



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**



ALEXANDRE CORREIA SILVA DE SANTANA MARQUES

**EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À RESTRIÇÃO HÍDRICA
EM SEMENTES DE *Physalis angulata* L. (SOLANACEAE)**

FEIRA DE SANTANA-BA

2012

ALEXANDRE CORREIA SILVA DE SANTANA MARQUES

**EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À RESTRIÇÃO HÍDRICA
EM SEMENTES DE *Physalis angulata* L. (SOLANACEAE)**

FEIRA DE SANTANA-BA

2012

ALEXANDRE CORREIA SILVA DE SANTANA MARQUES

**EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À RESTRIÇÃO HÍDRICA
EM SEMENTES DE *Physalis angulata* L. (SOLANACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Renato Delmondez de Castro.
Co-orientadora: Dra. Daniele Takahashi

FEIRA DE SANTANA-BA

2012

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

M315e Marques, Alexandre Correia Silva de Santana
Expressão de genes associados à restrição hídrica em sementes de *Physalis angulata* L. (SOLANACEAE). / Alexandre Correia Silva de Santana Marques. – Feira de Santana, 2012.
61 f : il.

Orientador: Renato Delmondez de Castro
Co-Orientadora: Daniele Takahashi

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2012.

1. *Physalis angulata* L. – Estresse. 2. Fisiologia vegetal.
3. Germinação. 4. RT-qPCR. I. Castro, Renato Delmondez de.
II. Takahashi, Daniele. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 582.951.4

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edvaldo Amaral da Silva

Prof. Dr. Edson Ferreira Duarte

Prof. Dr. Renato Delmondez de Castro
Orientador e Presidente da Banca

Feira de Santana
2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à minha família sem a qual nada seria possível. O apoio e o carinho de meus pais Agda Silva e Manoel Marques, Teresa Souza e meus irmãos Manuela e Maurício Marques. O carinho de Layla Damasceno que também me ajudou na redação.

Obrigado Cimille Antunes e Manuela Oliveira que além de amigas ajudaram-me muito com a correção do texto. A orientação do prof. Renato Delmondez de Castro e a equipe do Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (LBBB/UFBA) que me deram suporte técnico: Daniele Takahashi, Leomara França e aos companheiros que me mantiveram motivado: Clarissa Abreu, Cristiane Brito, Valdir Gomes, Marla Cerqueira, Ivana Virgens, Paulo Teixeira, Érika Castro, Erica Patrícia, Felipe Souza e Ana Carolina Régis.

O apoio dos laboratórios parceiros. Laboratório de Microbiologia (LABEM/UFBA) prof. Milton Roque, Brena Mota, Aldinéia Damião e Luiz Batista. Laboratório de Imunologia (LABIMUNO/UFBA). Plataforma de Sequenciamento do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - Fiocruz. Laboratório de Germinação (LAGER/UEFS), profa. Claudinéia Cruz pelo grande apoio e ensinamentos, Cíntia Souza que cultivou e gentilmente nos disponibilizou frutos e sementes de *Physalis angulata*.

Agradeço a Profa. Maria Aparecida Oliveira pela iniciação científica com fisiologia vegetal (UFBA). Laboratório de Sementes Florestais (LSF/UFLA) com Prof. Edvaldo Amaral da Silva, Prof. José Márcio Faria e Júlio Maia pela oportunidade de estágio e primeiras vivências com Biologia Molecular. Apoio técnico de Wilco Ligterink do Laboratório de Sementes da Universidade de Wageningen/Holanda.

E finalmente agradeço o apoio e competência do Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais/UEFS.

“Triste não é mudar de idéia. Triste é não ter idéia para mudar”.

