ ; b o comprimento óptico e m a massa em gramas. O teor de MDA foi expresso em nmol g<sup>-1</sup> de matéria fresca de sementes (MF). Os resultados correspondem a média de quatro medições.

### 3.6 ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA

#### 3.6.1 EXTRAÇÃO DE RNATotal

Para analisar os genes contrastantes nos tratamentos e conhecer os genes relacionados ao envelhecimento, foram selecionados os acessos que apresentaram a maior e menor longevidade nos resultados das determinações de *sigma* e P<sub>50</sub>, do teste de envelhecimento, na umidade relativa de 60% (Tabelas 2 e 3). Os acessos

selecionados foram GO 6 de Goiás e MG 2 de Minas Gerais com a maior e menor longevidade, respectivamente. Foram utilizadas sementes não envelhecidas e envelhecidas para os dois acessos selecionados. No total foram quatro tratamentos realizados.

Foram extraídos eixos embrionários de sementes não envelhecidas e envelhecidas artificialmente por 21 dias (temperatura de 45° C e UR de 60%). Para extração dos 100 eixos embrionários de cada tratamento, as sementes não envelhecidas e envelhecidas foram colocadas em rolos de papel filtro, tipo *Germitest*<sup>®</sup>, umedecidos com água destilada e deionizada na proporção de 3 vezes o peso do papel não hidratado, e colocados em germinador tipo BOD, por 20 horas de embebição. Foram feitas três amostras para cada tratamento. Os eixos embrionários extraídos foram colocados em microtubos de 1,5 ml, imersos em nitrogênio líquido. Após a extração os microtubos foram armazenados em *deep freezer* a temperatura de -80° C.

A extração de RNA total foi realizada com o *Kit NucleoSpin*<sup>®</sup> *RNA Plant da Macherey-Nagel*<sup>®</sup>. Conforme recomendação do fabricante, aproximadamente 100 mg de tecidos macerados em nitrogênio líquido foram transferidos para microtubo de 1,5 mL. Ao macerado foram adicionados 350 µl de tampão de extração e 3,5 µl de βmercaptoetanol (β-ME), sendo homogeneizada em agitador. As amostras foram filtradas no *NucleoSpin Filter*<sup>®</sup> e centrifugadas por 1 minuto a 11,000 g o filtrado foi coletado e transferido para microtubo de 1,5 ml sendo adicionado o volume de 350µl de etanol 70%. As amostras foram transferidas para colunas de *NucleoSpin RNA Plant*<sup>®</sup> e centrifugadas, por 30 segundos, a 11.000 g. O filtrado foi descartado, e adicionados 350 µl de *Membrane Desalting Buffer*<sup>®</sup> na coluna de filtragem e centrifugada por 1 minuto a 11,000 g. Ao centro da membrana da coluna foram adicionados 95 µl de *DNAse reaction mix*<sup>®</sup> permanecendo em repouso por 15 minutos a temperatura ambiente. As colunas foram submetidas a lavagem com 200 µl de tampão e centrifugadas por 30 segundos a 11,000 g. Posteriormente, as colunas passaram por uma segunda lavagem, adicionando-se 600 µl de tampão *RA3*, e centrifugadas por 30 segundos a 11,000 g. Após o descarte da solução do tubo coletor, foi adicionado 250 µl de tampão *RA3* e centrifugado por 2 minutos a 11,000 g até secar a membrana por completo. Os filtros foram transferidos para novos microtubos de 1,5 ml, para a recuperação do RNA total, assim foram adicionados 30

µl de água livre de *RNAse-free* no centro da coluna e centrifugadas por 2 minutos a 11,000 *g*.

As amostras de RNA extraídas foram quantificadas em espectrofotômetro *Nanodrop-2000*<sup>®</sup> (*Thermo Scientific*<sup>®</sup>) e seus resultados expressos em ng/µl. As amostras tiveram a concentração de RNA total para o acesso GO 6 sem envelhecimento de 456,6 ng/µl e de 817,8 ng/µl para sementes envelhecidas artificialmente. Para o acesso MG 2 sem envelhecimento de 635,2 ng/µl e 250,2 ng/µl para sementes envelhecidas. As razões de contaminação por proteínas com absorvância com comprimento de onda de 260/280nm e para os demais contaminantes com 260/230nm apresentaram valores próximo a dois, indicando que as amostras apresentaram pureza adequada para as análises seguintes.

### 3.6.2 SEQUENCIAMENTO E CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DE cDNA

As amostras de RNA foram sequenciadas no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida – LaCTAD, da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – SP. O sequenciamento foi realizado na plataforma *HiSeq2500*<sup>®</sup> (*Illumina*<sup>®</sup>), seguindo a especificação técnica indicada pela fabricante.

Para construção das bibliotecas foi utilizado o *kit TrueSeq RNA Library Prep Kit V2*<sup>®</sup> (*Illumina*<sup>®</sup>) usando as recomendações técnicas do fabricante. As bibliotecas foram construídas utilizando o sistema de adaptadores com *index* para isolamento das amostras durante o sequenciamento. As corridas de sequenciamento foram do tipo *paired end* em uma única *lane* com *reads* de 101 bp. Do sequenciamento foram geradas sequências no formato FASTQ que foram utilizadas nas etapas seguintes.

### 3.6.3 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

Para a espécie *A. fraxinifolium* não há um genoma de referência, sendo assim, a estratégia utilizada para identificação de transcritos foi a montagem “*de novo*”.

O controle de qualidade foi realizado utilizando o *software FastQC* versão v0.11.4 para fazer controle e filtragem das sequências com baixa qualidade com *Phred Score* igual ou menor que 30. Para realização do *trimming* foi usado o *software*



*Trimmomatic* versão 0.33 (BOLGER et al., 2014) para eliminação das sequências dos adaptadores.

A montagem “*de novo*” dos transcriptomas foi realizada por reconstrução dos transcritos com o *software Trinity*, versão r20140717 (HAAS, et al., 2013). A estimativa da expressão por quantificação dos transcritos foi realizada pelo *software RSEM*, versão 1.2.21 (LI e DEWEL, 2011). A comparação das análises da expressão diferencial de genes foi realizada com o *software DESeq* (ANDERS e HUBER, 2010). Os resultados das montagens produziram 124.528 sequências de transcritos.

As anotações funcionais foram realizadas utilizando o *pipeline* da *Trinotate* (<https://trinotate.github.io/>). Para identificação das funções dos transcritos, suas sequências foram comparadas com as sequências presentes no banco de dados *Swissprot-UniProt*.

As análises de enriquecimento Gene Ontology (GO) foram realizadas usando o *software AgriGO* (<[bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php](http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php)>) (DU et al., 2010) usando o genoma de *Populus trichocarpa* como modelo e o teste de Fisher com nível de significância de 0,05 com o teste de Hochberg para *False Discovery Rate* (FDR) como método de ajuste.

Genes expressos diferencialmente (DEG) relacionados aos domínios constituinte celular, função molecular e processos biológicos foram identificados em genes *Up* e *Down* regulados. Foi aplicado uma seleção *Top 50* em todos os DEG de cada tratamento, levando em consideração o valor mais expressivo de *log2FoldChange*.

### 3.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

No estudo da germinação o delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial, sendo um fator a umidade e o outro os acessos. Para os estudos de longevidade os tratamentos foram formados pelos 10 acessos de *A. fraxinifolium* e as três umidades relativas (60%, 65% e 70%), com quatro repetições. Os dados de germinação em porcentagem foram transformados em *probit*, conforme a equação proposta por Ellis e Robert (1980). Os dados obtidos da germinação, condutividade elétrica e teor de malonaldeído foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo Teste de Tukey,

considerando-se significativo quando  $p < 0,05$  e foi aplicada também a análise de componentes principais para avaliar a representação dessas variáveis na avaliação de longevidade dos acessos. O software utilizado foi o Minitab 16.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 GERMINAÇÃO DE SEMENTES

Considerando tratar-se de uma espécie arbórea do bioma Cerrado, com poucas informações disponíveis na literatura científica, a determinação da temperatura ótima para a germinação das sementes de *A. fraxinifolium* foi de grande importância. O teste de germinação é o mais tradicionalmente usado para avaliação da viabilidade de lotes de sementes. Para sementes de *A. fraxinifolium* o método do teste de germinação ainda não está definido quanto às condições ideais para realização do teste.

A Análise de Variância apresentou valores significativos ( $p > 0,05$ ) em todas as variáveis analisadas (Tabela 1).

**Tabela 1** – Porcentagem de germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de plântulas normais (PN) e comprimento de plântulas (CP) de sementes de *A. fraxinifolium* nas diferentes temperaturas

Temperatura (° C)	G (%)	IVG	PN (%)	CP (cm)
20	90 bc	0,39 d	60 b	3,95 d
25	100 a	0,61 c	92 a	8,11 b
30	99 ab	0,90 ab	98 a	11,20 a
35	97 ab	0,99 a	97 a	10,84 a
40	84 c	0,82 b	64 b	5,17 c
CV (%)	4,46	6,64	9,55	5,26

\* Média seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV – Coeficiente de variação (%).

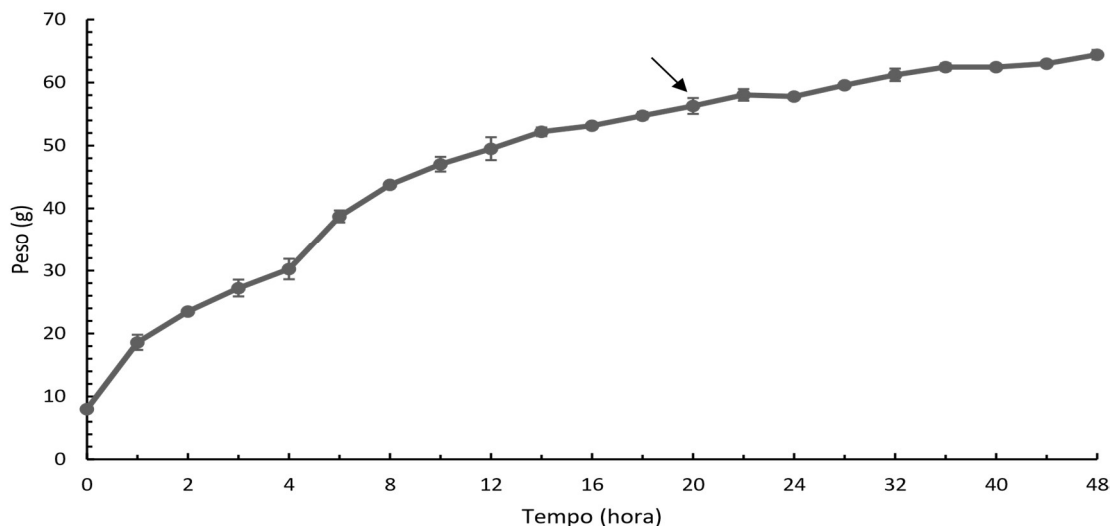
A temperatura de 30° C apresentou os melhores resultados durante as avaliações e não apresentou diferença estatística com a temperatura de 35° C. A temperatura de 30° C, fotoperíodo de 8 horas de luz e 16 horas de escuro, foi selecionada para realização de todos os experimentos de germinação realizados.

## 4.2 CURVA DE EMBEBIÇÃO DE SEMENTES

Verificou-se o aumento no peso fresco das sementes, devido ao incremento acumulado na quantidade de água das sementes de *A. fraxinifolium* durante a embebição (Figura 6). A curva de embebição apresentada não seguiu o padrão trifásico proposto por Bewley e Black (1994).

A primeira protrusão da radícula ocorreu com 20 horas após o início da embebição, conforme se observa na Figura 6. O acesso GO 4 foi utilizado para avaliar a curva de embebição de sementes de *A. fraxinifolium*.

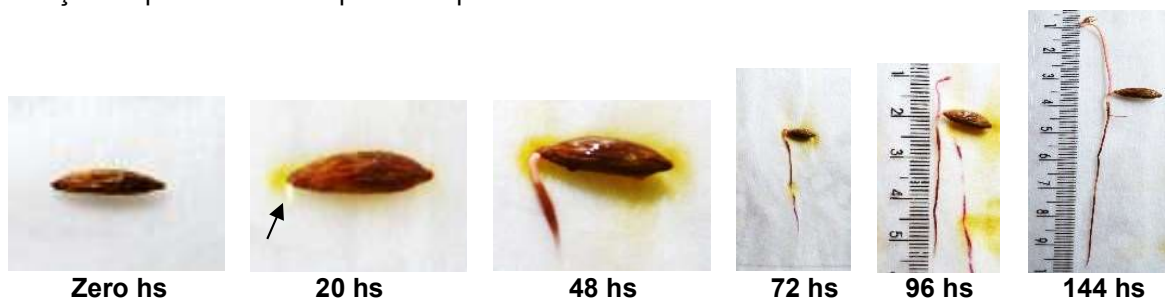
**Figura 6.** Curva de embebição de sementes de *A. fraxinifolium*, em temperatura de 30° C e fotoperíodo de 8 horas de luz e 16 horas de escuro, expressa em peso fresco (g), com a primeira protrusão da radícula (→)



Na Figura 7 verifica-se que após 20 horas do início da embebição houve a protrusão da radícula, com aproximadamente 2 mm. Após 48 horas da germinação, a raiz primária com aproximadamente 1 cm, apresenta a região dos pelos radiculares com coloração arroxeada. Com 72 horas de germinação as plântulas apresentam raiz primária de aproximadamente 2,5 cm e com hipocótilo evidente. Com 96 horas, as plântulas apresentam epicótilo e início da formação do primeiro par de folhas (eófilos) e com 144 horas verifica-se a coloração rósea dos primeiros pares de folhas.

A germinação é do tipo hipógea, com a plântula classificada como criptocotiledonarhipógea.

**Figura 7.** Evolução do processo germinativo de sementes de *A. fraxinifolium*, em horas (hs), até a formação da plântula com os primeiros pares de folhas



### 4.3 ENVELHECIMENTO

O envelhecimento das sementes foi realizado para avaliar o potencial de armazenamento das sementes. O teste de envelhecimento tem como princípio o fato de que a taxa de deterioração das sementes aumenta consideravelmente devido a sua exposição às condições adversas de umidade relativa e temperatura.

As diferenças na germinação das sementes dos acessos de *A. fraxinifolium* antes e durante o envelhecimento a 45° C e umidades relativas de 60%, 65% e 70%, para cada grupo de acessos coletados em Goiás (GO) e Minas Gerais (MG) são apresentados na Figura 8.

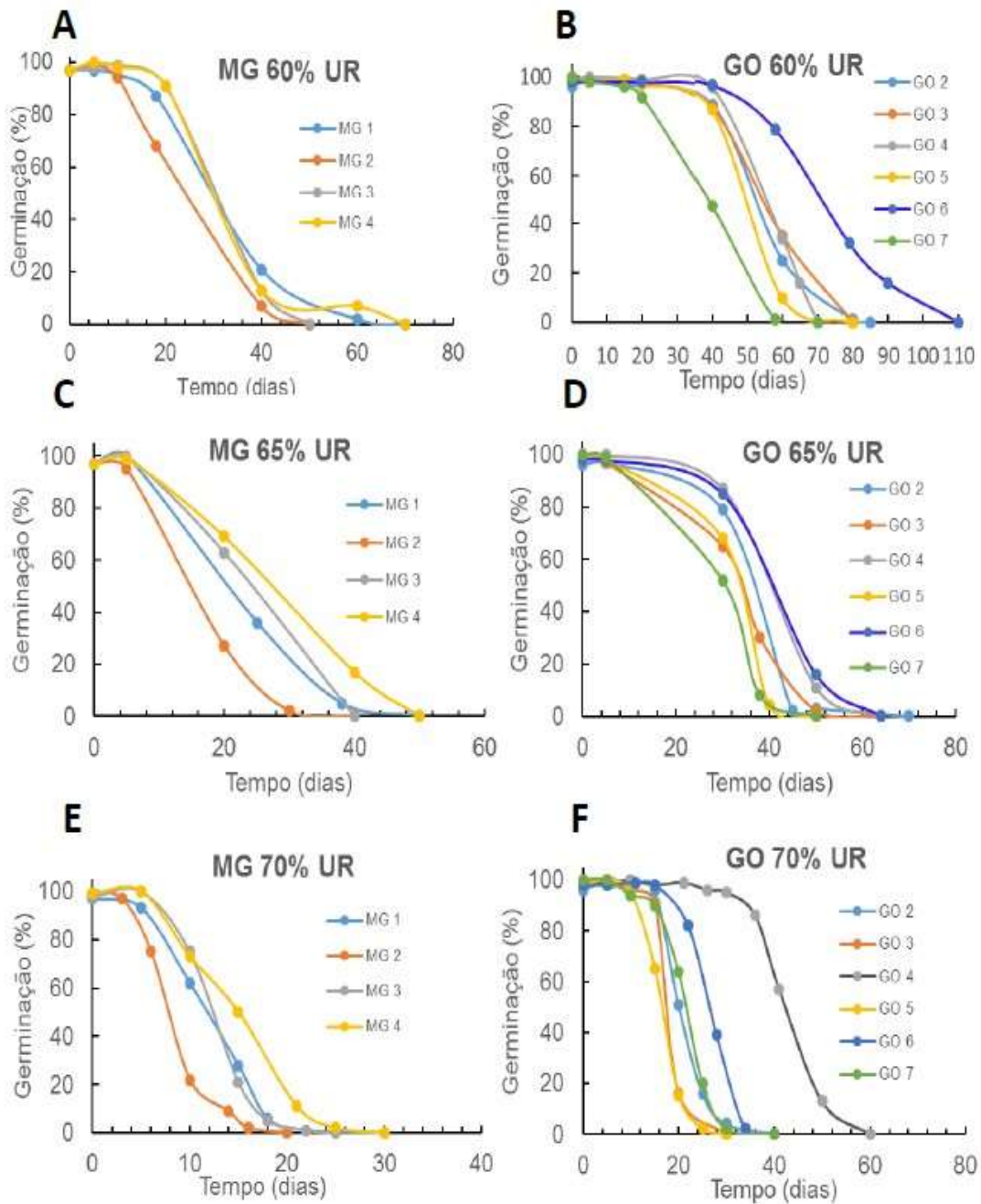
Na umidade relativa de 60%, os quatro acessos de Minas Gerais (MG) apresentaram comportamento muito semelhante, com período médio de germinação de 60 dias (Figura 8A). Os seis acessos de Goiás (GO) apresentaram comportamento semelhante, com exceção do acesso GO 6 que apresentou um período de germinação de 110 dias, sendo que os demais acessos tiveram um período de germinação de aproximadamente 80 dias (Figura 8B).

Na umidade relativa de 65%, os quatro acessos de Minas Gerais (MG) tiveram comportamento mais desuniforme, sendo que o acesso MG 4 teve a maior longevidade (Figura 8C). Os seis acessos de Goiás (GO) apresentaram comportamento mais uniforme, sendo que o acesso GO 6 teve a maior longevidade (Figura 8D).

Na avaliação do comportamento das sementes no armazenamento na umidade relativa de 70%, portanto, a maior umidade estudada, os quatro acessos de Minas Gerais (MG) apresentaram comportamento semelhante, sendo que o acesso MG 4 apresentou a maior longevidade (Figura 8E). Os seis acessos de Goiás (GO) apresentaram comportamento bem semelhante, com exceção do acesso GO 4, que

apresentou a maior longevidade. O tempo médio de germinação dos acessos foi de 40 dias e do acesso GO 4 foi de 60 dias. Com 20 dias de germinação a maioria dos acessos de Goiás apresentou baixa germinação, ao contrário do acesso GO 4 que apresentou germinação de 100% (Figura 8F).

**Figura 8** – Efeito do tempo de envelhecimento (dias) a 45° C nas UR de 60%, 65% e 70%, na germinação de sementes de *A. fraxinifolium* de acessos de Goiás (GO) e Minas Gerais (MG)



O envelhecimento a 45° C e umidades relativas de 60%, 65% e 70%, para todos os dez acessos, resultou na diminuição significativa da viabilidade das sementes (Figura 9).

Os quatro acessos de Minas Gerais (MG 1, MG 2, MG 3 e MG 4) apresentaram comportamento semelhante quanto ao envelhecimento das sementes. Este mesmo

comportamento foi apresentado por quatro acessos de Goiás (GO 2, GO 3, GO 5 e GO 7). Os acessos de Goiás (GO 4 e GO 6), nas três unidades relativas avaliadas, foram os que apresentaram sempre a maior viabilidade e o maior período de armazenamento, caracterizados como acessos que tiveram longevidade superior (Figura 9).

As sementes coletadas em Goiás apresentaram maior viabilidade e longevidade após o envelhecimento em todas as condições testadas e as sementes dos acessos GO 6 e MG 2 apresentaram, respectivamente, os maiores e menores índices de longevidade após o envelhecimento artificial (Tabela 2).

Os valores de viabilidade em porcentagem foram linearmente transformados em *probit*. Uma unidade de *probit* é equivalente a um desvio-padrão da distribuição normal de sementes mortas ao longo do tempo (ELLIS e ROBERTS, 1980). Os valores de viabilidade em *probit* foram usados para o cálculo dos valores de *sigma* e  $P_{50}$ , sendo que os resultados dos valores de *sigma* são apresentados na Tabela 2 e os de  $P_{50}$  na Tabela 3.

**Tabela 2** – Valores de *sigma*, em dia, na interação entre os 10 acessos de *A. fraxinifolium* com três níveis de UR (60%, 65% e 70 %)

<b>ACESSOS</b>	<b>60%</b>	<b>65%</b>	<b>70%</b>
GO 2	11.98 bA	10.05 abA	4.08 bB
GO 3	11.81 bA	9.12 abcB	3.96 bC
GO 4	9.84 bA	9.31 abA	8.01 aA
GO 5	11.42 bA	8.15 abcB	3.37 bC
GO 6	17.65 aA	10.97 aB	4.82 abC
GO 7	10.58 bA	7.31 bcB	5.05 abB
MG 1	11.90 bA	7.35 bcB	4.01 bC
MG 2	9.91 bA	5.74 cB	3.17 bB
MG 3	8.92 bA	5.67 cB	2.74 bC
MG 4	11.10 bA	8.37 abcB	4.06 bC

Classificados com letras minúsculas na coluna e letras maiúsculas na linha. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV% = 19,24.

Os valores de *sigma* encontrados, nas três umidades relativas avaliadas, variaram de 2,74 para o acesso MG 3 (70% UR) a 17,65 para o acesso GO 6 (60% UR), mostrando que quanto maior o grau de umidade relativa usado para envelhecer as sementes menor é a longevidade, em temperatura constante (Tabela 2).

Nas umidades relativas de 60% e 65%, o acesso de Goiás GO 6 apresentou o maior valor de *sigma* (17,65 e 10,97), respectivamente, e o acesso de Minas Gerais MG 3 o menor valor (8,92 e 5,67). Na umidade relativa de 70% o acesso de Goiás GO 4 apresentou o maior valor de *sigma* (8,01) e o acesso de Minas Gerais MG 3 o menor valor (2,74) (Tabela 2).

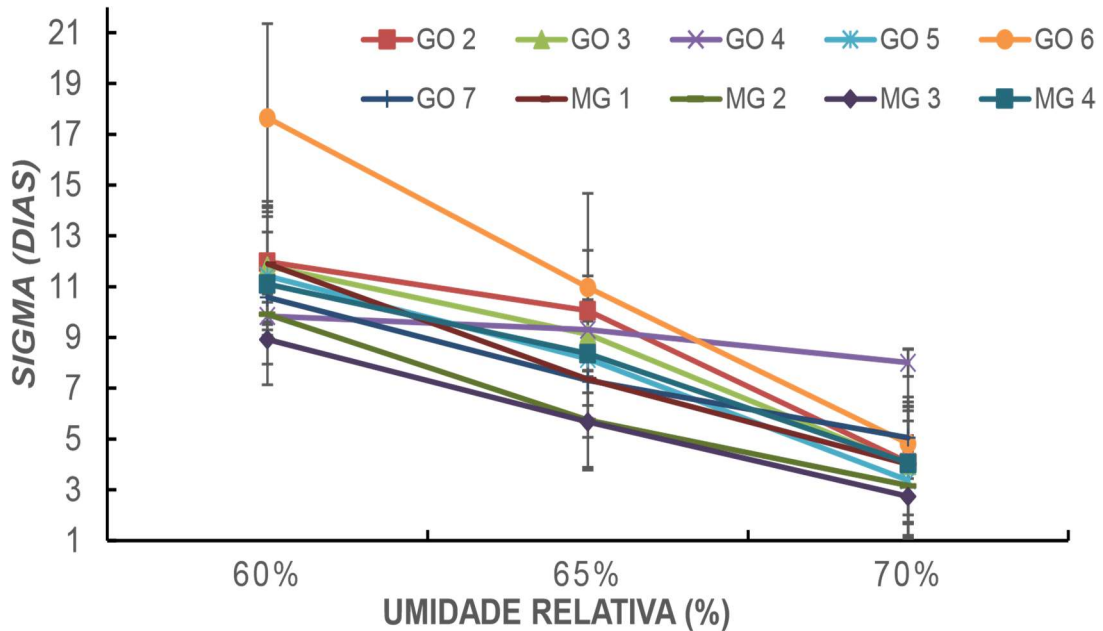
Verifica-se de forma acentuada na Figura 8 o comportamento diferenciado dos acessos de Goiás, GO 6 e GO 4, que apresentaram sempre a maior viabilidade, nos testes de envelhecimento acelerado. Os acessos de Minas Gerais MG 2 e MG 3 foram os que apresentaram a menor viabilidade. O acesso de Goiás GO 4 não apresentou diferença estatística entre os três níveis de umidade relativa avaliados, quanto aos valores de *sigma* (Tabela 2).

Na Figura 10 observa-se a diferença de comportamento entre os dois grupos de acessos de Goiás e Minas Gerais. Os acessos de Goiás (GO) apresentaram

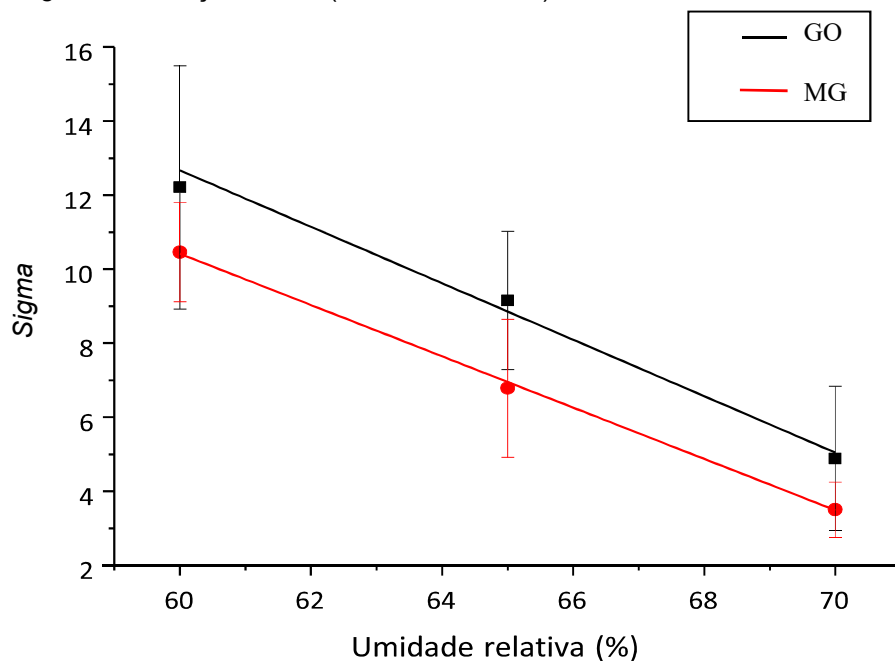


sempre maior viabilidade, e, por conseguinte, maior período de armazenamento, que os acessos de Minas Gerais (MG).

**Figura 9** – Comportamento dos dez acessos de *A. fraxinifolium* quanto à perda de viabilidade em *sigma* nas UR de 60%, 65% e 70%



**Figura 10** Comportamento dos acessos de *A. fraxinifolium* de Goiás (GO) e Minas Gerais (MG) quanto à longevidade em *sigma*, em relação as UR (60%, 65% e 70%) no envelhecimento a 45° C



Observa-se que o declive foi influenciado pelas condições do ambiente de armazenamento, pois quanto mais úmido é o ambiente, maior será a taxa de

deterioração da semente e, conseqüentemente, maior será a declividade da reta. Os acessos de Goiás (GO) apresentaram comportamento superior em relação aos acessos de Minas Gerais (MG) quando comparados em relação a perda de viabilidade em *sigma* (Figura 10).

