

THIAGO BARBOSA BATISTA

**LONGEVIDADE DE SEMENTES CONDICIONADAS DE TOMATE: ESTUDOS
FISIOLÓGICOS E MOLECULARES**

Botucatu

2018

THIAGO BARBOSA BATISTA

**LONGEVIDADE DE SEMENTES CONDICIONADAS DE TOMATE: ESTUDOS
FISIOLÓGICOS E MOLECULARES**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências Agronômicas
da Unesp Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em
Agronomia (Agricultura).

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo
Aparecido Amaral da Silva

Co-orientador: Dr. Júlio Maia de
Oliveira

Botucatu

2018

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

Batista, Thiago Barbosa, 1992-
B333L Longevidade de sementes condicionadas de tomate: estudos fisiológicos e moleculares / Thiago Barbosa Batista. - Botucatu: [s.n.], 2018
59 p.: fots. color., grafs., ils. color, tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2018
Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva
Coorientador: Júlio Maia de Oliveira
Inclui bibliografia

1. Tomate - Sementes. 2. Sementes - Fisiologia. 3. Tecnologia de sementes. 4. Sementes - Qualidade. 5. Choque térmico. I. Silva, Edvaldo Aparecido Amaral da. II. Oliveira, Júlio Maia de. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: LONGEVIDADE DE SEMENTES CONDICIONADAS DE TOMATE: ESTUDOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES

AUTOR: THIAGO BARBOSA BATISTA

ORIENTADOR: EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

COORIENTADOR: JULIO MAIA DE OLIVEIRA

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

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

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

Dr. DAI TOKUHISA
Departamento de Operações / Sakata Seeds Sudamerica Ltda

Botucatu, 25 de julho de 2018

Aos meus pais,
José e Elivanda.

Aos meus avós,
Clarindo e Maria (*in memoriam*),
David (*in memoriam*) e Maria.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais pelo apoio incondicional, sem o qual jamais chegaria até aqui. E a toda a minha família, por toda compreensão e apoio.

A todos os meus amigos do Grupo de Oração Cenáculo, pelas orações e por serem minha família em Botucatu.

Ao Prof. Edvaldo A. Amaral da Silva, pela orientação, valorosos ensinamentos, paciência e exemplo profissional.

Ao Dr. Júlio Maia, pelas contribuições para a realização deste trabalho.

Ao Prof. João Nakagawa, pelos ensinamentos e disposição em esclarecer dúvidas e incentivo a pesquisa.

A toda equipe do Laboratório de Sementes: Denise, Tiago Alexandre, Karina, Letícia, Gabriel, Maria Rita, Maurício, Daiane Ajala, Juliana Bravo, Samara, Larissa, Carolina, Victória, Girlânio Holanda, Bárbara Panoff, Gilberto, Rubiana, Matheus, Fabiola, Andrea Akemi; pelo apoio na execução do trabalho e amizade. Tenho o maior orgulho em fazer parte deste laboratório.

À todos os professores do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP/Botucatu pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal: Eliane, Iara, Amanda e Debora; e em especial a Valéria, por toda disposição e auxílio para tornar o ambiente do Laboratório de Sementes o melhor lugar para se trabalhar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio concedido por meio de bolsa de mestrado (Processo nº 2016/10716-1).

Ao CNPq pelo apoio financeiro para realização da pesquisa (Projeto CNPq: Processo nº 420374/2016).

Meus sinceros agradecimentos.

“Pelo amor de deus, rapaz! Já não basta eu ter respondido tantas perguntas suas? O que mais você quer saber?”

“E Pippin respondeu: "Tudo! Quero saber sobre o céu e a terra e o nome de todas as estrelas, claro! Porque menos?”

J. R. R. Tolkien.

RESUMO

O *Priming* é uma tecnologia utilizada para aprimorar a qualidade fisiológica de sementes. Todavia, a técnica reduz a longevidade das sementes. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar a aplicação de Epibrassinolídeo (EpiBL), ácido abscísico (ABA) e choque térmico (CT) associado ao *priming* para estender a longevidade das sementes de tomateiro e estudar o transcriptoma do tratamento que prolongar a longevidade das sementes condicionadas. As sementes dois acessos de *S. lycopersicum* foram condicionadas em solução de PEG -1,0 MPa (tratamento tradicional) pelo período de 60 horas (h) a 20 °C. Alternativamente, foram associados os tratamentos com 0,1 µM de EpiBL, 1 µM de ABA e após o *priming* as sementes foram secas pelo período de 24 h a 20 °C e ±60% de umidade relativa (UR). O choque térmico foi aplicado após o condicionamento submetendo-se as sementes a ambiente de 32% UR/38 °C pelo período de 2 h e posteriormente ao ambiente de 20 °C e ±60% UR. Avaliou-se a qualidade fisiológica da sementes pela germinação, velocidade de germinação (T50), uniformidade (T16-84) e a longevidade a 75% UR/35 °C. O *priming* aprimorou a qualidade fisiológica das sementes de *S. lycopersicum* com benefício adicional a velocidade de germinação empregando-se EpiBL e choque térmico. O choque térmico após o *priming* é capaz de ampliar a longevidade das sementes condicionadas e a análise de transcriptoma revelou abundancia e expressão de transcritos *sHSP* e *HSPs*, associadas a longevidade de sementes.

Palavras-chave: Choque térmico. *Priming*. Qualidade de sementes.

ABSTRACT

Seed priming is a technology used to improve the physiological quality of seeds. However, the technique reduces seed longevity. Therefore, the aim of this work was to evaluate the application of Epibrassinolide (EpiBL), abscisic acid (ABA) and heat shock (CT) associated with priming to extend the longevity of tomato seeds and the associated transcriptome application of treatment to prolong longevity of conditioned seeds. The seeds two accessions of *S. lycopersicum* were conditioned in PEG solution -1.0 MPa (traditional treatment) for the period of 60 hours (h) at 20 °C. Alternatively, the treatments were associated with 0.1 µM EpiBL, 1 µM ABA and after priming the seeds were dried for up to 24 h at 20 °C and ±60% relative humidity (RH). The heat shock was applied after the conditioning by exhibition the seeds to 32% RH/38 °C for 2 h and then to the environment of 20 °C and ±60% RH. Physiological quality of the seeds was evaluated by germination, germination speed (T50), uniformity (T16-84) and longevity at 75% RH/35 °C. Priming improved the physiological quality of *S. lycopersicum* seeds with additional benefit to germination speed using EpiBL and heat shock. Heat shock after priming is able to extend the longevity of conditioned seeds and transcriptome analysis revealed abundance and expression of sHSP and HSPs transcripts, associated with seed longevity.

Keywords: Heat shock. Priming. Seed quality.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	Longevidade de sementes	19
2.1.1	Longevidade e tolerância a dessecação	19
2.1.2	Mecanismos que aportam a longevidade	21
2.1.3	O papel hormonal na longevidade de sementes	23
2.1.4	Estudo da longevidade	24
2.2	<i>Priming</i> de sementes.....	24
2.3	Longevidade de sementes condicionadas.....	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Estudos Fisiológicos.....	27
3.1.1	Material vegetal	27
3.1.2	<i>Priming</i> e choque térmico.....	29
3.2	Estudos moleculares	32
3.2.1	Preparo e processamento do RNAseq.....	32
3.2.2	Alinhamento de <i>reads</i> e genes diferencialmente expressos (DEG)	32
3.2.3	Enriquecimento de <i>Gene Ontology</i> (GO).....	33
4	RESULTADOS	34
4.1	Efeito do <i>priming</i> em sementes de <i>S. lycopersicum</i>	34
4.2	Longevidade de sementes condicionadas de <i>S. lycopersicum</i>	37
4.3	Identificação de transcritos em resposta ao choque térmico após <i>priming</i>	40
5	DISCUSSÃO	44
5.1	<i>Priming</i> beneficia a qualidade de sementes de <i>S. lycopersicum</i>	44
5.2	O choque térmico é capaz de atenuar a perda da longevidade de sementes condicionadas	45
5.3	Importantes transcritos identificados no tratamento de choque térmico indicam a importância do sistema de proteção para longevidade de sementes condicionadas	47
6	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) pertence à família das Solanáceas e, apresenta grande importância agrícola. As variedades de tomateiro são cultivadas para a produção de frutos, que são consumidos *in natura* e/ou processados. O custo na produção de sementes, utilizadas na propagação do tomateiro, podem atingir altos valores, em função do nível de tecnológico investido.

Sementes frescas ou recém-processadas de tomateiro apresentam dormência ocasionado pela resistência mecânica do endosperma micropilar a protrusão da radícula (BEWLEY et al., 2013; MARCOS-FILHO, 2015), resultando em problemas para a propagação (FAROOQ et al., 2005). Para solucionar este problema, pesquisadores e empresas utilizam a técnica conhecida como condicionamento fisiológico de sementes ou “*priming*”, que consiste no fornecimento controlado de água, permitindo a ativação do metabolismo das sementes, de modo a iniciar o processo germinativo sem que haja, no entanto, a protrusão da radícula (LARA et al., 2014).

O *priming* é muito utilizado em sementes de hortaliças e outras pequenas sementes trazendo benefícios no aumento da velocidade da germinação e emergência das plântulas e na obtenção de mudas mais vigorosas, culminando em um estande homogêneo de plantas (LIU et al., 1996; BATISTA et al., 2015; ASGHARIPOUR & RAFIEI, 2011; FAROOQ et al., 2005). Além disso, o *priming* também aumenta a tolerância das sementes e plântulas a estresses bióticos e abióticos (CHEN et al., 2012; AMOOAGHAIE et al., 2010; WORRALL et al., 2012; CHEN & ARORA, 2013).

A longevidade é a capacidade de retenção da viabilidade das sementes durante o armazenamento (SANO et al., 2016) e, apesar dos benefícios à germinação propiciado pelo *priming*, as sementes tratadas perdem mais rapidamente a viabilidade, gerando problemas em seu armazenamento (ARGERICH et al., 1989; LIU et al., 1996) e logística para as empresas de sementes que precisam realizar o *priming* conforme a demanda do mercado.

No entanto, tem-se a possibilidade de ampliar a longevidade das sementes condicionadas, como relatado por Bruggink et al. (1999) ao demonstrarem

prolongamento da viabilidade de sementes condicionadas de pimentão através da aplicação de choque térmico após o tratamento de *priming* previamente à secagem definitiva.

Além disso, foi demonstrado que a aplicação do regulador vegetal Epibrassinolídeo, durante o *priming* tem o potencial de melhorar a longevidade de sementes condicionadas de pimentão (SILVA, 2015a), além de incrementar a expressão do vigor das sementes (SILVA et al., 2015b). De maneira geral, não há muitos estudos demonstrando o papel dos hormônios vegetais na longevidade de sementes, com exceção de alguns relatos sobre os mutantes insensíveis ao ácido abscídico (ABA) *abi3* e *abi5* que são mais sensíveis ao envelhecimento do que plantas do tipo selvagem (CLERKX et al., 2004), em função do ABA estar relacionado com a tolerância à dessecação (TD), que influencia diretamente na longevidade.

Diante do exposto, o objetivo foi avaliar a ação de reguladores vegetais e choque térmico na manutenção da longevidade de sementes condicionadas de tomate e avaliar o transcriptoma associado a aplicação do tratamento que prolongue a longevidade das sementes condicionadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Longevidade de sementes

A qualidade fisiológica de sementes é adquirida durante o desenvolvimento e refere-se a germinação, tolerância a dessecação, vigor e capacidade de armazenamento (VALÁRIO, 2016; BEWLEY et al. 2013).