(Francis Bacon)

RESUMO

Physalis angulata tem sido estudada devido a suas propriedades medicinais conferida pelos metabólitos poli-oxigenados e vitaesteróides, principalmente as fisalinas, que possuem propriedades imunomoduladora, antimicrobiana e anticancerígena. A recente demanda por *P. angulata* exige estudos voltados para melhor entendimento de suas características fisiológicas visando promover sua domesticação e manejo agrônomo. A produção de variedades tolerantes a restrição hídrica constitui importante alvo para o melhoramento genético, sendo este o principal fator limitante de produção no semiárido do nordeste brasileiro. O presente estudo teve como objetivo estabelecer protocolos para otimização do processo germinativo sob déficit hídrico através da técnica de *osmopriming* e identificar genes que possam auxiliar na tolerância a restrição hídrica em *P. angulata*. Desta forma quantificou-se a expressão relativa de genes associados ao déficit em sementes de *P. angulata* previamente osmocondicionadas e posteriormente submetidas à restrição hídrica. O osmocondicionamento pode ser utilizado como um tratamento pré-germinativo pois promoveu o aumento na porcentagem de germinação e a velocidade de germinação das sementes osmocondicionadas quando transferidas para água após o estresse da restrição hídrica. A expressão dos genes HSP17, HSP18, APX e TPX foram induzidas em sementes submetidas a restrição hídrica. Sementes osmocondicionadas e posteriormente submetidas a restrição hídrica mantiveram a expressão dos genes TPRP-F1 e APX elevados em relação a sementes não osmocondicionadas. O estudo da expressão relativa destes genes em sementes de *P. angulata* permitiu associá-los à restrição hídrica aplicada e a sua tolerância, os quais poderão auxiliar no desenvolvimento de novos genótipos mais adaptados às condições de seca em *P. angulata* e possivelmente outras espécies.

Palavras-chave: *Physalis angulata* L. – Estresse, Fisiologia vegetal, Germinação, RT-qPCR

ABSTRACT

Physalis angulata have been studied due to its medicinal properties conferred by poly-oxygenated metabolites and vitaesteroids, mainly physalins, showing immunomodulatory, antimicrobial and anticancer activities. The recent demand for *P. angulata* requires better understanding the plant physiological characteristics to promote its agricultural development. One focus is the development of varieties resistant to water restriction, being the main productivity limiting factor in Brazilian northeast semi-arid. This work aims to establish protocols for optimization of germination under water deprivation through osmopriming technique and identify genes that may assist tolerance to water deficit in *P. angulata*. Thus, was quantified gene expression in seeds of *P. angulata* previously osmoprimed and then subjected to water restriction. Osmopriming can be used as a pre-germinative treatment as it increased germination percentage and rate when transferred to distilled water after water deprivation stress. The HSP17, HSP18, TPX and APX gene expression were induced in seeds subjected to water deficit. Primed seeds then submitted to water restriction maintained elevated expression of the genes TPRP-F1 and APX higher than unprimed seeds. The relative expression of these genes in *P. angulata* allowed associate them to the water restriction and its tolerance, which can be used as a marker to develop new genotypes better adapted to drought conditions in *P. angulata* and possibly other species.

Keywords: *Physalis angulata* L. – stress, Plant Physiology, Germination, RT-qPCR

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 Caracterização da espécie – <i>Physalis angulata</i> L.	2
2.2 Estresse hídrico em plantas	4
2.3 A água e a restrição hídrica em sementes	6
2.4 Fisiologia molecular do estresse hídrico em sementes	7
2.5 Quantificação da expressão gênica através da técnica de RT-qPCR	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Osmocondicionamento e testes de germinação	9
3.1.1 Osmocondicionamento	10
3.1.2 Germinação de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas de <i>P. angulata</i> sob restrição hídrica	10
3.1.3 Germinação de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas de <i>P. angulata</i> em água após restrição hídrica	11
3.1.4 Avaliação dos parâmetros de germinação	12
3.2 Desenho de primers	13
3.3 Extração de RNA total	14
3.4 Confecção de cDNA	15
3.4 Reação quantitativa de PCR em tempo real (RT-qPCR)	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Osmocondicionamento, restrição hídrica e germinabilidade de sementes de <i>P. angulata</i>	18
4.2 Germinação de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas de <i>P. angulata</i> em água após déficit hídrico	20
4.3 Expressão Gênica	22
4.3.1 Qualidade e quantificação de RNA total	22
4.3.2 Primers para RT-qPCR: especificidade e eficiência da reação de amplificação	23
4.3.3 Seleção de genes referência	24
4.3.4 Expressão relativa do gene LEA em sementes osmocondicionadas de <i>P. angulata</i> submetidas à restrição hídrica	24
4.3.5 Expressão relativa dos genes <i>Heat Shock</i> em sementes osmocondicionadas de <i>P. angulata</i> submetidas a estresse osmótico	26
4.3.6 Expressão relativa do gene TPRP-F1 em sementes osmocondicionadas de <i>P. angulata</i> submetidas a estresse osmótico	28
4.2.7 Expressão relativa do gene <i>Tap Interaction Protein</i> em sementes osmocondicionadas de <i>P. angulata</i> submetidas a estresse osmótico	29
4.3.8 Expressão relativa do gene Lipoxigenase em sementes osmocondicionadas de <i>P. angulata</i> submetidas a estresse osmótico	31
4.3.9 Expressão relativa dos genes de enzimas antioxidantes em sementes osmocondicionadas de <i>P. angulata</i> submetidas a estresse osmótico	32
4.3.10 Expressão relativa do gene Tiorredoxina Peroxidase em sementes osmocondicionadas de <i>P. angulata</i> submetidas a estresse osmótico	33