Outro parâmetro de longevidade avaliado nos acessos de *A. fraxinifolium* foi o P<sub>50</sub>. O valor de P<sub>50</sub> representa o tempo necessário para que a viabilidade do acesso possa cair para 50% do máximo. Quanto maior o valor de P<sub>50</sub> maior será a longevidade do acesso (Tabela 3).

**Tabela 3** Valor de P<sub>50</sub> (dias), na interação entre os 10 acessos de *A. fraxinifolium* com três níveis de UR (60%, 65% e 70%) durante o envelhecimento a 45° C

<b>ACESSOS</b>	<b>60%</b>	<b>65%</b>	<b>70%</b>
GO 2	49.4 bcA	29.0 cB	21.8 bcC
GO 3	49.6 bcA	29.8 bcB	17.8 cdeC
GO 4	53.5 bA	37.5 aB	41.1 aB
GO 5	46.4 cA	27.1 cdB	16.8 cdefC
GO 6	69.5 aA	35.3 abB	24.5 bC
GO 7	36.4 dA	26.6 cdB	20.3 bcdC
MG 1	30.7 deA	25.7 cdB	11.8 fgC
MG 2	26.9 eA	15.6 eB	8.8 gC
MG 3	32.1 deA	22.2 dB	12.7 efgC
MG 4	36.1 dA	25.4 cdB	15.6 defC

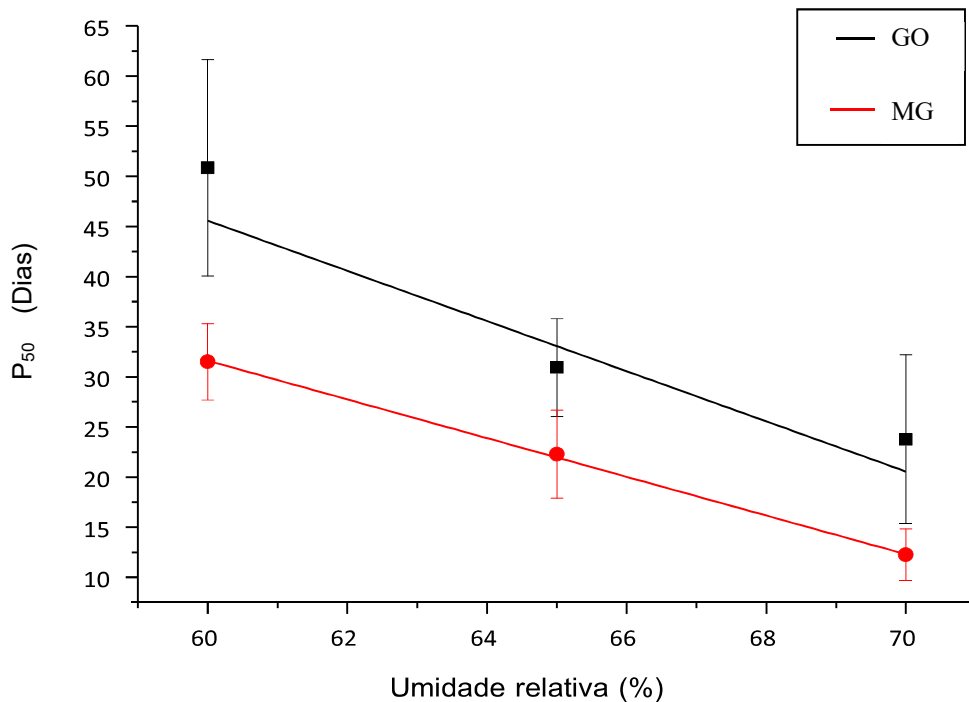
Classificado com letras minúsculas na coluna e com letras maiúsculas na linha. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV% = 8.64

O valor de P<sub>50</sub> variou de 8,8 dias para o acesso de Minas Gerais MG 2 (70% UR), a 69,5 dias para o acesso de Goiás GO 6 (60% UR), valor que foi também confirmado com o maior valor de *sigma* para este acesso.

Considerando os valores de P<sub>50</sub> para a umidade relativa de 60%, o acesso de Goiás GO 6 apresentou a maior longevidade (69,5), enquanto que o acesso de Minas Gerais MG 2 a menor longevidade (26,9). Nas umidades relativas de 65% e 70%, o acesso de Goiás GO 4 apresentou maior longevidade (37,5 e 41,1), respectivamente, e o acesso de Minas Gerais MG 2 a menor longevidade (15,6 e 8,8), respectivamente, conforme os dados apresentados na Tabela 3.

O comportamento médio dos acessos de Goiás (GO) comparados aos acessos de Minas Gerais (MG), quanto ao valor de  $P_{50}$  são apresentados na Figura 11. Os acessos de Goiás (GO) apresentaram maior viabilidade e longevidade nas três umidades relativas avaliadas, em relação aos acessos de Minas Gerais (MG).

**Figura 11** Comportamento dos acessos de *A. fraxinifolium* de Goiás (GO) e Minas Gerais (MG) quanto à longevidade ( $P_{50}$ ), em dias, em relação as UR (60%, 65% e 70%) no envelhecimento a 45° C



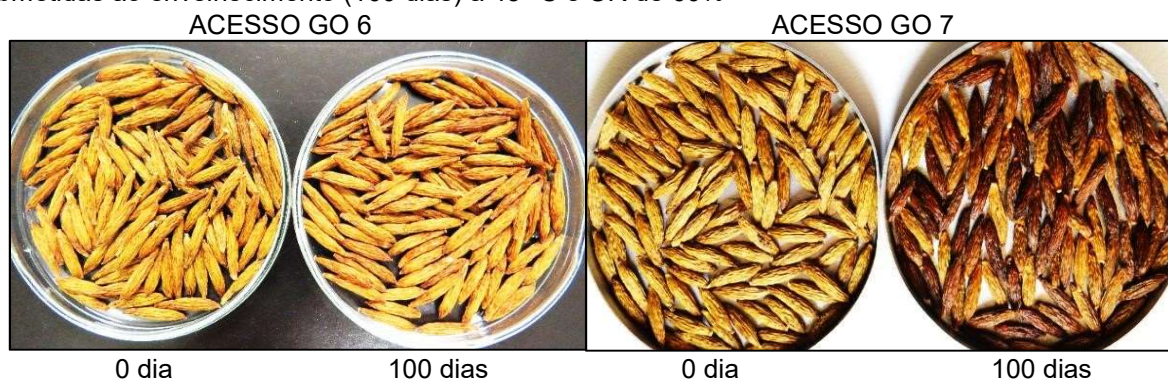
Como nos resultados de *sigma* (Figura 10), os valores médios encontrados de  $P_{50}$  para os acessos de Goiás (GO) foram superiores aos valores dos acessos de Minas Gerais (MG) (Figura 11).

O tratamento de envelhecimento das sementes na umidade relativa de 60% foi selecionado para os testes de condutividade elétrica, teor de malonaldeído e análise da expressão gênica, devido ser a condição de envelhecimento menos drástica e com maior longevidade dos acessos.

Na Figura 12, pode ser observado de forma evidente a diferença de qualidade entre os acessos de Goiás, GO 6 e GO 7, após o período de 100 dias de envelhecimento a 45° C e umidade relativa de 60%. São comparadas as sementes sem o tratamento de envelhecimento (0 dia) e com o tratamento de envelhecimento (100 dias). O acesso GO 7 apresenta as sementes escuras após o período de

envelhecimento, ao contrário do acesso GO 6 que não houve alteração na coloração das sementes, após um longo período de envelhecimento.

**Figura 12** Sementes de *A. fraxinifolium* dos acessos GO 6 e GO 7 sem envelhecimento (0 dia) e submetidas ao envelhecimento (100 dias) a 45° C e UR de 60%



O escurecimento enzimático de frutos é devido a enzima catecol oxidase que catalisa a oxidação de catecol a 0-quinona, na presença de oxigênio, que podem polimerizar-se rapidamente para formar a melanina, responsável pela coloração castanho escuro dos frutos (BAHL et al. 2013). Além do acesso GO 7, o acesso GO 2 também apresentou mudança de cor acentuada entre sementes não envelhecidas e sementes envelhecidas artificialmente, apresentando coloração castanho escuro das sementes envelhecidas.

#### 4.4 CONDUTIVIDADE ELÉTRICA

Os testes de condutividade elétrica (CE) foram realizados com os dez acessos de *A. fraxinifolium*, com sementes não envelhecidas e sementes envelhecidas por 21 dias, a 45° C de temperatura e UR de 60%. Os resultados expressos com base no peso da amostra em  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ , são apresentados na Tabela 4.

Os acessos de *A. fraxinifolium* apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos para todos os acessos de Minas Gerais e para um acesso de Goiás. Os acessos apresentaram diferença estatística no mesmo tratamento. Houve aumento no valor de condutividade elétrica para nove acessos avaliados, sendo que em cinco desses acessos a diferença foi significativa (Tabela 4).

O acesso de Goiás GO 6 apresentou o menor valor de CE nos dois tratamentos realizados. O acesso de Minas Gerais MG 2 apresentou os maiores valores nos dois tratamentos realizados (Tabela 4).

**Tabela 4** – Valor de CE ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ), na interação entre os 10 acessos de *A. fraxinifolium* com sementes sem envelhecimento e com envelhecimento, durante 21 dias, a 45° C e UR de 60%

<b>ACESSOS</b>	<b>Sem Env.</b>	<b>Com Env.</b>
GO 2	130 bcB	147 cdA
GO 3	103 deA	112 fA
GO 4	118 cdA	128 efA
GO 5	142 bA	139 deA
GO 6	94 eA	95 gA
GO 7	113 cdA	118 fA
MG 1	170 aB	203 bA
MG 2	170 aB	222 aA
MG 3	168 aB	194 bA
MG 4	145 bB	162 cA

Classificado com letras minúsculas na coluna e com letras maiúsculas na linha. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV% = 5.07

Os acessos GO 6 e MG 2 apresentaram no teste de CE comportamento semelhante aos encontrados no teste de envelhecimento, pois o acesso GO 6 teve quase o mesmo valor de condutividade elétrica nas sementes não envelhecidas e envelhecidas (94 e 95  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ), com o menor valor encontrado (Tabela 4).

O acesso MG 2 apresentou maior aumento no valor de CE entre os tratamentos (170 e 222  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ), com diferença estatística entre eles (Tabela 4). Estes foram os acessos que apresentaram maior e menor longevidade no teste de envelhecimento com UR de 60% (Tabela 3).

Antes do tratamento de envelhecimento a média do valor inicial da perda de eletrólitos para os seis acessos de Goiás foi de 117  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ , e após o tratamento de envelhecimento a média foi de 123  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ . Para os quatro acessos de Minas Gerais o valor médio da perda de eletrólitos, antes do

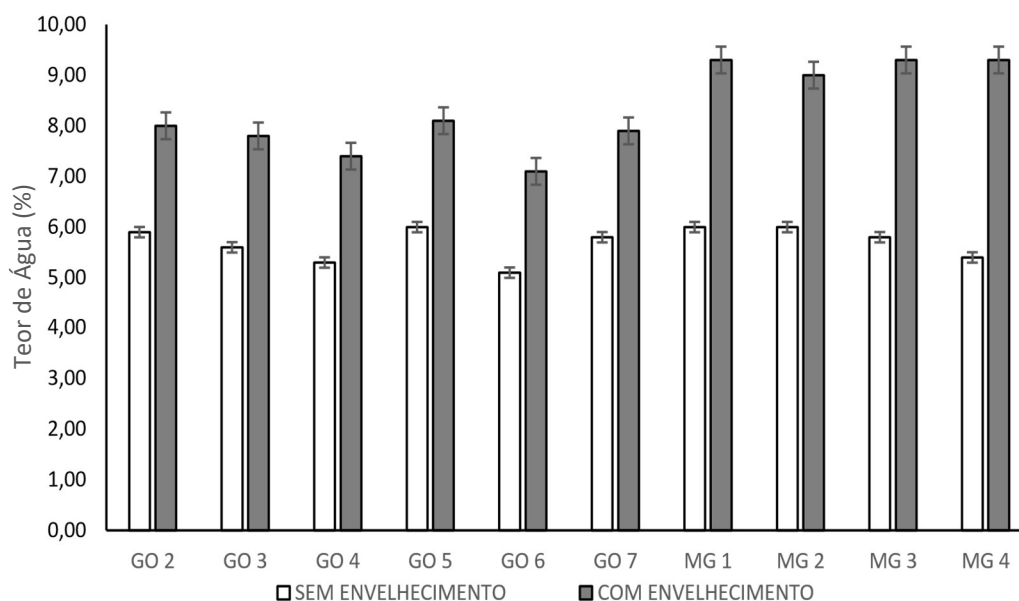
tratamento de envelhecimento, foi de  $163 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  e após o envelhecimento foi de  $195 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  (Tabela 4).

Foi avaliado o teor de água das sementes, antes e após o tratamento de envelhecimento. Os resultados dos teores de água das sementes dos dez acessos de *A. fraxinifolium* são apresentados na Figura 13.

As sementes de *A. fraxinifolium* foram conservadas na temperatura de  $5^\circ\text{C}$  e umidade relativa de 18%, como recomendado para a conservação de sementes a médio prazo. As condições de envelhecimento realizadas a  $45^\circ\text{C}$  e UR de 60% resultaram em aumento nos teores de água, em todos os acessos avaliados (Figura 13).

Como observado na Figura 13, em média, os seis acessos de Goiás apresentaram teor de água de 5,6% (base úmida) sem o tratamento de envelhecimento acelerado. Após o período de 21 dias, no tratamento de envelhecimento, as sementes de Goiás ainda permaneceram com baixo teor de água, com média de 7,7%. Os quatro acessos de Minas Gerais apresentaram, em média, 5,8% de teor de água antes do envelhecimento. Após o tratamento de envelhecimento as sementes passaram a ter 9,2%, em média, de teor de água. Os quatro acessos de Minas Gerais foram os que obtiveram maior ganho de umidade, mostrando a uniformidade que existe entre os acessos (Figura 13).

**Figura 13** – Teor de água das sementes (%), em peso fresco, de *A. fraxinifolium* com sementes sem envelhecimento e com envelhecimento a  $45^\circ\text{C}$  e UR de 60% em 21 dias



O teste de CE não foi capaz de identificar a perda de qualidade dos acessos de Goiás que apresentavam alta germinação com 21 dias de envelhecimento, conforme apresentado na Figura 8B. Para os acessos de Minas Gerais o teste de CE foi capaz de identificar a perda da qualidade dos acessos, pois, com 21 dias a germinação já apresentava uma redução acentuada como mostra a Figura 8A.

A condutividade elétrica não foi um bom teste para avaliar a longevidade de sementes de *A. fraxinifolium*, nas condições avaliadas neste estudo, pois os resultados dos testes com sementes sem envelhecimento e com 21 dias de envelhecimento apresentaram resultados semelhantes (Tabela 4).

#### **4.5 TEOR DE MALONALDEÍDO (MDA)**

Os resultados das avaliações de MDA das sementes dos dez acessos de *A. fraxinifolium* com sementes sem envelhecimento e com envelhecimento aos 21 e 31 dias são apresentados na Tabela 5. O conteúdo de MDA é apresentado em nmol g<sup>-1</sup> de matéria fresca (MF) das sementes.

Verifica-se nos resultados dos testes de teor de MDA que houve aumento significativo no teor em todos os acessos avaliados. Dos quatro acessos de Minas Gerais o acesso MG 2 foi o que apresentou maior aumento no teor de MDA. Nos seis acessos de Goiás, os acessos GO 3 e GO 6 foram os acessos que apresentaram maior aumento no teor de MDA com 31 dias de envelhecimento (Tabela 5).

**Tabela 5** – Resultado do teor de malonaldeído (nmol g<sup>-1</sup> de MF) das sementes de *A. fraxinifolium*, sem envelhecimento e com envelhecimento aos 21 e 31 dias

<b>ACESSOS</b>	<b>Sem env.</b>	<b>21 dias env</b>	<b>31 dias env.</b>
GO 2	23.4 abA	23.9 cdeA	25.5 bA
GO 3	23.0 abB	36.0 aA	35.6 aA
GO 4	23.9 abB	31.9 abA	28.1 bAB
GO 5	15.5 cB	30.3 abcA	26.2 bA
GO 6	28.8 aA	22.9 deB	30.6 abA
GO 7	19.0 bcB	22.2 deAB	25.8 bA
MG 1	24.3 abB	24.4 cdeB	30.0 abA
MG 2	23.3 abB	20.3 eB	31.4 abA
MG 3	20.1 bcB	28.2 bcdA	26.2 bA
MG 4	20.1 bcC	32.2 abA	26.1 bB

Classificado com letras minúsculas na coluna e com letras maiúsculas na linha. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV% = 11,79

A avaliação do teor de malonaldeído foi considerado um teste bioquímico adequado para avaliar a longevidade de sementes de *A. fraxinifolium* quando comparado com os resultados obtidos no teste de envelhecimento (Figura 9).

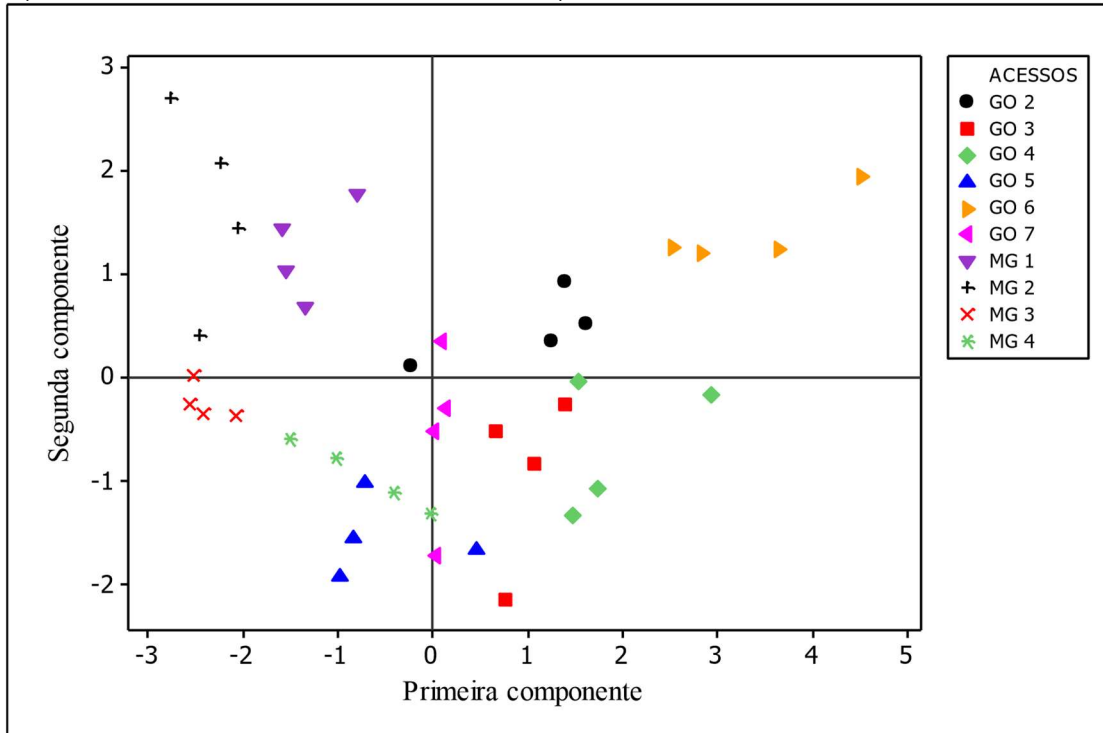
Com o objetivo de avaliar o comportamento dos resultados dos testes de envelhecimento (*sigma*), condutividade elétrica (CE) e teor de malonaldeído (MDA), na caracterização dos diferentes acessos relacionados ao estudo da longevidade de sementes, foi aplicado a Análise de Componente Principal (PCA), conforme apresentado na Tabela 6 e nas Figuras 14 e 15.



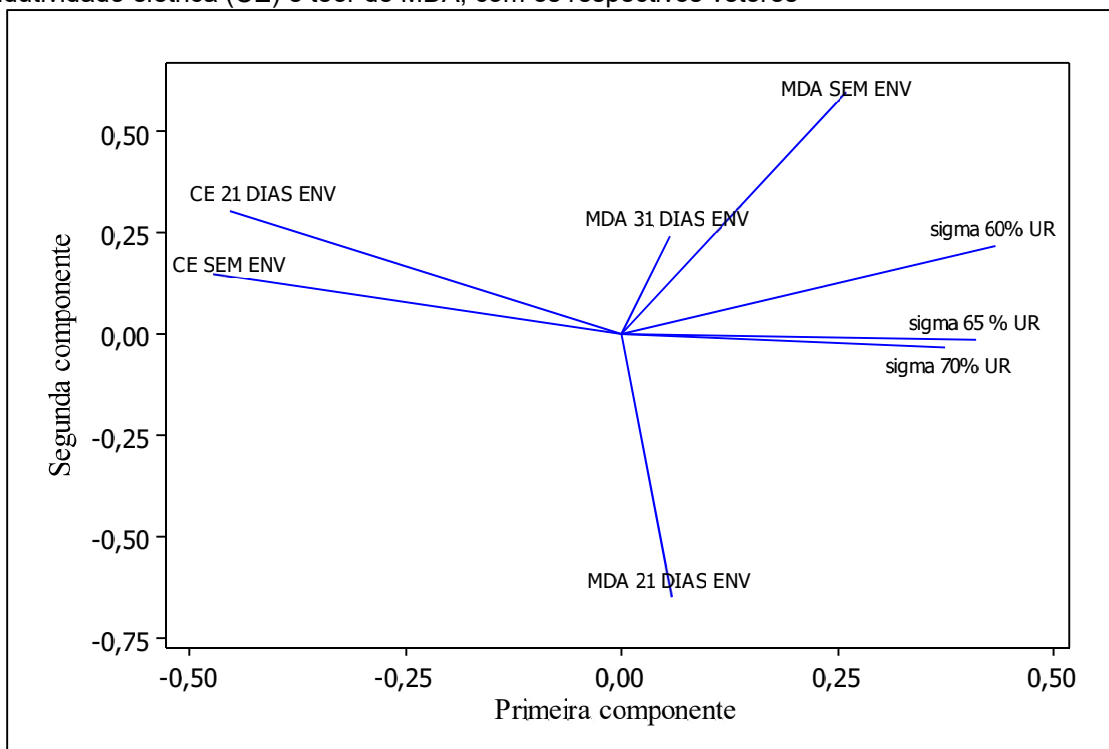
**Tabela 6** – Análise de componente principal de *sigma* 60% UR, *sigma* 65% UR, *sigma* 70% UR, CE sem e com 21 dias de envelhecimento e MDA sem e com 21 e 31 dias de envelhecimento

Variável	PC1	PC2
<i>sigma</i> 60% UR	0,432	0,221
<i>sigma</i> 65% UR	0,410	-0,014
<i>sigma</i> 70% UR	0,375	-0,031
CE sem env.	-0,474	0,151
CE 21 d. env.	-0,454	0,304
MDA sem env.	0,259	0,597
MDA 21 d. env.	0,057	-0,648
MDA 31 d. env.	0,055	0,241
Variância	0,429	0,181
Variância acumulada	0,429	0,610

**Figura 14** – Análise de componente principal dos resultados dos testes de envelhecimento (*sigma* 60%, 65% e 70% UR), condutividade elétrica (sem e com envelhecimento aos 21 dias) e teor de MDA (sem e com envelhecimento aos 21 e 31 dias)



**Figura 15** – Análise de componente principal dos resultados dos testes de envelhecimento (*sigma*), condutividade elétrica (CE) e teor de MDA, com os respectivos vetores



Analisando a primeira componente principal (Tabela 6), se verifica que os coeficientes dos três tratamentos de *sigma* e dos três tratamentos de teores de

MDA foram completamente opostos aos coeficientes dos dois tratamentos de condutividade elétrica (CE). Na segunda componente principal (Tabela 6) é possível verificar que o tratamento MDA 21 dias de envelhecimento foi o que apresentou a maior influência na separação dos grupos (-0,648) apresentando um coeficiente de representação oposto ao do MDA sem envelhecimento (0,597), comprovando assim que esta avaliação é promissora para estimar a longevidade de sementes, assim como o *sigma*. A avaliação de MDA com 31 dias de envelhecimento foi a que menos influenciou na separação dos grupos (Tabela 6 e Figura 15).

Os testes de CE sem envelhecimento e com 21 dias de envelhecimento não mostraram resultados promissores para a avaliação da longevidade, uma vez que estes apresentaram resultados semelhantes (Tabela 6 e Figura 15).

Na Figura 14 verifica-se de forma bastante clara a diferença no comportamento dos acessos GO 6 e MG 2 que apresentaram comportamento totalmente contrastantes, sendo que nos testes de envelhecimento o acesso GO 6 foi o que apresentou maior longevidade (Figura 8B) e o acesso MG 2 a menor longevidade (Figura 8A).

## 4.6 ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA

### 4.6.1 SEQUENCIAMENTO E CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DE cDNA

A corrida foi realizada em 1 “lane” com quatro amostras *paired end* de 101 pb. Os resultados obtidos do número de *Reads* nas comparações dos tratamentos estão apresentados na Tabela 7. O resultado das montagens *paired end* produziram 124.528 sequências de transcritos. Os genes considerados com expressão diferencial significativa tiveram o *Pvalue* ajustado (PAdj)  $\leq 0,05$  e *log fold change* (FC)  $\geq 2$ .

**Tabela 7** – Número de *Reads* mapeados obtidos no sequenciamento na plataforma *Illumina HiSeq2500*<sup>®</sup> de eixos embrionários de sementes de *A. fraxinifolium* de sementes sem e com envelhecimento

TRAT.	Nº <i>READS</i>	Nº <i>READS</i> <i>TRIMADOS</i>	<i>READS</i> MAP.	% <i>READS</i> MAP.	<i>READS</i> NÃO MAP.	% <i>READS</i> NÃO MAP.
GO 6 sem x com env.	73.058.144	69.236.758	59.600.544	86,08	9.636.214	13,91
MG 2 sem x com env.	128.874.380	121.011.132	104.046.698	85,98	16.964.434	14,01
GO 6 com x MG 2 com env.	103.382.264	97.804.592	85.003.636	86,91	12.800.956	13,08
GO 6 sem x MG 2 sem env.	95.814.580	90.062.502	76.652.780	85,11	13.409.722	14,88

#### 4.6.2 ANÁLISE DOS TRANSCRITOS

As análises de genes diferencialmente expressos (DEG) foram realizadas nas comparações dos tratamentos:

1. GO 6 com envelhecimento x sem envelhecimento
2. MG 2 com envelhecimento x sem envelhecimento
3. GO 6 com envelhecimento x MG 2 com envelhecimento
4. GO 6 sem envelhecimento x MG 2 sem envelhecimento

A quantidade de DEG obtidas nas comparações entre os tratamentos estão apresentados na Tabela 8. A comparação entre os tratamentos de sementes não envelhecidas GO 6 x MG 2 não apresentou diferença significativa dos DEG.

**Tabela 8** – Número de genes diferencialmente expressos (DEG) em sementes de *A. fraxinifolium* na comparação entre os tratamentos com sementes sem e com envelhecimento

TRATAMENTOS	DEG
GO 6 com env. x sem env.	296
MG 2 com env. x sem env.	115
GO 6 com env. x MG 2 com env.	327

A Tabela 9 apresenta os dados dos termos enriquecidos *Gene Ontology*, altamente significativos dos DEG, que foram *Up* e *Down* expressos na

comparação dos tratamentos de sementes MG 2 com envelhecimento x sem envelhecimento.