A viabilidade é uma características de sementes quiescentes que apresentam capacidade de germinar quando em condições favoráveis (MARCOS-FILHO, 2015) e, essencial para a propagação ao longo do tempo das espécies, que é perdida ao longo do período de armazenamento. A maioria das sementes apresentam capacidade de retenção da germinação após determinado período de armazenamento, sendo este um componente denominado “longevidade de sementes”, que pode ser definido como o período em que a semente consegue permanecer viável (LANDJEVA et al., 2010; revisado por SANO et al., 2016).

A longevidade é uma característica importante para os aspectos ecológicos, agrônômicos e econômicos (SANO et al., 2016). Existe uma variação entre a longevidade das espécies de plantas e acessos de uma mesma espécie, devido a diferenças no seu genótipo e procedência (HONG & ELLIS, 1996). Clerkx et al. (2004) constataram diferenças entre a longevidade das sementes de diferentes mutantes de *Arabidopsis*. A longevidade pode ser excepcionalmente alta para algumas espécies de plantas, como constatou Sallon et al. (2008) ao datarem viabilidade das sementes de *Phoenix dactylifera* superior a 2.000 anos.

No entanto, embora haja essa longevidade excepcional documentada, muito pouco se sabe sobre os mecanismos subjacentes a esta característica, pois esta é uma questão complexa de se estudar. Por exemplo, nota-se que as sementes que exibem tal longevidade excepcional foram recolhidas no solo (SALLON et al., 2008), paradoxalmente as condições ideais para reter a viabilidade por longos períodos.

2.1.1 Longevidade e tolerância a dessecação

Sementes imaturas germinam, se mantidas hidratadas, indicando que já adquiriram sua germinação potencial, após separadas da planta mãe. Contudo,

não germinariam após dessecação, pois é após a morfogênese que a semente entra na fase de maturação, onde adquire a tolerância a dessecação, com redução do conteúdo de água (< 20%) e em seguida a semente entra em quiescência (revisado por SANO et al., 2016).

Verdier et al. (2013) relataram em seu estudo com sementes de *Medicago truncatula* que durante a maturação fisiológica, a semente adquire a tolerância a dessecação, e conseguinte a longevidade. Portanto, a longevidade também está associada ao comportamento em relação a tolerância à dessecação das sementes (ABREU et al., 2014).

Probert et al. (2007) estabeleceram três padrões para aquisição da longevidade de sementes: i) aquisição da longevidade durante a maturação, que se mantém até o momento da colheita (tomate e pimenta); ii) aquisição da longevidade durante a maturação, com posterior diminuição anterior a colheita (*Medicago*, mostarda); e iii) aquisição da longevidade durante a maturação, porém o pico máximo só é atingido após dispersão (espécies selvagens – *Digitalis*).

Durante a aquisição de tolerância a dessecação o citoplasma das células da semente passa de fluido para o estado vítreo. A vitrificação, conforme relatou Santos (2000) é o processo através do qual a água passa por uma transição do estado líquido para o estado amorfo, meta-estável, de consistência rígida. O citoplasma nesse estado assume consistência de um líquido de alta viscosidade, suficiente para impedir ou dificultar reações químicas que exigem difusão molecular (MARCOS-FILHO, 2015).

Neste estado os componentes celulares estão estabilizados e sua mobilidade é reduzida (BUIKINK e LEPRINCE, 2008). Compostos acumulados durante a maturação da semente, tais como açúcares não redutores (sacarose, rafinose e ciclitóis (tipo de carboidrato solúvel)) estão envolvidos na formação e manutenção do estado vítreo, pois se acumulam enquanto o conteúdo de água decresce. As proteínas LEA (*Late abundant embryogenesis*) e *sHSPs* (*small heat shock proteins*) também podem promover a formação vítrea, em conjunto com os açúcares (BEWLEY et al., 2013).

No citoplasma em estado vítreo as proteínas LEA se encontram em abundância, são extremamente hidrofílicas, e estão associadas a tolerância a dessecação e estresse (SANO et al., 2016). Uma análise proteômica revelou que a RAB18, uma proteína LEA do grupo 2, também conhecido como “grupo

dehydrina” decaiu progressivamente, bem como a germinação de *Arabidopsis*, com o avanço do envelhecimento das sementes, sugerindo que esta proteína tem relação com a manutenção da longevidade de sementes (RAJJOU e DEBEAUJON et al., 2008). Além disso, várias outras proteínas LEA tem sido relacionada com a longevidade de sementes de *Medicago truncatula* (CHATELAIN et al., 2012).

As *sHSPs* estão envolvidas no desenvolvimento do polen e embrião, processo de maturação e germinação de sementes de diferentes espécies de plantas (revisado por KAUR, PETLA e MAJEE, 2016). O acúmulo de *sHSPs* como a *sHSP18.2* influencia tanto na aquisição de tolerância à dessecação como na longevidade de sementes de *Arabidopsis thaliana* (MACHEREL et al., 2007). As *sHSPs* variam em tamanho de 15 a 42 kDa e três classes (I, II e III) de *sHSPs* estão localizadas no citoplasma ou no núcleo e as outras três estão localizadas no cloroplasto, no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias (SUN et al., 2002; VIERLING, 1991).

Ao final do desenvolvimento, os organismos tolerantes à dessecação têm a capacidade de sobreviverem à desidratação inferior a 0,1 g de água por grama de massa seca (BEWLEY et al., 2013). É justamente em função deste “estado seco”, através da redução do teor de água e formação do estado vítreo que as sementes ortodoxas são capazes de reter sua viabilidade por longos períodos, prolongando assim sua longevidade.

2.1.2 Mecanismos que aportam a longevidade

A viabilidade das sementes diminui gradualmente devido aos "processos de envelhecimento" e/ou "eventos de deterioração", durante o armazenamento à seco (VALÁRIO, 2016). Durante o armazenamento, as sementes sofrem deterioração por estresse oxidativo, vazamento de eletrólitos e/ou danos dos constituintes celulares; provocando queda no seu vigor, tornando-se mais sensível ao estresse, perdendo por fim sua capacidade germinativa (revisado por RAJJOU e DEBEAUJON, 2008), afetando assim sua longevidade. De acordo com Silva e Cicero (2014) o processo de deterioração é irreversível, mesmo quando o armazenamento é realizado em condições adequadas.

A semente é incapaz de restaurar sua qualidade após iniciado os eventos de deterioração, todavia alguns sistemas são capazes de atenuar os efeitos da deterioração, preservando sua longevidade. Estes sistemas estão associados a mecanismo de desintoxicação, reparo e proteção.

A sobrevivência das sementes por longos períodos durante o armazenamento está relacionado com sua capacidade de “desligar” seu metabolismo, através da redução da mobilidade celular propiciada pelo estado vítreo, formado pelo acúmulo de açúcares não redutores nas sementes (revisado por SANO et al., 2016), além de proteínas *LEA* e *HSPs*. De acordo com Nishizawa et al. (2008) o estado vítreo é capaz de impedir a reação de Maillard, possivelmente pela eliminação de radicais livres propiciada pelas rafinoses, associadas a proteção de danos oxidativos.

Outra estratégia da semente para lidar com estresse e prolongar sua longevidade é a remoção do excesso de espécies reativas do oxigênio (ROS) e controle da superprodução de radicais livres gerados pelo reinício do metabolismo, através de um conjunto de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e glutatona (BAILLY 2004; KUMAR et al., 2015). Estressada ou não as células de sementes produzem ROS em vários compartimentos, normalmente em peroxissomos, mitocôndrias e citoplasma e, de acordo com Moller et al. (2007) o acúmulo destas leva a disfunção mitocondrial, a inativação da enzima, perturbação da membrana e a oxidação de lipídios, proteínas e do material genético.

A longevidade está também associada com sistema de reparação de DNA e proteínas, tal como DNA ligase (WATERWORTH et al., 2010) e proteína *L-isoaspartil metiltransferase* (OGÉ et al., 2008). A reinicialização da germinação depende de mRNA e proteínas armazenados (RAJJOU et al., 2004), portanto sementes com alto nível de danos em proteínas e material genético podem não suportar a reinicialização do processo de germinação e/ou ocorrência de formação de plântulas anormais.

Além disso, tem-se relatado a ação de polifenóis na manutenção da longevidade de sementes de *Arabidopsis*, tais como flavonoides, encontrados no tegumento, embrião e endosperma, uma vez que oferecem ação contra ROS, protegem membrana e limitam a peroxidação lipídica (DEBEAUJON et al., 2000;

STEVENSON e HURST, 2007;) e atividade de tocoferóis na proteção contra danos oxidativos (SATTLER et al. al., 2004).

2.1.3 O papel hormonal na longevidade de sementes

Foi relatado que mutantes insensíveis ao ácido abscídico (ABA) *abi3* e *abi5* são mais sensíveis ao envelhecimento do que plantas do tipo selvagem, além de apresentarem redução de dormência (CLERKX et al., 2004), que exerce influência na retenção da viabilidade. Kotak et al. (2007) atribui ao *abi3* papel central na sinalização a longevidade de sementes, através do fator HSFA9 de choque térmico das sementes, pois em *Arabidopsis* o fator está sob o controle do *abi3*, restrito ao final da maturação, ligado a indução de dormência e tolerância a dessecação.

Há estudos que mostram a possível relação entre o ácido giberélico (GA) e a longevidade de sementes em mutantes com elevada longevidade que super-expressam o fator de transcrição *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN 25* (*ATHB25*; At5g65410). A super-expressão do *ATHB25* induz a expressão aumentada do gene que codifica para *GA3OX2* (GIBBERELLIC ACID3-OXIDASE2) e promovendo um aumento no conteúdo de GA1 e GA4. Os autores sugerem uma conexão entre GA e longevidade através de mudanças na estrutura do tegumento das sementes (BUESO et al., 2014). Recentemente, foi demonstrado também que a aplicação de reguladores vegetais, especialmente brassinosteroides (BRs), durante o *priming* tem o potencial de manter a longevidade de sementes condicionadas de pimentão (SILVA, 2015a). Em seu estudo a aplicação do BR 24-epibrassinolídeo promoveu o aumento na atividade de enzimas antioxidantes e hidrolíticas, auxiliando na manutenção da longevidade de sementes condicionadas, uma função ainda não descrita para os BRs.

Os BRs são uma classe relativamente nova de hormônios vegetais reconhecidos por sua atividade de regulação do crescimento vegetativo e reprodutivo das plantas e também por induzirem a germinação de sementes e mediar a indução de genes ligados a resposta a estresses atribuindo às plantas e sementes maior tolerância a estresses bióticos e abióticos (TAIZ e ZEIGER, 2013).

2.1.4 Estudo da longevidade

Um dos pioneiros na análise quantitativa da perda de viabilidade durante o armazenamento foi E. H. Roberts. Foi observado que a perda da viabilidade geralmente segue um padrão sigmóide e reconheceu que isso poderia estar relacionado a uma distribuição normal de vida entre as sementes de uma população. Com o envelhecimento as sementes em algum momento perdem a capacidade de formar plantulas normais, com posterior incapacidade de protrusão da radícula e morte da semente (BEWLEY et al., 2013).

Conhecer o comportamento de perda da viabilidade das sementes é de grande importância para os bancos de germoplasma, visando a conservação da espécie.

Em laboratório, a análise da longevidade de sementes é realizado pelo método o envelhecimento controlado, para determinação do p50 (período de envelhecimento em dias, em que a viabilidade das sementes se reduz pela metade). Os dados obtidos, pela número de sementes germinadas, são convertidos em probit para linearização dos dados cumulativos e o p50 é calculado com base na equação matemática: $v = Ki - p/\sigma$.

2.2 *Priming* de sementes

O desenvolvimento de tecnologias híbridas e a competitividade do setor olerícola ressaltam a importância da sementes de qualidade, que segundo Nascimento e Costa (2009) refletem no desempenho superior das plantas em campo sob condições ambientais adversas, originando plantas vigorosas e potencialmente produtivas em menor tempo. Em função do alto custo unitário para implantação, há necessidade de utilizar sementes hortaliças de elevada qualidade.