4.3.11 Expressão relativa do gene Catalase em sementes osmocondicionadas de <i>P. angulata</i> submetidas a estresse osmótico	34
4.3.12 Expressão relativa do gene Ascorbato Peroxidase em sementes osmocondicionadas de <i>P. angulata</i> submetidas a estresse osmótico	36
6 CONCLUSÕES	37
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
8 APÊNDICES	47
8.3 APÊNDICE A - Eletroforese dos produtos de PCR.....	47
8.4 APÊNDICE B - Curvas de dissociação dos <i>amplicons</i>	48
8.2 APÊNDICE C - <i>Primers</i> utilizados.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Ácido Abscísico
APX	Ascorbato Peroxidase
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool.</i>
CAT1	Catalase 1
cDNA	DNA complementar
Cq	<i>Quantification cycle</i>
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
CUG	Coefficiente de Uniformidade de Germinação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Deoxyribonucleases são enzimas que catalizam a clivagem do DNA.
HSP17	Heat Shock Protein 17,6
HSP18	Heat Shock Protein 18,7
IVG	Índice de Velocidade de Germinação
LEA	Late Embryogenesis Abundant
LOX	Lipoxigenase
mRNA	RNA mensageiro
MTP	Metalotioneína
N	Não osmocondicionada
NA	Não osmocondicionada em Água
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF	Não osmocondicionada Fresca
NP	Não osmocondicionada em PEG
NS	Não osmocondicionada Seca
O	Osmocondicionada
OF	Osmocondicionada fresca
OP	Osmocondicionada em PEG
OS	Osmocodicionada seca
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietileno Glicol
PP2A	Fosfatase Protéica 2A
PPI	Peptidil Prolil Isomerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase a partir de cDNA
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa a partir de cDNA
TIP41	<i>Tap Interacting Protein</i>
TOR	<i>Target of Rapamycin</i>
TPRP-F1	Proteína rica em Prolina
TPX1	Tioredoxina Peroxidase
TSA	<i>Transcriptional Shotgun Analysis</i>
T50	Tempo para alcançar 50% da germinação
U8416	Tempo para que haja germinação no intervalo entre 84 a 16%

1 INTRODUÇÃO

Importantes descobertas sobre as aplicações medicinais de *Physalis angulata* L. (RIBEIRO *et al.*, 2002; MAGALHÃES *et al.*, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2010; HSEU *et al.*, 2011) demandam a sua produção em larga escala. Entretanto tais descobertas provêm de uma planta ainda não plenamente domesticada. Estudos fisiológicos, agrônômicos e moleculares podem embasar o melhoramento genético da espécie através de técnicas tradicionais e/ou biotecnologia engenharia genética promovendo assim seu desenvolvimento agrícola (VINOCUR & ALTMAN, 2005).

A germinação e o estabelecimento de plântulas é um estágio crítico no ciclo de vida e produção de *P. angulata* que podem ser prejudicados quando submetida a condições de restrição hídrica (SOUZA & AMORIM, 2009). Em ambientes naturais as plantas frequentemente crescem sob condições desfavoráveis, tais como alagamento, intensa luminosidade, resfriamento, congelamento, alta temperatura, salinidade e seca. Estas condições são conhecidas como estresses abióticos e podem impedir a germinação, retardar o crescimento, reduzir a produtividade e, em casos extremos, levar a plântula e a planta à morte (LIU *et al.*, 2000).

