

NILO CESAR QUEIROGA SILVA

**INDUÇÃO DA BIOSÍNTESE DO ÁCIDO ABCÍSIKO E
SEU PAPEL NO METABOLISMO DO ETILENO
ASSOCIADO A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE
Stylosanthes humilis H.B.K. SOB ESTRESSE SALINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

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

T

S586i
2017
Silva, Nilo Cesar Queiroga, 1985-
Indução da biossíntese do ácido abscísico e seu papel no
metabolismo do etileno associado a germinação de sementes de
Stylosanthes humilis H.B.K. sob estresse salino / Nilo Cesar
Queiroga Silva. – Viçosa, MG, 2017.
vi, 36f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Dimas Mendes Ribeiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Sementes. 2. Germinação. 3. *Stylosanthes humilis*.
4. Etileno. 5. Plantas - Efeito do etileno. 6. Biossíntese.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Vegetal. Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal.
II. Título.

CDD 22 ed. 633.304

NILO CESAR QUEIROGA SILVA

**INDUÇÃO DA BIOSÍNTESE DO ÁCIDO ABCÍSIKO E
SEU PAPEL NO METABOLISMO DO ETILENO
ASSOCIADO A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE
Stylosanthes humilis H.B.K. SOB ESTRESSE SALINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de Fevereiro de 2017.




Diego Silva Batista



Genaina Aparecida de Souza
(Coorientadora)



Agustin Zsögön
(Coorientador)



Dimas Mendes Ribeiro
(Orientador)

De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estamos começando,
a certeza de que é preciso continuar e
a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar.

Fazer da interrupção um caminho novo.

Fazer da queda um passo de dança,

do medo uma escola,

do sonho uma ponte,

da procura um encontro,

e assim terá valido a pena existir!

Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, em especial a minha mãe, Elizabeth, por todo o suporte e amor necessários durante todos esses anos, não medindo esforços para fazer o melhor aos seus filhos.

Aos meus irmãos, Kim, Aninha e João por vários momentos alegres na nossa infância que certamente contribuíram para me fazer uma pessoa mais feliz.

À todas as pessoas incríveis e companheiras que cruzaram meu caminho e me deram tanto carinho. Em especial a: Lilian por ser tão terna comigo, a Luciene por transmitir-me tanta tranquilidade e paz, a Andréa por contagiar-me com sua imensa felicidade.

Aos meus colegas de trabalho na UFV, por terem paciência comigo em todos os momentos necessários.

Aos meus amigos: Fred, Lucas, Rafael, Karla, Thaline, Lúbia, Medina, Ricardo, Rodrigo, Flávio, Genaina por toda a ajuda na realização desse trabalho do qual sem eles não seria possível.

Ao Prof. Dimas Mendes Ribeiro, por compartilhar seus conhecimentos e suas histórias hilárias.

Aos demais servidores, professores e técnicos do Programa de Fisiologia Vegetal por propiciarem um ambiente de trabalho acolhedor.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

SILVA, Nilo Cesar Queiroga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Indução da biossíntese do ácido abscísico e seu papel no metabolismo do etileno associado a germinação de sementes de *Stylosanthes humilis* H.B.K. sob estresse salino.** Orientador: Dimas Mendes Ribeiro. Coorientadores: Genaina Aparecida de Souza e Agustin Zsögön.

O estabelecimento de uma população de plantas depende dos aspectos adaptativos da germinação de suas sementes. Em condições de laboratório, têm-se indicações de que a habilidade das sementes de *Stylosanthes* em produzir etileno confere tolerância ao estresse salino durante o processo de germinação. Até o momento, no entanto, as vias regulatórias que conectam o controle da biossíntese do etileno com a germinação das sementes sob condição de estresse salino não são, ainda, conhecidas. Assim, sementes de *S. humilis* foram escarificadas e transferidas para placas de Petri de vidro ou frascos Erlenmeyer e tratadas com solução de NaCl, ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), fluridona e ácido abscísico (ABA), mantendo as no escuro, em câmara de crescimento. Quantificou-se a produção de etileno e ABA em cromatógrafo a gás e cromatografia líquida de ultra performance, respectivamente. Avaliou-se as ações integrativas entre o estresse salino e o metabolismo do etileno no controle da germinação de sementes de estilosante. Os resultados mostram que os efeitos inibitórios do NaCl sobre a germinação de sementes de *S. humilis* e a biossíntese de etileno foram revertidos por solução do ACC ou fluridona. Além disso, aumento na biossíntese do ABA foi observado quando as sementes foram tratadas com NaCl. Sob condição de estresse salino, as sementes também exibiram maiores níveis de aminoácidos e açúcares em relação ao controle (água desionizada). Entretanto, os níveis de ácidos orgânicos diminuíram em sementes tratadas com NaCl. Assim, o etileno parece ser essencial para acoplar o metabolismo primário ao processo de germinação das sementes de *S. humilis* sob condição de estresse salino. Esses resultados em conjunto indicam que o efeito do NaCl na germinação de sementes de *S. humilis* é uma consequência do aumento dos níveis de ABA promovida pela alta concentração de Na⁺, que induziu a inibição da biossíntese de etileno. Dessa forma, o ABA funcionaria como um sinal necessário para a sobrevivência das sementes de *S. humilis* sob condição de estresse salino.

ABSTRACT

SILVA, Nilo Cesar Queiroga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Induction of abscisic acid biosynthesis and its role in the ethylene metabolism associated with germination of *Stylosanthes humilis* H.B.K. seeds under salt stress.** Adviser: Dimas Mendes Ribeiro. Co-advisers: Genaina Aparecida de Souza and Agustin Zsögön.

The establishment of a plant population depends on the adaptive aspects of the germination of its seeds. In laboratory conditions, there is evidence that the ability of *Stylosanthes* seeds to produce ethylene gives tolerance to salt stress during the germination process. Nowadays, however, regulatory pathways that control the ethylene biosynthesis with seed germination under salt stress conditions are not yet known. Thus, *S. humilis* (Townsville stylo) seeds were scarified and transferred to glass Petri dishes or Erlenmeyer flasks and treated with NaCl solution, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), fluridone and abscisic acid (ABA) solution, keeping in the dark, at a growth chamber. The production of ethylene and ABA in gas chromatograph and ultra-performance liquid chromatography were quantified, respectively. The integrative actions between saline stress and ethylene metabolism in the control of germination of Townsville stylo seeds were evaluated. The results showed that the inhibitory effects of NaCl on germination and ethylene biosynthesis of *S. humilis* seeds were reversed by ACC or fluridone solution. In addition, increase in ABA biosynthesis was observed when the seeds were treated with NaCl. Under salt stress condition, the seeds also exhibited higher levels of amino acids and sugars as compared with control (deionized water). However, organic acid levels decreased in seeds treated with NaCl. Thus, ethylene seems to be essential for coupling the primary metabolism to the germination process of *S. humilis* seeds under salt stress conditions. Together, these data indicate that effect of NaCl on *S. humilis* seed germination is a consequence of increased ABA levels promoted by high Na⁺ concentration, which induced inhibition of ethylene biosynthesis. Thus, the ABA would act as a necessary signal for the survival of *S. humilis* seeds under salt stress conditions.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 MATERIAL E MÉTODOS	4
2.1 <i>Material vegetal e condições de cultivo</i>	4
2.2 <i>Germinação das sementes</i>	5
2.3 <i>Curva de embebição e germinação</i>	5
2.4 <i>Quantificação do etileno</i>	6
2.5 <i>Análises anatômicas</i>	6
2.6 <i>Quantificação do ABA</i>	7
2.7 <i>Efeito do NaCl nos níveis de ACC</i>	7
2.8 <i>Quantificação do Na, Ca e K</i>	9
2.9 <i>Perfil Metabólico</i>	9
2.10 <i>Análises estatísticas</i>	10
3 RESULTADOS.....	11
4 DISCUSSÃO	21
5 CONCLUSÃO	27
6 REFERÊNCIAS	28
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	34

1 INTRODUÇÃO

Stylosanthes é um gênero da família Fabaceae com mais de 40 espécies distribuídas em áreas tropicais e subtropicais da Ásia, África e América do Sul (Costa e Ferreira 1984, Costa 2006). Na América do Sul, o Brasil é o mais importante centro de diversidade do gênero, sendo encontrado em suas regiões central e nordeste (Stace e Cameron 1984, Williams et al 1984). *S. humilis* é uma espécie muito importante de *Stylosanthes*, sendo utilizadas em uma grande variedade de sistemas agrícolas (Costa e Ferreira 1984, Edye 1987). Adapta-se bem aos solos de baixa fertilidade e com elevada concentração de sais e tem contribuído para melhoria da qualidade das pastagens em regiões tropicais e subtropicais (Costa 2006, Santos-Garcia et al 2012).

Como muitas outras espécies da família da Fabaceae, a germinação das sementes de *S. humilis* é regulada pela impermeabilidade dos tegumentos a gases e água (Moïse et al 2005, Smýkal et al 2014). A barreira tegumentar constitui um dos fatores fundamentais para persistência e regeneração dessa leguminosa forrageira em pastagens, garantindo a manutenção da espécie em condições adversas do meio ambiente (Long et al 2015). Essa barreira pode ser quebrada por altas temperaturas e escarificação mecânica ou química (Anand et al 2011). Além da dormência física, sementes de *S. humilis* apresentam também dormência fisiológica (Vieira e Barros 1994). A dormência fisiológica é muito acentuada logo após sua maturação e vai sendo perdida gradualmente, até tornarem-se completamente germináveis, aos 12-15 meses de idade pós-colheita (Vieira e Barros 1994). A dormência fisiológica de sementes de *S. humilis* pode ser superada com ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), precursor imediato do etileno (Silva et al 2014) ou ácido 2-cloroetilfosfônico (CEPA), uma substância liberadora de etileno no interior das células (Ribeiro e Barros 2006). O requerimento por etileno é confirmado pela inibição da germinação de sementes não-dormentes por inibidores da síntese e da

ação do etileno, como a aminoetoxivinilglicina (AVG), e íons Co^{2+} e Ag^+ (Pelacani et al 2005, Ribeiro e Barros 2006). O etileno, portanto, seria um dos princípios requeridos para a quebra da dormência fisiológica e germinação das sementes de *S. humilis*.

O etileno é derivado do aminoácido metionina, que é convertido em *S*-adenosil-L-metionina (SAM), por ação da enzima sintase do SAM que, por sua vez, é convertido em ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), por ação da enzima sintase do ACC (ACS). A etapa final da biossíntese do etileno é mediada pela enzima oxidase do ACC (ACO), que converte o ACC em etileno (Wen 2015). O etileno tem-se mostrado essencial para a germinação de diversas outras espécies, como *Lepidium sativum* (Linkies et al 2009), *Arabidopsis thaliana* (Wilson et al 2014), *Lactuca sativa* (Chen et al 2016), *Cucumis sativus* (Wang et al 2011) e várias outras. Além do etileno contribuir para a germinação das sementes, tem sido proposto que a produção deste regulador durante o processo de embebição pode antagonizar a inibição da germinação promovida por estresse do ambiente, tais como, temperatura elevada, metais pesados e salinidade (Wang et al 2011, Steffens 2014, Silva et al 2014).