Neste sentido para obtenção de sementes de maior qualidade têm-se buscado o desenvolvimento de tecnologias/técnicas que permitam as sementes expressar todo seu potencial. Um das técnicas de maior sucesso empregadas é o condicionamento fisiológico (*priming*).

O *priming* permite que ocorre ativação do metabolismo das sementes, para dar início a germinação, sem que haja protrusão da radícula (LARA et al., 2014).

Isto é, através da hidratação controlada das sementes obtém-se sementes, metabolicamente mais preparadas para germinar. Em geral, o tratamento baseia-se na embebição das sementes em uma solução osmótica, sob condições controladas, seguida de secagem até retomada da umidade inicial (NASCIMENTO e COSTA, 2009). Marcos-Filho (2015) pondera a eficiência do *priming* para a maior expressão do potencial fisiológico de sementes e potencial para uniformizar o vigor de diferentes lotes de sementes.

O *priming* vem sendo utilizado em sementes hortaliças, trazendo benefícios através do aumento da velocidade de germinação e emergência, bem como para obtenção de mudas vigorosas, como constato por Batista et al. (2015) para sementes de pimenteira. Nascimento e Lima (2008), ao trabalharem com sementes de berinjela condicionadas em solução aerada de KNO_3 0,35 M e polietilenoglicol (PEG) em diferentes períodos de embebição verificaram que a germinação das mesmas foi favorecida em temperaturas abaixo do ideal (15 °C), isto é, além de beneficiar a germinação o tratamento propicia a sementes maior resistência ao estresse.

A técnica do *priming* é também relacionada ao aumento da síntese de DNA, RNA, proteínas e atividade enzimática (enzimas envolvidas na degradação do tecido de reserva e também com atividade antioxidante), sendo que estes aumentos capazes de contrapor o processo da deterioração (NASCIMENTO e COSTA, 2009).

2.3 Longevidade de sementes condicionadas

Têm-se relatado que o *priming* afeta negativamente a longevidade de sementes, uma vez que o efeito não é perdido em períodos curtos de armazenamento, contudo as sementes que passam pelo tratamento de *priming* quando armazenadas à longos prazos, particularmente em condições adversas, tem seu potencial fisiológico mais afetado em relação as sementes não tratadas (NASCIMENTO e COSTA, 2009).

Pereira et al. (2005) estudaram a peletização e condicionamento em semente de pimenteira e constataram que o condicionamento com KNO_3 com potencial de -1,1MPa à 25 °C diminui a capacidade de retenção da viabilidade ao

longo do períodos de armazenamento, isto é, durante as avaliações aos 4, 8, 12, 16 e 20 meses de armazenamento houve diminuição da capacidade germinativa.

Buitink, Hemminga e Hoekstra (2000) verificaram que em sementes condicionadas há aumento da mobilidade molecular, levando a perda da longevidade. No entanto, Bruggink, Ooms e van der Toorn (1999) demonstraram a possibilidade de se ampliar parcialmente a longevidade em sementes condicionadas através da aplicação de choque térmico após o tratamento de *priming* previamente à secagem.

Gurusinghe et al. (2002) constataram que nas sementes de tomate expostas ao choque térmico (40 °C) após o *priming* há um aumento de proteínas *BiP* (proteínas de reparo em resposta ao choque térmico e outros tipos de stress associada ao tratamento de altas temperatura), que levou a um moderado prolongamento da longevidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Sementes do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal (Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP-Campus de Botucatu-SP).

3.1 Estudos Fisiológicos

3.1.1 Material vegetal

As sementes *S. lycopersicum* usadas neste trabalho foram obtidas de uma população núcleo do *Tomato Genetics Resource Center* (TGRC). Foram produzidas sementes dos acessos LA2285 (cultivar) e LA1509 (espécie selvagem) de tomateiro (caracterizados com longevidade alta em experimento preliminar). A produção das sementes ocorreu entre os meses de janeiro e maio de 2017. A semeadura foi realizada em bandejas contendo substrato comercial composto de turfa de sphagno, vermiculita expandida, resíduo de casca de arroz torrefada, calcário dolomítico, gesso agrícola e traços de NPK – nitrogênio/fosforo/potássio. A emergência das plântulas ocorreu aos cinco dias após a semeadura (DAS).

O transplântio das mudas foi realizado aos 28 DAS, quando as mesmas apresentavam dois pares de folhas. As mudas foram transplantadas para as covas no solo sob cobertura plástica de ambiente agrícola e fechamento de sombrite (75%) nas laterais.

A adubação das covas, durante o ciclo do tomateiro, foi realizada utilizando-se o formulado 4-30-10. No transplântio realizou-se o fornecimento total de fosforo e a primeira das cinco aplicação de nitrogênio e potássio e, as demais aplicações de destes foram realizadas a cada duas semanas (NASCIMENTO, 2014). O cálculo das quantidades de adubo foram obtidas através da análise do solo da área (Tabela 1) baseando-se na recomendações para a cultura do tomateiro estaqueado (RAIJ et al., 1997).

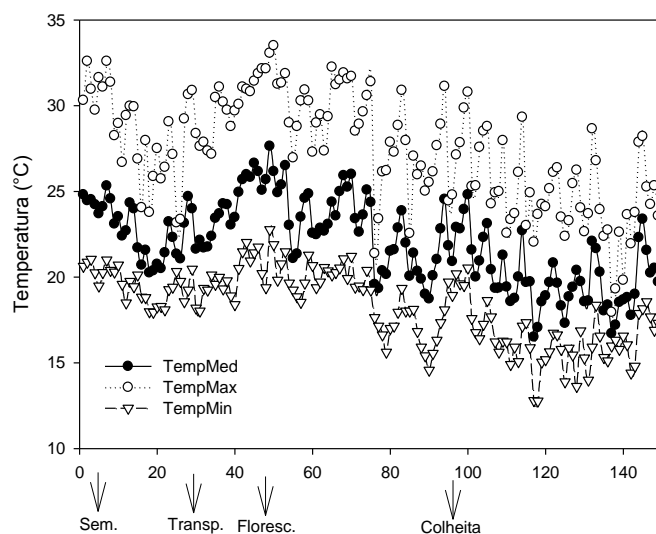
Tabela 1. Análise da solo da área experimental anterior a instalação do tomateiro na camada de 0-20 cm de profundidade.

pH	MO	P	S	Al ³⁺	H+Al ³⁺	K	Ca	Mg	SB	CTC	V
	<i>g dm⁻³</i>	<i>mg dm⁻³</i>		-----			<i>Mmolc dm⁻³</i>			-----	%
6,87	0	38,20	8,61	0	9,25	2,28	97,81	41,02	141,12	150,18	93,96

As plantas foram tutoradas em fio, conduzindo-se duas hastes por planta. As podas para remoção de “ramos ladrão” foram realizadas semanalmente. O controle de pragas e doenças foi realizado com utilização de defensivos (clorpirifos, lufenurum, piraclostrobina, tiametoxan+lambd-cialotrina, tiofanato-metilico+clorotalonil, metiram+piraclostrobina) recomendados para o tomateiro, com aplicações realizadas em função da ocorrência de pragas e prevenção de doenças e, extrato de Nim[®] a cada 15 dias. Ao iniciar a formação dos frutos realizou-se a aplicação de fertilizante via foliar composto de cálcio (21,4%) e boro (1%), a cada 10 dias.

Durante o desenvolvimento do tomateiro, do período compreendido entre a semeadura ao final da colheita, a temperatura média do ambiente externo a casa de vegetação foi de 21,9 °C e precipitação pluvial de 548,6 mm do transplântio ao final da colheita. A irrigação foi realizada via gotejamento uma vez ao dia por uma hora. Os dados relativos a temperaturas máximas, mínimas e média externas do ambiente estão dispostos na Figura 1.

Figura 1. Temperatura (°C) durante a produção de sementes de tomateiro de janeiro a maio de 2017.



A colheita dos frutos teve início aos 62 dias após o transplântio (DAT), para ambos os acessos, e foi realizada conforme o amadurecimento dos frutos aos 68, 71, 77 e 90 DAT, e após cada coleta, as sementes foram separadas do fruto manualmente e adicionada na massa de sementes solução de Hipoclorito de Sódio (NaClO) 9% na proporção de 1:1, pelo período de 30 minutos para remoção da mucilagem que envolve as sementes.

Após este período as sementes foram lavadas em água corrente e colocadas para secar sob peneiras em estufa de circulação forçada de ar a 32 °C e 32% UR pelo período de 24 h, até atingirem entre 0,08-0,09 gH₂O/gPS⁻¹ de teor de água. O lote de cada acesso foi composto pela homogeneização das sementes extraídas de cada coleta, com separação manual de sementes “chochas” e/ou mal formadas. Em sequência, as sementes foram armazenadas em pote hermético de vidro alocados na câmara fria a 14 °C e 64% UR.

3.1.2 *Priming* e choque térmico

Conforme protocolo estabelecido em experimento anterior, as sementes foram osmocondicionadas em tubos contendo solução de PEG 6000 à -1,0MPa, pelo período de 60 h a 20 °C. A fim de evitar alteração no potencial, a solução foi monitorada a cada 24 h utilizando refratômetro. Para manter a aeração da solução,

foi feito um orifício na tampa dos tubos e, em seguida, os mesmos foram colocados em agitador durante o período de condicionamento. Para a definição do efeito dos reguladores vegetais na longevidade foi adicionado EpiBL 0,1 μM e ABA 1 μM durante o condicionamento, além do controle (sementes apenas condicionadas em PEG) e a aplicação de choque térmico após o condicionamento das sementes. As concentrações de EpiBL e ABA foram definidas em experimento anterior (dados não apresentados). O choque térmico foi aplicado após o osmocondicionamento, em que, após lavagem das sementes e remoção da umidade superficial pela rápida disposição das sementes sobre “papel seco”, as sementes foram expostas a ambiente de 32% UR/38 °C, em estufa sem circulação de ar pelo período de 2 h.

Após aplicação dos tratamentos as sementes foram secas pelo período de 24 h a ambiente de $\pm 60\%$ UR/20 °C, sendo que as sementes do tratamento de choque térmico passaram por 22 h neste processo. Em sequência a secagem, as sementes foram armazenadas em potes herméticos de vidro até avaliação dos seguintes parâmetros:

Germinação: realizado com quatro sub amostras de 50 sementes, distribuídas uniformemente em placas de Petri plásticas, sobre substrato de papel tipo “mata borrão”. As sementes foram mantidas em germinador a 25 °C, com fotoperíodo de oito h de luz e 16 h escuro, adotando-se como parâmetro de germinação a protrusão radicular com comprimento ≥ 2 mm e, a máxima germinação contabilizada aos 14 dias, conforme adaptado da Regra para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). *Tempo para 50% de germinação (T50) e uniformidade (T16-84)*: o cálculo foi realizado através da análise de dados de protrusão cumulativa utilizando o módulo de ajuste de curva do pacote de software Germinator (JOOSEN et al., 2010)

Longevidade: as sementes de cada tratamento foram alocadas em saquinhos de tecido “voil” e estes distribuídos em potes herméticas de vidro de um litro, que continha 2 cm de coluna de solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) em seu interior, o que permitiu atmosfera de 75% de umidade relativa (UR) a 35 °C. Os saquinhos ficaram suspensas por um suporte de PVC e tela plástica perfurada para que não entrassem em contato com a solução e permitindo a homogeneização do ambiente interno da jarra (Figura 2), conforme adaptado de Gold e Hay (2014).

Figura 2. Pote hermético contendo solução saturada de NaCl e suporte (A) para os saquinhos com as sementes (B).