As respostas à restrição hídrica são multivariadas e alguns mecanismos participam na resistência ou tolerância a este tipo de estresse. Para que uma planta seja tolerante às condições de restrição hídrica, tais como seca e salinidade, é preciso que ele disponha de genes que quando regulados apropriadamente sob condições de estresse sua expressão contribua para manutenção do funcionamento normal da célula. A integridade e funcionalidade da membrana plasmática, citoesqueleto, proteção do DNA, sistema antioxidante eficiente e de moléculas osmoprotetoras tais como proteínas LEA e HSP são alguns dos mecanismos de proteção celular importantes em condições de estresse hídrico (BRUGGINK & TOORN, 1995; BLACK *et al.*, 1999; BERJAK; PAMMENTER, 2000; BUITINK *et al.*, 2003; FARIA, 2006; VERSLUES *et al.*, 2006).

Em vista do grande interesse na espécie e poucos estudos sobre a biologia e fisiologia molecular da planta, este trabalho teve como objetivo estudar o comportamento fisiológico-molecular de *P. angulata* submetida à restrição hídrica durante a germinação. Para tal foram estudados protocolos para melhoria do desempenho germinativo de sementes de *P. angulata* por meio de pré-tratamentos germinativos através da técnica do osmocondicionamento e avaliação do seu efeito no vigor das sementes submetidas à germinação sob condição de restrição hídrica por meio de estresse osmótico.

Para a investigação dos mecanismos moleculares que levam ao melhoria do desempenho germinativo das sementes osmocondicionadas foi utilizada a quantificação da expressão de genes associados à restrição hídrica através da técnica de RT-qPCR.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Caracterização da espécie – *Physalis angulata* L.

Physalis angulata é conhecida como camapu, mullaca ou juá-de-capote. Pertence à família Solanaceae A. L. Jussieu, com um dos maiores números de espécies dentre as Angiospermas e ampla distribuição, principalmente em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul (HUNZIKER *et al.*, 2001). As solanáceas são conhecidas por apresentar espécies de grande importância alimentar e condimentar como batatas (*Solanum*), pimentas e pimentões (*Capsicum*) e tomate (*Lycopersicum*), sendo estas os principais representantes. É frequente também seus usos para fins ornamentais (*Datura*), industriais como o tabaco (*Nicotiana*), bem como medicinais (*Physalis*) (TOMASSINI *et al.*, 2000).

O nome *Physalis* é oriundo do grego, onde “Physa” significa bolha ou bexiga, referindo-se ao cálice que encerra seus frutos (HAWKES *et al.*, 1991). Corresponde ao gênero mais derivado da Solanaceae, incluindo 110 espécies. No Brasil, pode ser encontrada em quase todo território. Na Bahia, existem registros em Seabra, Água Quente, Mucugê e Rio de Contas (MATOS, 2007). Para o Brasil, são reconhecidas 11 espécies do gênero *Physalis* (D'ARCY *et al.*, 2005), com distribuição nas várias regiões do país, especialmente na Amazônia e no Nordeste.

Physalis angulata é uma planta herbácea, ereta, medindo até um metro de altura, de ciclo anual e reprodução por semente. O ciclo de vida é relativamente curto, produzindo a

maior quantidade de frutos (do tipo baga) em média aos 90 dias após a semeadura (FREITAS, 2004). Os frutos são delicados, pequenos e redondos, com coloração amarelo-alaranjado quando maduros, envolvidos por sépalas em forma de balão (Figura 1).

As sementes de *P. angulata* são elipsóides e comprimidas, esbranquiçadas quando imaturas e castanho alaranjadas quando completamente maduras (Figura 2). Pesando em média 25mg (50 sementes e apresentando teor de água de cerca de 7.78%). O tegumento é glabro e reticulado na semente seca, sendo que após a embebição apresenta-se parcialmente liso e a testa permite a visualização do embrião. Apresentam em média 1,55 mm de comprimento, 1.26 mm de largura e 0.43 mm de espessura (SOUZA, 2009).



Figura 1. Ramos de *Physalis angulata* apresentando flores e frutos encerrados em cálices persistentes. Fonte: Antônio Carlos Bastos de Magalhães .