**Tabela 9** – Análise de enriquecimento *Gene Ontology* (GO) de DEG que foram *Up* e *Down* expressos na comparação dos tratamentos MG 2 com envelhecimento x sem envelhecimento

<b>GENES UP EXPRESSOS</b>						
<b>GO Termo</b>	<b>Ontologia</b>	<b>Descrição</b>	<b>DEG</b>	<b>Nº de BG/Ref.</b>	<b>p-value</b>	<b>FDR</b>
GO:0043232	componente celular	organela intracelular de membrana não delimitada	13	2967	4,40E-005	0,0026
GO:0005654	componente celular	nucleoplasma	6	861	0,00067	0,027
GO:0005856	componente celular	citoesqueleto	6	932	0,001	0,03
GO:0031981	componente celular	lúmen nuclear	7	1402	0,0016	0,039

<b>GENES DOWN EXPRESSOS</b>						
<b>GO Termo</b>	<b>Ontologia</b>	<b>Descrição</b>	<b>DEG</b>	<b>Número de BG/Ref.</b>	<b>p-value</b>	<b>FDR</b>
GO:0008270	função molecular	ligação do zinco	9	2571	0,00074	0,046

\*FDR – Taxa de falso descoberto

A Tabela 10 apresenta os dados dos termos enriquecidos *Gene Ontology*, altamente significativos, dos DEG que foram *Up* expressos na comparação dos tratamentos GO 6 com envelhecimento x sem envelhecimento. Os genes *Down* expressos não apresentaram significância na comparação entre os tratamentos das sementes GO 6 com e sem envelhecimento.

**Tabela 10** – Análise de enriquecimento *Gene Ontology* (GO) de DEG que foram *Up* expressos na comparação dos tratamentos sementes GO 6 com envelhecimento x sem envelhecimento

<b>GENES UP EXPRESSOS</b>						
<b>GO Termo</b>	<b>Ontologia</b>	<b>Descrição</b>	<b>DEG</b>	<b>Número de BG/Ref.</b>	<b>p-value</b>	<b>*FDR</b>
GO:0008380	processo biológico	ligação de RNA	11	468	3,80E-006	0,0037
GO:0016070	processo biológico	RNA processo metabólico	36	4225	8,40E-006	0,0041
GO:0016071	processo biológico	mRNA processo metabólico	11	613	4,40E-005	0,014
GO:0010605	processo biológico	regulação negativa de macromolécula de processo metabólico	11	722	0,00018	0,018
GO:0032501	processo biológico	processo de organismo multicelular	45	6831	0,00029	0,018
GO:0006396	processo biológico	processamento de RNA	14	1150	0,00024	0,018
GO:0009892	processo biológico	regulação negativa de processo metabólico	11	790	0,00038	0,021
GO:0048519	processo biológico	regulação negativa de processo biológico	16	1612	0,0008	0,035
GO:0006807	processo biológico	processo metabólico de compostos nitrogenados	53	8921	0,00091	0,038

\*FDR – Taxa de falso descoberto

A Tabela 11 apresenta os dados dos termos enriquecidos *Gene Ontology*, altamente significativos, dos DEG, que foram *Up* e *Down* expressos na comparação de sementes GO 6 com envelhecimento x MG 2 com envelhecimento.

**Tabela 11** – Análise de enriquecimento *Gene Ontology* (GO) de DEG que foram *Up* e *Down* expressos na comparação de sementes GO 6 com envelhecimento x MG 2 com envelhecimento

<b>GENES UP EXPRESSOS</b>						
<b>Termo GO</b>	<b>Ontologia</b>	<b>Descrição</b>	<b>DEG</b>	<b>Número de BG/Ref</b>	<b>p-value</b>	<b>*FDR</b>
GO:0005622	componente celular	intracelular	96	18820	7,00E-006	0,00071
GO:0043229	componente celular	organela intracelular	82	15937	9,30E-005	0,0048
GO:0043227	componente celular	organela de membrana	77	14836	0,00016	0,0054
GO:0005737	componente celular	citoplasma	68	13293	0,001	0,022
GO:0044464	componente celular	parte da célula	111	25755	0,0031	0,045
GO:0005623	componente celular	célula	111	25755	0,0031	0,045

<b>GENES DOWN EXPRESSOS</b>						
<b>GO Termo</b>	<b>Ontologia</b>	<b>Descrição</b>	<b>DEG</b>	<b>Número de BG/Ref.</b>	<b>p-value</b>	<b>FDR</b>
GO:0034641	processo biológico	processo metabólico de compostos nitrogenados celulares	13	1031	2,20E-005	0,016
GO:0005198	função molecular	atividade de estrutura molecular	12	1096	0,00018	0,041
GO:0044444	componente celular	parte do citoplasma	54	11331	0,00018	0,041
GO:0044422	componente celular	parte de organela	35	6519	0,00057	0,045

\*FDR – Taxa de falso descoberto

Foram elaborados Diagramas de *Venn* para os Genes *Up* e *Down* expressos nas comparações entre os tratamentos de GO 6 x MG 2. O Diagrama de *Venn* é um método estatístico de organização de conjuntos de dados, que consiste em agrupar seus elementos dentro de figuras geométricas.

O valor de *log2 Fold Change* é que determina os DEG que são *Up* e *Down* regulados na comparação entre dois tratamentos A e B. O *Fold Change* corresponde a razão entre *base mean* B e *base mean* A (tratado e não tratado). A *base mean* significa o valor da expressão do gene normalizada. O *Pvalue* corresponde a rejeição da hipótese nula.

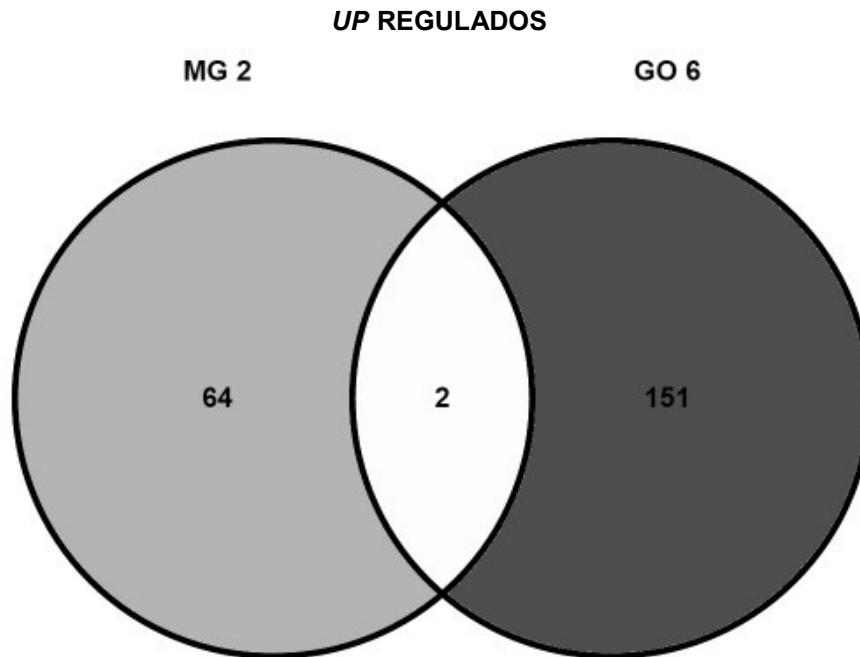
Para avaliar a função dos genes *Up* e *Down* regulados foi aplicado uma seleção *Top 50*, com os 50 genes com valor de *Pvalue* ajustado mais expressivos, ou seja, a diferença desses genes em relação ao controle é extremamente significativa.

As funções dos genes relacionados foram avaliadas nos sites do *UniProt Knowledgebase* (<http://www.uniprot.org/>) e no *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Os tratamentos apresentaram um total de 217 DEG *Up* regulados sendo que 64 genes foram exclusivos para o tratamento MG 2, 151 genes somente no tratamento GO 6 e dois genes foram expressos em ambos os tratamentos (Figura 16).



**Figura 16** – Análise do Diagrama de Venn dos 217 DEG *Up* regulados entre os tratamentos de sementes de *A. fraxinifolium* dos acessos MG 2 x GO 6 com sementes envelhecidas



Os dois genes regulados em ambos os tratamentos tiveram a função descrita em *Arabidopsis thaliana* como: c31142\_g1\_i6 - *ABC transporter B family member 26, chloroplastic* AB26B\_ARATH e c29015\_g2\_i10 - *Myosin-15*. - MYO15\_ARATH.

O gene AB26B\_ARATH é um transportador do fluxo de auxina, que atua como um regulador negativo da sinalização luminosa para promover o alongamento do hipocótilo. O gene MYO15\_ARATH é uma miosina que atua no transporte regulador do ciclo celular da segregação de várias proteínas e organelas. Tem papel importante na ligação de ATP, actina e nucleotídeo.

Para os 153 genes *Up* regulados do tratamento GO 6 na seleção *Top 50*, foram relacionados 18 genes que tiveram sua função descrita e o termo *Gene Ontology* relacionado, com possibilidade de estarem relacionados ao processo de envelhecimento das sementes de *A. fraxinifolium*. (Tabela 12).

**Tabela 12** – Seleção de genes *Up* regulados GO 6 com possível relação ao envelhecimento das sementes de *A. fraxinifolium*

ID	Termo Gene Ontology	Função do gene
c30095_g2_i20	AMINOTRANSFERASE	Branched-chain-amino-ac. aminotransferase-like protein 2 DUF21 domain-containing protein
c29650_g1_i7	COMP. MEMBRANA	At4g14240
c27188_g2_i2	COMP. MEMBRANA	AP3-complex subunit beta-A Pre-mRNA-splicing factor ATPdepend.RNA
c28091_g1_i6	HELICASE	helicase DEAH7
c30277_g1_i5	HELICASE	Probable helicase MAGATAMA 3 Probable receptor-like protein kinase
c29097_g1_i10	KINASE	At5g15080
c30654_g1_i9	KINASE	C-type lectin receptor-like tyrosine-protein kinase At1g52310 Prob. leucine-rich repeat receptor-like
c31494_g2_i12	KINASE	protein kinase At5g49770
c30426_g3_i2	LIGASE CoA	4-coumarate--CoA ligase-like 9
c29015_g2_i10	LIGASE CoA	4-coumarate--CoA ligase-like 9
c27812_g1_i1	MICROTUBULO	65-kDa microtubule-associated protein 6
c30834_g1_i8	NAP1	Protein NAP1 DNA-directed RNA polymerase III subunit 1
c30355_g2_i6	POLIMERASE PROTEINASE	
c26616_g1_i3	ASPARTICO	Aspartic proteinase-like protein 2 Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase
c31008_g2_i9	TPS1	
c30712_g3_i1	TRANSP. AÇUÇAR	Prob. sugar phosphate/translocator At1g06470
c26185_g2_i3	TRANSP. MAGNÉSIO	Probable magnesium transporter NIPA6
c20908_g1_i5	ZINCO	PHD finger protein ING1

Proteínas kinase que fazem a produção de ATP no processo de fosforilação; transporte de carboidrato; proteínas helicases e proteínas de microtúbulos relacionadas à organização celular, foram as principais funções relacionadas aos genes *Up* regulados do acesso GO 6 (Tabela 12).

Dos 66 genes *Up* regulados para o tratamento de MG 2, da seleção *Top 50* foram selecionados 20 genes que tiveram sua função descrita e o termo *Gene Ontology* relacionado. Na Tabela 13 estão apresentados os 20 genes selecionados com possibilidade de estarem relacionados ao processo de envelhecimento das sementes MG 2 de Minas Gerais.

Genes relacionados aos processos de transcrição de RNA; biossíntese de amido; transporte de zinco; proteínas LEA D29 e proteínas ubiquitinas foram as funções mais relacionadas ao acesso MG 2 (Tabela 13).

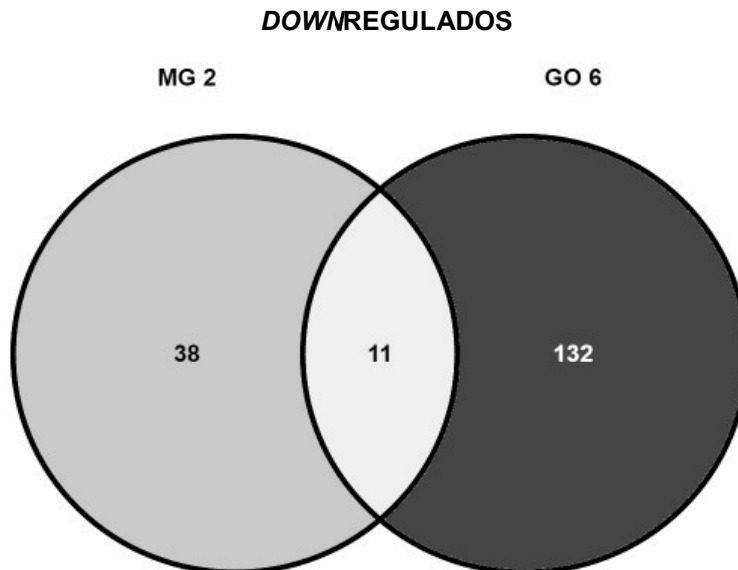
**Tabela 13** – Seleção de genes *Up* regulados MG 2 com possível relação ao envelhecimento das sementes de *A. fraxinifolium*

ID	Termo Gene Ontology	Função do Gene
c30925_g1_i2	BIOSSÍNTESE AMIDO	4-alpha-glucanotransferase DPE2
c27917_g1_i3	BIOSSÍNTESE AMIDO	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic
c28665_g1_i2	CATABOLISMO SUB.TOXICAS	Glutathione S-transferase U17
c22798_g1_i3	CATABOLISMO XILAN	Beta-D-xylosidase 4
c31176_g2_i7	DNA POLIMERASE II	DNA polymerase epsilon catalytic subunit A
c28093_g1_i3	HELICASE	ATP-dependent helicase BRM
c29854_g1_i7	ORGANIZAÇÃO NUCLEAR	Protein CROWDED NUCLEI 1
c21711_g1_i3	OXIDAÇÃO ÁC. GRAXOS	Protein HOTHEAD
c28543_g1_i4	PROTEINA UBIQUITINA	Protein FIZZY-RELATED 2
c30946_g1_i1	PROTEINA UBIQUITINA	Prob.ubiquitin-conjugating enzyme E2 24
c18835_g1_i2	RESERVA NUTRIENTE	Vicilin-like seed storage protein At2g28490
c17966_g1_i1	RNA POLIMERASE	RNA polymerase Two-component response regulator-like
c30965_g1_i3	TRANSCRIÇÃO	APRR5
c29015_g2_i1	TRANSCRIÇÃO	Protein ALWAYS EARLY 3
c27644_g1_i4	TRANSCRIÇÃO	Transcription factor GTE10
c12237_g1_i2	TRANSP. CARBOHIDRATO	Prob. sugar phosphate/p translocator At3g14410
c25778_g1_i1	TRANSP. POLIAMINA	Probable polyamine transporter At3g19553
c24339_g1_i1	TRANSPORTE LIPIDEO	Late embryogenesis abundant protein D-29
c20908_g1_i3	TRANSPORTE ZINCO	PHD finger protein ING1
c30020_g1_i5	TRANSPORTE ZINCO	Putative zinc transporter At3g08650

Os tratamentos apresentaram um total de 181 DEG *Down* regulados sendo que 38 genes foram exclusivos para o tratamento MG 2, 132 genes somente no

tratamento GO 6 e 11 genes foram expressos em ambos os tratamentos (Figura 17).

**Figura 17** – Análise do Diagrama de *Venn* dos 181 DEG *Down* regulados entre os tratamentos de sementes de *A. fraxinifolium* dos acessos MG 2 e GO 6 com sementes envelhecidas



Dos 11 genes regulados para ambos os tratamentos, cinco genes não tiveram sua função identificada, e os demais genes são apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14** – Genes *Down* regulados para GO 6 e MG 2 com possível relação ao envelhecimento das sementes de *A. fraxinifolium*

<b>ID</b>	<b>Função do gene</b>	<b>Observação</b>
c30708_g1_i13	Protein TAR1	Pode estar envolvida na estabilidade de mtDNA ou na regulação da expressão gênica mitocondrial ao nível pós-transcricional
c26084_g1_i2	Casein kinase I isoform delta-like.	KC1D_ARATH Caseína kinase são operacionalmente definidas pela sua utilização preferencial de proteínas ácidas
c22938_g1_i4	Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase	Transferase
c28984_g1_i3	3beta-hydroxysteroid-dehydrogenase/decarboxylase isoform 1	HSDD1_ARATH
c29489_g1_i2	Protein FAR1-RELATED SEQUENCE 5	FRS5_ARATH
c27880_g2_i1	Uncharacterized mitochondrial protein AtMg00030	M030_ARATH

Dos 143 genes *Down* regulados para o tratamento de GO 6, da seleção *Top 50* foram selecionados 25 genes que tiveram sua função descrita e o termo *Gene Ontology* relacionado. Na Tabela 15 estão apresentados os 25 genes selecionados com possibilidade de estarem relacionados ao processo de envelhecimento das sementes GO 6 de Goiás.

**Tabela 15** – Seleção de genes *Down* regulados GO 6 com possível relação ao envelhecimento das sementes de *A. fraxinifolium*

ID	Termo Gene Ontology	Função do gene
c27020_g1_i4	ABA	Glycine-rich domain-containing protein 1
c29563_g1_i8	AMIDO	Phosphoglucan phosphatase LSF1, chloroplastic
c29888_g6_i1	ATP	Endoribonuclease Dicer homolog 1
c29870_g1_i3	ATP	ABC transporter C family member 4
c29201_g1_i2	ETILENO	Ethylene-responsive transcription factor RAP2-12
c28093_g1_i5	HELICASE	ATP-dependent helicase BRM
c30277_g1_i3	HELICASE	Probable helicase MAGATAMA 3
c23560_g1_i3	KINASE	Probable inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At1g66830
c30654_g1_i3	KINASE	C-type lectin receptor-like tyrosine-protein kinase At1g52310
c26084_g1_i5	KINASE	Casein kinase I isoform delta-like
c26241_g6_i5	LIGAÇÃO AC. NUCLEICO - POLY(A)	Polyadenylate-binding protein RBP47B
c27942_g1_i1	LIGAÇÃO AC. NUCLEICO	Putative G3BP-like protein
c30709_g2_i2	LIGAÇÃO AC. NUCLEICO	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, chloroplastic
c24185_g1_i5	LISINA	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase, chloroplastic
c26944_g1_i1	METABOLISMO LIPIDIO, PECTINA	Feruloyl esterase A
c31157_g1_i3	PROTEÍNA UBIQUITINA	BTB/POZ domain-containing protein At1g04390
c30555_g2_i7	RNA POLIMERASE II	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23
c28984_g1_i3	SINTESE ESTEROL	3beta-hydroxysteroid-dehydrogenase/decarboxylase isoform 1
c23445_g1_i11	SUCROSE	Sucrose synthase
c31008_g2_i6	TPS1	Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase
c23779_g4_i5	TRANSCRIÇÃO	Protein FAR1-RELATED SEQUENCE 5
c27495_g7_i6	TRANSCRIÇÃO	Protein RTF1 homolog
c20908_g1_i3	ZINCO	PHD finger protein ING1
c29153_g1_i7	ZINCO	Vacuolar protein sorting-associated protein 8 homolog
c21777_g1_i4	ZINCO	Pentatricopeptide repeat-containing protein At1g19720

Proteínas kinases, ligadas a produção de ATP na fosforilação; proteínas helicases, que fazem a regulação da transcrição do DNA; ligação de nucleotídeos e polyA; metabolismo de açúcares e divisão celular são os principais mecanismos que estão relacionados com os genes que apresentaram regulação negativa de sementes envelhecidas do acesso GO 6 (Tabela 15).

Dos 49 genes *Down* regulados para o tratamento MG 2, foram selecionados 15 genes que tiveram sua função descrita e o termo *Gene Ontology* relacionado. Na Tabela 16 estão apresentados os 15 genes selecionados com possibilidade de estarem relacionados ao processo de envelhecimento das sementes MG 2 de Minas Gerais.

**Tabela 16** – Seleção de genes *Down* regulados MG 2 com possível relação ao envelhecimento das sementes de *A. fraxinifolium*

ID	Termo Gene Ontology	Função do gene
c28984_g1_i3	BIOSSINTESE ESTEROL	3beta-hydroxysteroid-dehydrogenase/decarboxylase isoform 1
c30545_g1_i5	CATABOL.CARBOIDRATO	Beta-galactosidase 3
c22798_g1_i2	CATABOLISMO XILAN	Beta-D-xylosidase 4
c30224_g2_i4	CITOSOL	F-box protein At1g78280
c29438_g1_i2	CRESCIMENTO DE RAIZ	Probable boron transporter 2
c25158_g2_i2	MICROTUBULOS	Tubulin C-terminal domain
c26737_g1_i2	PROTEÍNA UBIQUITINA	E3 ubiquitin-protein ligase At4g11680
c27190_g4_i4	PROTEÍNA UBIQUITINA	Protein pleiotropic regulatory locus 1
c30986_g1_i2	DNA POLIMERASE	DNA polymerase zeta catalytic subunit
c31176_g2_i8	DNA POLIMERASE	DNA polymerase epsilon catalytic sub. A
c29111_g2_i10	RNA POLIMERASE	Transcription initiation factor TFIID sub. 2
c20908_g1_i5	TRANSCRIÇÃO RNA	PHD finger protein ING1
c29489_g1_i2	TRANSCRIÇÃO RNA	Protein FAR1-RELATED SEQUENCE 5
c12237_g1_i3	TRANSP. CARBOIDRATO	Prob. sugar phosphate/phosphate translocator At3g14410
c29114_g2_i8	TRANSPORTE AMINOACIDO	Cationic amino acid transporter 9, chloroplastic

Proteínas polimerases e de transcrição, ubiquitinas, catabolismo e transporte de carboidratos e microtúbulos são as principais funções relacionadas aos genes *Down* regulados do acesso MG 2 (Tabela 16).

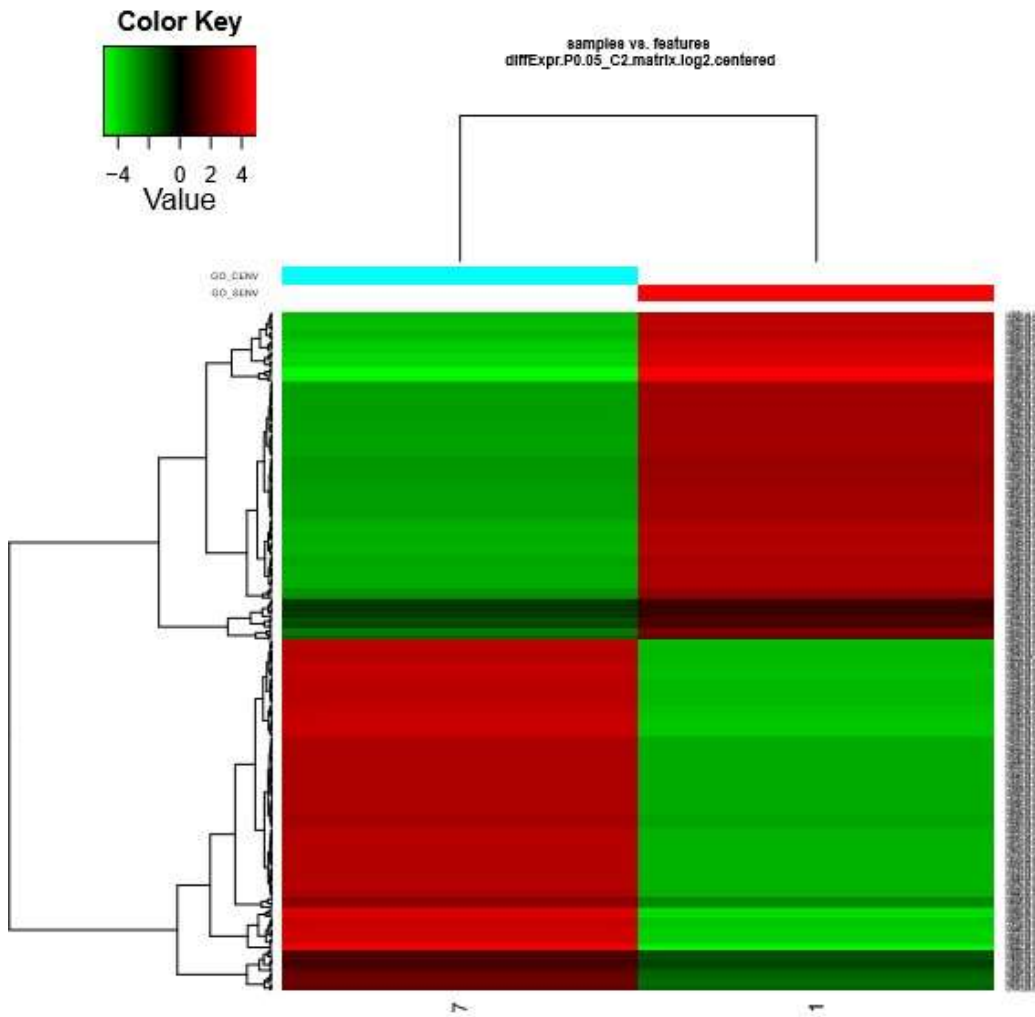
A relação completa de todos os genes diferencialmente expressos encontrados nos quatro tratamentos descritos *Up* e *Down* regulados são apresentados nos Anexos A, B, C e D.

Foram elaborados mapas de calor (*heatmap*) que indicaram o grau de correlação entre os tratamentos de sementes envelhecidas e não envelhecidas dos acessos de Goiás e Minas Gerais. As classes sobre-representadas (*Up*) e subrepresentadas (*Down*) são indicadas em vermelho e verde, respectivamente. Um mapa de calor é uma representação bidimensional de dados, em que os valores individuais contidos numa matriz são representados por cores. Em biologia, os mapas de calor são tipicamente utilizados em biologia molecular, para representar o nível de expressão de muitos genes, por meio de um número de amostras comparáveis, obtidas a partir de microarranjos de DNA ou RNA.

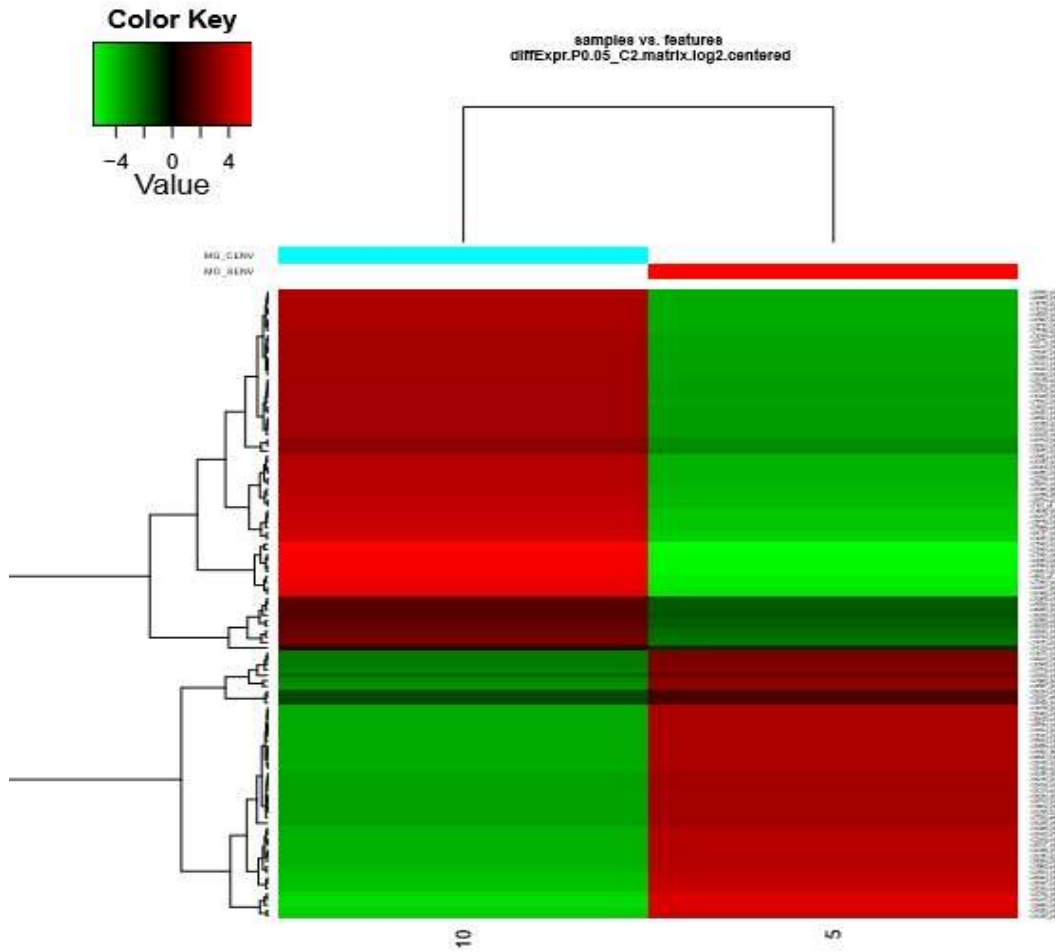
A comparação do transcriptoma de sementes envelhecidas e não envelhecidas de Goiás (GO 6) é apresentado na Figura 18. Na Figura 19 a comparação do transcriptoma de sementes envelhecidas e não envelhecidas de Minas Gerais (MG 2).