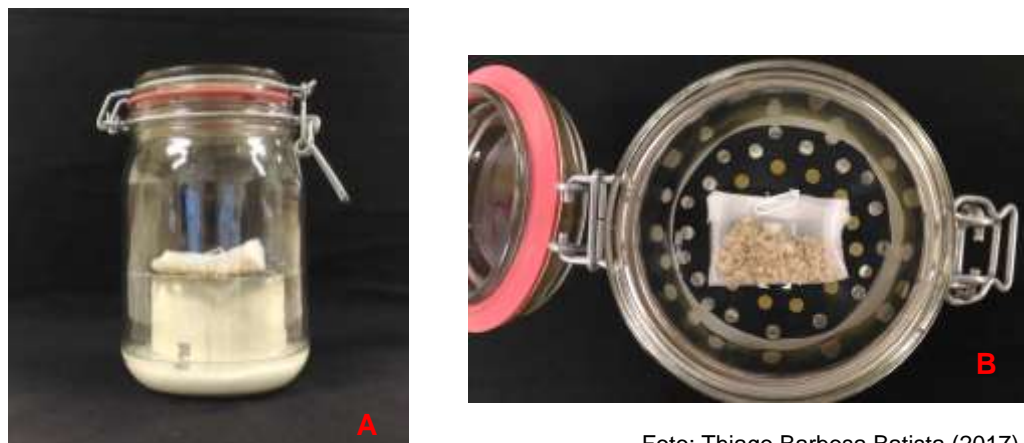


Foto: Thiago Barbosa Batista (2017)

Em cada ponto amostral foi avaliado a germinação (conforme descrito anteriormente). O teor de água das sementes foi determinado no ponto amostral de 30 dias, pelo método da estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 24 horas de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), com duas repetições de 50 sementes e, os dados foram expressos em gramas de água por gramas de peso seco.

Dos resultados obtidos ao longo do armazenamento foi elaborado a curva de distribuição da germinação de cada acesso ao longo do período, sendo os valores transformados em *probit* para determinação do momento em que a germinação é reduz pela metade (P50), por meio da equação:

$$v = Ki - p/\sigma \quad (1)$$

Em que: v = viabilidade em dias; Ki = germinação inicial; p = morte esperada no tempo; e σ = inclinação da reta.

3.1.3 Análise dos resultados

Os dados foram analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey e/ou teste-T ($P \leq 0,05$). As

curvas da perda da germinação ao longo do armazenamento foram ajustadas para o comportamento sigmoide.

3.2 Estudos moleculares

3.2.1 Preparo e processamento do RNAseq

O RNA total foi extraído utilizando o Kit NucleoSpin® RNA plant (Macherey-Nagel), seguindo rigorosamente as instruções do fabricante. Foram utilizadas três réplicas de 100 sementes armazenadas a -80 °C imediatamente após tratamento. A qualidade e quantificação das amostras de RNA total foram avaliadas em 2100 Bioanalyzer e amostras com RIN $\geq 7,2$ foram utilizadas para as etapas posteriores.

O sequenciamento foi realizado na plataforma HiSeq2500® (Illumina®, USA), utilizando o serviço do Laboratório Central de Tecnologia de Alto Desempenho em Ciências da Vida da Universidade Estadual de Campinas (LaCTAD, Brasil). Para construção das bibliotecas foi utilizado o kit TrueSeq RNA Library Prep Kit V2® (Illumina®, USA). Em resumo, realizou-se a hibridização e ligação dos adaptadores, transcriptase reversa, purificação do cDNA e, por fim amplificação e quantificação do cDNA amplificado. O cDNA foi diluído e utilizado para gerar os *clusters* (amplificação de fragmentos específicos) e, sequenciado. Construídas as bibliotecas foram sequenciados 100 bp *paired-end*. A saída de dados no formato de arquivo *fastq* continha informações de sequência, incluindo a qualidade de sequenciamento (Índice de qualidade de *Phred*). Escores médios ≥ 20 por posição foram utilizados para o alinhamento.

3.2.2 Alinhamento de *reads* e genes diferencialmente expressos (DEG)

Paired-end reads de mRNA foram mapeados no genoma de liberação 39 de *Solanum lycopersicum* usando os parâmetros padrão de TopHat2 (KIM et al., 2013). As contagens de genes RefSeq foram obtidas usando HTSeq (ANDERS, PLY & HUBER et al., 2015) e DESeq2 (LOVE, HUBER & ANDERS et al., 2014) foi usado para normalizar as contagens de expressão. As mudanças na expressão gênica foram consideradas estatisticamente significantes quando $|\text{fold change}|$ (FC) ≥ 2 e valores de $p \leq 0,05$.

3.2.3 Enriquecimento de *Gene Ontology* (GO)

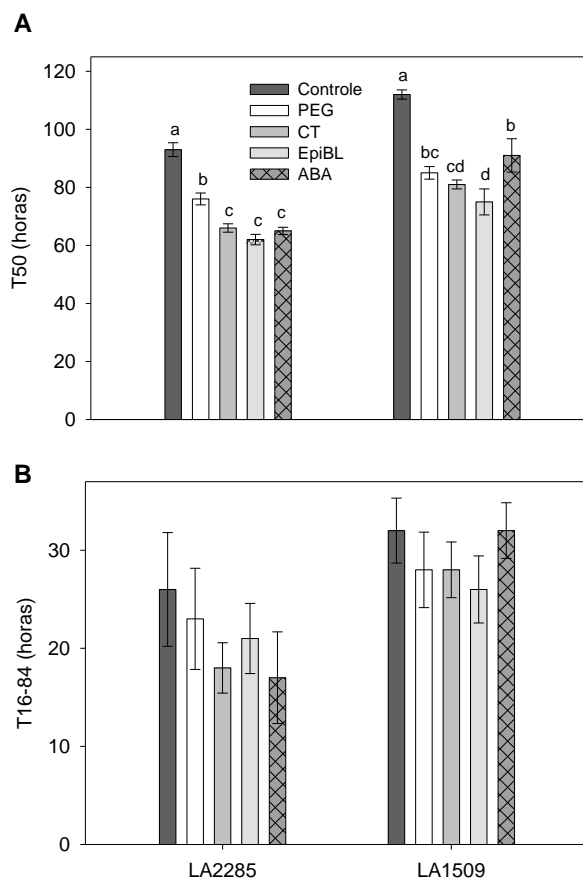
Enriquecimento de GO foi realizado utilizando o sistema de classificação PANTHER (MI et al., 2017), utilizando um teste hipergeométrico com uma correção da taxa de descoberta falsa de Benjamini e Hochberg. Um corte de *p*-valor de 0,05 e 2 de enriquecimento foi utilizado para identificar os processos enriquecidos.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do *priming* em sementes de *S. lycopersicum*

O osmocondicionamento a -1,0 MPa apresentou efeito significativo na redução do tempo para 50% de germinação para as sementes dos acessos analisados, levando 72 h (LA2285) e 85 h (LA1509) para 50% de germinação, resultado menor que 93 h (LA2285) e 112 h (LA1509) das sementes não tratadas (Figura 3-A). Não houve efeito significativo do *priming* sobre a uniformidade de germinação das sementes de ambos os acessos de *S. lycopersicum* (Figura 3-B).

Figura 3. Tempo para 50% de germinação (T50) e uniformidade de germinação (T16-84) em sementes de *S. lycopersicum* não tratadas e submetidas ao *priming* com PEG (solução de polietileno glicol -1,0 MPa), CT (choque térmico após *priming* a 32% UR/38 °C, por 2h), EpiBL (PEG -1,0 MPa associado com Epibrassinolídeo 0,1 μ M) e ABA (PEG -1,0 MPa associado com ácido abscísico 1 μ M). Letras distintas dentro de cada acesso indicam diferença significativa ($P \leq 0,05$).



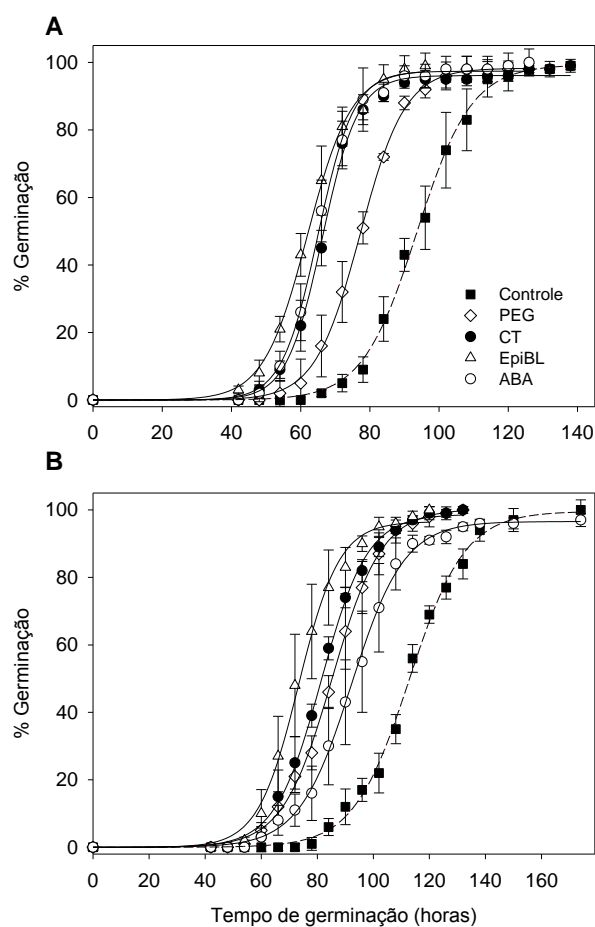
Foi verificado benefício adicional significativo dos tratamentos de CT, EpiBL e ABA na velocidade de germinação, isto é, menor T50 em relação ao tratamento tradicional com solução de PEG -1,0 MPa nas sementes do acesso LA2285. Para sementes do acesso LA1509, dentre os tratamentos adicionais, o *priming* associado com EpiBL propiciou rápida germinação, em relação ao tratamento tradicional, com 75 h para 50% de germinação, menor que 85 h do tratamento tradicional de PEG -1,0 MPa (Figura 3-A).

O ácido abscísico tem efeito antagonístico no processo germinativo, todavia a concentração utilizada de 1 μ M não interferiu na germinação das sementes do acesso LA2285 e, embora tenha aumentado o tempo para 50% de germinação

em relação aos demais tratamentos adicionais não afetou de maneira significativa o desempenho das sementes do acesso LA1509 em relação ao tratamento tradicional (Figura 3-A).

Por meio do aumento na velocidade de germinação em relação as sementes não condicionadas (Figura 3-A), o *priming* antecipou o início da germinação (Figura 4) e, assim, permitiu que as sementes condicionadas atingissem mais rapidamente taxas superiores de germinação. A germinação inicial entre todos os tratamentos foi $\geq 98\%$ (Figura 4), não sendo negativamente afetada após *priming*, com máximo de germinação atingido em menor tempo.

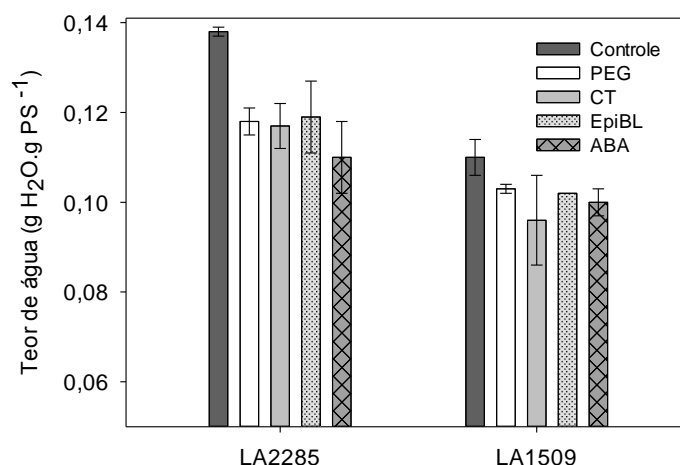
Figura 4. Curva de germinação de sementes dos acessos LA2285 (A) e LA1509 (B) de *S. lycopersicum* não tratadas e submetidas ao *priming* com PEG (solução de polietileno glicol -1,0 MPa), CT (choque térmico após *priming* a 32% UR/38 °C, por 2h), EpiBL (PEG -1,0 MPa associado com Epi brassinolídeo 0,1 μM) e ABA (PEG -1,0 MPa associado com ácido abscísico 1 μM).