A germinação das sementes é uma etapa importante e vulnerável do ciclo de vida das plantas e determina o estabelecimento e o crescimento das plântulas (Bewley et al 2013). Assim, o estabelecimento de uma população de plantas depende dos aspectos adaptativos da germinação de suas sementes. Neste contexto, os hormônios são responsáveis em modular respostas fisiológicas adequadas sob condições de estresse do ambiente (Willis et al 2014). Em solos salinos, a toxicidade do íon sódio é o principal fator limitante ao crescimento vegetal, sendo inicialmente expresso por uma redução do crescimento radicular (Zhu 2003, Chaves et al 2009). Mais de 60 milhões de hectares de terras agricultáveis estão contaminadas por altas concentrações de sal (FAO 2011). Nos últimos anos, muitos esforços têm sido feitos para elucidar os mecanismos de tolerância das plantas à toxicidade aos solos salinos (Munns e Tester 2008). Em contraste, estudos

que mostram o efeito integrado do estresse salino sobre a germinação são, ainda, pouco explorados. No entanto, alguns trabalhos de caracterização de efeitos regulados pelo estresse salino durante a germinação das sementes têm produzido resultados interessantes. Por exemplo, Wang et al (2011) verificaram que as sementes de pepino (*Cucumis sativus*) exibiram uma germinação aumentada sob condição de estresse salino quando expostas ao etileno juntamente com soluções de brassinosteróides. Além disso, a capacidade das sementes de *Stylosanthes* em produzir etileno conferiu tolerância ao estresse salino durante o processo de germinação (Silva et al 2014). Diferentes receptores de etileno como ETR1 e ETR2 (ETHYLENE RECEPTOR1, 2) influenciaram a sensibilidade ao ácido abscísico (ABA) acelerando ou retardando o processo de germinação de sementes de *Arabidopsis thaliana* em condições de estresse salino (Wilson et al 2014). Juntos, estes resultados mostram uma flexibilidade excepcional deste regulador gasoso no controle da germinação de sementes.

O ABA é bem conhecido por ter um papel importante no estabelecimento da dormência e na germinação das sementes (Linkies et al 2009, Corbineau et al 2014). Além disso, é capaz de antagonizar a produção de etileno, tendendo acumular-se em plantas que sofrem de estresse salino (Wilson et al 2014). Em estudo recente, Wang et al (2015) mostraram que a superexpressão do fator de transcrição SMR1 (SALT-RELATED MYB1), aumentou a biossíntese do ABA em sementes de *Arabidopsis thaliana*. Ademais, a regulação da biossíntese do ABA em sementes pode ocorrer pela ação da enzima 9-cis epoxicarotenoide dioxigenase (NCED) induzida por altas concentrações de NaCl (Arc et al 2013). Até o momento, no entanto, pouco é conhecido sobre os efeitos do estresse salino nas inter-relações entre o etileno e o ABA no controle da germinação de sementes, particularmente em espécies de sementes tropicais. Uma melhor compreensão do mecanismo de ação do estresse salino na germinação das sementes certamente levará a um melhor aproveitamento das áreas afetadas pela alta concentração de sal. Permitirá

também o desenvolvimento de tecnologias mais apropriadas para a preservação e utilização do ambiente. Assim, os objetivos do presente estudo foram: (i) investigar os possíveis efeitos do estresse salino sobre a germinação de sementes de *S. humilis*, examinando suas inter-relações com a via biossintética do etileno associados com os níveis de ABA nas sementes. (ii) Compreender as ações integrativas entre estresse salino e o etileno no controle do metabolismo primário das sementes em germinação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Plantas de *S. humilis* H.B.K. foram cultivadas em casa de vegetação, na Universidade Federal de Viçosa (20° 45'S, 42° 15'W), Viçosa, Minas Gerais, em vasos de plástico com capacidade de 3,5 L, contendo duas partes de solo tipo latossolo, uma parte de areia e uma parte de esterco bovino. A adubação foi de 5 g vaso⁻¹ de N-P-K (20-05-20), dividido em duas aplicações durante o ciclo de vida da planta. A irrigação foi feita diariamente, de forma a manter-se o solo próximo à capacidade de campo. Devido à espécie se comportar como planta de dia curto (Cameron e 'tMannetje 1977), nos meses do ano com dias mais longos (dezembro a março), as plantas foram cobertas com tecido preto, reduzindo o período de luz para 8 horas diárias, para promover a indução da floração. As sementes produzidas foram colhidas periodicamente e armazenadas em sacos de papel em condições de laboratório (25 ± 3 °C).

2.2 Germinação das sementes

Para a realização dos ensaios, os frutos foram previamente debulhados por fricção entre duas superfícies emborrachadas e, em seguida, as sementes foram escarificadas por leve fricção entre duas lixas d'água n° 150. Após escarificação, as sementes foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio 0,5% (v/v) por 10 minutos, e lavadas extensivamente com água destilada (Silva et al 2014). Em seguida, as sementes foram secas com papel absorvente e transferidas para placas de Petri de vidro (90 ou 150 mm de diâmetro), ou frascos de Erlenmeyer de 50 mL, contendo duas camadas de papel de filtro Whatman n° 1. As placas de Petri e os frascos Erlenmeyer contendo as sementes e suas respectivas soluções-teste foram mantidas no escuro, em câmara de crescimento (Forma Scientific Inc., Ohio, EUA), a 30 ± 1 °C. A protrusão da radícula foi o critério utilizado para considerar-se uma semente como germinada.

2.3 Curva de embebição e germinação

As sementes não dormentes foram embebidas em água desionizada (controle), ou em solução de NaCl (150 mM) ou ABA (50 µM), por período de 18 horas. Ao final de cada período de incubação, as sementes foram enxugadas com papel absorvente e as massas frescas foram determinadas em balança de precisão, a cada intervalo de 45 minutos durante as primeiras 4 horas. Após esse período de tempo, as sementes foram pesadas a cada 2 horas até o final do experimento (totalizando 18 horas). O teor de água das sementes foi calculado usando a seguinte fórmula:

$$\text{Teor de água [\%]} = (P_f - P_i/P_f) \times 100$$

Onde: P_i , peso inicial das sementes e P_f , peso final das sementes em cada tempo

A germinação foi também registrada em cada período de tempo mencionado acima.

2.4 Quantificação do etileno

O etileno acumulado na atmosfera dos frascos Erlenmeyer foi quantificado seguindo-se a técnica descrita por Silva et al (2014). A atmosfera dos frascos foi homogeneizada utilizando-se de uma seringa de 3,0 mL, provida de agulha longa, e retirou-se uma amostra de 1,0 mL daquela atmosfera, utilizando-se de seringas *ultra-fine* (agulhas 29 G 1/2”). As amostras foram injetadas em um cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 5890, serie II (USA), equipado com um detector de ionização de chama e uma coluna de aço inoxidável (1,0 m x 6,0 mm), empacotada com Porapak-N (80-100 mesh). O gás de arraste foi o nitrogênio em fluxo de 30 mL minuto⁻¹; os fluxos do hidrogênio e do ar sintético foram mantidos em 30 e 320 mL minuto⁻¹, respectivamente. As temperaturas da coluna, do injetor e do detector foram mantidas a 60, 110 e 150 °C, respectivamente. A determinação do etileno foi feita comparando-se as áreas das amostras obtidas no Software Peak-2 Simple com áreas de picos de uma mistura padrão de etileno de concentração conhecida.

2.5 Análises anatômicas

Sementes de *S. humilis* foram fixadas em solução de formaldeído, ácido acético e álcool 50%, FAA50 (1:1:10), durante 48 horas e armazenadas em etanol a 70% (Johansen 1940). Em seguida, o material vegetal foi incorporado em metacrilato (Historesina-Leica) de acordo com as recomendações do fabricante. O material foi seccionado na posição longitudinal em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA), com uma espessura de 5 µm, corada com azul de

toluidina (O'Brien et al 1964), pH 6,5. As imagens de análise estrutural foram obtidas com microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão), acoplado a uma câmera digital (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Alemanha) e computador com o programa de captura de imagem Axion Vision.

2.6 Quantificação do ABA

Sementes não dormentes foram embebidas em 10 mL de água desionizada (controle) ou solução de NaCl durante 6 horas. Subsequentemente, as sementes foram transferidas para novas placas de Petri contendo as soluções indicadas após a seta: água desionizada → água desionizada (controle), NaCl → água desionizada, NaCl → NaCl, NaCl → NaCl + fluridona, por 12 horas. Ao final do período de incubação, as sementes foram lavadas com água destilada, enxugadas com papel absorvente, pesadas e imersas em nitrogênio líquido e, então, estocadas em freezer a -80 °C, até análise. Os níveis de ABA nas sementes foram determinados seguindo-se a técnica descrita por Müller e Munné-Bosch (2011) com pequenas modificações. A extração do ABA foi realizada em meio contendo metanol, isopropanol, ácido acético (20: 79: 1) e [³H] ABA 20.000 dpm para quantificação das perdas. O extrato foi centrifugado a 13000 g, por 15 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação do ABA por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) acoplado ao espectrômetro de massa com analisador do tipo triplo quadrupolo (QqQ).

2.7 Efeito do NaCl nos níveis de ACC

O ACC em sementes não dormentes foi determinado seguindo a técnica descrita por Bulens et al (2011). As sementes foram embebidas em água desionizada ou solução

de NaCl (150 mM) ou ABA (10 μ M), por 6 horas. Subsequentemente, as sementes foram transferidas para novas placas de Petri contendo as soluções indicadas após a seta: água desionizada \rightarrow água desionizada (controle), NaCl \rightarrow água desionizada, NaCl \rightarrow NaCl, NaCl \rightarrow NaCl+fluridona e ABA \rightarrow ABA, por 12 horas. Ao final do período de incubação, as sementes foram lavadas com água destilada, enxugadas com papel absorvente, pesadas e imersas em nitrogênio líquido e, então, estocadas em freezer a -80 °C, até análise. Para os ensaios, as amostras foram extraídas por maceração em almofariz e pistilo em 10 mL de etanol (80%), adicionando também polivinil polipirrolidona (PVPP 5% p/v). O extrato foi centrifugado a 12000 g, por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi evaporado até securo, em evaporador rotativo, à temperatura de 45 °C. O resíduo foi suspenso em 4,0 mL de água destilada (extrato original), tomando-se a metade para quantificar-se o ACC livre.