**Figura 18** – Heatmap da comparação do transcriptoma de *A. fraxinifolium* de sementes GO 6 com envelhecimento (7) x sem envelhecimento (1)



**Figura 19** – *Heatmap* da comparação do transcriptoma de *A. fraxinifolium* de sementes MG 2 com env. (10) x sem envelhecimento (5)



Os mapas de calor apresentam a comparação de genes que foram *Up* e *Down* regulados nas comparações entre os tratamentos. Os genes são agrupados em *clusters* segundo o nível de expressão gênica positiva ou negativamente. Cada gene é representado por uma faixa única de cores e cada tratamento é representado por uma caixa de cores. Os genes foram agrupados em dendrograma de acordo com sua função.

## 5 DISCUSSÃO

O envelhecimento de sementes é influenciado por dois fatores ambientais importantes: a umidade relativa e a temperatura. A perda de viabilidade das sementes pode ser avaliada tanto pela exposição das sementes à temperatura constante e com variações nas umidades relativas, como à umidade relativa constante e diferentes temperaturas. O teste de envelhecimento tem sido reconhecido como um bom preditor da longevidade de lotes de sementes ortodoxas (PRIESTLEY, 1986).

As estimativas da inclinação negativa de ajustes de dados de sobrevivência (*sigma*), o qual corresponde à taxa de deterioração das sementes, foram significativas nas três umidades relativas avaliadas de 60%, 65% e 70% e também entre as três condições de armazenamento, para cada acesso. O valor de *sigma* é uma estimativa da deterioração de sementes durante o armazenamento.

Verifica-se nos resultados dos testes de envelhecimento uma distribuição normal na longevidade das sementes, sendo que as curvas de sobrevivência obtidas são retas de coeficiente de regressão negativa, quando as porcentagens de viabilidade foram transformadas em *probit* e plotadas linearmente em relação ao período de armazenamento das sementes. Ellis e Roberts (1980), demonstraram que as curvas de sobrevivência das sementes apresentam o mesmo formato, diferindo entre si apenas em relação ao período de deterioração, porém, apresentando todas um mesmo desvio padrão e, conseqüentemente, diferentes viabilidades médias.

De forma geral, em todas as umidades relativas avaliadas (60%, 65% e 70%), os acessos coletados no Estado de Goiás foram sempre superiores aos acessos coletados em Minas Gerais, em termos de longevidade (Figura 8). Essa diferença entre os acessos, quanto ao potencial de longevidade, pode ser devido ao genótipo e/ou a qualidade das sementes, resultante de vários fatores ambientais, os quais afetam a semente antes do armazenamento (ELLIS e ROBERTS, 1980).

A diferença na longevidade das sementes entre os acessos de Goiás e Minas Gerais pode também estar relacionado à maturidade das sementes. Como as sementes são colhidas ainda nas árvores é possível que o estado de

maturidade das sementes entre uma matriz e outra seja variável, o que poderia de certa forma contribuir para determinar as diferenças de longevidade entre os acessos.

Muitas manifestações fisiológicas e bioquímicas da deterioração de sementes têm sido extensivamente relatadas por diversos autores. Tompsett (1986), estudando as espécies *Ulmus carpinifolia* e *Terminalia brassii*, verificou que aumentando o grau de umidade das sementes armazenadas, em temperatura constante, ocorreu diminuição na longevidade, conforme prevista na equação de Ellis e Roberts (1980).

Ferreira et al., (2004), avaliando o comportamento de sementes de *Copaifera langsdorffii* (Copaíba), quanto ao envelhecimento, verificaram que o envelhecimento das sementes a 42° C, a partir de 48 horas, afetou a qualidade fisiológica de sementes de copaíba, promovendo a redução da viabilidade e do vigor.

Guedes et al., (2009), trabalhando com *Erythrina velutina* Wild. (Mulungu), constataram que os testes de envelhecimento a 41° C por 72 horas e 45° C por 24 horas, foram adequados para avaliação do vigor das sementes dessa espécie florestal.

Em sementes de *Pterogyne nitens* o envelhecimento afetou significativamente a viabilidade e o vigor das sementes, após prévia superação da dormência, observando o decréscimo na germinação e na atividade da enzima catalase e aumento na peroxidação de lipídios (ATAÍDE et al., 2012).

O presente trabalho demonstrou que a perda da viabilidade de sementes, durante o envelhecimento, sob temperatura constante, é fortemente dependente do grau de umidade (Figura 8). Um aumento de 10% no grau de umidade relativa no armazenamento das sementes foi suficiente para diminuir, em média, 2,5 vezes o período de armazenamento (Tabela 2 e Tabela 3).

O teste de envelhecimento foi considerado um bom teste para prever a longevidade das sementes de *A. fraxinifolium*, pois os resultados obtidos no presente estudo mostraram diferenças significativas entre a qualidade das sementes dos acessos coletados nos estados de Goiás e Minas Gerais e entre os acessos de cada região (Tabelas 2 e 3). Os resultados dos parâmetros fisiológicos

foram coincidentes com os parâmetros obtidos pelo teste de malonaldeído (Tabela 5).

Em sementes de girassol, o envelhecimento a 45° C e 100% de umidade relativa, resultou na progressiva redução da germinação e ocorrência de plântulas anormais e finalmente a morte das sementes (CORBINEAU e CÔME, 1991).

Para Mira et al., (2011), o estudo dos mecanismos de envelhecimento de sementes e a determinação de indicadores de sua qualidade podem resultar em benefícios para a preservação da biodiversidade genética das espécies em bancos de germoplasma. Resultados obtidos com sete espécies de *Brassicaceae* indicaram respostas altamente variável em termos de longevidade para os graus de umidade avaliados, mostrando diferenças acentuadas entre as espécies estudadas (MIRA et al., 2015).

A viabilidade e longevidade dos acessos de Goiás GO 4 e GO 6, apresentaram comportamento muito superior aos demais acessos, principalmente, em relação aos acessos de Minas Gerais MG 1 e MG 2, que tiveram sempre a menor viabilidade e longevidade. Essa diferença chega a ser três vezes superior quanto ao valor de  $P_{50}$  na umidade relativa de 70% (Tabela 3).

Os resultados obtidos no presente trabalho apresentaram diferenças entre os genótipos avaliados quanto ao declive da curva de sobrevivência, mostrando que cada acesso apresenta um comportamento diferente em relação ao *sigma*, mesmo estando armazenado em condições idênticas (Tabela 2 e Figura 9).

O  $P_{50}$  sob um dado conjunto de condições de armazenamento é uma medida útil na avaliação da longevidade de sementes (PROBERT et al., 2007). Os resultados apresentados no presente trabalho, nos valores de  $P_{50}$ , mostraram diferença estatística significativa entre os acessos de Goiás e Minas Gerais, nas três umidades relativas avaliadas (60%, 65% e 70%) (Tabela 3). Considerando a condição de armazenamento mais drástica, ou seja, 70% de umidade relativa e 45° C de temperatura, o acesso de Goiás GO 4 apresentou valor de  $P_{50}$  quase cinco vezes superior ao acesso de Minas Gerais MG 2, ou seja, 41,1 e 8,8 dias, respectivamente (Tabela 3). Em todos os acessos avaliados de Goiás os valores de  $P_{50}$  foram sempre superiores aos de Minas Gerais, mostrando diferença significativa na longevidade entre os acessos (Tabela 3 e Figura 11).

Nagel e Börner (2010), estudando o comportamento de 18 espécies no armazenamento por até 26 anos avaliaram que sementes de ervilha, feijão e milho mantiveram sua viabilidade durante o período mais longo (23, 21 e 19 anos, respectivamente), enquanto que sementes de alface e cebolinha sobreviveram pouco tempo (7 e 5 anos respectivamente). A taxa de germinação diminuiu de forma sigmoide, mas os parâmetros da curva de viabilidade foram características de cada espécie. Para os autores as espécies com sementes que o óleo foi o principal componente, o período de armazenamento foi menor, enquanto que para sementes compostas por carboidratos e proteínas não mostrou efeito sobre a longevidade das sementes (NAGEL e BÖNER, 2010).

Pereira Neto et al (2013), monitorando a viabilidade de 526 acessos de milho, conservados por 35 anos, em banco de germoplasma, identificaram que 20% dos acessos monitorados permaneciam com 100% de germinação e a média de germinação entre os acessos foi de 97%.

O tempo de duração que as sementes permanecem viáveis durante o armazenamento é difícil de prever, mas é de fundamental importância para as indústrias de sementes e na conservação em bancos de germoplasma.

Verifica-se nos resultados obtidos neste trabalho que o tratamento de envelhecimento propiciou aumento nos níveis de exsudados e, portanto, na condutividade elétrica (CE) das sementes de *A. fraxinifolium*, em comparação às sementes não envelhecidas (Tabela 4).

O valor da condutividade elétrica, expressa em  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ , e que representa a quantidade de lixiviados na solução de embebição das sementes, está diretamente relacionado à integridade das membranas celulares, sendo, portanto, um parâmetro de vigor das sementes (VIEIRA e KRZYZANOWSKI, 1999). A perda de lixiviados inclui açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, proteínas, enzimas e íons inorgânicos como potássio, cálcio, magnésio, sódio e manganês, e o teste avalia a quantidade da perda desses lixiviados (MARCOS-FILHO, 2015).

Os valores obtidos de CE, nas sementes não envelhecidas foram sempre inferiores aos valores encontrados nas sementes envelhecidas, com exceção de dois acessos de Goiás (GO 5 e GO 6), que não tiveram aumento no valor da condutividade (Tabela 4).

O teste de CE detectou a deterioração de sementes de espécies selvagens de *Brassicaceae*, e correlacionou a permeabilidade de membranas com a perda da germinação e do vigor. Esta correlação pode fornecer um meio útil para a detecção precoce da viabilidade de sementes em espécies selvagens de *Brassicaceae* (MIRA et al., 2011).

Os testes de CE a 45° C por 72 horas e 25° C por 48 horas foram adequados para avaliar a qualidade fisiológica de sementes de *Dictyoloma vandellianum* (FLAVIO; PAULA, 2010).

Comparando os resultados dos testes de CE (Tabela 4) com o teste de envelhecimento (Figura 8A), para os acessos de Minas Gerais, o teste de CE foi adequado para avaliar a perda de qualidade das sementes, pois com 21 dias as sementes já estavam perdendo a viabilidade. Para os acessos de Goiás, somente para o acesso GO 7 houve uma correlação da perda de eletrólitos com a perda de viabilidade. Para os demais acessos de Goiás, com 21 dias no teste de envelhecimento a germinação era próximo de 100% (Figura 8B), o que não é possível se relacionar aos resultados de condutividade elétrica.

Os resultados obtidos no teste de CE foram semelhantes aos encontrados no teste de envelhecimento quanto aos acessos de Goiás GO 6 e de Minas Gerais MG 2, pois foram os acessos que apresentaram a maior e menor qualidade fisiológica, respectivamente. O acesso GO 6 apresentou o mesmo valor de condutividade elétrica nas sementes não envelhecidas e envelhecidas, mostrando que o envelhecimento não causou danos ao sistema de membranas, o que mostra a qualidade de suas sementes. O acesso MG 2 apresentou o maior aumento no valor da condutividade elétrica, com diferença estatística entre os tratamentos, mostrando, portanto, a baixa qualidade das suas sementes.

As sementes submetidas aos testes de CE foram avaliadas quanto ao teor de água das sementes, antes e após o período de envelhecimento. Em média, os seis acessos de Goiás apresentaram teor de água de 5,6% (base úmida) sem envelhecimento. Após o período de 21 dias de envelhecimento, as sementes de Goiás ainda permaneceram com baixo teor de água, com média de 7,7%. Os quatro acessos de Minas Gerais apresentaram, em média, 5,8% de teor de água antes do envelhecimento. Após o tratamento as sementes passaram a ter 9,2%,

em média, de teor de água. Os quatro acessos de Minas Gerais foram os que obtiveram maior ganho de umidade. (Figura 13).

O teste de condutividade elétrica não foi capaz de identificar o início da deterioração em sementes dos acessos de Goiás que apresentavam alta viabilidade com 21 dias. Nos acessos de Minas Gerais que já apresentavam queda na viabilidade com 21 dias de envelhecimento foi possível identificar aumento no teor e exsudados no teste de CE (Tabela 4).

No geral o teste de CE não apresentou diferenças entre os tratamentos com sementes não envelhecidas e envelhecidas não sendo considerado um bom teste para avaliar a longevidade de sementes de *A. fraxinifolium*.

A peroxidação lipídica tem sido amplamente indicada como uma das principais causas da deterioração de sementes oleaginosas, durante o processo de envelhecimento (BAILLY, 2004; McDONALD, 1999; PRIESTLEY, 1986). Considerando que as sementes de *A. fraxinifolium* apresentaram teor de óleo de 40% (dados não apresentados) a avaliação do teor de malonaldeído (MDA) poderia indicar a perda de qualidade no armazenamento.

Foram avaliados o teor de MDA dos dez acessos de *A. fraxinifolium*. O MDA é um aldeído de cadeia curta, sendo medido pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) e ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação de lipídios em sistemas biológicos.

Verifica-se nos resultados obtidos no presente trabalho que o envelhecimento após 21 e 31 dias a 45° C e UR de 60% apresentaram aumento significativo nos valores de MDA em sementes de *A. fraxinifolium* (Tabela 5), indicando a perda da viabilidade das sementes.

O conteúdo de MDA manteve-se estável até 24 horas de envelhecimento, após a superação de dormência, de sementes de *Pterogyne nitens*, com valores máximos em 48 horas e redução significativa em 72 horas de envelhecimento artificial (ATAIDE et al., 2012).

Vários trabalhos realizados com diversas espécies, como soja (PRIESTLEY e LEOPOLD, 1979), amendoim (PEARCE e ABDELSAMAD, 1980), milho (LINN e PEARCE, 1990), trigo (LEHNER et al., 2008) e espécies selvagens de *Brassicaceae* (MIRA et al., 2011) demonstraram que a peroxidação lipídica,



avaliada pela concentração de MDA, não foi associada com a deterioração de sementes.

Trabalhos realizados com sementes de girassol mostraram que o envelhecimento acelerado a 45° C e 100% de umidade relativa, induz tanto a perda da viabilidade como no acúmulo de MDA (BAILLY et al., 1996; GIDROL et al., 1989).

Em sementes de *Pinus thunbergii*, envelhecidas artificialmente, foram observados altos conteúdos de MDA, os quais foram associados à perda da viabilidade das sementes (KIM et al., 2010).

A análise de malonaldeído com sementes envelhecidas aos 21 dias foi considerado um teste bioquímico promissor para avaliar a longevidade de sementes de *A. fraxinifolium*, pois na Análise de Componentes Principais (PCA) foi o teste que apresentou a maior influencia na separação dos grupos (Tabela 6).

Nas Análises de Componentes Principais foi possível identificar com clareza as correlações nos resultados dos testes de envelhecimento (*sigma*), condutividade elétrica e teor de malonaldeído.

Nos resultados das análises de PCA foi possível identificar as diferenças entre os testes de envelhecimento (*sigma*) e de condutividade elétrica e a pouca expressão dos testes de malonaldeído (Figura 15). A diferença acentuada de comportamento dos acessos GO 6 e MG 2 (Figura 14) confirmam que estes foram os acessos mais contrastantes em termos de longevidade de sementes.

O estudo do transcriptoma em plantas requer a quantificação precisa de mRNA, expressos em situações diferentes. A técnica de RNA-Seq tem como um dos principais objetivos comparar os níveis de expressão gênica entre as amostras avaliadas. O RNA-Seq se refere a todo o transcriptoma sequenciado, em que o mRNA ou cDNA é mecanicamente fragmentado, resultando na sobreposição de fragmentos curtos, que cobrem todo o transcriptoma (WANG, et al., 2009). O nível de expressão de praticamente todos os genes em uma amostra é medido pela contagem do número de moléculas de mRNA individuais, produzidos a partir de cada gene (XU et al., 2012).

Para identificar genes que poderiam estar envolvidos com longevidade de sementes de *A. fraxinifolium* foi realizado estudos usando RNA-Seq com transcritos de dois acessos, um com o maior valor de longevidade (GO 6) e outro

com o menor valor (MG 2) (Tabela 3), com sementes não envelhecidas e sementes envelhecidas, totalizando 4 amostras.

Foram sequenciadas 4 bibliotecas de cDNA de eixos embrionários de sementes de *A. fraxinifolium* e foram geradas aproximadamente 400 milhões de sequências de reads (Tabela 7).

Dos genes *Up* regulados de sementes envelhecidas de Goiás (GO 6), os genes diferencialmente expressos (DEG) com maior valor de expressão foram os relacionados aos processos de proteínas kinase, proteínas helicases, proteínas de microtúbulos, componentes de membrana celular, polimerase e transporte de carboidratos (Tabela 12).

Dos genes *Up* regulados de sementes envelhecidas de Minas Gerais (MG 2), os DEG com maior valor de expressão foram relacionados aos processos transcrição de DNA, proteínas ubiquitinas, biossíntese de amido, transporte de zinco e proteínas LEA D29 (Tabela 13).

Nos resultados obtidos neste trabalho, do total de genes diferencialmente expressos, os genes relacionados aos processos biológicos mais significativos foram referentes aos processos de transcrição de RNA, proteínas kinases, metabolismo de carboidratos, proteínas ubiquitinas, microtúbulos, proteínas de choque térmico, resposta ao ABA e estresse oxidativo.

Vários estudos têm indicado a presença de um grande número de proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo em sementes maduras secas e na germinação. Para controlar os danos celulares causados por radicais livres, as sementes têm desenvolvido um mecanismo de desintoxicação. Este sistema de desintoxicação inclui enzimas antioxidantes como catalase, peroxidase ascorbato, glutathione peroxidase, glutathione reductase, dentre outras. Antioxidante como a *glutathione S transferase U17* foram identificados entre os DEG *Up* regulados MG 2 de sementes envelhecidas.

Diversos autores têm apresentado que em sementes ortodoxas, proteínas LEA, proteínas de choque térmico e proteínas de armazenamento, estão relacionadas à longevidade de sementes.

Proteínas LEA, abundantes na fase final da maturação, são responsáveis por conferir tolerância à dessecação e proteção a estruturas celulares (NEPOMUCENO et al, 2001).

As proteínas ubiquitinas e proteínas de choque térmico são citadas na literatura como relacionadas à longevidade de sementes. Almoguera e Jordano (1992) identificaram proteínas LEAs e de choque térmico durante o desenvolvimento de embriões em sementes de girassol, em resposta ao estresse e ABA, e sugeriram que a existência de elementos de regulação comuns para ambos os genes, as proteínas de choque térmico podem ter funções alternativas na célula vegetal. Almoguera et al., (2009) identificaram fatores de transcrição HaDREB2 e HaHSFA9 como fator de elemento de ligação responsivo a seca e fator de choque térmico, respectivamente, em embriões de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.). Os autores encontraram a interdependência funcional de HaDREB2 e HaHSFA9 em sementes. Ambos os fatores podem estar envolvidos na coativação da transcrição de promotores de proteínas de estresse por calor, relacionadas à longevidade e termotolerância basal de sementes.

A longevidade de sementes é importante para preservar as plantas selvagens e as culturas agrícolas, porém, é limitada por danos celulares progressivos que ocorrem durante o armazenamento (BUESO et al., 2014). A indução de defesas de estresse celular e a formação do tegumento das sementes são eventos de proteção cruciais durante o desenvolvimento da semente, que em *A. thaliana* é um processo mediado por fatores de transcrição LEC1, LEC2 e FUS3 e ativado pelo ácido abscísico ABI3 (BUESO et al., 2014).

Em sementes, a tolerância à dessecação e à longevidade, são dois fatores essenciais para a qualidade das sementes e são adquiridas, consecutivamente, durante a maturação (VERDIER et al., 2013). Estes autores, estudando os processos de redes relacionados à tolerância à dessecação e à longevidade, em sementes de *M. truncatula*, confirmaram que genes envolvidos na tradução do RNA, juntamente com o acúmulo de proteínas LEA e aumento dos níveis de glicose e estaquiase foram correlacionados com a longevidade. Os genes MtAP2 e EREBP e dois fatores de transcrição da leucina também foram altamente correlacionados à longevidade. O aumento e a perda de função do gene MtABI3 confirmou 80% dos objetivos previstos, validando experimentalmente a rede. O estudo determinou a regulação coordenada da maturação de sementes de *M. truncatula* e identificou redes regulatórias distintas subjacentes à preparação para o estado seco e quiescente.

Sementes de *A. fraxinifolium* são tolerantes ao estresse osmótico e anóxico, com germinação rápida e homogênea em ambos os casos (A. N. Salomão, dados não publicados). Estas características foram um dos fatores que levaram à escolha das sementes de *A. fraxinifolium* para serem levadas à Estação Espacial Internacional (ISS), pelo astronauta brasileiro Coronel Marcos César Pontes, para serem realizados experimentos com germinação de sementes em micro gravidade (INGLIS et al., 2014). Nesses experimentos foram avaliados o efeito da gravidade na taxa de germinação, nos teores de clorofila e carotenoides e na análise da expressão diferencial de genes.

Foram usadas bibliotecas de cDNA por meio de hibridação subtrativa por supressão e análises de marcadores de sequências expressadas para detectar a expressão diferencial de genes nas plântulas tratadas com micro gravidade em comparação com plântulas cultivadas em gravidade normal. A protrusão radicular e o crescimento das raízes foram mais rápido e mais uniforme nas sementes enviadas à Estação ISS (INGLIS et al., 2014).

As enzimas polifenol oxidase e peroxidase tiveram vários genes associados com o envelhecimento de sementes de *A. fraxinifolium* entre todos os genes diferencialmente expressos dos tratamentos realizados neste estudo. Esses genes estão relacionados com função de proteção físico-químico das células.

Foram obtidas 157 mil anotações de transcritos de eixos embrionários de sementes de *A. fraxinifolium*, sendo estes dados de grande importância, pois representam uma análise dos genes associados ao genoma da planta.

A técnica de RNA-Seq é uma ferramenta poderosa no estudo do transcriptoma de plantas. Outras técnicas moleculares já foram empregadas na avaliação da longevidade de sementes. Análises de *Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)* foram usadas no estudo de alteração e morte programada de células durante o envelhecimento de sementes de girassol (EL-MAAROUF-BOUTEAU et al., 2011). Outra técnica utilizada foi a *qRT-PCR* (PCR quantitativa em tempo real) no estudo de ubiquitina ligase em sementes de *A. thaliana* (BUESO et al., 2014). Usando a combinação de fisiologia, metabolômica e transcriptômica, Verdier et al, (2013) estudando redes metabólicas relacionadas aos processos de tolerância à dessecação e longevidade, em sementes de *M. truncatula*, usaram as técnicas de RNA-Seq e PCR neste estudo. Estudando

proteínas de armazenamento relacionadas à longevidade de sementes de *A. thaliana*, Thu-Phuong Nguye et al. (2015), usaram eletroforese em gel 2D, PCR e análises *quantitative trait loci* (QTL) nas avaliações. WANG, et al., (2012) estudando a deterioração de sementes de soja utilizaram a *qRT-PCR* nas suas avaliações.

Os genes selecionados neste estudo totalizaram 78 DEG com expressão *Up* e *Down* regulados, nos quatro tratamentos avaliados, e foram considerados como possíveis genes candidatos no estudo de deterioração e longevidade de sementes de *A. fraxinifolium*.

## 5 CONCLUSÕES

1. Diferenças na longevidade de sementes entre os acessos de *A. fraxinifolium* coletados nos estados de Goiás e Minas Gerais foram identificadas no teste de envelhecimento.
2. Genes relacionados a transcrição de RNA, polimerases, proteínas kinases e ubiquitinas, transporte de zinco e metabolismo de carboidratos, foram as funções mais relacionadas aos genes diferencialmente expressos de eixos embrionários de sementes de *A. fraxinifolium*.
3. O teste de condutividade elétrica não foi adequado para avaliar a longevidade dos acessos e a avaliação do teor de malonaldeído foi considerado um teste promissor para avaliar a longevidade de sementes de *A. fraxinifolium*.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. V. et al. Determinação de parâmetros genéticos em população de gonçalo-alves (*Astronium fraxinifolium*) através das características fisiológicas da semente. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 60, p. 89-97, 2001.
- ALMOGUERA, C.; JORDANO, J. Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular-weight heat-shock protein and Lea mRNAs. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 19, n. 5, p. 781-792, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1386536>>. Acesso em: 03 set. 2016.
- ALMOGUERA, C. et al. The HaDREB2 transcription factor enhances basal thermotolerance and longevity of seeds through functional interaction with HaHSFA9. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 9, n. 75, 2009. 12 p. Disponível em: <<http://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-9-75>>. Acesso em: 03 set. 2016.
- ANDERS, S.; HUBER W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biology**, London, v. 11, p. R106, 2010.
- ANDREOLI, C. Simplificação da equação de viabilidade para prever a longevidade de sementes de milho e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.9, p.911-917, set. 2004.
- ATAIDE, G. M. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Pterogyne nitens* Tull, durante o envelhecimento artificial. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 1, p. 71-76, 2012.
- BAHL, V.; KAPOOR, P.; TYAGI, P.; KAMESHWAR SHARMA, Y.V.R. Enzymatic determination of Catechol oxidase and Protease from fruits (orange, apple) and vegetables (carrot, tomato). **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 5, n. 5, p. 29-35, 2013.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, Zurich, v. 14, p. 93-107, 2004.
- BAILLY, C. et al. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 97, n. 1, p. 104-110, 1996.
- BAILLY, C. et al. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 701-708, 2001.

BARBEDO, C. J.; MARCOS-FILHO, J. Tolerância a dessecação de sementes. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 145-164, 1998

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. Oxidants, antioxidants, and aging. In: SCANDALIOS, J.G. (Ed.). **Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. p. 201-246.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994.

BEWLEY, J. D. et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. New York: Springer, 2013. 392 p.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

BUESO, E. et al. A forward genetic approach in *Arabidopsis thaliana* identifies a RINGtype ubiquitin ligase as a novel determinant of seed longevity. **Plant Science**, Limerick, p. 215-216, 2014.

BUITINK, J.; LEPRINCE, O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. **Comptes Rendus Biologies, Paris**, v. 331, p. 788-795, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18926493>>. Acesso em: 02 abr. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 2009. 395 p. il.

CAKMAK, I.; HORST, J. H. Effects of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase actives in root tips of soybean (*Glicine max*). **Physiologia Plantarum, Copenhagen**, v. 83, p. 463-468, 1991. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x>>. Acesso em: 10 jul. 2016.

CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Morfologia, anatomia e desenvolvimento dos frutos, sementes e plântulas de *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl., *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allem. e *Astronium graveolens* Jacq. (Anacardiaceae)**. 1996. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1996.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5. ed. Jaboticabal: Funep, 2012.