4.2 Longevidade de sementes condicionadas de *S. lycopersicum*

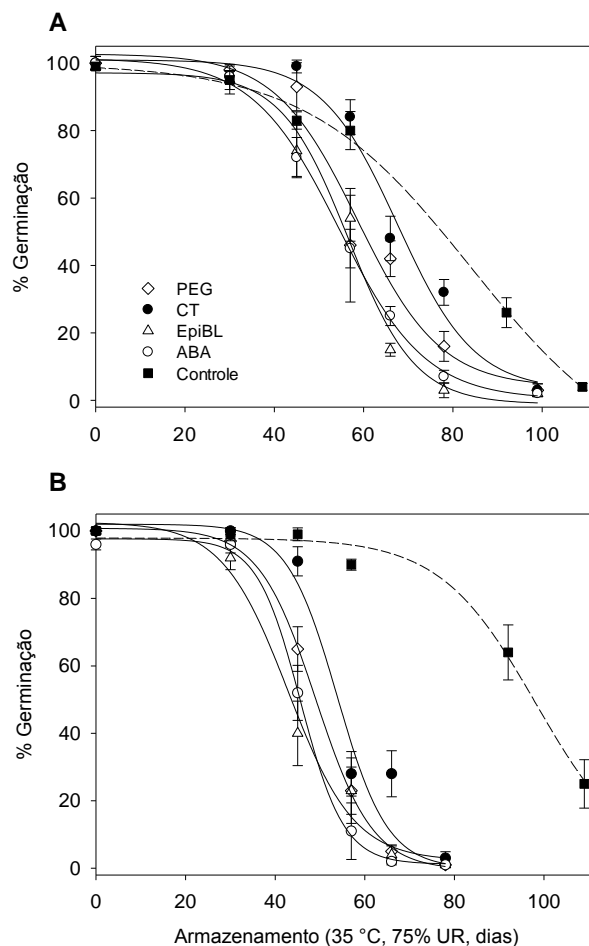
Após 30 dias de armazenamento controlado em condição de 75% UR e 35 °C, as sementes atingiram equilíbrio de teor de água de $0,11 \pm 0,02$ e $0,10 \pm 0,01$ gH₂O.gPS⁻¹ para sementes do acesso LA2285 e LA1509, respectivamente (Figura 5).

Figura 5. Teor de água (gH₂O.gPS⁻¹) após 30 d de armazenamento controlado (75% UR/35 °C) em sementes de *S. lycopersicum* não tratadas e submetidas ao *priming* com PEG (solução de polietileno glicol -1,0 MPa), CT (choque térmico após *priming* a 32% UR/38 °C, por 2h), EpiBL (PEG -1,0 MPa associado com Epibrassinolídeo 0,1 μM) e ABA (PEG -1,0 MPa associado com ácido abscísico 1 μM).



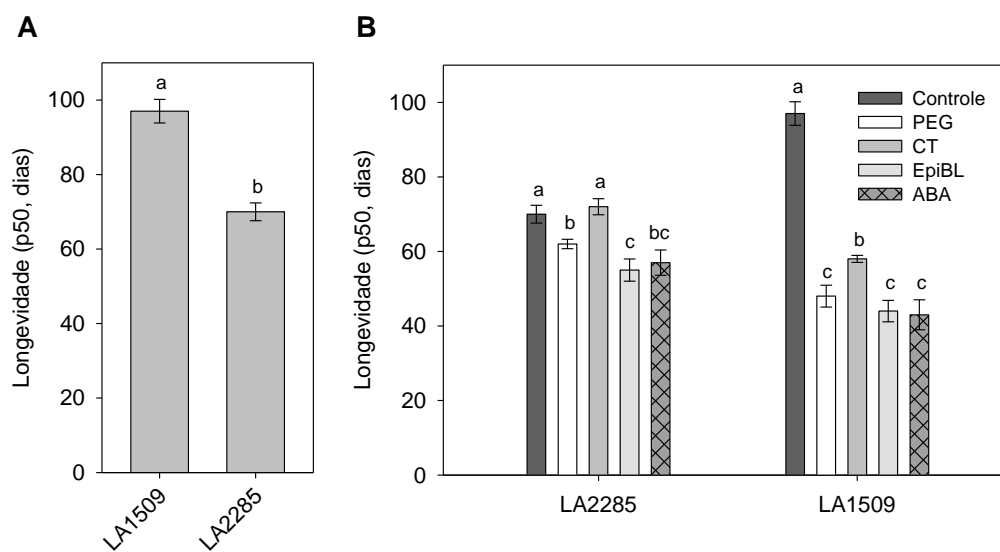
Embora obtenham maior velocidade de germinação (Figura 3-A e 4), sementes condicionadas perderam mais rapidamente a capacidade de germinação em relação as não tratadas, contudo o choque térmico após o *priming* promoveu acentuada retenção da capacidade de germinação ao longo do armazenamento (Figura 6).

Figura 6. Efeito de armazenamento controlado (35 °C, 75% UR) em sementes dos acessos LA2285 (A) e LA1509 (B) de *S. lycopersicum* não tratadas e submetidas ao *priming* com PEG (solução de polietileno glicol -1,0 MPa), CT (choque térmico após *priming* a 32% UR/38 °C, por 2h), EpiBL (PEG -1,0 MPa associado com Epibrassinólídeo 0,1 µM) e ABA (PEG -1,0 MPa associado com ácido abscísico 1 µM).



A longevidade das sementes não tratadas do acesso LA2285 foi de 70 d (P50) e do acesso LA1509 de 97 d (P50), apresentando diferença significativa (Figura 7-A) e, após o *priming*, sem considerar tratamentos adicionais a longevidade foi reduzida para 62 e 48 d (P50), respectivamente, isto é, houve uma redução na longevidade de 8 d (P50) para o acesso LA2285 e 49 d (P50) para o acesso LA1509, quando as sementes foram submetidas ao condicionamento (Figura 7-B).

Figura 7. Longevidade de sementes de dois acessos de *S. lycopersicum* (A) e submetidas ao *priming* com PEG (solução de polietileno glicol -1,0 MPa), CT (choque térmico após *priming* a 32% UR/38 °C, por 2h), EpiBL (PEG -1,0 MPa associado com Epibrassinólídeo 0,1 μ M) e ABA (PEG -1,0 MPa associado com ácido abscísico 1 μ M) (B). (A) Letras distintas indicam diferença significativa ($P \leq 0,05$) pelo teste-T e (B) Letras distintas dentro de cada acesso indicam diferença significativa ($P \leq 0,05$).



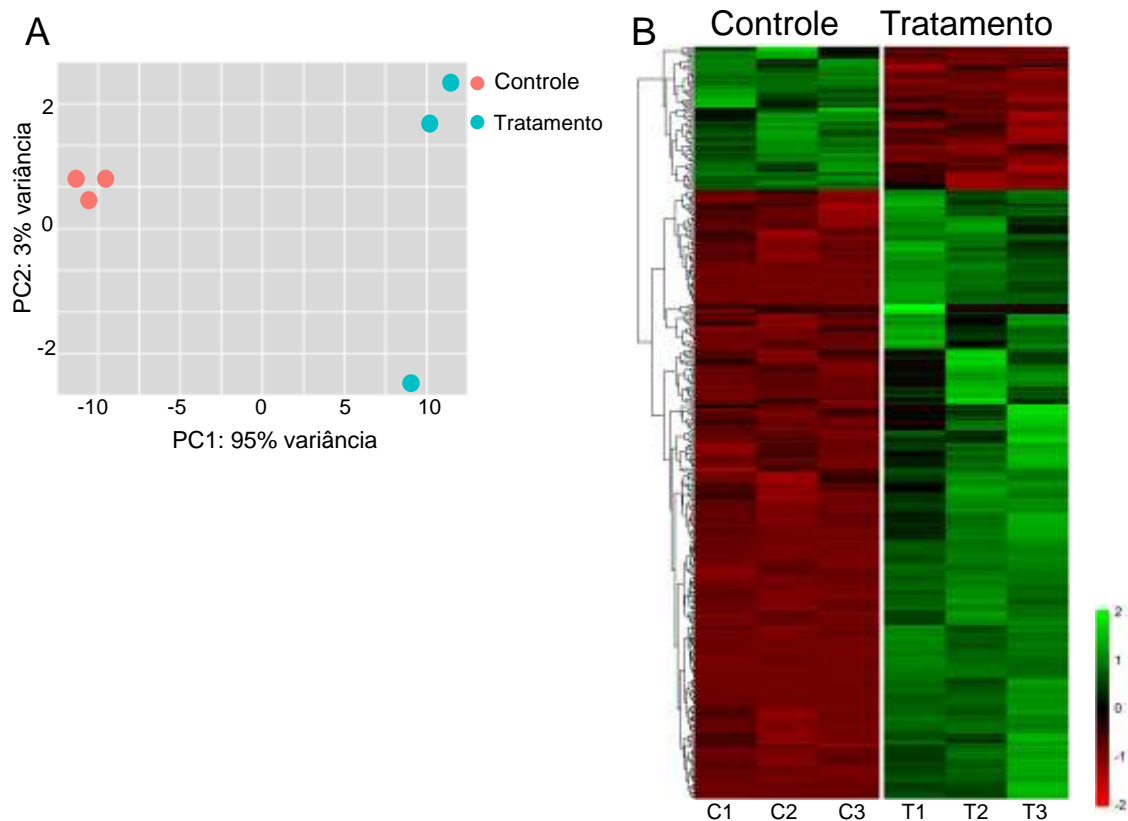
Todavia, o tratamento de choque térmico após o *priming* não permitiu a perda da longevidade nas sementes do acesso LA2285, enquanto que para o acesso LA1509 houve moderado prolongamento da longevidade para 58 d (P50), comparado as sementes condicionadas no *priming* tradicional, que foi de 48 d (P50), isto é, 10 d de prolongamento na longevidade em condições supra ótimas com utilização de choque térmico após o *priming*.

A adição de EpiBL durante o *priming* reduziu a longevidade quando comparado ao tratamento tradicional nas sementes do acesso LA2285 e, os tratamentos com EpiBL e ABA durante o *priming* não influenciaram a longevidade das sementes do acesso LA1509 (Figura 7-B). Adicionalmente, a aplicação de choque térmico a 32% UR/38 °C pelo período de 2 h demonstrou a possibilidade de reter e ampliar a longevidade de sementes condicionadas em sementes com baixa e alta longevidade, respectivamente (Figura 7-A e 7-B).

4.3 Identificação de transcritos em resposta ao choque térmico após *priming*

Foi analisado o transcriptoma das sementes de *S. lycopersicum* do acesso LA1509 em que o tratamento com choque térmico 32% UR/38 °C após *priming* ampliou a longevidade e seu respectivo controle (somente condicionadas em solução de PEG a -1,0 MPa) (Figura 7-B). O alinhamento dos *reads* mapeados foi $\geq 90\%$ no genoma referência de *S. lycopersicum* e, possibilitou verificar a expressão de 7560 genes. A análise de componentes principais (PCA) destes genes demonstrou diferença entre os grupos controle e tratamento, além de uma maior heterogeneidade na regulação do transcriptoma nas amostras submetidas ao tratamento de choque térmico (Figura 8-A), o que era esperado nas amostras biológicas em função da aplicação do tratamento de choque térmico a 32% UR/38 °C.