Uma alíquota de 0,5 mL do extrato foi adicionada em um tubo de ensaio, juntamente com 0,1 mL de cloreto de mercúrio (5,0 μ mol), completando-se o volume da reação para 0,8 mL, com água destilada. O tubo de ensaio foi vedado com selador de látex e mantido em banho de gelo. Uma alíquota de 0,2 mL de uma mistura resfriada de NaOCl (5%) e NaOH saturado (2:1, v/v) foi injetada no tubo, com auxílio de uma seringa. O tubo foi imediatamente agitado em um misturador tipo vórtex, por 5 segundos, e incubado em banho de gelo por 2,5 minutos. Após nova agitação por 5 segundos, uma amostra gasosa de 1,0 mL da atmosfera do tubo de ensaio foi recolhida, com uma seringa, e o etileno produzido foi analisado por cromatografia gasosa.

A metade remanescente do extrato original foi utilizada para determinar-se o ACC total (ACC livre + ACC conjugado), após hidrólise ácida com HCl (2 N), a 100 °C, por 3 horas. Em seguida, o extrato foi neutralizado com NaOH saturado e evaporado a 45 °C, até securo. O resíduo foi re-suspenso em 2,0 mL de água destilada. A quantificação do ACC total seguiu os mesmos procedimentos para quantificação do ACC livre.

2.8 Quantificação do Na, Ca e K

Sementes de *S. humilis* foram embebidas em água desionizada (controle) ou em solução de NaCl (150 mM), contendo também fluridona (50 μ M) ou ACC (1mM), por 6 horas. Em seguida, as sementes foram exaustivamente lavadas com água desionizada e secas a 65 °C durante 72 horas. As amostras secas foram submetidas a uma digestão nitro-perclórica (65% e 70%) sobre uma placa quente, e finalmente diluída com água desionizada. Os níveis de Na⁺, Ca²⁺ e K⁺ nas amostras foram quantificados por espectrometria de emissão óptica em plasma (ICP-OES, Perkin Elmer Optima 3000 DV).

2.9 Perfil Metabólico

Para a determinação do perfil metabólico foram utilizados os procedimentos descritos por Lisec et al (2006). Aproximadamente 30 mg das amostras liofilizadas foram colocados em tubos de 2,0 mL de capacidade e extraída em 750 μ L de metanol contendo 30 μ L de ribitol (0,2 mg/mL). Após agitação vigorosa em vórtex por 10 segundos, as amostras foram incubadas a 70 °C sob agitação (1000 g), por 15 minutos. Decorrido esse tempo, as amostras passaram por centrifugação a 14000 g, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante (500 μ L) foi transferido para um novo tubo, adicionando-se 750 μ L de clorofórmio. Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex durante 10 segundos seguindo-se de uma nova centrifugação a 4000 g, por 15 minutos, a 4 °C. A camada superior (fase polar) foi recolhida em alíquotas de 100 μ L e adicionada em um novo tubo. Em seguida, as amostras foram secas a vácuo e armazenadas à -80 °C. Para a derivatização, adicionou-se 40 μ L do reagente de metoxiaminação a cada amostra e agitou-se a 1000 g, por 2 horas, a 37 °C. Após esse tempo, foi adicionado 70 μ l de *N*-Metil-*N*-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) e padrões de ésteres metílicos de

ácidos graxos (FAMES) às amostras, do qual foram submetidas à agitação 1000 g, por 30 minutos, a 37 °C. As amostras foram transferidas para frascos de vidro e analisadas por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GC-MS).

Os cromatogramas e os espectros de massa gerados foram analisados utilizando o software TAGFINDER (Luedemann et al 2008), e a identificação e a anotação dos dados apresentados foram realizadas como descrito por Fernie et al (2011).

2.10 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado nos experimentos foi o inteiramente casualizado. A unidade experimental dos experimentos de germinação e de determinação do etileno foi composta por 50 sementes por frascos Erlenmeyer com seis repetições por tratamento. Os resultados de porcentagem de germinação foram transformados em arco-seno ($\% G/100$)^{1/2} antes da análise, e todos os dados foram verificados quanto à normalidade. Para quantificação do ACC e dos níveis de ABA, as unidades experimentais foram compostas de amostras do extrato de 150 sementes, com seis repetições por tratamento. A unidade experimental dos experimentos de análise de metabólitos e quantificação dos níveis de Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ foram compostas por 100 mg de material vegetal, por reação, sendo seis e três repetições, por tratamento, respectivamente. A análise de variância (ANOVA, $P < 0,05$) foi realizada para determinar os efeitos dos tratamentos. As diferenças de médias entre os tratamentos foram avaliadas pelo teste de Tukey ou pelo teste *t* em nível de 5 % de significância. Todas as comparações de médias foram realizadas utilizando o software SAEG (Sistema para Análises Estatísticas, versão 9.1, UFV).

3 RESULTADOS

O NaCl inibiu a germinação de sementes de *S. humilis*, sendo a germinação reduzida em 85%, após 18 horas de exposição à solução salina (Figura 1A). Semelhantemente ao efeito da solução de NaCl, o ABA foi capaz de inibir a germinação de sementes de *S. humilis*. Sob a ação do NaCl ou do ABA o teor de água das sementes foi reduzido em relação ao controle (água desionizada), ao final de 18 horas de incubação (Figura 1B). Os resultados da Figura 1 também indicam que a inibição da embebição promovida por soluções de NaCl ou ABA coincide a redução da germinação das sementes, ao final do experimento. Entretanto, sementes tratadas com NaCl apresentaram germinação um pouco superior a aquelas tratadas com ABA, apesar das sementes não apresentarem alterações significativas na embebição ao final do experimento. Interessantemente, sementes tratadas com solução de NaCl ou ABA não apresentaram alterações significativas na velocidade de embebição, no período de 3 a 10 horas de incubação em relação ao controle.

Sementes embebidas em solução de NaCl e em solução de ABA apresentaram uma redução de 83% e 95% na germinação e de 73% e 93% na produção de etileno, respectivamente, ao fim do período de incubação (Figura 2A, B). Para avaliar-se o grau de envolvimento do etileno na germinação de sementes de *S. humilis* tratadas com solução de NaCl e com ABA, buscou-se reverter a inibição da germinação com solução de ACC. O ACC reverteu a inibição da germinação das sementes promovida por solução de NaCl e ABA, resultado que também está correlacionado com a produção de etileno (Figura 2A, B). Além disso, sementes de *S. humilis* embebidas em água (controle), ABA+ACC e NaCl+ACC o tempo necessário para ocorrer 50% de germinação (t_{50}) foi aproximadamente 10, 11 e 13 horas, respectivamente. Sob a ação da fluridona, à concentração de 50 μM , verificou-se que a germinação das sementes foi 4,6 vezes maior

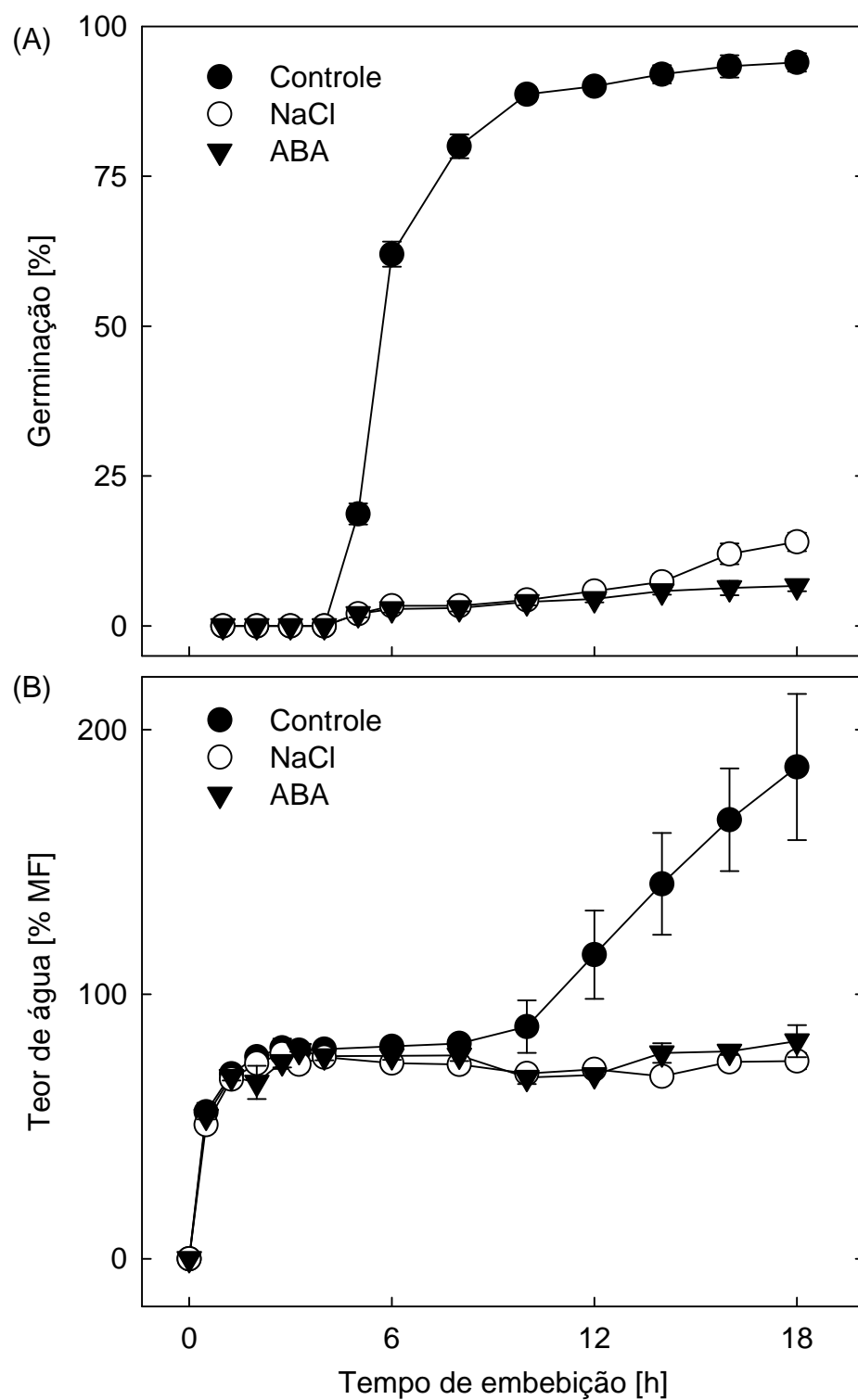


Figura 1. Efeito do NaCl e do ABA sobre a germinação (A) e a embebição (B) de sementes de *Stylosanthes humilis*. Médias de três repetições \pm erro da média