- CASTRO, R. D. et al. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- CATUSSE, J. et al. Proteome-wide characterization of sugarbeet seed vigor and its tissue specific expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 29, p. 10262-10267, 2008.  
Disponível em: <[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0800585105](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0800585105)>. Acesso em: 10 jul. 2016.
- CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE DO CERRADO E CAATINGA. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Biodiversidade. Brasília, 2016. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/cecat/conservacao-da-biodiversidade/biodiversidade.html>>. Acesso em 15 jun. de 2016.
- CHÂTELAIN, E. et al. Temporal profiling of the heat-stable proteome during late maturation of *Medicago truncatula* seeds identifies a restricted subset of late embryogenesis abundant proteins associated with longevity. **Plant Cell Environment**, Chichester, v. 35, p. 1440-1455, 2012.
- CLERKX, E. J. M. et al. Genetic differences in seed longevity of various Arabidopsis mutants. **Plant Physiology**, Washington, v. 121, p. 448–461, 2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0031-9317.2004.00339.x/abstract>>. Acesso em: 03 jan. 2016.
- CORBINEAU, F. Markers of seed quality: from present to future. **Seed Science Research**, Zurich, v. 22, n. S1, p. S61-S68, 2012.
- CORBINEAU, F.; CÔME, D. Effects of temperature and oxygen on seed germination and seedling growth in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 31, p. 193-200, 1991.
- CORBINEAU, F.; CÔME, D. Priming: a technique for improving seed quality. **Seed Testing International**, Bassersdorf, v. 132, p. 38-40, 2006.
- DEBEAUJON, I. et al. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Washington, v. 122, p. 403-414, 2000.
- DELOUCHE, J. C. Seed maturation. In: **Handbook of seed technology**. Mississippi: Mississippi State University, 1971. p. 17-21.
- DELOUCHE J. C. Germinação, deterioração e vigor de sementes. **Seed News**, Pelotas, v. 6, n. 6, p. 24-31, 2002.



DONA, M. et al. DNA profiling, telomere analysis and antioxidant properties as tools for monitoring ex situ seed longevity. **Annals of Botany**, London, v. 111, p. 987-998, 2013.

DU, Z. et al. AgriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 38, p. W64-W70, 2010.

EL-MAAROUF-BOUATEAU, H. et al. DNA alteration and programmed cell death during ageing of sunflower seed. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, 2011. Disponível em: <<http://jxb.oxfordjournals.org/content/early/2011/07/15/jxb.err198.full.pdf+html>>. Acesso em: 03 mar. 2016.

ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. Improved equations for the prediction of seed longevity. **Annals of Botany**, London, n. 45, p. 13-30, 1980.

ELLIS, R. H. et al. Low moisture content limits to relations between seed longevity and moisture. **Annals of Botany**, London, v. 65, p. 493-504, 1990.

FAIAD, M. G. R. et al. **Banco de germoplasma de sementes da Embrapa**. Brasília, DF: Embrapa, 2001. 31 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos 71).

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, v.61, p. 243-282, 1999

FERREIRA, R. A. et al. Qualidade fisiológica de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae Caesalpinioideae) envelhecidas artificialmente. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 35, n.1, p. 82-86, 2004.

FLAVIO, J. J. P.; PAULA, R. C. Testes de envelhecimento acelerado e de condutividade elétrica em sementes de *Dictyoloma vandellianum* A. Juss. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, v. 38, n. 87, p. 391-399, 2010.

GIDROL, X. et al. Biochemical changes induced by accelerated aging in sunflower seeds, I, Lipid peroxidation and membrane damage. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 76, p. 591-597, 1989.

GUEDES, R. S. et al. Resposta fisiológica de sementes de *Erythrina velutina* Willd. ao envelhecimento acelerado. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 323-330, 2009.

HAAS, B. J. et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq: reference generation and analysis with Trinity. **Nature Protocols**, London, v. 8, p. 1494-1512, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 1999. 980 p.

HENDRY, G. A. F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, Zurich, v. 3, p. 141-153, 1993.

HU, D. et al. Spatial and temporal nature of reactive oxygen species production and programmed cell death in elm (*Ulmus pumila* L.) seeds during controlled deterioration. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 35, p. 2045-2059, 2012.

HUNDERTMARK, M. et al. The reduction of seed-specific dehydrins reduces seed longevity in *Arabidopsis thaliana*. **Seed Science Research**, Zurich, v. 21, p. 165-173, 2011.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Lista oficial de flora ameaçada de extinção. **Instrução Normativa**, n. 6, 2008. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/patrimonio>>. Acesso em: 10 abr. 2016.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Árvores do Brasil central: espécies da região geoeconômica de Brasília**. Rio de Janeiro, 2002.

INGLIS, P. W. et al. Expression of stress-related genes in zebrawood (*Astronium fraxinifolium*, Anacardiaceae) seedlings following germination in microgravity. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 1, p. 81-92, 2014.

KEW ROYAL BOTANIC GARDENS. **Seed viability equation: viability utility**. Richmond, 2016. Disponível em: <<http://data.kew.org/sid/viability/>>. Acesso em 05 mai. 2016

KIBINZA, S. et al. Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 128, p. 496-506, 2006.

KILIAN, A. et al. Barley telomeres shorten during differentiation but grow in callus culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. A 92, p. 9555–9559, 1995.

KIM, D. H. et al. Germination and biochemical changes in accelerated aged and osmoprimed *Pinus thunbergii* seeds. **Journal of the Korean Forestry Society**, Chunchon, v. 99, n. 2, p. 244-250, 2010.

KRANNER, I. et al. Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death? **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 40, p. 2155-2165, 2006.

LEHNER, A. et al. Changes in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the embryo during ageing in wheat grains. **Journal of Cereal Science**, Melbourne, v. 47, n. 3, p. 555-565, 2008.

LEOPOLD, A. C. Coping with desiccation. In: ALSCHER, R. G.; CUMMING, J. R. (Ed.). **Stress responses in plants adaptation and acclimation mechanisms**. New York: Wiley-Liss, 1990. p. 57-86.

LEPRINCE, O. et al. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Zurich, v. 3, p. 231-246, 1993.

LEPRINCE, O.; BUITINK, J. Desiccation tolerance: from genomics to the field. **Plant Science**, Limerick, v. 179, p. 554-564, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945210000415>>. Acesso em: 05 jun. 2016.

LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome **BMC Bioinformatics**, Oxford, v. 12, p. 323, 2011.

LI, D. Z.; PRITCHARD, H. W. The science and economics of ex situ plant conservation. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 14, p. 614-621, 2009.

LINN, S. S.; PEARCE, R. S. Changes in lipids in bean seeds (*Phaseolus vulgaris*) and corn caryopses (*Zea mays*) aged in contrasting environments. **Annals of Botany**, London, v. 65, p. 452-545, 1990.

LONG, T. A. et al. Systems approaches to identifying gene regulatory networks in plants. **Annual Review Cell Developmental Biology**, Palo Alto, v. 24, p. 81-103, 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 6. ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2014. v. 1.

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

MARCOS-FILHO, J. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 72, n. 4, p. 363-374, 2015.

MIRA, S. et al. Biochemical changes induced in seeds of Brassicaceae wild species during ageing. **Acta Physiologiae Plantarum**, Cracóvia, v. 33, n. 5, p. 1803- 1809, 2011.

MIRA, S. et al. Effect of water content and temperature on seed longevity of seven Brassicaceae species after 5 years of storage. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 17, p. 153-162, 2015.

- MOLLER, I. M. et al. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 459-481, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17288534>>. Acesso em: 05 jun. 2016
- NAGEL, M.; BÖNNER, A. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. **Seed Science Research**, Zurich, v. 20, p. 1-12, 2010.
- NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas: mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, nº 23, novembro/dezembro, p. 12-18, 2001.
- NGUYEN, T. P.; CUEFF, G.; HEGEDUS, D. D.; RAJJOU, L.; BENTSINK, L. A role for seed storage proteins in Arabidopsis seed longevity. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 20, p. 6399-6413, 2015.
- PEARCE, R. S.; ABDELSAMAD, I. M. Change in fatty acid content of polar lipids during aging of seeds of peanut (*Arachis hypogea* L). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 31, p. 1283-1290, 1980.
- PEREIRA NETO, L. G. et al. Viabilidade de sementes de milho (*Zea mays* L.) armazenados em bancos de germoplasma por 35 anos. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 18., 2013, Florianópolis. **Informativo ABRATES**, Florianópolis, 2013. v. 23.
- PRIESTLEY, D. A. **Seed aging, implications of seed storage and persistence in the soil**. Ithaca: Cornell University Press, 1986.
- PRIESTLEY, D. A.; LEOPOLD, A. C. Absence of lipid oxidation during accelerated aging of soybean seeds. **Plant Physiology**, Washington, v. 63, p. 726-729, 1979.
- PRIETO-DAPENA, P. et al. Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. **Plant physiology**, Washington, v. 142, p. 1102, 2006. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/content/142/3/1102.abstract>>. Acesso em: 15 jan. 2016.
- PROBERT, R. J. et al. Seed quality for conservation is critically affected by prestorage factors. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, 2007, v. 55, p. 326-335, 2007. Disponível em: <[www.publish.csiro.au/journals/ajb](http://www.publish.csiro.au/journals/ajb)>. Acesso em: 10 ago. 2016.
- PROBERT, R. J. et al. Ecological correlates of ex situ seed longevity: a comparative study on 195 species. **Annals of Botany**, London, v. 104, p. 57-69, 2009.
- RAJJOU, L.; DEBEAUJON I. Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 331, v.10, p. 796-805, 2008.

RIGHETTI, K. et al. Inference of longevity-related genes from a robust co-expression network of seed maturation identifies new regulators linking seed storability to biotic defense-related pathways. **Plant Cell**, Rockville, v. 27, p. 2692-2708, 2015.

Disponível em: <<http://www.plantcell.org/content/early/2015/09/25/tpc.15.00632.short>>. Acesso em: 04 jan. 2016

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

ROBERTS, E. H. Storage environment and control of viability. In: ROBERTS, E. H. (Ed.). **Viability of seed**. Syracuse: Syracuse University Press, 1972. p. 14-58.

ROBERTS, E. H. The viability of cereal seed in relation to temperature and moisture. **Annals of Botany**, London, v. 24, p.12-31, 1960.

ROBERTS, E. H. The viability of rice seed in relation to temperature, moisture content and gaseous environment. **Annals of Botany**, Oxford, v. 25, p. 381-390, 1961.

ROSNOBLET, C. et al. The regulatory gamma subunit SNF4b of the sucrose nonfermenting-related kinase complex is involved in longevity and stachyose accumulation during maturation of *Medicago truncatula* seeds. **Plant Journal**, Oxford, v. 51, p. 47-59, 2007.

SALOMÃO, A. N.; SILVA, J. A. **Reserva genética florestal Tamanduá**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 137 p.

SANTIN, D. A. **Revisão taxonômica do gênero *Astronium* Jacq. e revalidação do gênero *Myracrodruon* Fr. Allen (Anacardiaceae)**. 1989. 178 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

SATTLER, S. E. et al. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 1419-1432, 2004. Disponível em: <[www.plantcell.org](http://www.plantcell.org)>. Acesso em: 02 jan. 2016.

SINNIAH, U. R. et al. Irrigation and seed quality development in seed rapid-cycling brassica: soluble carbohydrates and heat-stable proteins. **Annals of Botany**, London, v. 82, p. 647-655, 1998.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, 2012. 26 p.

- SMITH, M. T.; BERJAK, P. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 701-746.
- SUN, W. Q. Glassy state and seed storage stability: the WLF kinetics of seed viability loss at T-T<sub>g</sub> and the plasticization effect of water on storage stability. **Annals of Botany**, London, v. 79, p. 291-297, 1997.
- SUN, W. Q.; LEOPOLD, A. C. Glassy state and seed storage stability: a viability equation analysis. **Annals of Botany**, London, v. 74, p. 291-297, 1994.
- SUN, W. Q. et al. Advances on seed vigor physiological and genetic mechanisms. 2007. **Agricultural Sciences in China**, Beijing, v. 6, n. 9, p. 1060-1066, 2007.
- SUTHERLAND, J. R.; DIEKMANN, M.; BERJAK, P. (eds.). **Forest tree seed health for germplasm conservation**. Rome, Italy: IPGRI, 2002. 85 p. (IPGRI technical bulletin, 6)
- TOMPSETT, P. B. The effect of temperature and moisture content on the longevity of seed of *Ulmus carpinifolia* and *Terminalia brassii*. **Annals of Botany**, London, v. 57, p. 875-883, 1986.
- VANDECASTEELE, C. et al. Quantitative trait loci analysis reveals a correlation between the ratio of sucrose/raffinose family oligosaccharides and seed vigour in *Medicago truncatula*. **Plant Cell and Environment**, Chichester, v. 34, n. 9, p. 1473-1487, 2011.
- VENTURA, L. et al. Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 60, p. 196-206, 2012.
- 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**, Washington, v. 163, p. 757-774, 2013. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/content/163/2/757.full>>. Acesso em: 10 jan. 2016
- VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIEGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 237-271.
- VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 1-26.

WALTERS, C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. **Seed Science and Research**, Zurich, v. 8, p. 223-244, 1998. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=1355988>>. Acesso em: 12 jun. 2016.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.

WETZEL, M. M. V.; SILVA, D. B.; PEREIRA NETO, L. G. **Conservação de germoplasma semente de cebola (*Allium cepa* L.) a longo prazo no Brasil**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2005. (Circular Técnica 38).

XU, H.; GAO, Y.; WANG, J. Transcriptomic analysis of rice (*Oryza sativa*): developing embryos using the RNA-Seq technique. **Plos one**, Canada, v. 7, p. 30646, 2012.

## ANEXOS

**Anexo A – Relação do total de genes *Up* regulados do tratamento MG 2 das sementes envelhecidas de *A. fraxinifolium*.**

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c11613_g1_i1	gb OAY36418.1  hypothetical protein MANES_11G020100 [Manihot esculenta] gb OAY36419.1  hypothetical protein MANES_11G020100 [Manihot esculenta]
c15719_g2_i1	no hits found
c15771_g2_i1	gb ETN66835.1  actin [Anopheles darlingi]
c16257_g1_i1	no hits found
c16618_g2_i1	ref XP_002517840.1  PREDICTED: fasciclin-like arabinogalactan protein 6 [Ricinus communis] gb EEF44358.1  conserved hypothetical protein [Ricinus communis]
c17423_g1_i1	ref XP_012852552.1  PREDICTED: 14 kDa proline-rich protein DC2.15-like [Erythranthe guttata] gb EYU24741.1  hypothetical protein MIMGU_mgv1a016172mg [Erythranthe guttata]
c17966_g1_i1	gb ANG56339.1  putative RNA-dependent RNA polymerase [Diaphorina citri associated C virus]
c18424_g1_i1	ref YP_004429258.1  RNA-dependent RNA polymerase [Fig cryptic virus] emb CBW77436.1  RNA-dependent RNA polymerase [Fig cryptic virus]
c19744_g1_i1	no hits found
c19803_g2_i1	gb KPJ15203.1  hypothetical protein RR48_09230 [Papilio machaon]
c19868_g1_i1	ref XP_006443666.1  hypothetical protein CICLE_v10022672mg [Citrus clementina] ref XP_015386396.1  PREDICTED: uncharacterized PE-PGRS family protein PE_PGRS46-like [Citrus sinensis] gb ESR56906.1  hypothetical protein CICLE_v10022672mg [Citrus clementina]
c19899_g1_i2	ref XP_006482842.1  PREDICTED: 30S ribosomal protein 2, chloroplastic [Citrus sinensis]
c20486_g1_i1	gb ANI19834.1  hPS protein [Chronic bee paralysis virus]
c20626_g1_i1	gb KYP37670.1  14 kDa proline-rich protein DC2.15 [Cajanus cajan]
c20908_g1_i3	ref XP_006420512.1  hypothetical protein CICLE_v10005726mg [Citrus clementina] gb ESR33752.1  hypothetical protein CICLE_v10005726mg [Citrus clementina] gb KDO43052.1  hypothetical protein CISIN_1g025753mg [Citrus sinensis]
c21080_g1_i2	gb JAS77165.1  hypothetical protein g.30173 [Homalodisca liturata]
c21080_g3_i1	gb JAN90749.1  hypothetical protein, partial [Daphnia magna]
c21146_g1_i2	ref XP_006451444.1  hypothetical protein CICLE_v10008864mg [Citrus clementina] gb ESR64684.1  hypothetical protein CICLE_v10008864mg [Citrus clementina]
c21204_g1_i2	ref XP_006472515.1  PREDICTED: serine/threonine-protein kinase-like protein At1g28390 isoform X1 [Citrus sinensis]
c22385_g2_i4	ref XP_007031486.2  PREDICTED: tetraketide alpha-pyrone reductase 1 [Theobroma cacao]
c22557_g2_i2	gb AAD50629.1 AF106571_1 alpha-tubulin, partial [Gossypium hirsutum]
c22607_g1_i3	ref XP_006481904.1  PREDICTED: histone deacetylase HDT1 isoform X2 [Citrus sinensis]
c22644_g1_i2	ref WP_032941583.1  hypothetical protein [Citrobacter sp. 30_2]
c22676_g2_i5	ref XP_006476279.1  PREDICTED: protein GPR107 [Citrus sinensis]
c22931_g1_i2	ref XP_006443110.1  hypothetical protein CICLE_v10019191mg [Citrus clementina] ref XP_006478853.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102619708 isoform X1 [Citrus sinensis] gb ESR56350.1  hypothetical protein CICLE_v10019191mg [Citrus clementina]



ID	NR_Top_BLASTX_hit
c23078_g1_i2	ref XP_012079870.1  PREDICTED: adenylate kinase 4 [ <i>Jatropha curcas</i> ] gb KDP30944.1  hypothetical protein JCGZ_11320 [ <i>Jatropha curcas</i> ]
c23402_g1_i1	dbj GAT20840.1  NADH-cytochrome b5 reductase [ <i>Aspergillus luchuensis</i> ]
c23445_g1_i11	ref XP_006452883.1  hypothetical protein CICLE_v10007483mg [ <i>Citrus clementina</i> ]
c23716_g2_i1	ref XP_002266748.1  PREDICTED: splicing factor 3A subunit 2 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
c23725_g1_i1	gb ANH54459.1  cytochrome c oxidase subunit 1, partial (mitochondrion) [ <i>Spodoptera frugiperda</i> ]
c23845_g3_i2	ref XP_015574642.1  PREDICTED: epidermal growth factor receptor substrate 15 isoform X4 [ <i>Ricinus communis</i> ]
c23886_g1_i1	ref XP_017977102.1  PREDICTED: arabinogalactan peptide 13-like [ <i>Theobroma cacao</i> ]
c23946_g1_i3	ref XP_006423254.1  hypothetical protein CICLE_v10028348mg [ <i>Citrus clementina</i> ] ref XP_006487150.1  PREDICTED: probable receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g34500 [ <i>Citrus sinensis</i> ] gb ESR36494.1  hypothetical protein CICLE_v10028348mg [ <i>Citrus clementina</i> ]
c24352_g2_i1	ref XP_009374655.1  PREDICTED: soluble inorganic pyrophosphatase-like [ <i>Pyrus x bretschneideri</i> ] ref XP_009350087.1  PREDICTED: soluble inorganic pyrophosphatase-like [ <i>Pyrus x bretschneideri</i> ]
c24510_g1_i4	ref XP_006452627.1  hypothetical protein CICLE_v10008869mg [ <i>Citrus clementina</i> ] gb ESR65867.1  hypothetical protein CICLE_v10008869mg [ <i>Citrus clementina</i> ] gb KDO59165.1  hypothetical protein CISIN_1g019880mg [ <i>Citrus sinensis</i> ]
c24544_g1_i2	gb KDO71819.1  hypothetical protein CISIN_1g006358mg [ <i>Citrus sinensis</i> ]
c24621_g1_i1	gb KDO76694.1  hypothetical protein CISIN_1g018508mg [ <i>Citrus sinensis</i> ]
c24687_g1_i10	ref NP_195236.1  plasma membrane intrinsic protein 3 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] ref NP_001190920.1  plasma membrane intrinsic protein 3 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] sp P93004.2 PIP27_ARATH RecName: Full=Aquaporin PIP2-7; AltName: Full=Plasma membrane intrinsic protein 2-7; Short=AtPIP2;7; AltName: Full=Plasma membrane intrinsic protein 3; AltName: Full=Salt stress-induced major intrinsic protein; Contains: RecName: Full=Aquaporin PIP2-7, N-terminally processed gb AAL06563.1 AF412110_1 AT4g35100/M4E13_150 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] emb CAA17774.1  plasma membrane partial [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] gb AEE86464.1  plasma membrane intrinsic protein 3 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] gb AEE86465.1  plasma membrane intrinsic protein 3 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] gb OAP00878.1  SIMIP [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
c24887_g1_i11	ref XP_010250184.1  PREDICTED: adenine phosphoribosyltransferase 5 [ <i>Nelumbo nucifera</i> ] ref XP_010250185.1  PREDICTED: adenine phosphoribosyltransferase 5 [ <i>Nelumbo nucifera</i> ] ref XP_010250186.1  PREDICTED: adenine phosphoribosyltransferase 5 [ <i>Nelumbo nucifera</i> ]
c24958_g1_i3	ref XP_006464430.1  PREDICTED: COP9 signalosome complex subunit 7 isoform X2 [ <i>Citrus sinensis</i> ] gb KDO85517.1  hypothetical protein CISIN_1g024854mg [ <i>Citrus sinensis</i> ]
c25134_g1_i2	gb KDO83305.1  hypothetical protein CISIN_1g007321mg [ <i>Citrus sinensis</i> ]
c25158_g2_i1	ref XP_015879449.1  PREDICTED: tubulin alpha chain [ <i>Ziziphus jujuba</i> ]
c25229_g1_i3	ref XP_006441290.1  hypothetical protein CICLE_v10020366mg [ <i>Citrus clementina</i> ] gb ESR54530.1  hypothetical protein CICLE_v10020366mg [ <i>Citrus clementina</i> ]
c25473_g1_i4	ref XP_012071453.1  PREDICTED: RNA-dependent RNA polymerase 6-like [ <i>Jatropha curcas</i> ] gb KDP38635.1  hypothetical protein JCGZ_03988 [ <i>Jatropha curcas</i> ]

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c25476_g1_i2	ref XP_006429312.1  hypothetical protein CICLE_v10011473mg [Citrus clementina] gb ESR42552.1  hypothetical protein CICLE_v10011473mg [Citrus clementina] gb KDO53237.1  hypothetical protein CISIN_1g009759mg [Citrus sinensis]
c25602_g3_i2	ref XP_006446662.1  hypothetical protein CICLE_v10016241mg [Citrus clementina] ref XP_006470201.1  PREDICTED: proteasome subunit beta type-7B [Citrus sinensis] gb ESR59902.1  hypothetical protein CICLE_v10016241mg [Citrus clementina]
c25614_g1_i4	ref XP_006425858.1  hypothetical protein CICLE_v10025861mg [Citrus clementina] ref XP_006466632.1  PREDICTED: nodulation protein H isoform X4 [Citrus sinensis] gb ESR39098.1  hypothetical protein CICLE_v10025861mg [Citrus clementina]
c25748_g5_i2	gb AAV91346.1  cuticle protein 1 [Lonomia obliqua]
c26236_g2_i1	gb OAY45474.1  hypothetical protein MANES_07G063600 [Manihot esculenta]
c26244_g2_i5	ref XP_006447390.1  hypothetical protein CICLE_v10017300mg [Citrus clementina] ref XP_006469830.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102611045 [Citrus sinensis] gb ESR60630.1  hypothetical protein CICLE_v10017300mg [Citrus clementina] gb KDO36055.1  hypothetical protein CISIN_1g039583mg [Citrus sinensis]
c26244_g3_i1	ref XP_006447390.1  hypothetical protein CICLE_v10017300mg [Citrus clementina] ref XP_006469830.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102611045 [Citrus sinensis] gb ESR60630.1  hypothetical protein CICLE_v10017300mg [Citrus clementina] gb KDO36055.1  hypothetical protein CISIN_1g039583mg [Citrus sinensis]
c26288_g1_i2	ref XP_013164291.1  PREDICTED: myosin heavy chain, muscle isoform X23 [Papilio xuthus]
c26570_g6_i1	no hits found
c26570_g6_i3	no hits found
c26570_g7_i4	no hits found
c26570_g7_i5	no hits found
c26902_g3_i1	gb KZV53345.1  hypothetical protein F511_06487 [Dorcoceras hygrometricum]
c26902_g3_i2	no hits found
c26902_g4_i1	ref WP_065573400.1  hypothetical protein [Micrococcus luteus]
c26902_g4_i2	ref WP_065573400.1  hypothetical protein [Micrococcus luteus]
c26923_g1_i1	ref XP_015382738.1  PREDICTED: trans-resveratrol di-O-methyltransferase-like [Citrus sinensis]
c26924_g4_i4	ref XP_006444463.1  hypothetical protein CICLE_v10020947mg [Citrus clementina] ref XP_006480056.1  PREDICTED: dnaJ protein ERDJ3B [Citrus sinensis] gb ESR57703.1  hypothetical protein CICLE_v10020947mg [Citrus clementina]
c26936_g2_i3	gb EOY22993.1  Glutathione-regulated potassium-efflux system protein kefB [Theobroma cacao]
c27061_g1_i4	ref XP_007682036.1  hypothetical protein BAUCODRAFT_80780, partial [Baudoinia panamericana UAMH 10762] gb EMC90811.1  hypothetical protein BAUCODRAFT_80780, partial [Baudoinia panamericana UAMH 10762]
c27061_g10_i1	ref XP_018060490.1  hypothetical protein LY89DRAFT_703100 [Phialocephala scopiformis] gb KUJ06135.1  hypothetical protein LY89DRAFT_703100 [Phialocephala scopiformis]
c27061_g11_i2	gb OAD58190.1  hypothetical protein WN48_00612 [Eufriesea mexicana]
c27061_g2_i1	ref XP_001624571.1  predicted protein [Nematostella vectensis] gb EDO32471.1  predicted protein, partial [Nematostella vectensis]
c27061_g3_i1	no hits found
c27061_g4_i2	gb ABK29517.1  cytochrome P450-like TBP, partial [Helicoverpa armigera]

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c27061_g6_i1	gb EQH87717.1  hypothetical protein QMY_2873, partial [Clostridium difficile F152]
c27184_g1_i6	ref XP_006428505.1  hypothetical protein CICLE_v10013115mg [Citrus clementina] gb ESR41745.1  hypothetical protein CICLE_v10013115mg [Citrus clementina]
c27362_g1_i1	gb KDO64536.1  hypothetical protein CISIN_1g011045mg [Citrus sinensis]
c27491_g2_i1	gb KPJ04394.1  hypothetical protein RR46_01763 [Papilio xuthus]
c27516_g2_i6	gb KDO62339.1  hypothetical protein CISIN_1g008819mg [Citrus sinensis]
c27688_g2_i2	ref XP_006486631.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102624434 [Citrus sinensis]
c27746_g1_i9	ref XP_006437984.1  hypothetical protein CICLE_v10031168mg [Citrus clementina] gb ESR51224.1  hypothetical protein CICLE_v10031168mg [Citrus clementina]
c27751_g1_i1	gb AAD13304.1  polyprotein [Solanum lycopersicum]
c27776_g1_i3	ref XP_006422003.1  hypothetical protein CICLE_v10004200mg [Citrus clementina] ref XP_006422004.1  hypothetical protein CICLE_v10004200mg [Citrus clementina] ref XP_006422005.1  hypothetical protein CICLE_v10004200mg [Citrus clementina] ref XP_006422006.1  hypothetical protein CICLE_v10004200mg [Citrus clementina] ref XP_006490655.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102609710 [Citrus sinensis] gb ESR35243.1  hypothetical protein CICLE_v10004200mg [Citrus clementina] gb ESR35244.1  hypothetical protein CICLE_v10004200mg [Citrus clementina] gb ESR35245.1  hypothetical protein CICLE_v10004200mg [Citrus clementina] gb ESR35246.1  hypothetical protein CICLE_v10004200mg [Citrus clementina]
c27783_g1_i3	gb KDO72635.1  hypothetical protein CISIN_1g0091671mg, partial [Citrus sinensis]
c27783_g1_i5	ref XP_006431204.1  hypothetical protein CICLE_v10011434mg [Citrus clementina] gb ESR44444.1  hypothetical protein CICLE_v10011434mg [Citrus clementina]
c27804_g2_i3	ref XP_006435693.1  hypothetical protein CICLE_v10032067mg [Citrus clementina] ref XP_006486355.1  PREDICTED: glycosyltransferase family 64 protein C4 [Citrus sinensis] gb ESR48933.1  hypothetical protein CICLE_v10032067mg [Citrus clementina] gb KDO69060.1  hypothetical protein CISIN_1g020041mg [Citrus sinensis]
c27816_g1_i2	ref XP_006453083.1  hypothetical protein CICLE_v10007519mg [Citrus clementina] ref XP_006474418.1  PREDICTED: probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 6 [Citrus sinensis] ref XP_015384541.1  PREDICTED: probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 6 [Citrus sinensis] gb ESR66323.1  hypothetical protein CICLE_v10007519mg [Citrus clementina]
c28006_g1_i10	no hits found
c28006_g1_i8	no hits found
c28006_g1_i9	gb KNA05978.1  hypothetical protein SOVF_185310, partial [Spinacia oleracea]
c28103_g1_i2	ref XP_006474943.1  PREDICTED: scarecrow-like transcription factor PAT1 isoform X2 [Citrus sinensis]
c28153_g3_i5	ref XP_010263896.1  PREDICTED: fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic [Nelumbo nucifera]
c28229_g1_i5	ref XP_006475933.1  PREDICTED: serine/threonine-protein kinase EDR1 isoform X1 [Citrus sinensis] gb KDO80082.1  hypothetical protein CISIN_1g037068mg [Citrus sinensis]
c28231_g1_i2	ref XP_006472964.1  PREDICTED: serine decarboxylase [Citrus sinensis] ref XP_006472965.1  PREDICTED: serine decarboxylase [Citrus sinensis]
c28248_g1_i7	gb KDO63243.1  hypothetical protein CISIN_1g023289mg [Citrus sinensis]