Figura 8. Perfil de expressão de sementes de *S. lycopersicum* submetidas ao choque térmico após *priming* e controle. (A) PCA dos genes expressos nas amostras de controle (PEG -1,0 MPa) e tratamento (choque térmico 32% UR/38 °C). (B) *Heatmap* de DEG nas amostras de controle e tratadas com choque térmico.



A análise destes 7560 genes revelou 368 genes diferencialmente expressos (DEG) ($p \leq 0.05$ e *fold change* ≥ 2) nas sementes de *S. lycopersicum*, dos quais 298 e 70 genes foram induzidos e reprimidos, respectivamente (Figura 8-B).

A análise de enriquecimento de GO processo biológico completo dos DEG, revelou que a via mais enriquecida foi a de “resposta ao calor” com cinco DEG ($E = 27,66$); seguido de “resposta ao estímulo de temperatura” com oito DEG ($E = 18,66$). A terceira via mais enriquecida foi “dobramento de proteínas” com 11 DEG ($E = 6,88$) e, por fim a via de “resposta a estímulos abióticos” com 12 DEG ($E = 4,76$) (Tabela 2).

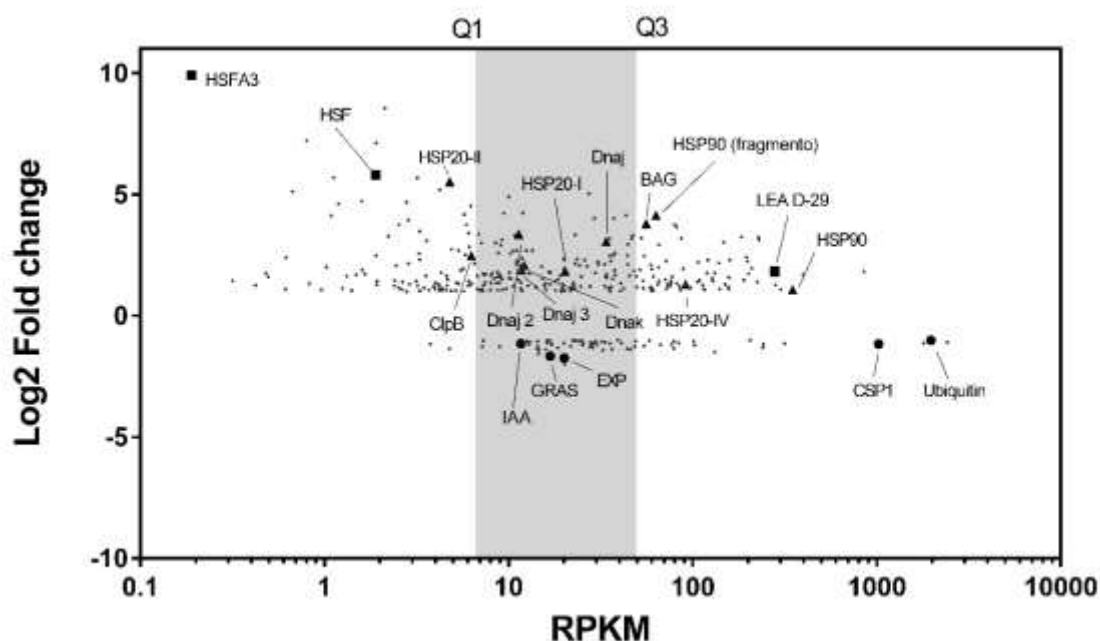
Tabela 2. Enriquecimento de GO de processo biológico completo dos DEG encontrados em sementes de *S. lycopersicum* submetidas ao tratamento de choque térmico 32% UR/38 °C.

GO processo biológico completo	# genes	DEG	Esperado	Enriquecimento (E)	FDR*
<i>Resposta ao calor</i>	19	5	0,18	27,66	3,26E-03
<i>Resposta ao estímulo de temperatura</i>	45	8	0,43	18,69	1,29E-04
<i>Dobramento de proteínas</i>	168	11	1,6	6,88	2,21E-03
<i>Resposta ao estímulo abiótico</i>	265	12	2,52	4,76	1,32E-02

#número de genes dentro da via; *FDR = taxa de falso descoberto

Utilizando um gráfico de dispersão que integra o grau de regulação transcrito (*Log2 Fold change*) e abundância (RPKM - *Reads Per Kilobase Million*) foi identificado mudanças entre a regulação e abundancia dos transcritos (Figura 9).

Figura 9. Dispersão comparando a abundância (RPKMs, eixo x) e seu grau de expressão (\log_2 *fold change*, eixo y). Cada ponto representa os transcrito DEG. Transcritos induzidos dentro das principais vias estimuladas (\blacktriangle), transcritos induzidos fora das principais vias estimuladas (\blacksquare) e, transcritos reprimidos verificados (\bullet). Sombra cinza indica divisão entre baixa, média e alta abundancia, definida utilizando quartilhes (Q1 e Q3).



Dentre os genes identificados nas principais vias enriquecidas, ocorre a presença de transcritos da classe das *HEAT SHOCK PROTEINS* (HSPs), como HSP90 com alta abundancia, todavia com baixo *fold change* ($FC = 1,08$) e, *SMALL HEAT SHOCK PROTEINS* (sHSPs) das classes I, II e IV ($FC = 1,84$; $5,53$ e $1,30$, respectivamente), com média, baixa e alta abundancia, respectivamente. Com abundancia média foram identificados transcritos do grupo chaperonas, como *CHAPERONE PROTEIN DNAJ* (DNAJ) ($FC = 3,06$) e *CHAPERONE DNAK* (DNAK) ($FC = 2,08$) (Figura 9).

Foram identificados dois fatores de transcrição fora das principais vias enriquecidas, com baixa abundancia, porém alto valor de *fold change*: *HEAT SHOCK FACTOR A3* (HSFA3) e *HEAT SHOCK FACTOR* (HSF) ($FC = 9,89$ e $5,79$) (Figura 9). Adicionalmente, verificou-se genes de alta abundancia fora das principais vias enriquecidas: *LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT PROTEIN* (LEA D-29) ($FC = 1,82$) (Figura 9).

Entre os genes reprimidos foram identificados *EXPANSIN* (EXP), *UBIQUITIN*, *COLD SHOCK PROTEIN-1* (CSP1), *AUXIN RESPONSIVE PROTEIN* (IAA) e *GRAS FAMILY TRANSCRIPTION FACTOR* (GRAS) (FC =; -1,74; -1,00; -1,16; -1,15 e -1,66, respectivamente) (Figura 9).

5 DISCUSSÃO

O *priming* é uma importante tecnologia para maximizar e uniformizar o desempenho de lotes de sementes, todavia sementes condicionadas perdem mais rapidamente sua longevidade. No entanto, o presente estudo demonstrou que a aplicação de choque térmico a 32% UR/38 °C após o *priming* é capaz de estender a longevidade de sementes submetidas ao *priming* de *S. lycopersicum*, como sugerido anteriormente e que a extensão da longevidade está associada a mudança no perfil transcriptômico que leva ao acúmulo de transcritos da classe *HSPs* (*Heat shock proteins*).

5.1 *Priming* beneficia a qualidade de sementes de *S. lycopersicum*

De acordo com os resultados, o protocolo de osmocondicionamento estabelecido (-1,0 MPa, 20 °C pelo período de 60h) foi eficiente para permitir maior expressão do vigor nas sementes dos acessos estudados de *S. lycopersicum*, por meio do incremento a velocidade de germinação (Figura 3-A e 4). As sementes de *S. lycopersicum* apresentam dormência por resistência mecânica do endosperma micropilar a protrusão da radícula. A enzima endo- β -mananase (E.C. 3.2.1.78) é uma das envolvida no enfraquecimento parcial desta barreira (BEWLEY et al., 2013; MARCOS-FILHO, 2015).

Em sementes de tomate a atividade da enzima endo- β -mananase inicia na região do endosperma micropilar e aumenta ao longo da embebição, com máximo ao atingir 50% de germinação (MO e BEWLEY, 2002; MO e BEWLEY, 2003) e o *priming* aumenta a atividade de endo- β -mananase a medida que diminui a restrição mecânica do endosperma micropilar (TOOROP et al., 1998). Anese et al. (2011) verificaram que o hidrocondicionamento aumenta a atividade da enzima endo- β -mananase nas sementes de *Solanum lycocarpum* e, as sementes tratadas germinaram mais rapidamente que as sementes não tratadas.

Portanto, é possível que o enfraquecimento do endosperma micropilar, propiciado pelo condicionamento fisiológico empregado neste trabalho, permitiu as sementes de tomateiro uma germinação rápida em relação ao controle. Esta rapidez refletiu no adequado desempenho das sementes, em que todas atingiram

máxima germinação em um tempo reduzido, e que pode ter fundamental importância no desempenho de estande de plantas (Figura 3-A e 4).

Além disso, foi verificado benefício adicional com a adição de 0,1 μM de EpiBL. O *priming* com regulador EpiBL aumentou a atividade antioxidante em sementes de pimentão (SILVA et al., 2015a) o que possibilita o combate a atividade das ROS durante a reinicialização do metabolismo. Leubner-Metzger (2001) ao estudar a ação do brassinosteróides em sementes de tabaco (*Nicotina tabacum*) constatou que este hormônio atua na promoção da germinação por um caminho distinto ao das giberelinas e relacionado diretamente com o enfraquecimento do endosperma micropilar.

Assim, o *priming* pode ter induzido a síntese e atividade de enzimas no endosperma micropilar, e a adição de EpiBL no tratamento promoveu aumento no efeito fisiológico do brassinosteróides nas sementes de tomate, promovendo enfraquecimento do endosperma micropilar e combate de ROS, levando a rápida germinação. Além disso, os brassinosteróides estão associados ao alongamento e divisão celular (FAGAN et al, 2015; TAIZ e ZEIGER, 2013) e portanto, o fornecimento exógeno de EpiBL durante o *priming* pode ter promovido o alongamento das células do hipocótilo e, aliado ao enfraquecimento do endosperma, favoreceu a superação da dormência e a protrusão da radícula.

Pela inibição da ruptura do endosperma, o ABA antagoniza os caminhos de giberelina e brassinosteróides (LEUBNER-METZGER, 2001). De fato o aumento de conteúdo de ABA exógeno impede a promoção da germinação, no entanto, no presente estudo a adição de 1 μM foi insuficiente para reduzir de forma significativa a germinação das sementes (Figura 4). Portanto, conclui-se que a intensidade de dormência estava baixa nos acessos do presente estudo, justificando a insensibilidade a ação do ácido abscísico. Todavia, divergente entre os acessos o que justifica diferença quanto a velocidade de germinação verificada entre os acessos.

5.2 O choque térmico é capaz de atenuar a perda da longevidade de sementes condicionadas

O *priming*, embora benéfico para as sementes de *S. lycopersicum* acentuou a perda da longevidade em comparação com as sementes não tratadas (Figura

6). A perda da longevidade das sementes condicionadas também foi verificada para sementes de alface (HILL et al., 2007) e *Impatiens* e pimentão (BUITINK, HEMMINGA e HOEKSTRA, 2000). Assim, foi investigado se os tratamentos alternativos de EpiBL e ABA durante o *priming* e choque térmico a 32% UR/38 °C após condicionamento prolongam a longevidade das sementes de *S. lycopersicum*.