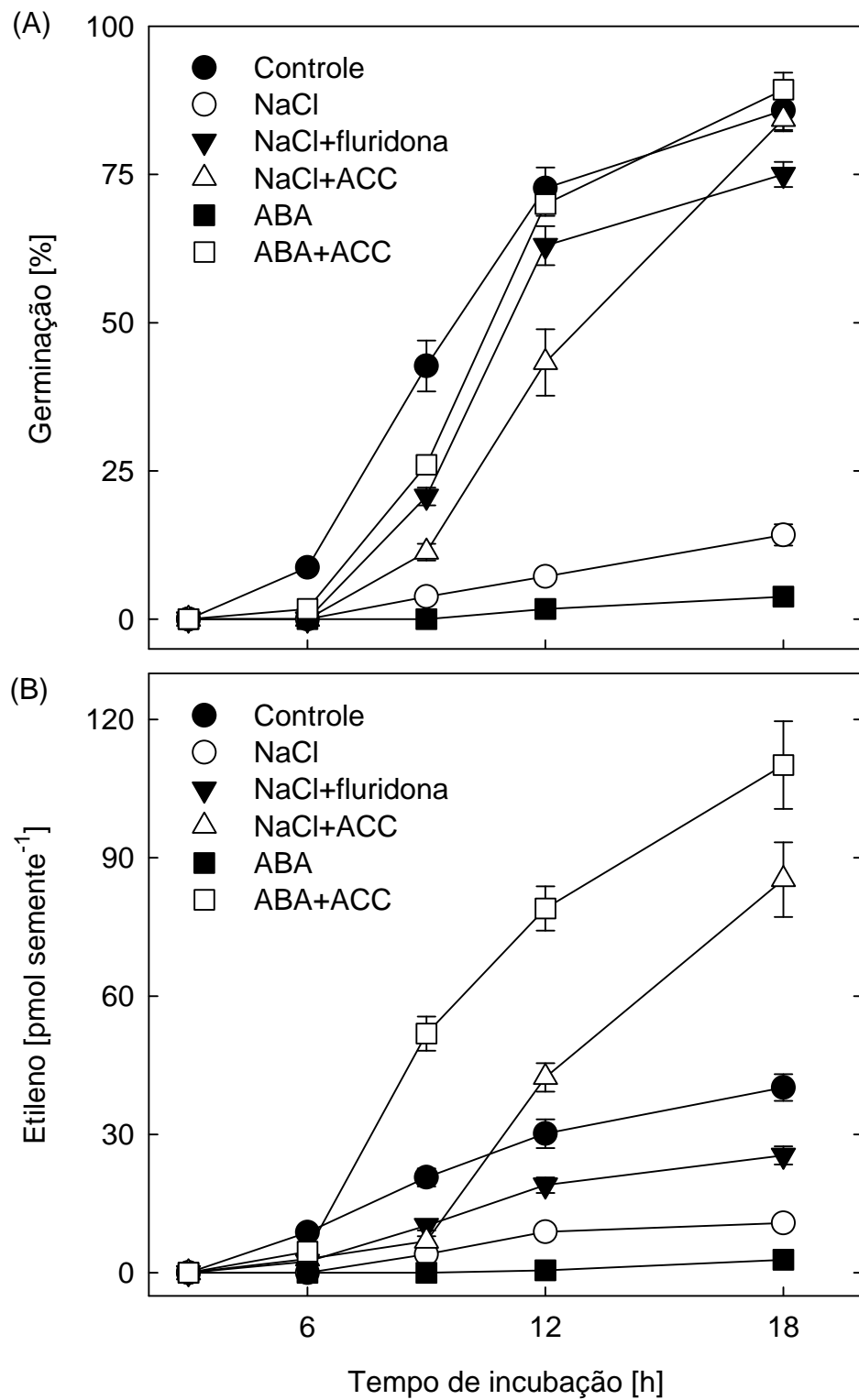


Figura 2. Germinação e produção de etileno por sementes de *Stylosanthes humilis*. Germinação (A). Produção de etileno (B). Médias de seis repetições \pm erro da média

do que as mantidas em solução de NaCl puro, ao final de 18 horas de embebição (Figura 2A). A essa concentração de fluridona houve um aumento de 2,2 vezes na produção de etileno das sementes mantidas em solução de NaCl+fluridona, quando comparada a solução de NaCl pura (Figura 2B).

Sementes que receberam solução controle (água desionizada), ABA+ACC e NaCl+fluridona apresentaram rompimento do tegumento com protrusão radicular (Figura 3A, B, C). Sob ação da solução de NaCl+ACC, verificou-se que o tegumento das sementes começou a apresentar rachaduras e redução na espessura, após 6 horas de embebição (Figura 3D). Entretanto, um menor alongamento das células do embrião, ocorreu nas sementes tratadas com ABA+ACC, NaCl+fluridona e NaCl+ACC, em relação ao controle, indicando um atraso na germinação (Figura 3B, C, D). Ademais, a ruptura do tegumento foi completamente inibida por solução de NaCl ou ABA (Figura 3E, F).

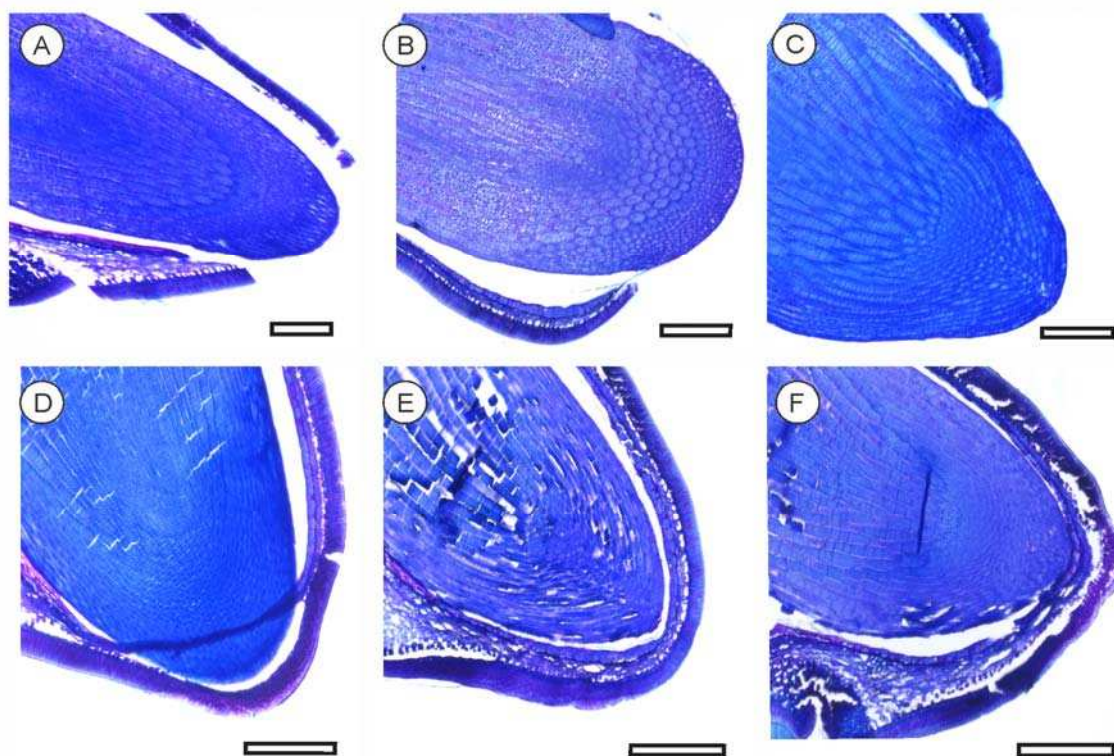


Figura 3. Corte longitudinal de sementes de *Stylosanthes humilis*. Controle (A); ABA+ACC (B); NaCl+fluridona (C); NaCl+ACC (D); NaCl (E) e ABA (F). Barras= 200 μ m

Sementes embebidas em solução de NaCl (150 mM) apresentaram um aumento de 3,6 vezes na produção de ABA, ao fim do período de incubação (Figura 4). Por outro lado, os efeitos NaCl sobre a indução da biossíntese do ABA foram inibidos seguindo a transferência das sementes para fluridona ou água desionizada. Assim, torna-se provável que o estresse salino seja o disparador da biossíntese do ABA, promovendo, portanto, a inibição da biossíntese de etileno e da germinação de sementes de *S. humilis*. Consistente com esses resultados, sementes incubadas em solução de NaCl (150 mM) apresentaram redução significativa na germinação e nos níveis de ACC livre (88%), ACC total (76%) e de ACC conjugado (71%) em relação ao controle (Figura 5A-D). Ademais, os efeitos inibitórios provocados pelo NaCl na germinação e na biossíntese do ACC foram revertidos após a transferência das sementes para solução de NaCl+fluridona ou água desionizada. Após 18 horas de incubação das sementes em solução de ABA observou-se inibição significativa na germinação das sementes (Figura 5A). Semelhantemente aos efeitos da solução de NaCl, os níveis de ACC livre, ACC total e de ACC conjugado em sementes de *S. humilis* submetidas à solução de ABA foram significativamente reduzidos em relação as sementes do controle (Figura 5B-D). O tratamento das sementes de *S. humilis* com NaCl puro ou ABA fez aumentar a razão ACC total/ACC livre, quando comparados com os outros tratamentos (Figura 5E). No entanto, a razão ACC total/ACC conjugado permaneceu estável nas sementes de todos os tratamentos (Figura 5F).

Para analisar se a diferença na germinação de sementes tratadas com NaCl puro ou em conjunto com fluridona e ACC poderia ser resultado da absorção seletiva do íon Na^+ ou redução nos níveis de K^+ ou Ca^{2+} , o acúmulo de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} nos tecidos das sementes de *S. humilis* foi quantificado. A exposição das sementes de *S. humilis* a solução de NaCl (150 mM) pura ou em conjunto com fluridona ou ACC levou a um aumento acentuado nos níveis de Na^+ nos tecidos das sementes, em comparação com as sementes