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c28290_g1_i7	ref XP_006424242.1  hypothetical protein CICLE_v10030134mg [Citrus clementina] gb ESR37482.1  hypothetical protein CICLE_v10030134mg [Citrus clementina] gb KDO58081.1  hypothetical protein CISIN_1g027063mg [Citrus sinensis] gb KDO58082.1  hypothetical protein CISIN_1g027063mg [Citrus sinensis] gb KDO58083.1  hypothetical protein CISIN_1g027063mg [Citrus sinensis]
c28290_g1_i8	gb KJB54422.1  hypothetical protein B456_009G085600 [Gossypium raimondii]
c28340_g1_i1	ref XP_006480476.1  PREDICTED: transmembrane protein 208 homolog [Citrus sinensis] ref XP_006480477.1  PREDICTED: transmembrane protein 208 homolog [Citrus sinensis] ref XP_006480478.1  PREDICTED: transmembrane protein 208 homolog [Citrus sinensis] gb KDO53106.1  hypothetical protein CISIN_1g0306652mg [Citrus sinensis] gb KDO53107.1  hypothetical protein CISIN_1g0306652mg [Citrus sinensis] gb KDO53108.1  hypothetical protein CISIN_1g0306652mg [Citrus sinensis] gb KDO53109.1  hypothetical protein CISIN_1g0306652mg [Citrus sinensis]
c28381_g1_i4	ref XP_012445863.1  PREDICTED: 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase [Gossypium raimondii] gb KJB57823.1  hypothetical protein B456_009G182300 [Gossypium raimondii]
c28525_g1_i1	ref XP_015582764.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC8268227 [Ricinus communis]
c28563_g1_i1	ref XP_006476575.2  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102610276 [Citrus sinensis]
c28587_g2_i8	dbj BAC18353.1  conserved hypothetical protein [Corynebacterium efficiens YS-314]
c28626_g1_i4	gb KDO55484.1  hypothetical protein CISIN_1g011050mg [Citrus sinensis]
c28776_g4_i5	ref XP_006426971.1  hypothetical protein CICLE_v10026841mg [Citrus clementina] ref XP_006465606.1  PREDICTED: 60S ribosomal protein L37-3 [Citrus sinensis] gb ESR40211.1  hypothetical protein CICLE_v10026841mg [Citrus clementina] gb KDO56887.1  hypothetical protein CISIN_1g034400mg [Citrus sinensis]
c28795_g2_i4	ref XP_008778673.1  PREDICTED: acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha, chloroplastic-like isoform X1 [Phoenix dactylifera]
c28856_g1_i6	ref XP_006448191.1  hypothetical protein CICLE_v10014990mg [Citrus clementina] ref XP_006469226.1  PREDICTED: glucan endo-1,3-beta-glucosidase 3 [Citrus sinensis] gb ESR61431.1  hypothetical protein CICLE_v10014990mg [Citrus clementina]
c28867_g3_i5	ref XP_006470614.1  PREDICTED: armadillo repeat-containing protein 8 [Citrus sinensis]
c28927_g1_i2	ref XP_011016275.1  PREDICTED: vesicle transport protein GOT1B-like [Populus euphratica]
c28931_g1_i1	ref XP_006473275.1  PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Citrus sinensis]
c29059_g1_i6	ref XP_006445831.1  hypothetical protein CICLE_v10015009mg [Citrus clementina] ref XP_006492706.1  PREDICTED: GPI mannosyltransferase 2 [Citrus sinensis] gb ESR59071.1  hypothetical protein CICLE_v10015009mg [Citrus clementina] gb KDO62996.1  hypothetical protein CISIN_1g011059mg [Citrus sinensis]
c29068_g1_i2	gb EOY10511.1  Uncharacterized protein TCM_025853 isoform 1 [Theobroma cacao]
c29108_g3_i3	gb KDO55927.1  hypothetical protein CISIN_1g008405mg [Citrus sinensis]
c29113_g3_i6	ref XP_006492294.1  PREDICTED: IAA-alanine resistance protein 1 [Citrus sinensis]
c29216_g2_i3	ref XP_016748672.1  PREDICTED: cytochrome c [Gossypium hirsutum]
c29307_g1_i13	ref XP_015865843.1  PREDICTED: RNA pseudouridine synthase 7-like [Ziziphus jujuba]

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c29317_g4_i5	gb OAY25507.1  hypothetical protein MANES_17G100400 [Manihot esculenta]
c29377_g1_i3	gb KJB83920.1  hypothetical protein B456_013G271500 [Gossypium raimondii]
c29508_g1_i6	ref XP_002484510.1  hypothetical protein TSTA_040370 [Talaromyces stipitatus ATCC 10500] gb EED14557.1  hypothetical protein TSTA_040370 [Talaromyces stipitatus ATCC 10500]
c29508_g4_i1	ref XP_013448061.1  hypothetical protein MTR_7g031847 [Medicago truncatula] gb KEH22088.1  hypothetical protein MTR_7g031847 [Medicago truncatula]
c29537_g3_i2	no hits found
c29568_g2_i2	ref XP_006451164.1  hypothetical protein CICLE_v10007670mg [Citrus clementina] gb ESR64404.1  hypothetical protein CICLE_v10007670mg [Citrus clementina]
c29703_g1_i5	gb KDO46042.1  hypothetical protein CISIN_1g015786mg [Citrus sinensis] gb KDO46043.1  hypothetical protein CISIN_1g015786mg [Citrus sinensis]
c29704_g2_i7	ref XP_006453252.1  hypothetical protein CICLE_v10009594mg [Citrus clementina] ref XP_006474269.1  PREDICTED: tRNA-specific adenosine deaminase 2 isoform X2 [Citrus sinensis] gb ESR66492.1  hypothetical protein CICLE_v10009594mg [Citrus clementina] gb KDO61912.1  hypothetical protein CISIN_1g029549mg [Citrus sinensis]
c29783_g5_i1	gb ABA98491.1  retrotransposon protein, putative, unclassified [Oryza sativa Japonica Group]
c29806_g1_i5	ref XP_006430659.1  hypothetical protein CICLE_v10011294mg [Citrus clementina] gb ESR43899.1  hypothetical protein CICLE_v10011294mg [Citrus clementina]
c29870_g1_i3	ref XP_006444306.1  hypothetical protein CICLE_v10018482mg [Citrus clementina] gb ESR57546.1  hypothetical protein CICLE_v10018482mg [Citrus clementina] gb KDO87263.1  hypothetical protein CISIN_1g000438mg [Citrus sinensis]
c29960_g2_i4	no hits found
c30055_g2_i7	ref XP_017189606.1  PREDICTED: embryonic protein DC-8-like isoform X2 [Malus domestica]
c30070_g7_i2	no hits found
c30082_g3_i5	ref XP_006466281.1  PREDICTED: classical arabinogalactan protein 2 [Citrus sinensis]
c30095_g2_i16	ref XP_006426126.1  hypothetical protein CICLE_v10026719mg [Citrus clementina] ref XP_006466433.1  PREDICTED: 60S ribosomal protein L26-1 [Citrus sinensis] gb ESR39366.1  hypothetical protein CICLE_v10026719mg [Citrus clementina] gb KDO78878.1  hypothetical protein CISIN_1g032182mg [Citrus sinensis]
c30167_g1_i1	gb KDO66718.1  hypothetical protein CISIN_1g000597mg [Citrus sinensis]
c30249_g5_i7	ref XP_006446171.1  hypothetical protein CICLE_v10015158mg [Citrus clementina] ref XP_006446172.1  hypothetical protein CICLE_v10015158mg [Citrus clementina] ref XP_006446173.1  hypothetical protein CICLE_v10015158mg [Citrus clementina]
c30259_g1_i3	ref XP_002313223.1  hypothetical protein POPTR_0009s08090g [Populus trichocarpa] gb EEE87178.1  hypothetical protein POPTR_0009s08090g [Populus trichocarpa]
c30277_g1_i3	ref XP_006491853.1  PREDICTED: probable helicase MAGATAMA 3 isoform X1 [Citrus sinensis] ref XP_006491854.1  PREDICTED: probable helicase MAGATAMA 3 isoform X1 [Citrus sinensis]
c30303_g1_i9	ref XP_008236165.2  PREDICTED: squalene monooxygenase-like [Prunus mume]

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c30475_g6_i4	ref XP_006432164.1  hypothetical protein CICLE_v10002244mg [Citrus clementina] ref XP_006432165.1  hypothetical protein CICLE_v10002244mg [Citrus clementina] ref XP_006465066.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102630478 isoform X1 [Citrus sinensis] gb ESR45404.1  hypothetical protein CICLE_v10002244mg [Citrus clementina] gb ESR45405.1  hypothetical protein CICLE_v10002244mg [Citrus clementina]
c30476_g1_i2	ref XP_006425822.1  hypothetical protein CICLE_v10027285mg, partial [Citrus clementina] gb ESR39062.1  hypothetical protein CICLE_v10027285mg, partial [Citrus clementina]
c30476_g1_i3	ref XP_006425822.1  hypothetical protein CICLE_v10027285mg, partial [Citrus clementina] gb ESR39062.1  hypothetical protein CICLE_v10027285mg, partial [Citrus clementina]
c30493_g3_i3	ref XP_012078036.1  PREDICTED: 2-hydroxyacyl-CoA lyase [Jatropha curcas] gb KDP33027.1  hypothetical protein JCGZ_13058 [Jatropha curcas]
c30539_g3_i7	ref XP_006429012.1  hypothetical protein CICLE_v10011464mg [Citrus clementina] ref XP_006429013.1  hypothetical protein CICLE_v10011464mg [Citrus clementina] gb ESR42252.1  hypothetical protein CICLE_v10011464mg [Citrus clementina] gb ESR42253.1  hypothetical protein CICLE_v10011464mg [Citrus clementina]
c30615_g1_i3	ref XP_006429895.1  hypothetical protein CICLE_v10011813mg [Citrus clementina] ref XP_006492846.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102622440 [Citrus sinensis] gb ESR43135.1  hypothetical protein CICLE_v10011813mg [Citrus clementina] gb KDO70902.1  hypothetical protein CISIN_1g014562mg [Citrus sinensis]
c30664_g4_i7	ref XP_016734461.1  PREDICTED: uncharacterized protein At1g10890-like [Gossypium hirsutum]
c30702_g1_i4	ref XP_006426798.1  hypothetical protein CICLE_v10025334mg [Citrus clementina] gb ESR40038.1  hypothetical protein CICLE_v10025334mg [Citrus clementina]
c30708_g1_i1	ref XP_007928849.1  hypothetical protein MYCFIDRAFT_54532 [Cercospora fijiensis CIRAD86] gb EME80501.1  hypothetical protein MYCFIDRAFT_54532 [Cercospora fijiensis CIRAD86]
c30708_g1_i11	gb KOS36100.1  hypothetical protein ACN38_g13205 [Penicillium nordicum] gb KUM55552.1  hypothetical protein ACN42_g11702 [Penicillium freii]
c30708_g2_i1	no hits found
c30783_g1_i4	ref XP_006485676.1  PREDICTED: malate dehydrogenase, mitochondrial [Citrus sinensis] gb KDO48349.1  hypothetical protein CISIN_1g018314mg [Citrus sinensis]
c30945_g3_i3	ref XP_006422699.1  hypothetical protein CICLE_v10029851mg [Citrus clementina] gb ESR35939.1  hypothetical protein CICLE_v10029851mg [Citrus clementina]
c30954_g1_i2	ref XP_006428637.1  hypothetical protein CICLE_v10012249mg [Citrus clementina] ref XP_006480456.1  PREDICTED: luc7-like protein [Citrus sinensis] gb ESR41877.1  hypothetical protein CICLE_v10012249mg [Citrus clementina]
c31142_g1_i7	gb KDO55145.1  hypothetical protein CISIN_1g005386mg [Citrus sinensis] gb KDO55146.1  hypothetical protein CISIN_1g005386mg [Citrus sinensis]
c31157_g1_i3	ref XP_006478019.1  PREDICTED: BTB/POZ domain-containing protein At1g04390 isoform X1 [Citrus sinensis]
c31172_g2_i7	ref XP_015874684.1  PREDICTED: 26S protease regulatory subunit 6B homolog [Ziziphus jujuba]
c31208_g1_i8	ref XP_006450196.1  hypothetical protein CICLE_v10007223mg [Citrus clementina] gb ESR63436.1  hypothetical protein CICLE_v10007223mg [Citrus clementina]
c31238_g1_i2	ref XP_006470807.1  PREDICTED: protein STICHEL [Citrus sinensis]

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c31248_g1_i6	gb KDO65276.1  hypothetical protein CISIN_1g002867mg [Citrus sinensis]
c31352_g2_i6	gb KDO70146.1  hypothetical protein CISIN_1g048747mg, partial [Citrus sinensis]
c31463_g1_i4	gb KDO50106.1  hypothetical protein CISIN_1g000334mg [Citrus sinensis]
c31473_g3_i1	emb CCL55187.1  conserved hypothetical protein [Clostridium difficile E14]
c31473_g3_i4	gb KRH17836.1  hypothetical protein GLYMA_13G020100 [Glycine max]
c31473_g3_i6	ref XP_017630340.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC108473348 [Gossypium arboreum]
c31473_g4_i1	gb EGC42647.1  transcript antisense to ribosomal RNA protein, partial [Histoplasma capsulatum H88]
c31552_g1_i4	dbj BAD83547.2  hypothetical protein, partial (mitochondrion) [Nicotiana tabacum]
c31554_g1_i3	gb KDO47002.1  hypothetical protein CISIN_1g008200mg [Citrus sinensis]
c31600_g3_i1	ref XP_006478453.1  PREDICTED: SCY1-like protein 2 [Citrus sinensis]
c31618_g2_i4	ref XP_010106597.1  hypothetical protein L484_002552 [Morus notabilis] gb EXC10888.1  hypothetical protein L484_002552 [Morus notabilis]
c31618_g2_i5	ref XP_002425519.1  conserved hypothetical protein [Pediculus humanus corporis] gb EEB12781.1  conserved hypothetical protein [Pediculus humanus corporis]
c31632_g1_i2	gb KDO42444.1  hypothetical protein CISIN_1g039882mg, partial [Citrus sinensis]
c31700_g4_i1	no hits found
c31700_g4_i2	no hits found
c3180_g1_i1	no hits found
c40853_g1_i1	gb ABK21482.1  unknown [Picea sitchensis]
c4543_g1_i1	gb KPI91794.1  Apolipoprotein D [Papilio xuthus]
c4843_g1_i2	no hits found
c635_g1_i1	ref XP_002515493.1  PREDICTED: 14 kDa proline-rich protein DC2.15 [Ricinus communis] gb EEF46942.1  14 kDa proline-rich protein DC2.15 precursor, putative [Ricinus communis]
c7172_g1_i1	no hits found

**Anexo B –** Relação do total de genes *Up* regulados do tratamento GO 6 das sementes envelhecidas de *A. fraxinifolium*.

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c12237_g1_i3	ref XP_017980686.1  PREDICTED: probable sugar phosphate/phosphate translocator At3g14410 [Theobroma cacao] ref XP_017980687.1  PREDICTED: probable sugar phosphate/phosphate translocator At3g14410 [Theobroma cacao] ref XP_017980688.1  PREDICTED: probable sugar phosphate/phosphate translocator At3g14410 [Theobroma cacao]
c17616_g2_i1	ref XP_006438697.1  hypothetical protein CICLE_v10032651mg [Citrus clementina] gb ESR51937.1  hypothetical protein CICLE_v10032651mg [Citrus clementina]
c19483_g1_i1	ref XP_014499715.1  PREDICTED: proteasome subunit beta type-3-A [Vigna radiata var. radiata]
c19669_g1_i1	ref XP_006425685.1  hypothetical protein CICLE_v10026748mg [Citrus clementina] ref XP_006466787.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102624721 [Citrus sinensis] gb ESR38925.1  hypothetical protein CICLE_v10026748mg [Citrus clementina] gb KDO79533.1  hypothetical protein CISIN_1g046060mg [Citrus sinensis]

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c20463_g1_i1	ref XP_002301424.2  AAA-type ATPase family protein [Populus trichocarpa] gb EEE80697.2  AAA-type ATPase family protein [Populus trichocarpa]
c21040_g1_i4	ref XP_012064680.1  PREDICTED: superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplastic isoform X2 [Jatropha curcas]
c21204_g1_i1	ref XP_006472515.1  PREDICTED: serine/threonine-protein kinase-like protein At1g28390 isoform X1 [Citrus sinensis]
c22122_g1_i1	ref XP_006450710.1  hypothetical protein CICLE_v10008638mg [Citrus clementina] gb ESR63950.1  hypothetical protein CICLE_v10008638mg [Citrus clementina]
c22543_g3_i1	ref XP_006482536.1  PREDICTED: mitochondrial outer membrane protein porin of 34 kDa [Citrus sinensis]
c22607_g1_i2	ref XP_006481904.1  PREDICTED: histone deacetylase HDT1 isoform X2 [Citrus sinensis]
c22639_g1_i5	ref XP_003607876.1  phloem protein [Medicago truncatula] gb AES90073.1  phloem protein [Medicago truncatula] gb AFK38923.1  unknown [Medicago truncatula]
c23369_g1_i1	ref XP_006425270.1  hypothetical protein CICLE_v10025677mg [Citrus clementina] gb ESR38510.1  hypothetical protein CICLE_v10025677mg [Citrus clementina]
c23433_g1_i3	ref XP_006483921.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102606970 [Citrus sinensis]
c23434_g1_i2	ref XP_006473976.1  PREDICTED: NADP-dependent glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase [Citrus sinensis] gb KDO59413.1  hypothetical protein CISIN_1g010963mg [Citrus sinensis]
c24209_g1_i2	ref XP_006423375.1  hypothetical protein CICLE_v10029285mg [Citrus clementina] gb ESR36615.1  hypothetical protein CICLE_v10029285mg [Citrus clementina]
c24621_g1_i2	gb KDO76694.1  hypothetical protein CISIN_1g018508mg [Citrus sinensis]
c24701_g3_i3	ref XP_016740977.1  PREDICTED: zinc finger BED domain-containing protein RICESLEEPER 2-like [Gossypium hirsutum] ref XP_016742294.1  PREDICTED: zinc finger BED domain-containing protein RICESLEEPER 2-like [Gossypium hirsutum]
c24958_g1_i6	ref XP_006464430.1  PREDICTED: COP9 signalosome complex subunit 7 isoform X2 [Citrus sinensis] gb KDO85517.1  hypothetical protein CISIN_1g024854mg [Citrus sinensis]
c25245_g2_i3	gb KDO61275.1  hypothetical protein CISIN_1g014513mg [Citrus sinensis]
c25473_g1_i2	ref XP_012071453.1  PREDICTED: RNA-dependent RNA polymerase 6-like [Jatropha curcas] gb KDP38635.1  hypothetical protein JCGZ_03988 [Jatropha curcas]
c25539_g1_i3	ref XP_006450932.1  hypothetical protein CICLE_v10009114mg [Citrus clementina] gb ESR64172.1  hypothetical protein CICLE_v10009114mg [Citrus clementina]
c25621_g4_i8	gb KDO42130.1  hypothetical protein CISIN_1g011622mg [Citrus sinensis]
c25628_g1_i2	ref XP_006489329.1  PREDICTED: uncharacterized GPI-anchored protein At3g06035-like [Citrus sinensis]
c25874_g2_i7	ref XP_006487024.1  PREDICTED: phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3phosphatase and protein-tyrosine-phosphatase PTEN2A [Citrus sinensis] ref XP_006487025.1  PREDICTED: phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3phosphatase and protein-tyrosine-phosphatase PTEN2A [Citrus sinensis]
c25894_g1_i1	ref XP_002308448.2  alcohol dehydroge family protein [Populus trichocarpa] gb EEE91971.2  alcohol dehydroge family protein [Populus trichocarpa]
c25902_g2_i1	ref XP_015387240.1  PREDICTED: (-)-isopiperitenol/(-)-carveol



ID	NR_Top_BLASTX_hit
	dehydrogenase, mitochondrial-like isoform X1 [Citrus sinensis] gb KDO61663.1  hypothetical protein CISIN_1g041914mg [Citrus sinensis]
c26088_g1_i7	ref XP_010258036.1  PREDICTED: ninja-family protein AFP3 [Nelumbo nucifera]
c26217_g1_i1	gb OAY22343.1  hypothetical protein MANES_S008600 [Manihot esculenta]
c26248_g1_i1	gb EOY30311.1  Mechanosensitive channel of small conductance-like 10, putative isoform 2 [Theobroma cacao]
c26312_g1_i2	ref XP_006449270.1  hypothetical protein CICLE_v10017033mg [Citrus clementina] ref XP_006467858.1  PREDICTED: uncharacterized protein At5g65660 [Citrus sinensis] gb ESR62510.1  hypothetical protein CICLE_v10017033mg [Citrus clementina]
c26328_g3_i4	ref XP_006443835.1  hypothetical protein CICLE_v10024065mg [Citrus clementina] gb ESR57075.1  hypothetical protein CICLE_v10024065mg [Citrus clementina]
c26540_g1_i6	ref XP_006488876.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102628873 [Citrus sinensis] ref XP_015388989.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102628873 [Citrus sinensis]
c26617_g1_i2	ref XP_017976114.1  PREDICTED: uncharacterized acetyltransferase At3g50280 [Theobroma cacao] gb EOX91480.1  HXXXD-type acyl-transferase family protein, putative [Theobroma cacao]
c26635_g1_i1	ref XP_017977235.1  PREDICTED: trafficking protein particle complex subunit 8 isoform X2 [Theobroma cacao]
c26655_g2_i11	gb KDO82191.1  hypothetical protein CISIN_1g006587mg [Citrus sinensis]
c26655_g2_i3	gb KDO82194.1  hypothetical protein CISIN_1g006587mg [Citrus sinensis]
c26737_g1_i2	ref XP_006445135.1  hypothetical protein CICLE_v10020664mg [Citrus clementina] gb ESR58375.1  hypothetical protein CICLE_v10020664mg [Citrus clementina]
c26820_g1_i6	ref XP_003631572.1  PREDICTED: putative amidase C869.01 [Vitis vinifera]
c26866_g2_i1	ref XP_006438677.1  hypothetical protein CICLE_v10030989mg [Citrus clementina] ref XP_006483161.1  PREDICTED: probable methyltransferase PMT2 [Citrus sinensis] gb ESR51917.1  hypothetical protein CICLE_v10030989mg [Citrus clementina]
c26870_g1_i2	ref XP_006476984.1  PREDICTED: uncharacterized protein DDB_G0284459 isoform X1 [Citrus sinensis]
c26919_g2_i3	gb KDO87133.1  hypothetical protein CISIN_1g028425mg [Citrus sinensis] gb KDO87134.1  hypothetical protein CISIN_1g028425mg [Citrus sinensis]
c27001_g1_i3	gb KDO46778.1  hypothetical protein CISIN_1g045708mg [Citrus sinensis]
c27041_g1_i6	gb KDO68901.1  hypothetical protein CISIN_1g002690mg [Citrus sinensis]
c27045_g3_i8	ref XP_006435470.1  hypothetical protein CICLE_v10000595mg [Citrus clementina] gb ESR48710.1  hypothetical protein CICLE_v10000595mg [Citrus clementina] gb KDO85269.1  hypothetical protein CISIN_1g006964mg [Citrus sinensis] gb KDO85270.1  hypothetical protein CISIN_1g006964mg [Citrus sinensis]
c27057_g1_i9	gb KCW88608.1  hypothetical protein EUGRSUZ_A009811, partial [Eucalyptus grandis]
c27132_g4_i4	ref XP_006481501.1  PREDICTED: nicalin-1 [Citrus sinensis]
c27280_g4_i8	ref XP_006420702.1  hypothetical protein CICLE_v10004398mg [Citrus clementina] gb ESR33942.1  hypothetical protein CICLE_v10004398mg [Citrus clementina]

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c27506_g3_i1	ref XP_006450858.1  hypothetical protein CICLE_v10007603mg [Citrus clementina] ref XP_006475909.1  PREDICTED: ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 4, mitochondrial [Citrus sinensis] gb ESR64098.1  hypothetical protein CICLE_v10007603mg [Citrus clementina] gb KDO80126.1  hypothetical protein CISIN_1g005066mg [Citrus sinensis]
c27601_g3_i1	ref XP_006451215.1  hypothetical protein CICLE_v10009504mg [Citrus clementina] ref XP_006451216.1  hypothetical protein CICLE_v10009504mg [Citrus clementina] ref XP_006475671.1  PREDICTED: DNA-directed RNA polymerases II and IV subunit 5A [Citrus sinensis] ref XP_006475672.1  PREDICTED: DNA-directed RNA polymerases II and IV subunit 5A [Citrus sinensis] gb ESR64455.1  hypothetical protein CICLE_v10009504mg [Citrus clementina] gb ESR64456.1  hypothetical protein CICLE_v10009504mg [Citrus clementina]
c27715_g4_i1	ref XP_006423339.1  hypothetical protein CICLE_v10028331mg [Citrus clementina] gb ESR36579.1  hypothetical protein CICLE_v10028331mg [Citrus clementina]
c27739_g2_i4	ref XP_006452583.1  hypothetical protein CICLE_v10007691mg [Citrus clementina] ref XP_006452584.1  hypothetical protein CICLE_v10007691mg [Citrus clementina] ref XP_006452585.1  hypothetical protein CICLE_v10007691mg [Citrus clementina]
c27741_g1_i4	ref XP_006470158.1  PREDICTED: 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 homolog A [Citrus sinensis]
c27872_g1_i2	gb AI199806.1  gigantea [Dimocarpus longan]
c27884_g1_i3	ref XP_006443945.1  hypothetical protein CICLE_v10019453mg [Citrus clementina] ref XP_006479617.1  PREDICTED: pyruvate kinase isozyme A, chloroplastic-like [Citrus sinensis] gb ESR57185.1  hypothetical protein CICLE_v10019453mg [Citrus clementina]
c28036_g1_i2	gb KDO71861.1  hypothetical protein CISIN_1g008389mg [Citrus sinensis]
c28097_g1_i1	ref XP_006472181.1  PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein At1g09190 [Citrus sinensis]
c28126_g1_i3	gb KDO68695.1  hypothetical protein CISIN_1g000404mg [Citrus sinensis]
c28153_g3_i6	ref XP_010263896.1  PREDICTED: fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic [Nelumbo nucifera]
c28237_g1_i2	ref XP_006443392.1  hypothetical protein CICLE_v10018788mg [Citrus clementina] ref XP_006479084.1  PREDICTED: general negative regulator of transcription subunit 3 isoform X1 [Citrus sinensis] gb ESR56632.1  hypothetical protein CICLE_v10018788mg [Citrus clementina]
c28350_g5_i4	ref XP_007037609.1  PREDICTED: ABC transporter B family member 25 [Theobroma cacao] ref XP_017973989.1  PREDICTED: ABC transporter B family member 25 [Theobroma cacao] ref XP_017973990.1  PREDICTED: ABC transporter B family member 25 [Theobroma cacao] gb EOY22109.1  Transporter associated with antigen processing protein 2 isoform 1 [Theobroma cacao] gb EOY22110.1  Transporter associated with antigen processing protein 2 isoform 1 [Theobroma cacao] gb EOY22111.1  Transporter associated with antigen processing protein 2 isoform 1 [Theobroma cacao]
c28365_g1_i1	gb KDO65524.1  hypothetical protein CISIN_1g008807mg [Citrus sinensis]
c28388_g3_i6	ref XP_006430577.1  hypothetical protein CICLE_v10011792mg [Citrus clementina] gb ESR43817.1  hypothetical protein CICLE_v10011792mg [Citrus clementina]
c28411_g2_i7	ref XP_006438410.1  hypothetical protein CICLE_v10030647mg [Citrus clementina] ref XP_006438413.1  hypothetical protein CICLE_v10030647mg [Citrus clementina] ref XP_015387390.1  PREDICTED: RNA-binding protein 25 isoform X2 [Citrus sinensis] ref XP_015387391.1  PREDICTED: RNA-binding protein 25 isoform X2 [Citrus sinensis] gb ESR51650.1  hypothetical protein