Após condicionamento as sementes apresentavam teor de água de $\pm 1,08$ gH₂O.gPS⁻¹ e decorrido o período de secagem houve redução para $\pm 0,09$ gH₂O.gPS⁻¹ (dados não apresentados) e, atingiram taxa de germinação $\geq 98\%$ (Figura 4-A e 4-B). Isto é, a tolerância a dessecação (TD) não foi afetada pelo *priming*, em função do mesmo ter encerrado durante a fase II da absorção de água, período em que de acordo com Bewley et al. (2013) as sementes ainda toleram a dessecação se interrompido o processo de aquisição de água.

De fato, para caracterizar a técnica do *priming* as sementes necessitam passar pela secagem, sem que ocorra diminuição da porcentagem de germinação anterior ao tratamento. Porém a reinicialização do metabolismo e posterior suspensão do processo pode levar a alterações nos componentes celulares, relacionados com a baixa capacidade de armazenamento das sementes condicionadas.

Em sementes condicionadas de pimentão e *Impatiens walleriana* ocorre aumento da mobilidade molecular com relação direta à perda da longevidade das sementes e, existe ainda uma notável diminuição no conteúdo de oligossacarídeos, porém não afeta a estabilidade do estado vítreo (BUITINK, HEMMINGA E HOEKSTRA, 2000), indicando que a perda da longevidade está relacionada com a diminuição e/ou alteração de outras moléculas relacionadas com a estabilização da matriz celular. Apesar de compartilhar mecanismos com a TD, outros sistemas como o de proteção e desintoxicação são característicos da longevidade (RAJJOU e DEBEAUJON, 2008; SANO et al., 2016), porém, o mecanismo pelo qual sementes condicionadas perdem a longevidade ainda é desconhecido.

O tratamento com EpiBL contrariou evidências anteriores que o associam a prolongamento da longevidade (SILVA, 2015b). A aplicação de ABA, fitohormônio associado a longevidade (SANO et al., 2016), não influenciou na retenção da longevidade. Isto é, a aplicação destes reguladores através do *priming*

parece não influenciar na retenção da germinação ao longo do armazenamento, obviamente para as concentrações testadas neste estudo, pois concentrações maiores destes reguladores possam estender a longevidade, necessitando a ampliação de estudos.

Nas condições de armazenamento de 75% UR/35 °C apenas a aplicação de choque térmico a 32% UR/38 °C por 2 h permitiu significativa manutenção da longevidade comparada ao tratamento convencional de *priming* (Figura 6 e 7-B). Neste tratamento as sementes após o *priming* apresentaram conteúdo de água de 1,08 gH₂O.gPS⁻¹ e após o choque térmico reduziu para 0,08 g H₂O.g PS⁻¹, isto é, uma perda de ±1 gH₂O.gPS⁻¹ no período de 2 h (dados não apresentados), constituindo assim uma secagem rápida com um aumento de 18 °C em relação a temperatura do tratamento de *priming* aplicado.

5.3 Importantes transcritos identificados no tratamento de choque térmico indicam a importância do sistema de proteção para longevidade de sementes condicionadas

O acesso LA1509 foi selecionado para o estudo do transcriptoma em função de maior contraste na perda da longevidade entre o controle e sementes condicionadas e em que a aplicação do choque térmico ampliou a longevidade, coerente com estudos anteriores. Além disso, trata-se de um acesso no qual não ocorreu a domesticação.

Bruggink, Ooms e van der Toorn (1999) demonstraram que o estresse hídrico e choque térmico após o *priming* nas sementes ainda com elevado conteúdo de água, permite maiores taxas de sobrevivência após deterioração controlada a 50 °C por 48 h. Gurusinghe, Powell e Bradford (2002) demonstraram aumento na intensidade de proteínas *BiP* (*immunoglobulin binding protein*) da família das *heat-shock proteins* e, a expressão aumentada destas foi associada ao prolongamento da longevidade de sementes condicionadas de tomate submetidas ao choque térmico a 37 °C por 2, 3 ou 4 h.

As proteínas *BiP* da classe das *HSPs* estão relacionadas com a restauração de proteínas danificadas pelo calor e/ou enrolamento incorreto (LEE e VIERLING, 2000), além de funcionar como chaperona na preservação da estrutura proteica durante a desidratação ou na reativação de proteínas danificada durante a

aquisição de água e secagem - etapas do *priming* (GURUSINGHE, POWELL e BRADFORD, 2002). No presente estudo, ampliaram-se as informações em relação ao estímulo e o acúmulo de moléculas através do choque térmico, pois foram encontradas diversas moléculas estimuladas pelo tratamento de choque térmico a 32% UR/38 °C após o *priming* (Figura 9), que podem ser importantes na busca para elucidar os mecanismos subjacentes a longevidade.

A abundância do transcrito *LEA D-29* após choque térmico nas sementes de *S. lycopersicum* indica adequada secagem após *priming* e, embora análoga a secagem ideal das sementes para que não ocorra danos celulares ou avanço de etapas, permitiu a indução e acúmulo de moléculas protetoras da classe das *HSPs* (Figura 9), o que parece ser o responsável por garantir o emprego da técnica e o fator chave responsável por prolongar a longevidade das sementes de *S. lycopersicum*.

A elevação na temperatura para aplicação do tratamento certamente justifica o enriquecimento GO de via de resposta ao calor e estímulo de temperatura (Tabela 2) e reflete a robusta mudança no perfil de expressão dos genes (Figura 8-B) o que possibilita estudar o papel destes genes no prolongamento da longevidade (Figura 7-B).

O aumento da atividade das *HSPs* não é surpreendente mediante aplicação do choque térmico, pois estas são o maior grupo de proteínas em resposta ao estresse e se acumulam no final da maturação para permitir que as sementes ortodoxas sobrevivam à dessecação e, portanto relacionadas com a tolerância à dessecação e a longevidade e (HE e YANG, 2013; KAUR et al., 2015; LIMA et al., 2017).

Apesar de abundância variada é notável a participação de *small HSPs* (*sHSPs*) no prolongamento da longevidade das sementes de *S. lycopersicum*, o que possivelmente está relacionado com função chaperona de prevenir agregação e desnaturação de proteínas (LEE et al., 1997), assim como relatado por Kaur et al. (2015) para a *OsHSP18.2*, que facilita o dobramento de proteínas, assim preveni a desnaturação destas e, além disso aumentam em resposta ao estresse térmico em sementes de arroz, diminuem o acúmulo de espécies reativas do oxigênio e permitem maior viabilidade de sementes de *Arabidopsis* após deterioração.

O transcrito de *DNAJ* verificado no presente estudo também tem função chaperona relatada, induzido por choque térmico, desempenha papel fundamental no crescimento de plantas (FAN et al., 2017) e indução de resistência ao estresse (BEKH-OCHIR et al., 2013).

Os genes *HSF* são importantes fatores de transcrição (FTs) que regulam a expressão de vários genes responsivos ao estresse e desempenham um papel fundamental na tolerância a estresse abiótico (GHO et al., 2016), o que justifica a presença de *HSFA3* e *HSF* com alto valor de *fold change* ($FC \geq 5,79$), como revelou o transcriptoma das sementes de *S. lycopersicum* tratadas (Figura 9). Além disso, amplia as possibilidades de se relacionar este transcrito com a longevidade, pois tem-se relatado que apenas o *HSFA9* é específico em sementes (KOTAK et al., 2007), o que demonstra a possibilidade de se induzir a atividade de outros FTs que podem ampliar a longevidade de sementes.

Este resultado é importante, pois identificar FTs relacionados ao estresse abiótico (choque térmico) abre possibilidades para programas de melhoramento visando aliviar as tensões nas plantas e, neste caso referente ao calor e prolongamento do período de armazenamento nas espécies de plantas cultivadas cuja a propagação dá-se por sementes.

As *HSPs* também tem sido associados ao vigor de sementes em outras trabalhos (KAUR et al., 2015), como relatado por Bettey e Finch-Savage (1998) para a *sHSP17.6*, a qual afeta a tolerância ao estresse da sementes e, portanto, contribui para a determinação do vigor, mas ressalta que este é apenas um dos vários fatores que influenciam o desempenho das sementes. Alinhado a este resultado a presença de transcritos *small HSPs* deste estudo podem indicar que estes transcritos estão envolvidos no “envigoramento” de sementes. Pois, verificou-se incremento na velocidade de germinação das sementes de *S. lycopersicum* com aplicação do choque termico (Figura 3-A e 4), com notável acúmulo e expressão de *HSPs* (Figura 9) e posterior retenção da viabilidade em relação as sementes condicionadas (Figura 6 e 7-B).

Genes relacionados a organização da parede celular (*EXP*) e degradação de proteínas (*Ubiquitin*) que foram reprimidos indicam a suspensão do processo de reinicialização do metabolismo. E a análise do transcriptoma nas sementes de *S. lycopersicum* revelou ainda que durante o *priming* não há atividade de transcritos relacionados a proteção do tipo *HSPs* (Figura 8-B e 9). Logo, ainda que

acumuladas durante a maturação, ao reiniciar o metabolismo através do *priming* nas sementes, parece necessário que haja um novo aumento da atividade desta moléculas através do choque térmico, para que as sementes condicionadas tolerem maiores períodos de armazenamento.

Em hipótese, as *HSPs* pré-armazenadas são requeridas durante a reinicialização da germinação e, ainda que responsivas ao estresse abiótico, estas moléculas não foram induzidas através do *priming* -1,0 MPa a 20 °C que pode ser considerado um tipo de estresse. E ainda, o sistema de proteção parece estar mais relacionado a longevidade do que outros sistemas em comum com a TD quando as sementes foram condicionadas anteriormente, ainda que não esteja esclarecido por quais caminhos estas perdem mais rapidamente sua longevidade.

Difícilmente houve indução da atividade e/ou acúmulo das moléculas encontradas no tratamento de choque térmico nas sementes do grupo controle, pois as mesmas foram verificadas em condição de estresse a 32% UR/38 °C, contrário a condição de secagem utilizada de \pm 60% UR/20 °C para os demais tratamentos; reforçando a hipótese levantada anteriormente.

Assim, o resultado do presente estudo indica a potencialidade da aplicação deste tratamento para estender a longevidade de sementes condicionadas e ainda incrementar a expressão do vigor das sementes, com um emprego relativamente fácil e menos oneroso que associar um regulador vegetal ao *priming*. Além disso, expande as informações em relação as moléculas que podem estar envolvidas e/ou governar a longevidade das sementes.

Neste estudo, o conteúdo de água das sementes de *S. lycopersicum* durante o armazenamento ficou entre $0,11 \pm 0,02$ gH₂O.gPS⁻¹, que corresponde a \pm 10,5% em base úmida. O armazenamento a 75% UR/35 °C pode ter propiciado que o citoplasma saísse do estado vítreo, passando a um estado “emborrachado” amorfo e de consistência sólida em que não ocorre reações químicas, mas capaz de oferecer condições deletérias aos tecidos das sementes e redução da viabilidade mensurável (LIMA et al., 2017; MARCOS-FILHO, 2015; BALLESTEROS e WALTERS, 2011; BUITINK e LEPRINCE, 2004; WALTERS, 1998).

Isto indica que os resultados obtidos podem refletir as condições mais próximas de armazenamento ideal, em que as sementes apresentem o mesmo estado citoplasmático, contrario as condições mais extremas, principalmente de

temperatura verificado nos trabalhos anteriores de Gurusinghe, Powell e Bradford (2002) e Bruggink, Ooms e van der Toorn (1999).

6 CONCLUSÕES

O tratamento de *priming* beneficia maior velocidade de germinação das sementes e o choque térmico é capaz de ampliar a longevidade de sementes de *S. lycopersicum*.

O acúmulo de moléculas chaperonas do tipo *HSPs* está envolvido na retenção da longevidade em sementes condicionadas de tomate.