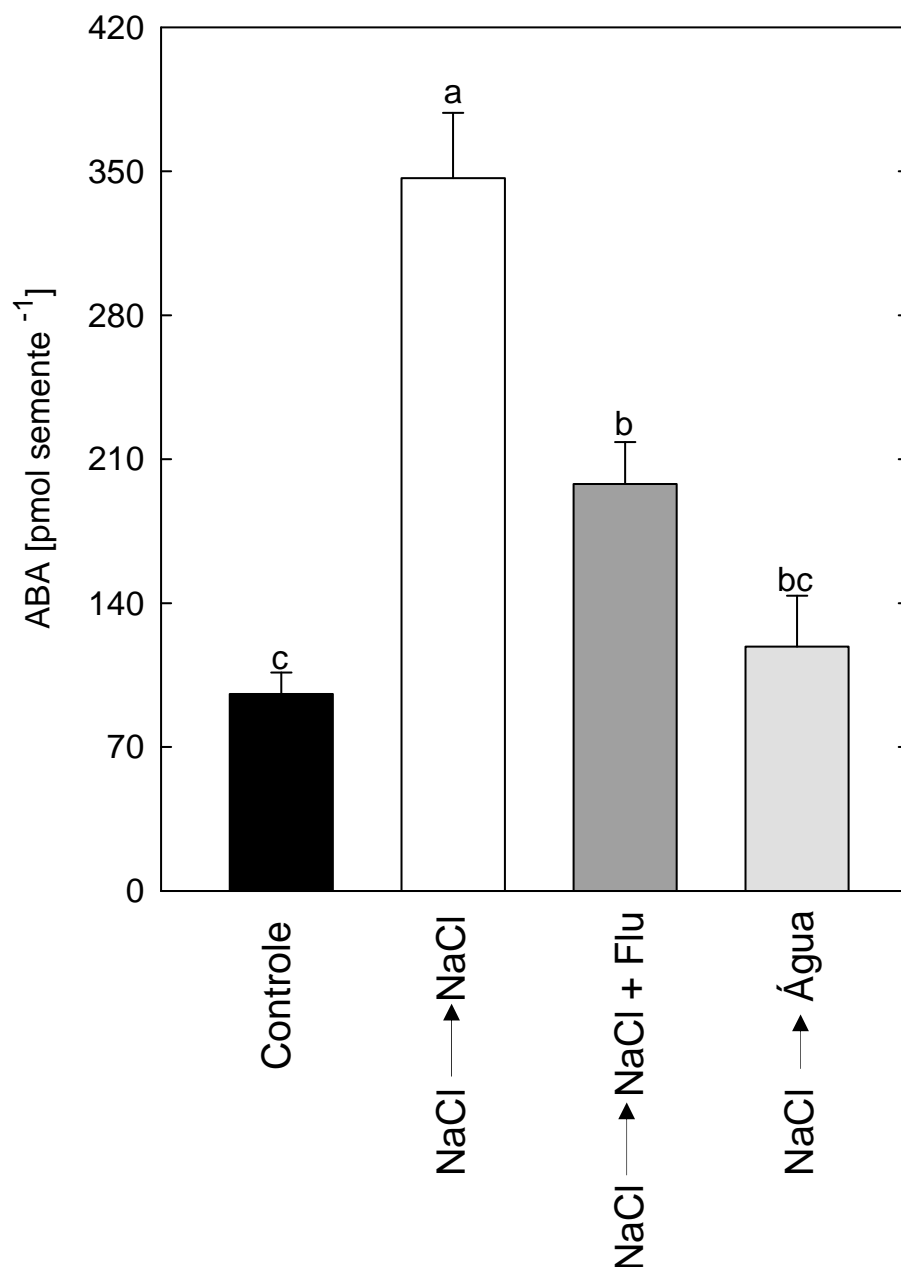


Figura 4. Níveis de ABA em sementes de *Stylosanthes humilis* embebidas em água desionizada ou em solução de NaCl (150mM) por 6 horas, após serem transferidas para segundo meio, indicado após a seta (NaCl; 150 mM ou fluridona; 50 μ M). A germinação e os níveis de ABA foram quantificados 12 horas após a transferência das sementes para o segundo meio. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, em nível de 5% pelo teste de Tukey. Médias de seis repetições \pm erro da média

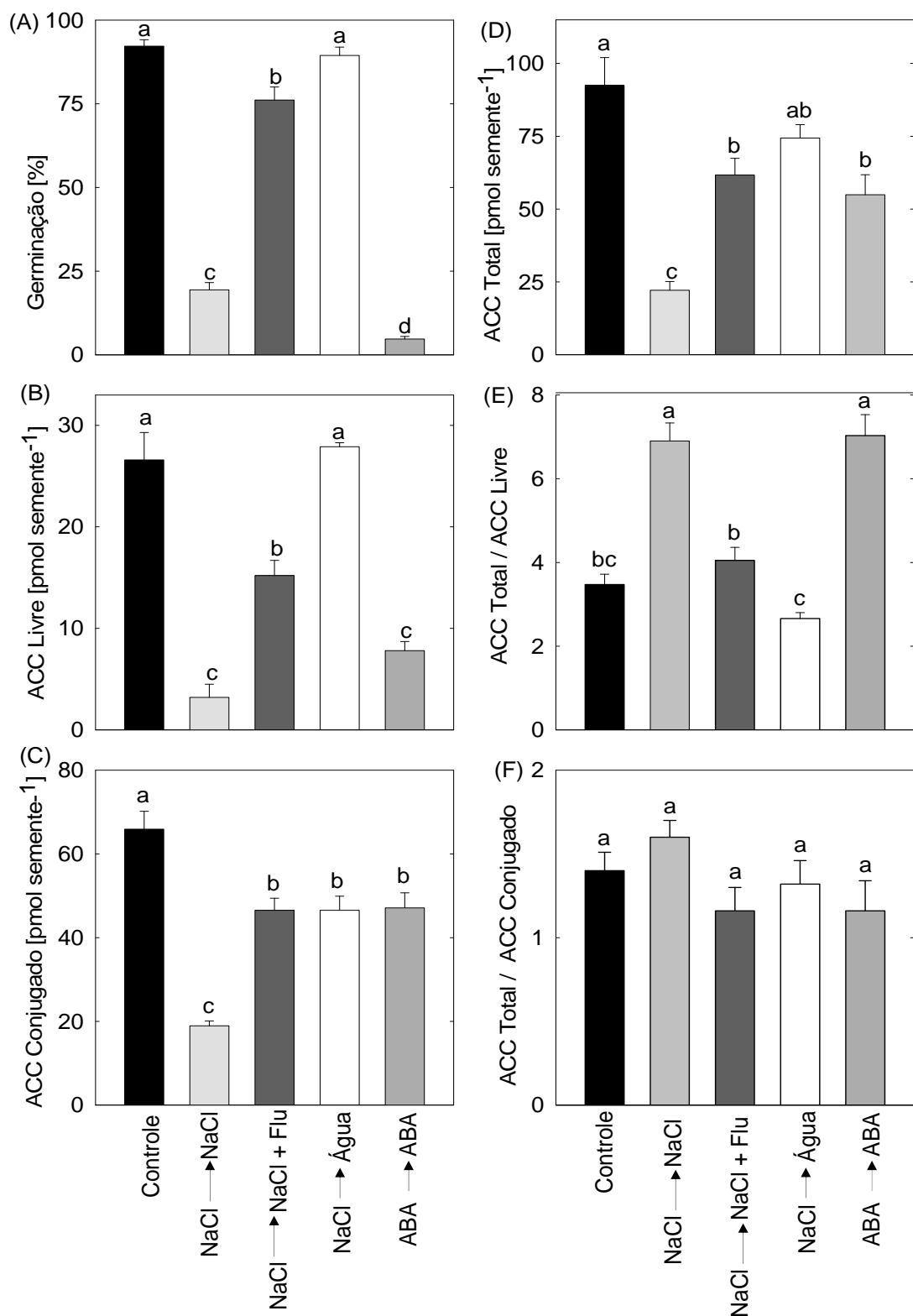


Figura 5. Germinação e níveis de ACC em sementes de *Stylosanthes*. Germinação (A), mudanças no conteúdo de ACC livre (B), conjugado (C) e total (D) bem como fração ACC total/ACC livre (E) e ACC total/ACC conjugado (F). As sementes foram embebidas em água desionizada, NaCl ou em solução de ABA por 6 horas, após serem transferidas para o segundo meio, indicado após a seta (NaCl, 150 mM, fluridona, 50 μ M ou ABA, 50 μ M). A germinação e os níveis de ACC foram quantificados 12 h após a transferência das sementes para o segundo meio. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, em nível de 5% pelo teste de Tukey. Médias de seis repetições \pm erro da média

do controle (Figura 6A). Ademais, os níveis de K^+ e Ca^{2+} permaneceram estáveis nas sementes tratadas com NaCl, NaCl+fluridona ou NaCl+ACC, em comparação com sementes do controle (Figura 6B, C).

Buscando-se um entendimento da ação do NaCl no metabolismo primário das sementes, o perfil metabólico foi analisado usando cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS). Os níveis de sacarose, trealose, cisteína, glutamato, glicina, lisina, ornitina, serina, treonina, tirosina, valina e piruvato em sementes tratadas com NaCl→NaCl, NaCl→água ou NaCl→fluridona foram semelhantes aos observados nas sementes do controle (Figura 7). O estresse salino aumentou os níveis de mio-inositol, glicose, glutamina, fenilalanina, prolina e triptofano em sementes embebidas em NaCl, em relação ao controle, mas não em sementes embebidas em NaCl, seguindo a transferência das sementes para fluridona ou água desionizada. Em contraste, os níveis de citrato, isocitrato, 2-oxoglutarato e succinato foram significativamente reduzidos em sementes tratadas com NaCl, mas não em sementes tratadas com NaCl→água ou NaCl→fluridona. Os níveis de frutose, 3-P-glicerato, arginina, asparagina, aspartato, ácido γ -aminobutírico (GABA) e metionina foram significativamente aumentados em sementes tratadas com NaCl ou NaCl→fluridona, enquanto se mantiveram estáveis em sementes tratadas com NaCl→água, em relação ao controle (Figura 7). Claramente, houve um aumento significativo nos níveis do aminoácido alanina nas sementes tratadas com NaCl e NaCl→água, mas não em sementes embebidas em NaCl, seguindo a transferência para fluridona. Os níveis de malato e fumarato foram significativamente reduzidos em sementes tratadas com NaCl, enquanto aumentou nas sementes tratadas com NaCl→fluridona, em relação ao controle. Por outro lado, o estresse salino não alterou os níveis de malato e fumarato nas sementes tratadas com NaCl→água (Figura 7).

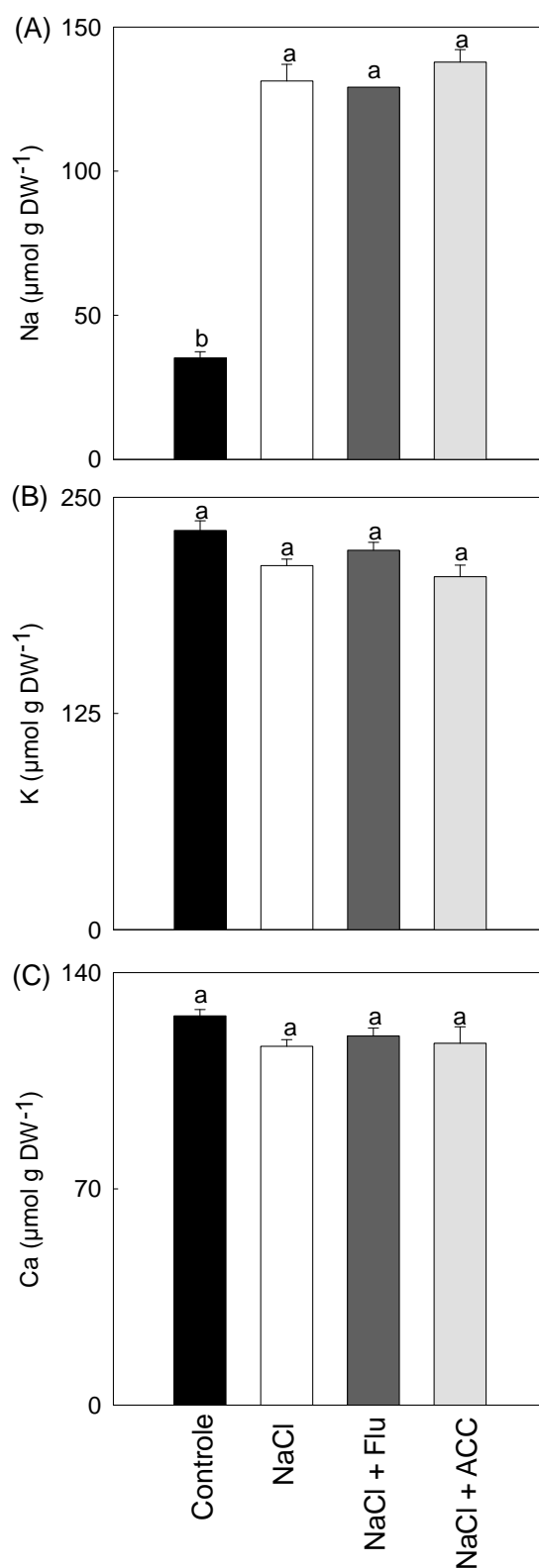


Figura 6. Acúmulo de Na, K e Ca em sementes de *S. humilis* incubadas em água desionizada (controle) ou em solução de NaCl (150 mM) pura ou suplementada com fluridona (50 μM) ou ACC (1 mM). Os níveis de Na (A), K (B) e Ca (C) foram quantificados 6 h após o início da embebição. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, em nível de 5% pelo teste de Tukey. Médias de três repetições \pm erro da média