ID	NR_Top_BLASTX_hit
	CICLE_v10030647mg [Citrus clementina] gb ESR51653.1  hypothetical protein CICLE_v10030647mg [Citrus clementina] gb KDO82458.1  hypothetical protein CISIN_1g002335mg [Citrus sinensis]
c28531_g1_i4	ref XP_009365586.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC103955420 [Pyrus x bretschneideri]
c28547_g2_i15	gb AJD87509.1  embryonic flower 2a [Dimocarpus longan]
c28563_g1_i3	ref XP_006476575.2  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102610276 [Citrus sinensis]
c28578_g1_i1	ref XP_006479204.1  PREDICTED: serine/threonine-protein kinase MHK [Citrus sinensis] ref XP_015386141.1  PREDICTED: serine/threonine-protein kinase MHK [Citrus sinensis] ref XP_015386142.1  PREDICTED: serine/threonine-protein kinase MHK [Citrus sinensis]
c28580_g3_i1	gb AAC41680.1  protein kinase p34cdc2 [Petroselinum crispum]
c28599_g8_i10	ref XP_006453219.1  hypothetical protein CICLE_v10007305mg [Citrus clementina] ref XP_006474293.1  PREDICTED: calcium-transporting ATPase 8, plasma membrane-type [Citrus sinensis] ref XP_006474294.1  PREDICTED: calcium-transporting ATPase 8, plasma membrane-type [Citrus sinensis] ref XP_006474295.1  PREDICTED: calcium-transporting ATPase 8, plasma membrane-type [Citrus sinensis] ref XP_006474296.1  PREDICTED: calciumtransporting ATPase 8, plasma membrane-type [Citrus sinensis] ref XP_006474297.1  PREDICTED: calcium-transporting ATPase 8, plasma membrane-type [Citrus sinensis] ref XP_006474298.1  PREDICTED: calciumtransporting ATPase 8, plasma membrane-type [Citrus sinensis] ref XP_015384503.1  PREDICTED: calcium-transporting ATPase 8, plasma membrane-type [Citrus sinensis] gb ESR66459.1  hypothetical protein CICLE_v10007305mg [Citrus clementina]
c28679_g3_i1	ref XP_010673168.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC104889608 [Beta vulgaris subsp. vulgaris]
c28773_g1_i12	ref XP_009395339.1  PREDICTED: cell division control protein 2 homolog [Musa acuminata subsp. malaccensis]
c28773_g1_i2	ref XP_006429284.1  hypothetical protein CICLE_v10013703mg [Citrus clementina] gb ESR42524.1  hypothetical protein CICLE_v10013703mg [Citrus clementina]
c28773_g1_i3	no hits found
c28870_g2_i1	ref XP_004140112.1  PREDICTED: phospholipase A1-IIgamma [Cucumis sativus] gb KGN47948.1  hypothetical protein Csa_6G419450 [Cucumis sativus]
c28887_g2_i4	gb EOY12548.1  Translation initiation factor SUI1 family protein, putative [Theobroma cacao]
c28988_g1_i2	ref XP_006467127.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102618464 [Citrus sinensis]
c28997_g4_i6	ref XP_015385348.1  PREDICTED: putative uncharacterized protein DDB_G0272456 [Citrus sinensis]
c29002_g3_i12	gb KDO43903.1  hypothetical protein CISIN_1g0086951mg, partial [Citrus sinensis]
c29061_g1_i1	ref XP_006470234.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102616162 [Citrus sinensis]
c29109_g2_i2	ref XP_006427460.1  hypothetical protein CICLE_v10025249mg [Citrus clementina] ref XP_006427461.1  hypothetical protein CICLE_v10025249mg [Citrus clementina] gb ESR40700.1  hypothetical protein CICLE_v10025249mg [Citrus clementina] gb ESR40701.1  hypothetical protein CICLE_v10025249mg [Citrus clementina]
c29111_g2_i10	ref XP_006485746.1  PREDICTED: transcription initiation factor TFIID subunit 2 [Citrus sinensis]

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c29128_g5_i4	ref XP_006427858.1  hypothetical protein CICLE_v10026233mg [Citrus clementina] ref XP_006464568.1  PREDICTED: 50S ribosomal protein L15 [Citrus sinensis] gb ESR41098.1  hypothetical protein CICLE_v10026233mg [Citrus clementina]
c29179_g1_i7	ref XP_006432245.1  hypothetical protein CICLE_v10000085mg [Citrus clementina] ref XP_006464641.1  PREDICTED: phosphatidylinositol 4-kinase beta 1-like isoform X1 [Citrus sinensis] gb ESR45485.1  hypothetical protein CICLE_v10000085mg [Citrus clementina]
c29338_g1_i6	ref XP_006428185.1  hypothetical protein CICLE_v10024720mg [Citrus clementina] ref XP_006464227.1  PREDICTED: ABC transporter D family member 1 isoform X1 [Citrus sinensis] ref XP_015382798.1  PREDICTED: ABC transporter D family member 1 isoform X2 [Citrus sinensis] ref XP_015382809.1  PREDICTED: ABC transporter D family member 1 isoform X3 [Citrus sinensis] gb ESR41425.1  hypothetical protein CICLE_v10024720mg [Citrus clementina]
c29350_g2_i1	gb KDO61351.1  hypothetical protein CISIN_1g027940mg [Citrus sinensis] gb KDO61352.1  hypothetical protein CISIN_1g027940mg [Citrus sinensis]
c29351_g4_i1	gb ADD54644.1  peroxidase [Bruguiera gymnorhiza]
c29413_g3_i6	ref XP_017983631.1  PREDICTED: transcription factor Pur-alpha 1 [Theobroma cacao]
c29592_g4_i8	ref XP_012067355.1  PREDICTED: histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-9 specific SUVH4 isoform X3 [Jatropha curcas] gb KDP41858.1  hypothetical protein JCGZ_26876 [Jatropha curcas]
c29613_g1_i2	ref XP_006477702.1  PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein PNM1, mitochondrial [Citrus sinensis]
c29637_g2_i1	gb KDO78602.1  hypothetical protein CISIN_1g014532mg [Citrus sinensis]
c29650_g1_i7	ref XP_006419804.1  hypothetical protein CICLE_v10004788mg [Citrus clementina] gb ESR33044.1  hypothetical protein CICLE_v10004788mg [Citrus clementina] gb KDO74825.1  hypothetical protein CISIN_1g010325mg [Citrus sinensis]
c29673_g2_i15	no hits found
c29703_g1_i2	gb KDO46042.1  hypothetical protein CISIN_1g015786mg [Citrus sinensis] gb KDO46043.1  hypothetical protein CISIN_1g015786mg [Citrus sinensis]
c29780_g1_i11	ref XP_012084543.1  PREDICTED: subtilisin-like protease SBT2.5 [Jatropha curcas] ref XP_012084544.1  PREDICTED: subtilisin-like protease SBT2.5 [Jatropha curcas]
c29788_g1_i1	gb KJB21065.1  hypothetical protein B456_003G181400 [Gossypium raimondii]
c29857_g1_i3	ref XP_006468281.1  PREDICTED: cation-chloride cotransporter 1 [Citrus sinensis] emb CBJ19439.1  cation chloride cotransporter [Citrus clementina]
c29866_g1_i4	ref XP_006451747.1  hypothetical protein CICLE_v10007809mg [Citrus clementina] ref XP_006494847.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102612450 [Citrus sinensis] gb ESR64987.1  hypothetical protein CICLE_v10007809mg [Citrus clementina] gb KDO58493.1  hypothetical protein CISIN_1g048038mg [Citrus sinensis]
c29874_g2_i9	ref XP_006445380.1  hypothetical protein CICLE_v10018658mg [Citrus clementina] ref XP_006464455.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102610616 [Citrus sinensis] ref XP_006464456.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102610616 [Citrus sinensis] gb ESR58620.1  hypothetical protein CICLE_v10018658mg [Citrus clementina] gb KDO85575.1  hypothetical protein CISIN_1g001712mg [Citrus sinensis] gb KDO85576.1  hypothetical protein CISIN_1g001712mg [Citrus sinensis] gb KDO85577.1  hypothetical protein CISIN_1g001712mg [Citrus sinensis]
c29924_g1_i3	no hits found
c30015_g1_i13	ref XP_002283855.1  PREDICTED: glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 1 [Vitis vinifera]

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c30017_g4_i1	gb KDO51260.1  hypothetical protein CISIN_1g001975mg [Citrus sinensis] gb KDO51261.1  hypothetical protein CISIN_1g001975mg [Citrus sinensis]
c30020_g1_i5	gb KDO64178.1  hypothetical protein CISIN_1g007535mg [Citrus sinensis]
c30055_g2_i5	emb CAA79329.1  BP8 [Betula pendula]
c30055_g2_i6	emb CAA79329.1  BP8 [Betula pendula]
c30055_g2_i8	emb CAA79329.1  BP8 [Betula pendula]
c30056_g5_i4	gb EOY32945.1  Ubiquitin-associated/translation elongation factor EF1B protein [Theobroma cacao]
c30056_g7_i2	ref XP_006474562.1  PREDICTED: 1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5kinase FAB1A-like [Citrus sinensis] ref XP_006474563.1  PREDICTED: 1phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase FAB1A-like [Citrus sinensis] ref XP_015384490.1  PREDICTED: 1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase FAB1A-like [Citrus sinensis] ref XP_015384491.1  PREDICTED: 1phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase FAB1A-like [Citrus sinensis]
c30056_g7_i7	ref XP_006474562.1  PREDICTED: 1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5kinase FAB1A-like [Citrus sinensis] ref XP_006474563.1  PREDICTED: 1phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase FAB1A-like [Citrus sinensis] ref XP_015384490.1  PREDICTED: 1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase FAB1A-like [Citrus sinensis] ref XP_015384491.1  PREDICTED: 1phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase FAB1A-like [Citrus sinensis]
c30088_g1_i5	ref XP_006447134.1  hypothetical protein CICLE_v10014955mg [Citrus clementina] ref XP_006447135.1  hypothetical protein CICLE_v10014955mg [Citrus clementina] ref XP_006447136.1  hypothetical protein CICLE_v10014955mg [Citrus clementina] ref XP_006470001.1  PREDICTED: histone-lysine N-methyltransferase setd3 isoform X2 [Citrus sinensis] gb ESR60374.1  hypothetical protein CICLE_v10014955mg [Citrus clementina] gb ESR60375.1  hypothetical protein CICLE_v10014955mg [Citrus clementina] gb ESR60376.1  hypothetical protein CICLE_v10014955mg [Citrus clementina]
c30144_g2_i4	ref XP_015874162.1  PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein At3g62890-like [Ziziphus jujuba]
c30167_g1_i4	gb KDO66718.1  hypothetical protein CISIN_1g000597mg [Citrus sinensis]
c30188_g1_i10	ref XP_015384055.1  PREDICTED: serine/threonine-protein kinase CTR1 isoform X2 [Citrus sinensis]
c30188_g1_i3	ref XP_015384055.1  PREDICTED: serine/threonine-protein kinase CTR1 isoform X2 [Citrus sinensis]
c30283_g2_i3	gb EOX92539.1  SEUSS transcriptional co-regulator isoform 1 [Theobroma cacao]
c30303_g1_i5	ref XP_008236165.2  PREDICTED: squalene monooxygenase-like [Prunus mume]
c30343_g2_i1	gb KDO86954.1  hypothetical protein CISIN_1g000982mg [Citrus sinensis]
c30343_g2_i3	ref XP_006492355.1  PREDICTED: nodal modulator 3 isoform X2 [Citrus sinensis] gb KDO86957.1  hypothetical protein CISIN_1g000982mg [Citrus sinensis]
c30362_g1_i5	ref XP_006445920.1  hypothetical protein CICLE_v10014393mg [Citrus clementina] gb ESR59160.1  hypothetical protein CICLE_v10014393mg [Citrus clementina]
c30386_g1_i6	emb CAN74303.1  hypothetical protein VITISV_032980 [Vitis vinifera]
c30402_g1_i1	ref XP_006427303.1  hypothetical protein CICLE_v10024867mg [Citrus clementina] gb ESR40543.1  hypothetical protein CICLE_v10024867mg [Citrus clementina]
c30403_g1_i4	gb KDO83872.1  hypothetical protein CISIN_1g009257mg [Citrus sinensis]

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c30405_g1_i4	ref XP_006471920.1  PREDICTED: multisubstrate pseudouridine synthase 7 [Citrus sinensis] ref XP_015383946.1  PREDICTED: multisubstrate pseudouridine synthase 7 [Citrus sinensis] ref XP_015383947.1  PREDICTED: multisubstrate pseudouridine synthase 7 [Citrus sinensis]
c30426_g3_i3	ref XP_006447133.1  hypothetical protein CICLE_v10014804mg [Citrus clementina] ref XP_006470006.1  PREDICTED: 4-coumarate--CoA ligase-like 9 [Citrus sinensis] gb ESR60373.1  hypothetical protein CICLE_v10014804mg [Citrus clementina]
c30476_g1_i8	ref XP_002320850.2  nodulin 25 family protein [Populus trichocarpa] gb EEE99165.2  nodulin 25 family protein [Populus trichocarpa]
c30495_g3_i3	ref XP_007030571.1  PREDICTED: transcription factor UNE12 isoform X1 [Theobroma cacao] gb EOY11073.1  Basic helix-loop-helix DNA-binding superfamily protein [Theobroma cacao]
c30533_g3_i6	ref XP_006444616.1  hypothetical protein CICLE_v10019765mg [Citrus clementina] ref XP_006492422.1  PREDICTED: proline--tRNA ligase,
	cytoplasmic [Citrus sinensis] gb ESR57856.1  hypothetical protein CICLE_v10019765mg [Citrus clementina] gb KDO86777.1  hypothetical protein CISIN_1g010398mg [Citrus sinensis] gb KDO86778.1  hypothetical protein CISIN_1g010398mg [Citrus sinensis] gb KDO86779.1  hypothetical protein CISIN_1g010398mg [Citrus sinensis]
c30555_g2_i6	ref XP_006448190.1  hypothetical protein CICLE_v10014030mg [Citrus clementina] gb ESR61430.1  hypothetical protein CICLE_v10014030mg [Citrus clementina]
c30664_g4_i6	ref XP_016734461.1  PREDICTED: uncharacterized protein At1g10890-like [Gossypium hirsutum]
c30736_g1_i10	ref XP_006434103.1  hypothetical protein CICLE_v10000027mg [Citrus clementina] gb ESR47343.1  hypothetical protein CICLE_v10000027mg [Citrus clementina]
c30770_g2_i1	gb AKE49464.1  NBS-LRR disease resistance protein NBS49 [Dimocarpus longan]
c30837_g4_i3	gb OAY62460.1  hypothetical protein MANES_01G269900 [Manihot esculenta] gb OAY62461.1  hypothetical protein MANES_01G269900 [Manihot esculenta]
c30877_g1_i7	ref XP_006434296.1  hypothetical protein CICLE_v10000009mg [Citrus clementina] gb ESR47536.1  hypothetical protein CICLE_v10000009mg [Citrus clementina]
c30905_g4_i8	ref XP_006422384.1  hypothetical protein CICLE_v10028022mg [Citrus clementina] gb ESR35624.1  hypothetical protein CICLE_v10028022mg [Citrus clementina]
c30909_g2_i2	gb KDO70070.1  hypothetical protein CISIN_1g003284mg [Citrus sinensis]
c30950_g1_i10	gb KDO65119.1  hypothetical protein CISIN_1g0004212mg, partial [Citrus sinensis] gb KDO65120.1  hypothetical protein CISIN_1g0004212mg, partial [Citrus sinensis] gb KDO65121.1  hypothetical protein CISIN_1g0004212mg, partial [Citrus sinensis]
c30979_g3_i10	gb KDO38162.1  hypothetical protein CISIN_1g009003mg [Citrus sinensis]
c30986_g1_i2	ref XP_015875103.1  PREDICTED: DNA polymerase zeta catalytic subunit isoform X1 [Ziziphus jujuba]
c31005_g3_i12	ref XP_006451272.1  hypothetical protein CICLE_v10007331mg [Citrus clementina] ref XP_006475557.1  PREDICTED: probable RNA-dependent RNA polymerase 3 isoform X2 [Citrus sinensis] gb ESR64512.1  hypothetical protein CICLE_v10007331mg [Citrus clementina]
c31016_g1_i1	ref XP_006465391.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102618171 [Citrus sinensis]
c31078_g4_i3	gb KDO82475.1  hypothetical protein CISIN_1g000127mg [Citrus sinensis]

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c31142_g1_i14	gb KDO55145.1  hypothetical protein CISIN_1g005386mg [Citrus sinensis] gb KDO55146.1  hypothetical protein CISIN_1g005386mg [Citrus sinensis]
c31147_g1_i3	ref XP_002527308.1  PREDICTED: aquaporin NIP6-1 [Ricinus communis] gb EEF35060.1  Aquaporin NIP1.1, putative [Ricinus communis]
c31172_g2_i1	ref XP_015874684.1  PREDICTED: 26S protease regulatory subunit 6B homolog [Ziziphus jujuba]
c31268_g2_i2	ref XP_006472178.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102616179 [Citrus sinensis]
c31269_g4_i3	gb KDO63773.1  hypothetical protein CISIN_1g015755mg [Citrus sinensis]
c31304_g2_i5	ref XP_015384844.1  PREDICTED: (-)-germacrene D synthase-like isoform X2 [Citrus sinensis]
c31360_g5_i3	ref XP_006473836.1  PREDICTED: dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1A [Citrus sinensis]
c31383_g1_i5	no hits found
c31389_g1_i6	ref XP_006452545.1  hypothetical protein CICLE_v10007688mg [Citrus clementina] ref XP_006474931.1  PREDICTED: DUF21 domain-containing protein At1g55930, chloroplastic-like isoform X1 [Citrus sinensis] gb ESR65785.1  hypothetical protein CICLE_v10007688mg [Citrus clementina]
c31414_g1_i1	gb KDO46755.1  hypothetical protein CISIN_1g038306mg [Citrus sinensis]
c31414_g1_i6	gb KDO46755.1  hypothetical protein CISIN_1g038306mg [Citrus sinensis]
c31417_g2_i4	no hits found
c31565_g1_i4	ref XP_006468637.1  PREDICTED: type II inositol polyphosphate 5phosphatase 15 isoform X1 [Citrus sinensis]
c31569_g1_i3	no hits found
c31639_g1_i1	gb KDO50134.1  hypothetical protein CISIN_1g000138mg [Citrus sinensis]
c3998_g1_i1	no hits found

**Anexo C – Relação do total de genes *Down* regulados do tratamento MG 2 das sementes envelhecidas de *A. fraxinifolium*.**

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c12237_g1_i3	ref XP_017980686.1  PREDICTED: probable sugar phosphate/phosphate translocator At3g14410 [Theobroma cacao] ref XP_017980687.1  PREDICTED: probable sugar phosphate/phosphate translocator At3g14410 [Theobroma cacao] ref XP_017980688.1  PREDICTED: probable sugar phosphate/phosphate translocator At3g14410 [Theobroma cacao]
c29650_g1_i7	ref XP_006419804.1  hypothetical protein CICLE_v10004788mg [Citrus clementina] gb ESR33044.1  hypothetical protein CICLE_v10004788mg [Citrus clementina] gb KDO74825.1  hypothetical protein CISIN_1g010325mg [Citrus sinensis]
c22798_g1_i2	ref XP_006432467.1  hypothetical protein CICLE_v10000355mg [Citrus clementina] gb ESR45707.1  hypothetical protein CICLE_v10000355mg [Citrus clementina]
c24051_g1_i3	ref XP_002533540.1  PREDICTED: protein SPIRAL1-like 1 [Ricinus communis] ref XP_015583469.1  PREDICTED: protein SPIRAL1-like 1 [Ricinus communis] gb EEF28843.1  SP1L, putative [Ricinus communis]
c20285_g1_i3	no hits found
c30545_g1_i5	ref XP_006435077.1  hypothetical protein CICLE_v10000260mg [Citrus clementina] gb ESR48317.1  hypothetical protein CICLE_v10000260mg [Citrus clementina]
c30708_g1_i13	ref XP_007297914.1  hypothetical protein MBM_10038 [Marssonina brunnea f. sp. 'multigermtubi' MB_m1] gb EKD11810.1  hypothetical protein MBM_10038 [Marssonina brunnea f. sp. 'multigermtubi' MB_m1]

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c24391_g1_i1	ref XP_015879295.1  PREDICTED: WD repeat-containing protein 82-like [Ziziphus jujuba] ref XP_015897771.1  PREDICTED: WD repeat-containing protein 82-like [Ziziphus jujuba]
c31142_g1_i14	gb KDO55145.1  hypothetical protein CISIN_1g005386mg [Citrus sinensis] gb KDO55146.1  hypothetical protein CISIN_1g005386mg [Citrus sinensis]
c26084_g1_i2	ref XP_006476059.1  PREDICTED: casein kinase I-like [Citrus sinensis] ref XP_006476060.1  PREDICTED: casein kinase I-like [Citrus sinensis] ref XP_015385044.1  PREDICTED: casein kinase I-like [Citrus sinensis] ref XP_015385045.1  PREDICTED: casein kinase I-like [Citrus sinensis] ref XP_015385046.1  PREDICTED: casein kinase I-like [Citrus sinensis] ref XP_015385047.1  PREDICTED: casein kinase I-like [Citrus sinensis]
c28097_g1_i1	ref XP_006472181.1  PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein At1g09190 [Citrus sinensis]
c31482_g6_i1	gb EHN79822.1  hypothetical protein SMCF_600 [Streptomyces coelicoflavus ZG0656]
c31565_g1_i4	ref XP_006468637.1  PREDICTED: type II inositol polyphosphate 5phosphatase 15 isoform X1 [Citrus sinensis]
c31473_g3_i2	gb KZM80197.1  hypothetical protein DCAR_032322 [Daucus carota subsp. sativus]
c22604_g1_i1	ref XP_015386644.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC107177413 [Citrus sinensis]
c20285_g2_i1	ref XP_007132742.1  hypothetical protein PHAVU_011G1212001g [Phaseolus vulgaris] gb ESW04736.1  hypothetical protein PHAVU_011G1212001g [Phaseolus vulgaris]
c26737_g1_i2	ref XP_006445135.1  hypothetical protein CICLE_v10020664mg [Citrus clementina] gb ESR58375.1  hypothetical protein CICLE_v10020664mg [Citrus clementina]
c22938_g1_i4	ref XP_006435986.1  hypothetical protein CICLE_v10032053mg [Citrus clementina] ref XP_006486104.1  PREDICTED: dolichyl-phosphate betaglycosyltransferase [Citrus sinensis] gb ESR49226.1  hypothetical protein CICLE_v10032053mg [Citrus clementina] gb KDO67618.1  hypothetical protein CISIN_1g019818mg [Citrus sinensis]
c30986_g1_i2	ref XP_015875103.1  PREDICTED: DNA polymerase zeta catalytic subunit isoform X1 [Ziziphus jujuba]
c28587_g2_i5	gb EID19495.1  hypothetical protein HMPREF1043_0707 [Streptococcus anginosus subsp. whileyi CCUG 39159]
c29438_g7_i3	ref XP_006449322.1  hypothetical protein CICLE_v10014972mg [Citrus clementina] gb ESR62562.1  hypothetical protein CICLE_v10014972mg [Citrus clementina]
c28984_g1_i3	ref XP_015384565.1  PREDICTED: 3beta-hydroxysteroid-dehydrogenase/decarboxylase isoform 2 isoform X4 [Citrus sinensis]
c30056_g7_i7	ref XP_006474562.1  PREDICTED: 1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase FAB1A-like [Citrus sinensis] ref XP_006474563.1  PREDICTED: 1phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase FAB1A-like [Citrus sinensis] ref XP_015384490.1  PREDICTED: 1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase FAB1A-like [Citrus sinensis] ref XP_015384491.1  PREDICTED: 1phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase FAB1A-like [Citrus sinensis]
c28704_g3_i1	ref XP_006492756.1  PREDICTED: formin-like protein 2 [Citrus sinensis] ref XP_006492757.1  PREDICTED: formin-like protein 2 [Citrus sinensis]
c29350_g2_i1	gb KDO61351.1  hypothetical protein CISIN_1g027940mg [Citrus sinensis] gb KDO61352.1  hypothetical protein CISIN_1g027940mg [Citrus sinensis]



ID	NR_Top_BLASTX_hit
c20908_g1_i5	ref XP_006420512.1  hypothetical protein CICLE_v10005726mg [Citrus clementina] gb ESR33752.1  hypothetical protein CICLE_v10005726mg [Citrus clementina] gb KDO43052.1  hypothetical protein CISIN_1g025753mg [Citrus sinensis]
c17830_g1_i1	gb KDO73644.1  hypothetical protein CISIN_1g025086mg [Citrus sinensis]
c20285_g1_i1	no hits found
c26635_g1_i1	ref XP_017977235.1  PREDICTED: trafficking protein particle complex subunit 8 isoform X2 [Theobroma cacao]
c31176_g2_i8	ref XP_006471371.1  PREDICTED: DNA polymerase epsilon catalytic subunit A-like [Citrus sinensis]
c29489_g1_i2	ref XP_010649323.1  PREDICTED: protein FAR1-RELATED SEQUENCE 5-like isoform X1 [Vitis vinifera]
c19930_g1_i2	ref XP_006446756.1  hypothetical protein CICLE_v10018336mg [Citrus clementina] gb ESR59996.1  hypothetical protein CICLE_v10018336mg [Citrus clementina]
c31104_g2_i8	ref XP_015381997.1  PREDICTED: putative 1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase FAB1C isoform X2 [Citrus sinensis]
c15514_g1_i1	dbj BAU03542.1  hypothetical protein VIGAN_UM125900 [Vigna angularis var. angularis]
c26643_g1_i2	emb CAJ30045.1  conserved hypothetical protein [Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1] emb CDK99198.1  protein of unknown function [Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1 v2]
c26654_g1_i3	gb KDO80217.1  hypothetical protein CISIN_1g012146mg [Citrus sinensis]
c29188_g3_i3	gb KDO62491.1  hypothetical protein CISIN_1g007884mg [Citrus sinensis]
c29111_g2_i10	ref XP_006485746.1  PREDICTED: transcription initiation factor TFIID subunit 2 [Citrus sinensis]
c25158_g2_i2	ref XP_015879449.1  PREDICTED: tubulin alpha chain [Ziziphus jujuba]
c27190_g4_i4	ref XP_006419550.1  hypothetical protein CICLE_v10004853mg [Citrus clementina] gb ESR32790.1  hypothetical protein CICLE_v10004853mg [Citrus clementina]
c30837_g4_i6	ref XP_006433412.1  hypothetical protein CICLE_v10001108mg [Citrus clementina] ref XP_006472091.1  PREDICTED: tafazzin [Citrus sinensis] gb ESR46652.1  hypothetical protein CICLE_v10001108mg [Citrus clementina]
c30224_g2_i4	gb KDO81021.1  hypothetical protein CISIN_1g002043mg [Citrus sinensis]
c26294_g1_i1	ref XP_007043543.1  PREDICTED: (R,S)-reticuline 7-O-methyltransferase [Theobroma cacao] gb EOX99374.1  O-methyltransferase [Theobroma cacao]
c27880_g2_i1	dbj GAU19291.1  hypothetical protein TSUD_335770 [Trifolium subterraneum]
c29438_g1_i2	gb KDO72102.1  hypothetical protein CISIN_1g004693mg [Citrus sinensis]
c30056_g5_i8	gb OAY58446.1  hypothetical protein MANES_02G178500 [Manihot esculenta]
c29211_g3_i5	ref XP_006450593.1  hypothetical protein CICLE_v10007225mg [Citrus clementina] gb ESR63833.1  hypothetical protein CICLE_v10007225mg [Citrus clementina]
c29114_g2_i8	gb EYU42360.1  hypothetical protein MIMGU_mgv1a003383mg [Erythranthe guttata]
c31639_g1_i1	gb KDO50134.1  hypothetical protein CISIN_1g000138mg [Citrus sinensis]