Os FTs *HSFA3* e *HSFB* são possíveis genes candidatos envolvidos no prolongamento da longevidade.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. A. S. et al. Behavior of coffee seeds to desiccation tolerance and storage. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 4, p. 399-406, 2014.
- AMOOAGHAIE, R.; NIKZAD, K.; SHAREGHI, B. The effect of priming on emergence and biochemical changes of tomato seeds under suboptimal temperatures. **Seed Science and Technology**, v. 38, n. 2, p. 508-512, 2010.
- ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 2, p. 166–169, 2015.
- ANESE, S. et al. Seed priming improves endosperm weakening, germination, and subsequent seedling development of *Solanum lycocarpum* St. Hil. **Seed Science and Technology**, v. 39, n. 1, p. 125-139, 2011.
- ARGERICH, C. A.; BRADFORD, K. J.; TARQUIS, A. M. The effects of priming and ageing on resistance to deterioration of tomato seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 40, n. 5, p. 593-598, 1989.
- ASGHARIPOUR, M. R.; RAFIEI, M. The effects of osmo-priming on tomato seed germination. **Advances in Environmental Biology**, v. 5, n. 9, p. 2866-2870, 2011.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, p. 93–107, 2004.
- BALLESTEROS, D.; WALTERS, C. Detailed characterization of mechanical properties and molecular mobility dry seed glasses: relevance to the physiology of dry biological systems. **The Plant Journal**, v. 68, p. 607-619, 2011.
- BATISTA, T. B. et al. Aspectos fisiológicos e qualidade de mudas da pimenteira em resposta ao vigor e condicionamento das sementes. **Bragantia**, v. 74, n. 4, p. 367-373, 2015.
- BEKH-OCHIR, D. et al. A novel mitochondrial DnaJ/Hsp40 family protein BIL2 promotes plant growth and resistance against environmental stress in brassinosteroid signaling. **Planta**, v. 237, p. 1509-1525, 2013.
- BETTEY, M.; FINCH-SAVAGE, W. E. Stress protein of mature *Brassica* seeds and their germination performance. **Seed Science Research**, v. 8, n. 3, p. 347-355, 1998.
- BEWLEY, J. D. et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. New York: Springer, 2013. 392 p.
- BRUGGINK, G. T.; OOMS, J. J. J.; van der TOORN, P. Induction of longevity in primed seeds. **Seed Science Research**, v. 9, n. 1, p. 49-53, 1999.

BUESO E, et al. ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX25 uncovers a role for gibberellins in seed longevity. **Plant physiology**, v. 164, p. 999-1010, 2014.

BUITINK, J.; HEMMINGA, M. A.; HOEKSTRA, F. A. Is there a role for oligosaccharides in seed longevity? An assessment of intracellular glass stability. **Plant Physiology**, v. 122, p. 1217-1224, 2000.

BUITINK, J.; LEPRINCE, O. Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. **Cryobiology**, v. 48, p. 214-228, 2004.

BUITINK, J.; LEPRINCE, O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, n. 10, p. 788-795, 2008.

CHATELAIN, 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 and Environment**, v. 35, n. 8, p. 1440–1455, 2012.

CHEN, K.; ARORA, R. Priming memory invokes seed stress-tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 94, p. 33-45, 2014.

CHEN, K.; FESSEHAIE, A.; ARORA, R. Dehydrin metabolism is altered during seed osmopriming and subsequent germination under chilling and desiccation in *Spinacia oleracea* L. cv. Bloomsdale: possible role in stress tolerance. **Plant science: an international journal of experimental plant biology**, v. 183, p. 27-36, 2012.

CLERKX, E. J. M. et al. Genetic differences in seed longevity of various *Arabidopsis* mutants. **Physiologia plantarum**, v. 121, n. 3, p. 448-461, 2004.

DEBEAUJON, I.; LEON-KLOOSTERZIEL, K. M.; KOORNNEEF, M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 122, p. 403–414, 2000.

DHAUBHADEL, S. et al. Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedling. **Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 333-342, 1999.

EDMOND, J. B.; DRAPALA, W. J. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. **Proceedings of the American Society Horticultural Science**, n. 71, p. 428-434, 1958.

FAGAN, E. B. et al. **Fisiologia vegetal: reguladores vegetais**. Piracicaba: Andrei, 2015. 300 p.

FAN, F. et al. The DnaJ gene Family in pepper (*Capsicum annum* L.): comprehensive identification, characterization and expression profiles. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1-11, 2017.

FAROOQ, M. et al. Enhancement of tomato seed germination and seedling vigor by osmopriming. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 42, n. 3-4, p. 36-41, 2005.

GHO, M. et al. The plant heat stress transcription factors (HSFs): structure, regulation, and function in response to abiotic stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-13, 2016.

GOEL, A.; GOEL, A. K.; SHEORAN, I. S. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. **Journal Plant Physiology**, v. 160, n. 9, p. 1093-1100, 2003.

GOLD, K.; HAY, F. **Equilibrating seeds to specific moisture levels**. Millennium seed bank partnership Kew. Informação técnica, n. 9, 2014.

GURUSINGHE, S.; POWELL, A. L. T.; BRADFORD, K. J. Enhanced expression of BiP is associated with treatment that extend storage longevity of primed tomato seeds. **Journal American Society Horticultural**, v. 127, n. 4, p. 528-534, 2002.

HE, D.; YANG, P. Proteomics of rice seed germination. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-9, 2013.

HILL, J. H. et al. Primed lettuce seeds exhibit increased sensitivity to moisture content during controlled deterioration. **HortScience**, v. 42, n. 6, p. 1436-1439, 2007.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behavior**. IPGRI Technical Bulletin. International Plant Genetic Resources Institute, Roma, Itália, 1996.

JOOSEN, R. V. L. et al. GERMINATOR: a software package for high-throughput scoring and curve fitting of Arabidopsis seed germination. **Plant Journal**, v. 62, n. 1, p. 148–159, 2010.

KAUR, H. et al. Differentially expressed seed aging responsive heat shock protein OsHSP18.2 implicates in seed vigor, longevity, and improves germination and seedling establishment under abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-13, 2015.

KAUR, H.; PETLA, B. P.; MAJEE, M. Small heat shock proteins: roles in development, desiccation tolerance and seed longevity. In: ASEA, A. A. A.; CALDERWOOD, S.; KAUR, P. (Eds.). **Heat shock proteins and plants**, 2016. p 3-18.

KIM, D. et al. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. **Genome Biology**, v. 14, n. 4, 2013.

KOTAK, S. et al. A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress protein during seed development of *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 19, p. 182-195, 2007.

KUMAR, S. J. et al. Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. **Annals of Botany**, v. 116, n. 4, p. 663–668, 2015.

LANDJEVA, S.; LOHWASSER, U.; BÖRNER, A. Genetic mapping within the wheat D genome reveals QTL for germination, seed vigour and longevity, and early seedling growth. **Euphytica**, v. 171, p. 129-143, 2010.

LARA, T. S. et al. Potassium nitrate priming affects the activity of nitrate reductase and antioxidant enzymes in tomato germination. **Journal of Agricultural Science**, v. 6, n. 2, p. 72-80, 2014.

LEE, G. J. et al. A small heat shock protein stably binds heat- denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. **EMBO Journal**, v. 16, n. 3, p. 659–671, 1997.

LEE, G. J.; VIERLING, E. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. **Plant Physiology**, v. 122, p. 189-197, 2000.

LEUBNER-METZGER, G. Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. **Planta**, v. 213, n. 5, p. 758-763, 2001.

LIMA, J. J. P. et al. Molecular characterization of the acquisition of longevity during seed maturation in soybean. **Plos One**, v. 12, n. 7, p. 1-25, 2017.

LIU, Y. et al. Effects of osmotic priming on dormancy and storability of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. **Seed Science Research**, v. 6, n. 2, p. 49-55, 1996.

LOVE, M. I., HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, 2014.

MACHEREL, D. et al. Function and stress tolerance of seed mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 129, p. 233-241, 2007.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Londrina: Abrates, 2015. 660p.

MI, H. PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. 183-189, 2017.

MO, B.; BEWLEY, J. D. The relationship between β -mannosidase and endo- β -mannanase activities in tomato seeds during and following germination a comparasion of seed populations and individual seeds. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.392, p.2503- 2510, 2003.

MO, B.; BEWLEY, J. D. β -mannosidase (Ec 3.2.1.25) activity during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds: purification, cloning and characterisation. **Planta**, New York, v. 215 p.141-152, 2002.

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **The Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459-481, 2007.

NASCIMENTO, W. M.; COSTA, C. J. Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças. In: NASCIMENTO, W. M. **Tecnologia de sementes de hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2009, p. 345-396.

NASCIMENTO, W. M.; LIMA, L. B. Condicionamento osmótico de sementes de berinjela visando a germinação sob temperaturas baixas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 2, p.224-227, 2008.

NASCIMENTO, W. M. **Produção de sementes de hortaliças**. v. 2. Brasília: Embrapa, 2014. 342 p.

NISHIZAWA, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. **Plant Physiology**, v. 147, n.3, p. 1251–1263, 2008.

OGÉ L. et al. Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase 1 is involved in both seed longevity and germination vigor in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 20, n. 11, p. 3022– 3037, 2008.

PEREIRA, C. E. et al. Condicionamento fisiológico e revestimento de sementes de pimentão. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, n. 1, p. 74-81, 2005.

PROBERT, R. et al.. Seed quality for conservation is critically affected by pre-storage factors. **Australian Journal of Botany**, v. 55, n. 3, p. 326–335, 2007.

RAIJ, B. van. et al. Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo. 2. ed. Campinas: Instituto Agronômico, 1997. 285 p. (IAC. Boletim Técnico 100).

RAJJOU, L. et al. The effect of alpha-amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. **Plant Physiology**, v. 134, n. 4, p. 1598–1613, 2004.

RAJJOU, L.; DEBEAUJON, I. Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, n. 10, p. 796-805, 2008.

SALLON, S. et al. Germination, genetics, and growth of an ancient date seed. **Science**, v. 320, p. 1464, 2008.

SANO, N. et al. Staying Alive: Molecular aspects of seed longevity. **Plant Cell Physiology**, v. 57, n. 4, p. 660-674, 2016.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 70-84, 2000.

SATTLER, S. E. et al. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. **Plant Cell**, v. 16, n. 6, p. 1419–1432, 2004.

SILVA, C. B. **Condicionamento fisiológico de sementes de pimentão com biorreguladores**. 2015. 100 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015a.

SILVA, C. B. et al. Performance of bell pepper seeds in response to drum priming with addition of 24-Epibrassinolide. **HortScience**, v. 50, n. 6, p. 873-878, 2015b.

SILVA, V. N.; CICERO, S. M. Avaliação do vigor de sementes de tomate durante o armazenamento por meio de análise computadorizada de imagens de plântulas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 2317-2326, 2014.

STEVENSON, D. E.; HURST, R. D Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more?. **Cellular and Molecular life Sciences**, v. 62, n. 22, p. 2900-2916, 2007.

SUN, W.; MOTANGU, M. V.; VERBRUGGEN, N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. **Biochimica et Biophysica Acta – Gene structure and expression**, v. 1577, n. 1, p. 1–9, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TOOROP, P. E. **The role of endo- β -mananase activity in tomato seed germination**. 1998. 125 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Wageningen Agricultural University, Wageningen, 1998.

VALÁRIO, B. P. **Estudo da tolerancia a dessecação e longevidade em sementes de soja (*Glycine max* (L.) MERK)**. 2016. 95 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

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

VIERLING, E. The role of heat shock proteins in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 579-620, 1991.

WALTERS, C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. **Seed Science Research**, v. 8, n. 2, p. 223-244, 1998.

WATERWORTH, W. M. et al. A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity. **Plant Journal**, v 63, n. 5, p. 848–860, 2010.

WORRALL, D. et al. Treating seeds with activators of plant defence generates long-lasting priming of resistance to pests and pathogens. **The New phytologist**, v. 193, n. 3, p. 770-778, 2012.