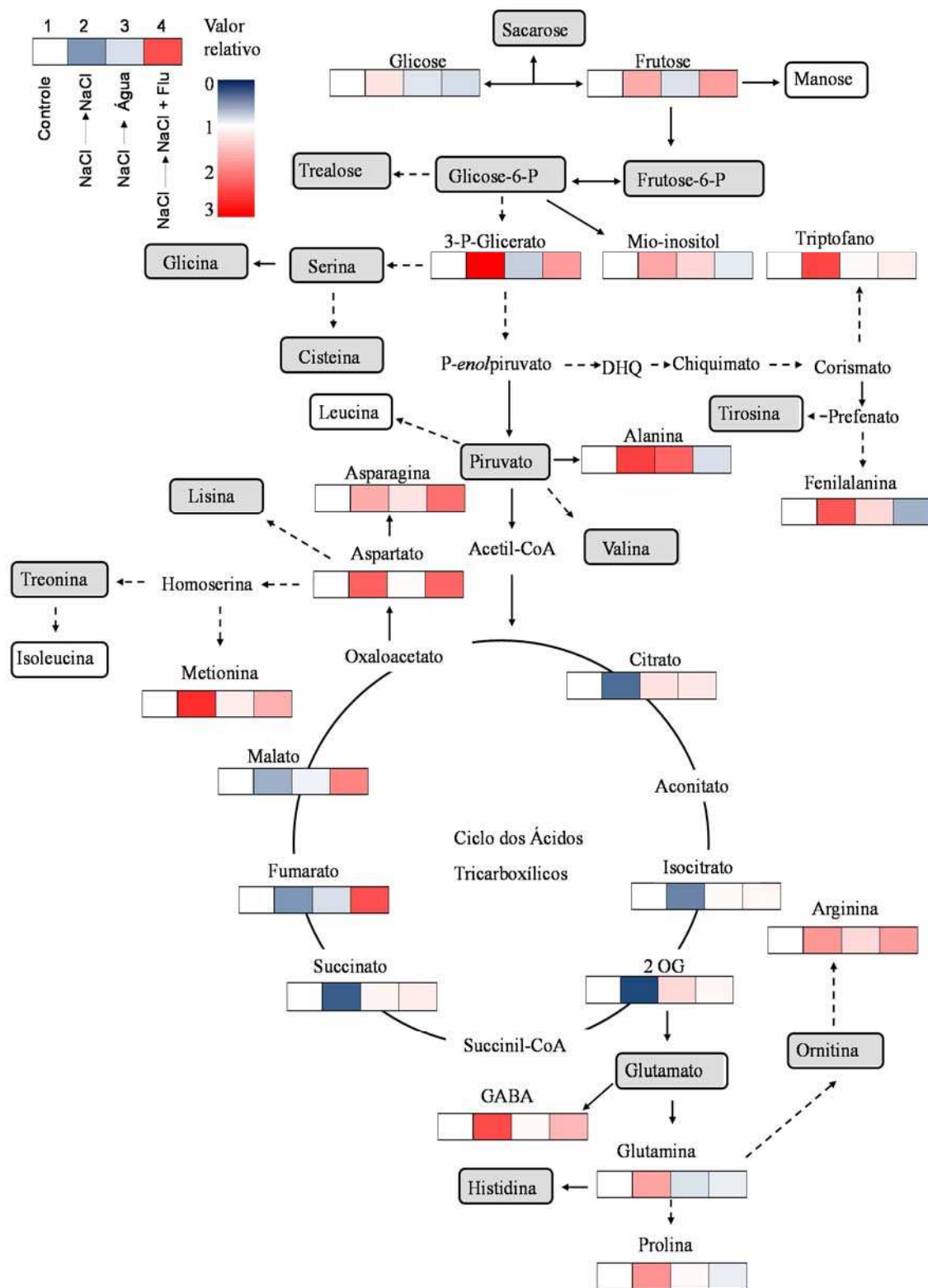


Figura 7. Alteração nos níveis de metabólitos em sementes de *S. humilis*. As sementes foram embebidas em água desionizada ou em solução de NaCl (150mM) por 6 horas, seguido de transferência para segundo meio, indicado após a seta. Os níveis de metabólitos foram quantificados 12 horas após a transferência das sementes para o segundo meio. Médias indicadas por quadrantes diferem estatisticamente do controle em nível de 5% pelo teste *t*. Médias de seis repetições \pm erro da média

4 DISCUSSÃO

O efeito do NaCl na inibição da germinação das sementes pode ser atribuído ao estresse osmótico ou à toxicidade específica do íon sódio (Song et al 2005, Zhang et al 2010). Entretanto, o NaCl não foi capaz de inibir a embebição das sementes de *S. humilis*, sendo o teor de água das sementes mantido semelhante ao controle, após 8 horas de exposição à solução de NaCl (Figura 1). Da mesma forma, a embebição das sementes de *S. humilis* submetidas à solução de ABA não diferiu significativamente das sementes do controle (Figura 1). Assim, torna-se improvável que o estresse osmótico seja o disparador da inibição da germinação de sementes de *S. humilis* tratadas com solução de NaCl ou com solução de ABA. Os resultados da Figura 1 também indicam que o teor de água das sementes do controle (água desionizada) aumentou significativamente no intervalo de 10 a 18 horas de embebição, coincidindo com o aumento da expansão do eixo embrionário (Figuras 1, 3). Por outro lado, os efeitos inibitórios causados por solução de NaCl ou ABA sobre a expansão do eixo embrionário foram verificados até o final do experimento.

O etileno, além de desempenhar um efeito promotor na germinação de sementes (Corbineau et al 2014, Yoong et al 2016), tem-se mostrado benéfico em antagonizar a inibição da germinação de algumas espécies por estresse salino (Silva et al 2014, Wilson et al 2014). Para avaliar o grau de envolvimento do etileno na germinação de sementes de *S. humilis* tratadas com solução de NaCl ou com solução de ABA, buscou-se reverter a inibição da germinação devida ao estresse salino ou ao ABA com solução de ACC. O ACC reverteu a inibição da germinação das sementes promovida por solução de NaCl ou ABA, resultado que também está correlacionado com a produção de etileno (Figura 2). Esses resultados indicam que estresse salino e o ABA inibiram a germinação de sementes de *S. humilis* por reduzir a biossíntese de etileno. Interessantemente, os efeitos inibitórios do NaCl, à concentração de 150 mM, sobre a germinação foram revertidos por solução

de fluridona, um inibidor da biossíntese do ABA (Figura 2). Os resultados da Figura 2 também mostram que a produção de etileno foi significativamente maior em sementes de *S. humilis* embebidas em solução de NaCl+fluridona do que em sementes incubadas com solução de NaCl pura.

A expansão das células do eixo hipocótilo-radicular são essenciais para que ocorra a ruptura do tegumento e a protrusão da radícula (Linkies et al 2009, Sliwinska et al 2009). Entretanto, nas sementes tratadas com NaCl ou ABA, a expansão das células não ocorreu, portanto, não houve protrusão radicular (Figura 3). Quando essas soluções foram acrescidas com solução de ACC ou de fluridona, um efeito antagônico ao NaCl ou ABA foi constatado, assim, foi observado aumento da expansão celular. A expansão celular aumenta a força exercida pelo embrião em crescimento contra o tegumento (Linkies et al 2009). Essa força associada ao enfraquecimento do tegumento, provavelmente promovido pela ação do ACC ou fluridona (evidenciado pelas imagens da região micropilar, Figura 3), foram suficientes para induzir o rompimento do tegumento, promovendo a germinação. Assim como em sementes de *Arabidopsis thaliana*, nas quais observou-se, que a germinação foi proveniente da expansão celular, sem ocorrência da divisão celular (Sliwinska et al 2009). Os resultados da Figura 2 e 3 indicam que o ABA atuaria como molécula chave na cadeia de eventos disparada pelo estresse salino que levaria a inibição da germinação das sementes de *S. humilis*. De fato, o ABA pode atuar inibindo a protrusão da radícula, sem prejudicar a embebição em sementes de *Nicotiana tabacum* (Manz et al 2005). Além disso, o NaCl é capaz de agir de maneira direta ativando a expressão dos genes NCED3 e Salt-Related MYB1 (SRM1) relacionados a síntese de ABA em sementes de *Arabidopsis thaliana* (Wilson et al 2014, Wang et al 2015). Consistente com esses resultados, sementes de *S. humilis* incubadas em solução de NaCl (150 mM) apresentaram aumento significativo nos níveis de ABA em relação ao controle (Figura 4). Adicionalmente, o efeito indutor provocado pelo NaCl na biossíntese do ABA

foi revertido após a transferência das sementes para solução de NaCl+fluridona. Ademais, após 12 horas de incubação das sementes em solução de NaCl, não mais observou-se incremento significativo nos níveis de ABA nas sementes transferidas para água desionizada (Figura 4). Juntos os resultados sugerem que a inibição da germinação promovida pelo estresse salino pode ocorrer por uma via dependente da síntese do ABA, que agiria inibindo a biossíntese do etileno. Alternativamente, o estresse salino pode tornar os tecidos internos das sementes menos sensíveis ao regulador gasoso.