**Anexo D – Relação do total de genes *Down* regulados do tratamento GO 6 das sementes envelhecidas de *A. fraxinifolium*.**

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c15514_g1_i1	dbj BAU03542.1  hypothetical protein VIGAN_UM125900 [Vigna angularis var. angularis]
c17031_g1_i1	ref XP_010657188.1  PREDICTED: glycine-rich cell wall structural protein-like isoform X1 [Vitis vinifera]
c18236_g1_i1	ref XP_006474757.1  PREDICTED: WPP domain-interacting protein 1-like isoform X1 [Citrus sinensis]
c19899_g1_i2	ref XP_006482842.1  PREDICTED: 30S ribosomal protein 2, chloroplastic [Citrus sinensis]
c20285_g1_i1	no hits found
c20285_g1_i3	no hits found
c20285_g2_i1	ref XP_007132742.1  hypothetical protein PHAVU_011G1212001g [Phaseolus vulgaris] gb ESW04736.1  hypothetical protein PHAVU_011G1212001g [Phaseolus vulgaris]
c20646_g1_i1	ref XP_015874611.1  PREDICTED: laccase-13 isoform X1 [Ziziphus jujuba] ref XP_015874612.1  PREDICTED: laccase-13 isoform X2 [Ziziphus jujuba]
c20908_g1_i3	ref XP_006420512.1  hypothetical protein CICLE_v10005726mg [Citrus clementina] gb ESR33752.1  hypothetical protein CICLE_v10005726mg [Citrus clementina] gb KDO43052.1  hypothetical protein CISIN_1g025753mg [Citrus sinensis]
c21199_g1_i7	ref XP_006423471.1  hypothetical protein CICLE_v10029089mg [Citrus clementina] ref XP_006423472.1  hypothetical protein CICLE_v10029089mg [Citrus clementina] gb ESR36713.1  hypothetical protein CICLE_v10029089mg [Citrus clementina] gb KDO49897.1  hypothetical protein CISIN_1g024887mg [Citrus sinensis] gb KDO49898.1  hypothetical protein CISIN_1g024887mg [Citrus sinensis]
c21777_g1_i4	ref XP_006435073.1  hypothetical protein CICLE_v10000229mg [Citrus clementina] gb ESR48313.1  hypothetical protein CICLE_v10000229mg [Citrus clementina]
c21778_g1_i3	ref XP_012080629.1  PREDICTED: BAH and coiled-coil domain-containing protein 1-like [Jatropha curcas] gb KDP30792.1  hypothetical protein JCGZ_13735 [Jatropha curcas]
c22223_g1_i5	gb KDO64381.1  hypothetical protein CISIN_1g020938mg [Citrus sinensis]
c22279_g1_i1	ref XP_007027837.1  PREDICTED: WD repeat-containing protein LWD1 [Theobroma cacao] gb EOY08339.1  TTG1-like protein [Theobroma cacao]
c22719_g2_i4	gb KDO76652.1  hypothetical protein CISIN_1g004410mg [Citrus sinensis] gb KDO76653.1  hypothetical protein CISIN_1g004410mg [Citrus sinensis] gb KDO76654.1  hypothetical protein CISIN_1g004410mg [Citrus sinensis]
c22875_g1_i4	gb KHN25192.1  hypothetical protein glysoja_044789 [Glycine soja]
c22938_g1_i4	ref XP_006435986.1  hypothetical protein CICLE_v10032053mg [Citrus clementina] ref XP_006486104.1  PREDICTED: dolichyl-phosphate betaglycosyltransferase [Citrus sinensis] gb ESR49226.1  hypothetical protein CICLE_v10032053mg [Citrus clementina] gb KDO67618.1  hypothetical protein CISIN_1g019818mg [Citrus sinensis]
c23158_g1_i8	gb KDO85012.1  hypothetical protein CISIN_1g021623mg [Citrus sinensis]
c23402_g1_i1	dbj GAT20840.1  NADH-cytochrome b5 reductase [Aspergillus luchuensis]
c23413_g3_i7	ref XP_016726717.1  PREDICTED: putative HVA22-like protein g [Gossypium hirsutum] ref XP_017612379.1  PREDICTED: putative HVA22-like protein g [Gossypium arboreum] gb KHG20933.1  HVA22-like protein i [Gossypium arboreum]

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c23445_g1_i11	ref XP_006452883.1  hypothetical protein CICLE_v10007483mg [Citrus clementina] ref XP_006452884.1  hypothetical protein CICLE_v10007483mg [Citrus clementina] ref XP_006452885.1  hypothetical protein CICLE_v10007483mg [Citrus clementina] ref XP_006452886.1  hypothetical protein CICLE_v10007483mg [Citrus clementina]
c23560_g1_i3	gb KDO81950.1  hypothetical protein CISIN_1g005226mg [Citrus sinensis]
c23626_g1_i4	ref XP_007043333.2  PREDICTED: traB domain-containing protein [Theobroma cacao]
c23779_g4_i5	ref XP_006445005.1  hypothetical protein CICLE_v10018794mg [Citrus clementina] ref XP_006491138.1  PREDICTED: protein FAR1-RELATED SEQUENCE 12-like isoform X3 [Citrus sinensis] gb ESR58245.1  hypothetical protein CICLE_v10018794mg [Citrus clementina]
c24185_g1_i5	ref XP_006472249.1  PREDICTED: 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase, chloroplastic-like [Citrus sinensis]
c24381_g1_i4	ref XP_006488802.1  PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein At3g48810 [Citrus sinensis]
c24653_g1_i4	ref XP_006491292.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102626154 [Citrus sinensis] gb KDO86498.1  hypothetical protein CISIN_1g013049mg [Citrus sinensis]
c24710_g1_i3	ref XP_006445149.1  hypothetical protein CICLE_v10019779mg [Citrus clementina] ref XP_006491017.1  PREDICTED: plant UBX domain-containing protein 8 isoform X1 [Citrus sinensis] gb ESR58389.1  hypothetical protein CICLE_v10019779mg [Citrus clementina]
c24744_g1_i3	ref XP_006485418.1  PREDICTED: tobamovirus multiplication protein 2B isoform X1 [Citrus sinensis]
c24769_g1_i1	ref XP_006424754.1  hypothetical protein CICLE_v10028859mg [Citrus clementina] gb ESR37994.1  hypothetical protein CICLE_v10028859mg [Citrus clementina]
c24801_g1_i7	gb EOY21787.1  Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein [Theobroma cacao]
c24887_g1_i11	ref XP_010250184.1  PREDICTED: adenine phosphoribosyltransferase 5 [Nelumbo nucifera] ref XP_010250185.1  PREDICTED: adenine phosphoribosyltransferase 5 [Nelumbo nucifera] ref XP_010250186.1  PREDICTED: adenine phosphoribosyltransferase 5 [Nelumbo nucifera]
c24904_g1_i2	ref XP_017971375.1  PREDICTED: phosphoenolpyruvate carboxylase 4 isoform X2 [Theobroma cacao]
c24946_g1_i4	gb KDP31599.1  hypothetical protein JCGZ_14824 [Jatropha curcas]
c24958_g1_i3	ref XP_006464430.1  PREDICTED: COP9 signalosome complex subunit 7 isoform X2 [Citrus sinensis] gb KDO85517.1  hypothetical protein CISIN_1g024854mg [Citrus sinensis]
c25153_g2_i4	ref XP_006447738.1  hypothetical protein CICLE_v10015084mg [Citrus clementina] ref XP_006469525.1  PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1 [Citrus sinensis] gb ESR60978.1  hypothetical protein CICLE_v10015084mg [Citrus clementina]
c25444_g1_i1	gb KDO70778.1  hypothetical protein CISIN_1g028585mg [Citrus sinensis]
c25621_g4_i3	gb KDO42132.1  hypothetical protein CISIN_1g011622mg [Citrus sinensis]
c25867_g4_i13	gb KDO73449.1  hypothetical protein CISIN_1g008267mg [Citrus sinensis]
c26029_g2_i3	ref XP_007218830.1  hypothetical protein PRUPE_ppa010169mg [Prunus persica] gb EMJ20029.1  hypothetical protein PRUPE_ppa010169mg [Prunus persica]
c26084_g1_i2	ref XP_006476059.1  PREDICTED: casein kinase I-like [Citrus sinensis] ref XP_006476060.1  PREDICTED: casein kinase I-like [Citrus sinensis]

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c26084_g1_i5	ref XP_006476059.1  PREDICTED: casein kinase I-like [Citrus sinensis] ref XP_006476060.1  PREDICTED: casein kinase I-like [Citrus sinensis]
c26173_g1_i5	ref XP_015900607.1  PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein At2g35030, mitochondrial-like [Ziziphus jujuba] ref XP_015869673.1  PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein At2g35030, mitochondrial-like [Ziziphus jujuba] ref XP_015869679.1  PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein At2g35030, mitochondrial-like [Ziziphus jujuba] ref XP_015872496.1  PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein At2g35030, mitochondrial-like [Ziziphus jujuba]
c26241_g6_i5	gb KDO49119.1  hypothetical protein CISIN_1g013061mg [Citrus sinensis]
c26291_g1_i6	ref XP_006473636.1  PREDICTED: 5'-3' exoribonuclease 3 isoform X1 [Citrus sinensis]
c26301_g3_i2	gb EDK23019.1  hypothetical protein RUMTOR_02824 [Ruminococcus torques ATCC 27756]
c26314_g1_i4	gb KDO83010.1  hypothetical protein CISIN_1g010411mg [Citrus sinensis]
c26323_g2_i2	gb KDO58410.1  hypothetical protein CISIN_1g007997mg [Citrus sinensis]
c26529_g2_i3	gb KDO64204.1  hypothetical protein CISIN_1g000727mg [Citrus sinensis]
c26655_g2_i15	gb KDO82194.1  hypothetical protein CISIN_1g006587mg [Citrus sinensis]
c26710_g1_i2	gb KJB09636.1  hypothetical protein B456_001G153900 [Gossypium raimondii]
c26746_g1_i6	ref XP_006423000.1  hypothetical protein CICLE_v10028188mg [Citrus clementina] ref XP_006423001.1  hypothetical protein CICLE_v10028188mg [Citrus clementina] gb ESR36240.1  hypothetical protein CICLE_v10028188mg [Citrus clementina] gb ESR36241.1  hypothetical protein CICLE_v10028188mg [Citrus clementina]
c26877_g1_i3	ref XP_006447184.1  hypothetical protein CICLE_v10014295mg [Citrus clementina] ref XP_006447185.1  hypothetical protein CICLE_v10014295mg [Citrus clementina] ref XP_006469958.1  PREDICTED: protein FAR1-RELATED SEQUENCE 7-like isoform X1 [Citrus sinensis] gb ESR60424.1  hypothetical protein CICLE_v10014295mg [Citrus clementina] gb ESR60425.1  hypothetical protein CICLE_v10014295mg [Citrus clementina]
c26944_g1_i1	ref XP_006426820.1  hypothetical protein CICLE_v10025373mg [Citrus clementina] gb ESR40060.1  hypothetical protein CICLE_v10025373mg [Citrus clementina]
c27020_g1_i4	ref XP_006466362.1  PREDICTED: glycine-rich domain-containing protein 1 [Citrus sinensis] ref XP_006466363.1  PREDICTED: glycine-rich domain-containing protein 1 [Citrus sinensis]
c27061_g9_i1	ref XP_002484510.1  hypothetical protein TSTA_040370 [Talaromyces stipitatus ATCC 10500] gb EED14557.1  hypothetical protein TSTA_040370 [Talaromyces stipitatus ATCC 10500]
c27122_g1_i3	ref XP_012071119.1  PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein At1g04840 [Jatropha curcas] ref XP_012071120.1  PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein At1g04840 [Jatropha curcas] gb KDP39353.1  hypothetical protein JCGZ_01110 [Jatropha curcas]
c27186_g1_i2	ref XP_006467722.1  PREDICTED: guanylate-binding protein 1 [Citrus sinensis]
c27228_g4_i7	gb KDO66574.1  hypothetical protein CISIN_1g036360mg [Citrus sinensis]
c27404_g1_i3	ref XP_006438225.1  hypothetical protein CICLE_v10030867mg [Citrus clementina] gb ESR51465.1  hypothetical protein CICLE_v10030867mg [Citrus clementina]
c27495_g7_i6	ref XP_006422902.1  hypothetical protein CICLE_v10028000mg [Citrus clementina] gb ESR36142.1  hypothetical protein CICLE_v10028000mg [Citrus clementina]
c27516_g2_i6	gb KDO62339.1  hypothetical protein CISIN_1g008819mg [Citrus sinensis]

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c27653_g1_i3	ref XP_006420121.1  hypothetical protein CICLE_v10004215mg [Citrus clementina] ref XP_006420122.1  hypothetical protein CICLE_v10004215mg [Citrus clementina] ref XP_006420123.1  hypothetical protein CICLE_v10004215mg [Citrus clementina] gb ESR33361.1  hypothetical protein CICLE_v10004215mg [Citrus clementina] gb ESR33362.1  hypothetical protein CICLE_v10004215mg [Citrus clementina] gb ESR33363.1  hypothetical protein CICLE_v10004215mg [Citrus clementina]
c27816_g1_i3	ref XP_006453083.1  hypothetical protein CICLE_v10007519mg [Citrus clementina] ref XP_006474418.1  PREDICTED: probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 6 [Citrus sinensis] ref XP_015384541.1  PREDICTED: probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 6 [Citrus sinensis] gb ESR66323.1  hypothetical protein CICLE_v10007519mg [Citrus clementina]
c27880_g2_i1	dbj GAU19291.1  hypothetical protein TSUD_335770 [Trifolium subterraneum]
c27880_g5_i3	gb AGC78890.1  hypothetical protein (mitochondrion) [Vicia faba] gb AGC79003.1  hypothetical protein (mitochondrion) [Vicia faba]
c27942_g1_i1	ref XP_006489618.1  PREDICTED: putative G3BP-like protein isoform X2 [Citrus sinensis]
c27974_g2_i2	ref XP_006488735.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102614586 [Citrus sinensis]
c27997_g1_i1	ref XP_006473341.1  PREDICTED: phosphatidate phosphatase PAH2 [Citrus sinensis]
c28075_g7_i6	ref XP_006489225.1  PREDICTED: F-box/LRR-repeat protein 4 [Citrus sinensis]
c28078_g1_i3	ref XP_006470432.1  PREDICTED: Ia-related protein 1A [Citrus sinensis]
c28093_g1_i5	gb KDO86230.1  hypothetical protein CISIN_1g000099mg [Citrus sinensis]
c28101_g2_i2	ref XP_006483980.1  PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase RGLG2 isoform X1 [Citrus sinensis] ref XP_015387444.1  PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase RGLG2 isoform X1 [Citrus sinensis]
c28122_g1_i4	dbj GAO47202.1  hypothetical protein G7K_1412-t1 [Saitoella complicata NRRL Y-17804]
c28135_g1_i10	ref XP_006471081.1  PREDICTED: phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase 8-like [Citrus sinensis]
c28206_g1_i4	gb KDO84257.1  hypothetical protein CISIN_1g000918mg [Citrus sinensis]
c28267_g1_i1	gb KDO72329.1  hypothetical protein CISIN_1g011110mg [Citrus sinensis]
c28348_g1_i4	gb AIG15451.1  NADPH-cytochrome P450 reductase 1 [Azadirachta indica]
c28403_g1_i11	ref XP_006451438.1  hypothetical protein CICLE_v10007842mg [Citrus clementina] gb ESR64678.1  hypothetical protein CICLE_v10007842mg [Citrus clementina]
c28414_g2_i6	ref XP_006430134.1  hypothetical protein CICLE_v10012009mg [Citrus clementina] gb ESR43374.1  hypothetical protein CICLE_v10012009mg [Citrus clementina]
c28452_g2_i3	gb KDO54002.1  hypothetical protein CISIN_1g002828mg [Citrus sinensis]
c28563_g1_i1	ref XP_006476575.2  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102610276 [Citrus sinensis]
c28570_g1_i4	ref XP_006475640.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102621477 isoform X2 [Citrus sinensis]
c28601_g1_i4	ref XP_010657605.1  PREDICTED: probable protein phosphatase 2C BIPP2C1 isoform X1 [Vitis vinifera] emb CBI20067.3  unnamed protein product, partial [Vitis vinifera]
c28718_g5_i4	ref XP_006446270.1  hypothetical protein CICLE_v10014100mg [Citrus clementina] gb ESR59510.1  hypothetical protein CICLE_v10014100mg [Citrus clementina]

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c28735_g1_i4	ref XP_006421210.1  hypothetical protein CICLE_v100041741mg, partial [Citrus clementina] gb ESR34450.1  hypothetical protein CICLE_v100041741mg, partial [Citrus clementina]
c28758_g1_i2	ref XP_006480797.1  PREDICTED: beta-glucuronosyltransferase GlcAT14C [Citrus sinensis]
c28767_g1_i10	ref XP_006479207.1  PREDICTED: myb-like protein X [Citrus sinensis] ref XP_006479209.1  PREDICTED: myb-like protein X [Citrus sinensis] ref XP_006479211.1  PREDICTED: myb-like protein X [Citrus sinensis]
c28769_g1_i12	gb KDO46869.1  hypothetical protein CISIN_1g0021102mg, partial [Citrus sinensis] gb KDO46870.1  hypothetical protein CISIN_1g0021102mg, partial [Citrus sinensis]
c28931_g1_i1	ref XP_006473275.1  PREDICTED: cysteine proteinase RD21a [Citrus sinensis]
c28984_g1_i3	ref XP_015384565.1  PREDICTED: 3beta-hydroxysteroid-dehydrogenase/decarboxylase isoform 2 isoform X4 [Citrus sinensis]
c28992_g2_i10	gb KDO63181.1  hypothetical protein CISIN_1g029107mg [Citrus sinensis]
c29105_g1_i1	ref XP_006452984.1  hypothetical protein CICLE_v10010780mg [Citrus clementina] gb ESR66224.1  hypothetical protein CICLE_v10010780mg [Citrus clementina]
c29153_g1_i7	ref XP_006491365.1  PREDICTED: vacuolar protein sorting-associated protein 8 homolog isoform X1 [Citrus sinensis]
c29201_g1_i2	ref XP_006426779.1  hypothetical protein CICLE_v10025816mg [Citrus clementina] ref XP_006426780.1  hypothetical protein CICLE_v10025816mg [Citrus clementina] gb ESR40021.1  hypothetical protein CICLE_v10025816mg [Citrus clementina]
c29246_g1_i1	ref XP_006492175.1  PREDICTED: transcriptional activator DEMETER isoform X2 [Citrus sinensis]
c29280_g3_i3	ref XP_006476967.1  PREDICTED: oxygen-independent coproporphyrinogen-III oxidase-like protein sll1917 [Citrus sinensis]
c29307_g1_i13	ref XP_015865843.1  PREDICTED: RNA pseudouridine synthase 7-like [Ziziphus jujuba]
c29363_g1_i2	ref XP_006450336.1  hypothetical protein CICLE_v10007789mg [Citrus clementina] gb ESR63576.1  hypothetical protein CICLE_v10007789mg [Citrus clementina]
c29448_g7_i8	ref XP_006438532.1  hypothetical protein CICLE_v10030537mg [Citrus clementina] ref XP_006483292.1  PREDICTED: phospholipid-transporting ATPase 3 [Citrus sinensis] gb ESR51772.1  hypothetical protein CICLE_v10030537mg [Citrus clementina]
c29489_g1_i2	ref XP_010649323.1  PREDICTED: protein FAR1-RELATED SEQUENCE 5-like isoform X1 [Vitis vinifera]
c29508_g1_i6	ref XP_002484510.1  hypothetical protein TSTA_040370 [Talaromyces stipitatus ATCC 10500] gb EED14557.1  hypothetical protein TSTA_040370 [Talaromyces stipitatus ATCC 10500]
c29563_g1_i8	emb CAN61666.1  hypothetical protein VITISV_037832 [Vitis vinifera]
c29650_g1_i10	ref XP_006419804.1  hypothetical protein CICLE_v10004788mg [Citrus clementina] gb ESR33044.1  hypothetical protein CICLE_v10004788mg [Citrus clementina] gb KDO74825.1  hypothetical protein CISIN_1g010325mg [Citrus sinensis]
c29675_g1_i11	ref XP_006430775.1  hypothetical protein CICLE_v10012575mg [Citrus clementina] gb ESR44015.1  hypothetical protein CICLE_v10012575mg [Citrus clementina] gb KDO59015.1  hypothetical protein CISIN_1g025796mg [Citrus sinensis]
c29721_g1_i5	ref XP_002520606.1  PREDICTED: glutamate receptor 3.2 [Ricinus communis] ref XP_015575583.1  PREDICTED: glutamate receptor 3.2 [Ricinus communis] gb EEF41779.1  glutamate receptor 3 plant, putative [Ricinus communis]

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c29801_g2_i7	ref XP_006483424.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102613578 isoform X1 [Citrus sinensis]
c29870_g1_i3	ref XP_006444306.1  hypothetical protein CICLE_v10018482mg [Citrus clementina] gb ESR57546.1  hypothetical protein CICLE_v10018482mg [Citrus clementina] gb KDO87263.1  hypothetical protein CISIN_1g000438mg [Citrus sinensis]
c29888_g6_i1	ref XP_006444699.1  hypothetical protein CICLE_v10018447mg [Citrus clementina] gb ESR57939.1  hypothetical protein CICLE_v10018447mg [Citrus clementina]
c29989_g2_i6	ref XP_006444514.1  hypothetical protein CICLE_v10018925mg [Citrus clementina] ref XP_006492349.1  PREDICTED: DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 24 [Citrus sinensis] gb ESR57754.1  hypothetical protein CICLE_v10018925mg [Citrus clementina] gb KDO86969.1  hypothetical protein CISIN_1g003881mg [Citrus sinensis] gb KDO86970.1  hypothetical protein CISIN_1g003881mg [Citrus sinensis]
c30007_g1_i8	ref XP_006435169.1  hypothetical protein CICLE_v10001119mg [Citrus clementina] gb ESR48409.1  hypothetical protein CICLE_v10001119mg [Citrus clementina]
c30055_g2_i7	ref XP_017189606.1  PREDICTED: embryonic protein DC-8-like isoform X2 [Malus domestica]
c30245_g1_i5	ref XP_002516035.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC8274487 [Ricinus communis] gb EEF46455.1  conserved hypothetical protein [Ricinus communis]
c30277_g1_i3	ref XP_006491853.1  PREDICTED: probable helicase MAGATAMA 3 isoform X1 [Citrus sinensis] ref XP_006491854.1  PREDICTED: probable helicase MAGATAMA 3 isoform X1 [Citrus sinensis]
c30330_g1_i1	gb EDM87028.1  hypothetical protein RUMOBE_02439 [Blautia obeum ATCC 29174]
c30355_g2_i9	gb KDO73040.1  hypothetical protein CISIN_1g000828mg [Citrus sinensis] gb KDO73041.1  hypothetical protein CISIN_1g000828mg [Citrus sinensis]
c30360_g6_i2	ref XP_006481619.1  PREDICTED: putative phosphatidylglycerol/phosphatidylinositol transfer protein DDB_G0282179 [Citrus sinensis]
c30390_g1_i2	ref XP_015572906.1  PREDICTED: guanine nucleotide-binding protein subunit gamma 3 isoform X2 [Ricinus communis]
c30402_g1_i4	ref XP_006427303.1  hypothetical protein CICLE_v10024867mg [Citrus clementina] gb ESR40543.1  hypothetical protein CICLE_v10024867mg [Citrus clementina]
c30469_g5_i8	gb OAY48149.1  hypothetical protein MANES_06G135400 [Manihot esculenta]
c30532_g1_i2	ref XP_006473595.1  PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein At1g25360 [Citrus sinensis] ref XP_006473596.1  PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein At1g25360 [Citrus sinensis]
c30555_g2_i7	ref XP_006448190.1  hypothetical protein CICLE_v10014030mg [Citrus clementina] gb ESR61430.1  hypothetical protein CICLE_v10014030mg [Citrus clementina]
c30652_g1_i5	gb AGC78944.1  hypothetical protein (mitochondrion) [Vicia faba]
c30654_g1_i3	ref XP_006448624.1  hypothetical protein CICLE_v10014781mg [Citrus clementina] ref XP_006448625.1  hypothetical protein CICLE_v10014781mg [Citrus clementina] gb ESR61864.1  hypothetical protein CICLE_v10014781mg [Citrus clementina] gb ESR61865.1  hypothetical protein CICLE_v10014781mg [Citrus clementina]
c30708_g1_i13	ref XP_007297914.1  hypothetical protein MBM_10038 [Marssonina brunnea f. sp. 'multigermtubi' MB_m1] gb EKD11810.1  hypothetical protein MBM_10038 [Marssonina brunnea f. sp. 'multigermtubi' MB_m1]

ID	NR_Top_BLASTX_hit
c30709_g2_i2	ref XP_006479182.1  PREDICTED: polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, chloroplastic isoform X1 [Citrus sinensis] ref XP_015386155.1  PREDICTED: polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, chloroplastic isoform X1 [Citrus sinensis]
c30725_g2_i5	gb KDO71347.1  hypothetical protein CISIN_1g002610mg [Citrus sinensis]
c30753_g1_i2	ref XP_006436594.1  hypothetical protein CICLE_v10030523mg [Citrus clementina] ref XP_006485247.1  PREDICTED: uncharacterized ATPdependent helicase C29A10.10c [Citrus sinensis] ref XP_006485248.1  PREDICTED: uncharacterized ATP-dependent helicase C29A10.10c [Citrus sinensis] gb ESR49834.1  hypothetical protein CICLE_v10030523mg [Citrus clementina]
c30790_g2_i9	ref XP_003632087.1  PREDICTED: UDP-glycosyltransferase 74E2-like [Vitis vinifera]
c31008_g2_i6	ref XP_006467572.1  PREDICTED: alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 1-like isoform X4 [Citrus sinensis]
c31090_g2_i9	gb KDO67642.1  hypothetical protein CISIN_1g021753mg [Citrus sinensis]
c31142_g1_i7	gb KDO55145.1  hypothetical protein CISIN_1g005386mg [Citrus sinensis] gb KDO55146.1  hypothetical protein CISIN_1g005386mg [Citrus sinensis]
c31157_g1_i3	ref XP_006478019.1  PREDICTED: BTB/POZ domain-containing protein At1g04390 isoform X1 [Citrus sinensis]
c31157_g1_i8	ref XP_006478020.1  PREDICTED: BTB/POZ domain-containing protein At1g04390 isoform X2 [Citrus sinensis]
c31187_g1_i5	ref XP_006440983.1  hypothetical protein CICLE_v10018856mg [Citrus clementina] gb ESR54223.1  hypothetical protein CICLE_v10018856mg [Citrus clementina]
c31238_g1_i2	ref XP_006470807.1  PREDICTED: protein STICHEL [Citrus sinensis]
c31248_g1_i6	gb KDO65276.1  hypothetical protein CISIN_1g002867mg [Citrus sinensis]
c31336_g1_i8	ref XP_006466676.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC102617616 [Citrus sinensis]
c31342_g3_i3	gb KDO82335.1  hypothetical protein CISIN_1g006968mg [Citrus sinensis]
c31469_g1_i7	ref XP_010058631.1  PREDICTED: uncharacterized protein LOC104446483 [Eucalyptus grandis]
c31473_g3_i2	gb KZM80197.1  hypothetical protein DCAR_032322 [Daucus carota subsp. sativus]
c31484_g2_i3	ref XP_006441093.1  hypothetical protein CICLE_v10018477mg [Citrus clementina] gb ESR54333.1  hypothetical protein CICLE_v10018477mg [Citrus clementina]
c45200_g1_i1	gb KOM42622.1  hypothetical protein LR48_Vigan05g022600 [Vigna angularis]