Para testar a relação entre o ABA e o etileno na inibição da germinação promovida por solução de NaCl, os níveis de ACC livre, total e conjugado foram quantificados em sementes tratadas com solução de NaCl ou ABA, por 6 horas, posteriormente transferidas para fluridona ou água desionizada, por 12 horas. Sementes incubadas em solução de NaCl ou ABA apresentaram redução significativa nos níveis de ACC livre, ACC total e ACC conjugado em relação ao controle, sugerindo que tanto o estresse salino e o ABA poderia estar inibindo a atividade da ACS (Figura 5). Interessantemente, a atividade da ACO de sementes de *S. humilis* foi inibida fortemente por solução de ABA (Figura S1, ver Material Suplementar). Ademais, os efeitos inibitórios provocados pelo NaCl na biossíntese do ACC e na germinação foram revertidos após a transferência das sementes para água desionizada ou para solução de fluridona. Entretanto, após 18 horas de incubação das sementes em solução de ABA, não mais observou-se incremento significativo nos níveis de ACC livre, ACC total e ACC conjugado bem como na germinação das sementes (Figura 5). Esses resultados fornecem evidências de que a capacidade de sintetizar etileno constitui um requisito importante na germinação e na tolerância de sementes de *Stylosanthes* ao estresse salino. O tratamento NaCl→NaCl ou ABA→ABA aumentou a razão ACC total/ACC livre (Figura 5E). Novamente, sugerindo, que o NaCl e o ABA estão regulando negativamente a atividade da enzima ACS, portanto há uma menor síntese de ACC total. Entretanto, a razão ACC total/ACC conjugado

permaneceu estável em todos os tratamentos, sugerindo que o estresse salino e o ABA não favoreceram o processo de conjugação. Recentemente, foi demonstrado que o ABA pode inibir a germinação de sementes de *Lactuca sativa* L., via redução na atividade da enzima celulase (Chen et al 2016). Além disso, o etileno restaurou a germinação inibida pelo ABA, aumentando a expressão dos genes *LsCell* e *LsCel2* bem como a atividade da enzima celulase (Chen et al 2016). Apesar de o etileno ter sido, por muito tempo, reconhecido como um inibidor de crescimento sabe-se que esse hormônio gasoso também pode ser um indutor do crescimento e desenvolvimento das plantas (Pierik et al 2006). Dessa forma, é bastante provável que o etileno atue como um sinal necessário para a ativação da enzima celulase e a germinação das sementes de *Stylosanthes* sob condição de estresse salino. A resposta das sementes de *Stylosanthes* ao estresse salino, bem poderia ser resultado da ação do íon Na^+ nos níveis de K^+ e Ca^{2+} (Orlovsky et al 2016). O tratamento das sementes com fluridona e ACC também poderia influenciar a absorção do íon Na^+ . Assim, os níveis de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} nos tecidos das sementes de *S. humilis* previamente tratadas com solução de NaCl, NaCl+fluridona e NaCl+ACC foram quantificados.

A exposição das sementes de *S. humilis* à solução de NaCl pura ou em conjunto com fluridona ou ACC levou a um aumento acentuado nos níveis de Na^+ nos tecidos das sementes, sugerindo que a absorção seletiva ou exclusão de Na^+ não estão associadas com a presença da fluridona ou ACC no meio de incubação (Figura 6). Na Figura 6, observa-se também que os níveis de K^+ e Ca^{2+} não foram afetados pelo tratamento das sementes com NaCl puro ou em conjunto com fluridona ou ACC. Em conjunto, esses resultados indicam que o Na^+ é capaz de penetrar na semente sem a ocorrência de extravasamento de K^+ e Ca^{2+} , um fenômeno comum de ser observado na fase da germinação, mantendo, assim, a homeostase dos íons Ca^{2+} e K^+ (Weitbrecht et al 2011).

Para uma análise mais completa da ação do estresse salino no processo de germinação de sementes de *S. humilis*, os níveis de metabólitos envolvidos no metabolismo central foram quantificados em sementes tratadas com solução de NaCl, ou após incubação por 6 horas na solução salina, as sementes foram transferidas para água desionizada ou fluridona por 12 horas adicionais. De maneira geral, foram observados aumentos nos níveis de carboidratos (açúcares e seus derivados), e em alguns aminoácidos, quando as sementes foram submetidas ao tratamento com solução salina (Figura 7). Claramente, houve uma redução significativa nos níveis dos ácidos orgânicos nas sementes tratadas com NaCl, mas não em sementes embebidas em NaCl, seguindo a transferência para água ou fluridona. Esses resultados sugerem, um impedimento a partir da via glicolítica, reduzindo drasticamente os níveis de ácidos orgânicos no ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos. Esse ciclo tem extrema importância por produzir intermediários que serão utilizados em outras rotas metabólicas. Uma grande demanda de carbono e proteínas é requerido para o crescimento do eixo embrionário, como em *Oryza sativa*, que foi observado aumento nos níveis de metabólitos após 12 horas de embebição (Howell et al 2009). Por exemplo, ácidos orgânicos como fumarato e malato são essenciais ao crescimento do eixo embrionário, servindo como fonte de fotoassimilados em *Arabidopsis* (Pracharoenwattana et al 2010).

Aminoácidos como prolina e GABA, apresentaram aumento nos seus níveis quando submetido a tratamento com NaCl. Esses aminoácidos tendem a acumular quando em situação de estresse salino, em uma tentativa de preservação de proteínas e membranas celulares (Guo et al 2015). Podemos sugerir, com os resultados encontrados, que o estresse salino exerceu efeito inibitório no ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos, acumulando metabólitos da glicólise e favorecendo o acúmulo de aminoácidos. Isso pode indicar que o etileno é requerido para acoplar o metabolismo primário a germinação das sementes de *S. humilis*.

5 CONCLUSÃO

O NaCl inibi a germinação de sementes de *S. humilis* reduzindo a biossíntese de etileno via aumento nos níveis de ABA. O estresse salino e o ABA também reduzem os níveis de ACC livre, conjugado e total das sementes. Em adição, solução de ACC e de fluridona revertem a inibição da germinação das sementes promovida por solução de NaCl, o que também mostrou-se correlacionado com a produção de etileno. O efeito do NaCl na germinação de sementes de *S. humilis* é, possivelmente, uma consequência da condição de estresse promovida pela alta concentração do Na, que inibi da atividade da ACS e da ACO pelo aumento dos níveis de ABA (Figura 8). Dessa forma, o ABA funcionaria como um sinal necessário para a sobrevivência das sementes de *S. humilis* sob condição de estresse salino. Ademais, a característica das sementes tratadas com NaCl em utilizar menos eficientemente os elevados níveis de carbono, dificultando a expansão celular influenciou diretamente o processo de germinação. Neste contexto, o etileno parece ser requerido para acoplar o metabolismo primário ao crescimento do eixo embrionário (Figura 8). No futuro, análises da expressão de genes ou a atividade de enzimas relacionado a biossíntese de ABA podem ajudar na compreensão de como o NaCl induz a produção de ABA em sementes. Além disso, entender como a estreita coordenação da biossíntese do etileno e do metabolismo primário é alcançada em sementes cultivadas em um ambiente salino.

6 REFERÊNCIAS

- Anand A, Bhardwaj J, Nagarajan S** (2011) Comparative evaluation of seed coat dormancy breaking treatments in *Stylosanthes seabrana*. Grass and Forage Science **66**: 272-276
- Arc E, Sechet J, Corbineau F, Rajjou L, Marion-Poll A** (2013) ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. Frontiers in Plant Science **4** (63): 1-19
- Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H** Seeds: physiology of development, germination and dormancy. 3rd ed. New York: Springer, 2013. 392p.
- Bulens I, Van de Poel B, Hertog ML, Proft MP, Geeraerd AH, Nicolai BM** (2011) Protocol: An updated integrated methodology for analysis of metabolites and enzyme activities of ethylene biosynthesis. Plant Methods **7**: 17
- Cameron DF, 'tMannetje L** (1977) Effects of photoperiod and temperature on flowering of twelve *Stylosanthes* species. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry **17**: 417-24
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C** (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. Annals of Botany **103**: 551-560
- Chen B, Ma J, Xu Z, Wang X** (2016) Abscisic acid and ethephon regulation of cellulose in the endosperm cap and radicle during lettuce seed germination. Journal of Integrative Plant Biology **58** (10): 859-869
- Corbineau F, Xia Q, Bailly C, El-Maarouf-Bouteau H** (2014) Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy. Frontiers in Plant Science **5**: 539
- Costa NMS** (2006) Revisão do gênero de *Stylosanthes* Sw. Tese de Doutorado. Universidade Técnica de Lisboa Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 470p.

- Costa NMS, Ferreira MB** (1984) Some Brazillian species of *Stylosanthes*. In Stace H M; Edey L A (Eds) *The biology and agronomy of Stylosanthes*. Sydney, Academic Press. p 23-48
- Edey LA** (1987) Potential of *Stylosanthes* for improving tropical grasslands. *Outlook on agriculture* **16**: 124-130
- FAO** (2011) The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW)—managing systems at risk. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
- Fernie AR, Aharoni A, Willmitzer L, Stitt M, Tohge T, Kopka J, Carroll AJ, Saito K, Fraser PD, DeLuca V** (2011) Recommendations for reporting metabolite data. *The Plant Cell* **23**: 2477-2482
- Guo R, Yang Z, Li F, Yan C, Zhong X, Liu Q, Xia X, Li H, Zhao L** (2015) Comparative metabolic responses and adaptive strategies of wheat (*Triticum aestivum*) to salt and alkali stress. *BioMed Central Plant Biology* **15**: 170
- Howell KA, Narsai R, Carroll A, Ivanova A, Lohse M, Usadel B, Millar AH, Whelan J** (2009) Mapping Metabolic and Transcript Temporal Switches during Germination in Rice Highlights Specific Transcription Factors and the Role of RNA Instability in the germination process. *Plant Physiology* **149**: 961-980
- Johansen DA** (1940) *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book. 528p.
- Linkies A, Muller K, Morris K, Tureckova V, Wenk M, Cadman C, Corbineau F, Strnad M, Lynn J, Finch-Savage W, Leubner-Metzger G** (2009) Ethylene Interacts with Abscisic Acid to Regulate Endosperm Rupture during Germination: A Comparative Approach Using *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*. **21**: 3803-3822.
- Lisee J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR** (2006) Gas chromatography mass spectrometry based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* **1**: 387-396.

- Long RL, Gorecki MJ, Renton M, Scott JK, Colville L, Goggin DE, Commander LE, Westcott DA, Cherry H, Finch-Savage WE** (2015) The ecophysiology of seed persistence: a mechanism view of journey to germination or demise. *Biological Review of the Cambridge Philosophical Society* **90** (1): 31-59
- Luedemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J** (2008) TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics Advance Access*. **24**: 732-737
- Manz B, Muller K, Kucera B, Volke F, Leubner-Metzger G** (2005) Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated in vivo by nuclear magnetic resonance imaging. *Plant Physiology* **138**: 1538-1551
- Moïse JA, Han S, Gudynaite-Savitch L, Johnson DA, Miki BLA** (2005) Seed coats: structure, development, composition, and biotechnology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* **41**: 620-644
- Müller M, Munné-Bosch S** (2011) Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods* **7**:37
- Munns R, Tester M** (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 651-81
- Pelacani CR, Barros RS, Ribeiro DM, Frigeri RBC** (2005) Breaking dormancy of *Stylosanthes humilis* seeds with low pH solutions. *Acta Physiologiae Plantarum* **27**: 317-323
- Pierik R, Tholen D, Poorter H, Visser EJ, Voeselek LA** (2006) The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Science* **11** (4): 176-183
- Pracharoenwattana I, Zhou W, Keech O, Francisco PB, Udomchalothorn T, Tschoep H, Stitt M, Gibon Y, Smith SM** (2010) *Arabidopsis* has a cytosolic

- fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen. *The Plant Journal* **62** (5): 785-795
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME** (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* **59** (2): 368-373
- Orlovsky N, Japakova U, Zhang H, Volis S** (2016) Effect of salinity on seed germination, growth and ion content in dimorphic seeds of *Salicornia europaea* L. (Chenopodiaceae). *Plant Diversity* **38** (4): 183-189
- Ribeiro DM, Barros RS** (2006) Sensitivity to ethylene as a major component in the germination of seeds of *Stylosanthes humilis*. *Seed Science Research* **16**: 37-45
- Santos-Garcia MO, Toledo-Silva G, Sasaki RP, Ferreira TH, Resende RMS, Chiari L, Karia CT, Carvalho MA, Faleiro FG, Zucchi MI, Souza AP** (2012) Using genetic diversity information to establish core collections of *Stylosanthes capitata* and *Stylosanthes macrophala*. *Genetics and Molecular Biology* **35**: 847-861
- Silva PO, Medina EF, Barros RS, Ribeiro DM** (2014) Germination of salt-stressed seeds as related to ethylene biosynthesis ability in three stylosanthes species. *Journal of Plant Physiology* **171**: 14–22
- Sliwinska E, Bassel GW, Bewley JD** (2009) Germination of *Arabidopsis thaliana* seed is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl. *Journal of Experimental Botany* **60** (12): 3587-3594
- Smýkal P, Vernoud V, Blair MW, Soukup A, Thompson RD** (2014) The role of testa during development and establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science* **5**:531
- Song J, Feng G, Tian C, Zhang F** (2005) Strategies for adaptation of *Suaeda physophora*, *Haloxylon ammodendron* and *Haloxylon persicum* to a saline environment during seed germination stage. *Annals of Botany* **96**: 399–405

- Stace HM, Cameron DF** (1984) Genetic systems in *Stylosanthes*. In Stace H M; Edye L A (Eds) *The biology and agronomy of Stylosanthes*. Sydney, Academic Press. p 49-72
- Steffens B** (2014) The role of ethylene and ROS in salinity, heavy metal, and flooding in responses in rice. *Frontiers in Plant Science* **5**: 685
- Vieira HD, Barros RS** (1994) Responses of seed of *Stylosanthes humilis* to germination regulators. *Physiologia Plantarum* **92**: 17-20
- Wang B, Zhang J, Xia X, Zhang WH** (2011) Ameliorative effect of brassinosteroid and ethylene on germination of cucumber seeds in the presence of sodium chloride. *Plant Growth regulation* **65**: 407-413
- Wang T, Tohge T, Ivakov A, Mueller-Roeber B, Fernie AR, Mutwil M, Schippers JHM, Persson S** (2015) Salt-related MYB1 coordinates abscisic acid biosynthesis and signaling during salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **169**:1027-1041
- Weitbrecht K, Muller K, Leubner-Metzger G** (2011) First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany* **62** (10): 3289-3309
- Wen CK** (2015). Ethylene in Plants. *Springer Netherlands*
- Williams RJ, Reid R, Schultze-Kraft R, Souza Costa NM, Thomas BD** (1984) Natural distribution of *Stylosanthes*. In Stace H M; Edye L A (Eds) *The biology and agronomy of Stylosanthes*. Sydney, Academic Press. p 73-101
- Willis CG, Baskin CC, Baskin JM, Auld JR, Venable DL, Cavender-Bares J, Donohue K, Rubio de Casas R** (2014) The evolution of seed dormancy: environmental cues, evolutionary hubs, and diversification of the seed plants. *New Phytologist* **203**: 300-309
- Wilson RL, Kim H, Bakshi A, Binder BM** (2014) The ethylene receptors ethylene response1 and ethylene response2 have contrasting roles in seed germination of *arabidopsis* during salt stress. *Plant Physiology* **165**: 1353-1366

- Yoong FY, O'Brien LK, Truco MJ, Huo H, Sideman R, Hayes R, Michelmore RW, Bradford KJ** (2016) Genetic variation for thermotolerance in lettuce seed germination is associated with temperature-sensitive regulation of ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 (ERF1). *Plant Physiology* **170** (1): 472-488
- Zhang S, Song J, Wang H, Feng G** (2010) Effect of salinity on seed germination, ion content and photosynthesis of cotyledons in halophytes or xerophyte growing in Central Asia. *Journal of Plant Ecology* **3** (4): 259-267
- Zhu JK** (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 441-445

MATERIAL SUPPLEMENTAR

Tabela S1. Níveis de metabólitos em sementes embebidas em água desionizada ou em solução de NaCl (150mM) por 6 horas, após o que foram transferidas para segundo meio, indicado após a seta tratadas com água; água→água; NaCl→NaCl; NaCl→água; NaCl→fluridona. Valores definidos em negrito diferem estatisticamente do controle, em nível de 5 % pelo teste *t*. Os dados são a média de 6 repetições \pm erro da média.

Metabólito	Tratamento			
	Control	NaCl→NaCl	NaCl→Água	NaCl→FLU
Açúcares e derivados de açúcares				
Frutose	1.00±0.08	1.43±0.06	0.91±0.12	1.50±0.12
Glicose	1.00±0.04	1.15±0.11	0.92±0.10	0.89±0.05
3-P-Glicerato	1.00±0.10	2.32±0.14	0.85±0.07	1.52±0.13
Mio-inositol	1.00±0.04	1.46±0.09	1.22±0.10	0.94±0.05
Sacarose	1.00±0.14	1.15±0.11	1.14±0.05	0.87±0.12
Trealose	1.00±0.07	1.20±0.08	0.82±0.08	0.91±0.10
Aminoácidos				
Alanina	1.00±0.11	1.99±0.10	1.82±0.08	0.90±0.08
Arginina	1.00±0.03	1.54±0.08	1.20±0.11	1.51±0.05
Asparagina	1.00±0.10	1.43±0.05	1.15±0.07	1.74±0.09
Aspartato	1.00±0.05	1.82±0.09	1.02±0.15	1.79±0.17
Cisteína	1.00±0.11	1.02±0.12	1.07±0.06	0.91±0.12
GABA	1.00±0.08	1.94±0.07	1.03±0.12	1.38±0.11
Glutamato	1.00±0.07	1.01±0.08	0.99±0.05	1.23±0.15
Glutamina	1.00±0.09	1.48±0.10	0.91±0.08	0.95±0.09
Glicina	1.00±0.11	0.98±0.15	1.23±0.14	0.84±0.10
Lisina	1.00±0.05	1.02±0.06	1.21±0.14	0.79±0.07
Metionina	1.00±0.08	2.09±0.09	1.10±0.09	1.41±0.09
Ornitina	1.00±0.12	0.88±0.15	1.12±0.15	0.90±0.07
Fenilalanina	1.00±0.09	1.88±0.02	1.20±0.10	0.76±0.10
Prolina	1.00±0.14	1.56±0.08	1.05±0.06	0.95±0.06
Serina	1.00±0.05	1.00±0.09	0.82±0.12	0.93±0.09
Treonina	1.00±0.10	0.99±0.10	0.94±0.18	1.04±0.11
Triptofano	1.00±0.06	1.97±0.05	1.03±0.03	1.08±0.04
Tirosina	1.00±0.11	1.16±0.12	1.20±0.18	0.96±0.06
Valina	1.00±0.09	0.87±0.10	0.97±0.11	0.97±0.07
Ácidos orgânicos				
Citrato	1.00±0.09	0.54±0.07	1.16±0.13	1.12±0.15
Fumarato	1.00±0.07	0.67±0.05	0.90±0.09	1.92±0.10
Isocitrato	1.00±0.06	0.61±0.08	1.03±0.05	1.05±0.06
Malato	1.00±0.07	0.75±0.14	0.96±0.08	1.64±0.07
2 OG	1.00±0.08	0.42±0.09	1.20±0.14	1.05±0.12
Piruvato	1.00±0.10	0.76±0.10	0.91±0.17	1.18±0.09
Succinato	1.00±0.09	0.49±0.06	1.06±0.05	1.10±0.11

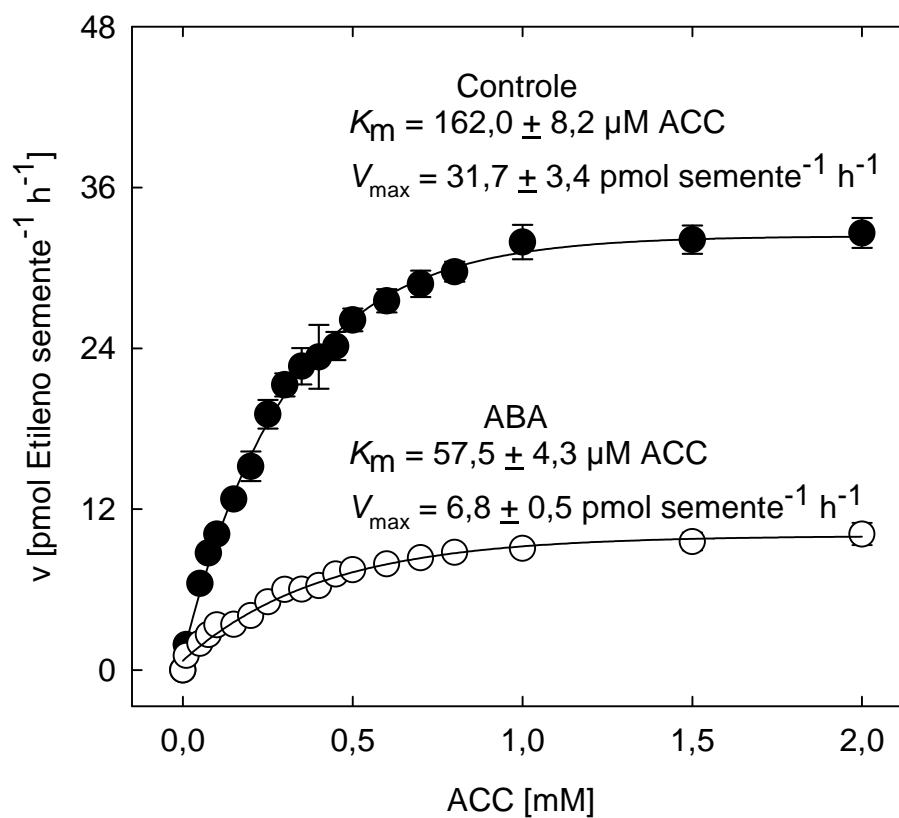


Figura S1. Efeito da concentração de ACC sobre a produção de etileno em extrato enzimático de sementes não-dormentes de 364 dias de idade pós-colheita, incubadas por 24 horas em água desionizada (controle, círculo cheio) ou em solução de ABA (50 μM, círculo aberto)