Figura 2. Emissão de raiz primária de *Physalis angulata*.

No Nordeste brasileiro, *P. angulata* é amplamente utilizada popularmente em tratamentos caseiros de reumatismo crônico, problemas renais, da bexiga e do fígado, e também como sedativo, antifebril e para doenças da pele (MATOS, 2007). No Pará as raízes são utilizadas para o tratamento de hepatite e malária (BRANCH & DA SILVA, 1983). Na medicina popular pode ainda ser utilizada como anticoagulante, antileucêmico, antimutagênico, antiinflamatório, antiespasmódico, antiséptico, analgésico e no tratamento de diabetes, entre outros (CHIANG *et al.*, 1992).

O gênero *Physalis* ocupa lugar de destaque na família Solanaceae pela presença de metabólitos poli-oxigenados e vitaesteróides (TOMASSINI *et al.*, 2000). As fisalinas, moléculas às quais se atribuem várias atividades farmacológicas, são responsáveis pelas atividades imunomoduladora, antimicrobiana, antinociceptiva e anticancerígena de *P. angulata* (JANUÁRIO *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2002; MAGALHÃES, 2005; BASTOS *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2006).

As fisalinas são seco-esteróides produzidos a partir do metabolismo secundário de espécies do gênero *Physalis*. As fisalinas estão presentes normalmente em raízes, caules e folhas (LOPES *et al.*, 2006; SOARES, *et al.*, 2006). Fisalinas B e F, obtidas de extratos etanólicos de raízes, caule e folhas de *P. angulata* demonstraram a inibição do crescimento de células tumorais (RIBEIRO *et al.*, 2002; MAGALHÃES *et al.*, 2006; HSEU *et al.*, 2011). Atuam também na inibição do crescimento dos promastigotas de espécies de *Leishmania sp.* sugerindo um potencial terapêutico destas moléculas na leishmaniose (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

P. angulata produz substâncias químicas que possuem muitas aplicações médicas, entretanto estes compostos secundários não são capazes de proteger a planta contra o ataque de patógenos (LISSNER & VELA, 2009).

2.2 Estresse hídrico em plantas

O estresse abiótico é causado por fatores ambientais extremos que, dependendo da sua intensidade e duração, pode causar alterações significativas na fisiologia da planta (GODBOLD, 1998).

Os vários estresses abióticos são correlacionados devido ao fato de que parte dos efeitos negativos sobre o desempenho da planta tem relação comum com a deficiência hídrica causadora de desequilíbrios na homeostase e metabolismo da planta. A restrição

hídrica pode ocorrer pela redução da disponibilidade de água no ambiente durante períodos de seca, alta concentração salina, ou formação de gelo extracelular durante o congelamento (BRAY, 1997).

A seca, em conjunto com a alta temperatura e radiação, são os efeitos ambientais mais importantes para a sobrevivência das plantas e produtividade das culturas (BOYER, 1982). Classicamente, a tolerância das plantas à seca tem sido dividida em evitar, escapar ou tolerá-la (LEVITT, 1980; TURNER, 1986). Plantas que escapam exibem um elevado grau de plasticidade do desenvolvimento, sendo capaz de completar o seu ciclo de vida antes que déficits hídricos ocorram. Esta adaptação é importante em regiões áridas, onde as plantas podem combinar ciclos de vida curtos, com altas taxas de crescimento e trocas gasosas enquanto há umidade no solo (MAROCO *et al.*, 2000).

As plantas podem também suportar as condições de seca evitando a desidratação dos tecidos mantendo o potencial de água tão alto quanto possível, ou tolerando baixo potencial hídrico. Evitar a desidratação é comum em plantas anuais e perenes e está associado com uma variedade de traços adaptativos como a minimização transpiração e perda de água através do fechamento estomático. (EHLERINGER & COOPER, 1992; JACKSON *et al.*, 2000; LARCHER, 2000).

Physalis angulata é uma planta que apresenta pouca tolerância aos estresses hídrico e salino (SOUZA & AMORIM, 2009). A queda das flores e a redução na produção de frutos, conforme o aumento das concentrações de NaCl, indicam que *P. angulata* é sensível a salinidade (SOUZA *et al.*, 2007).

Em estudos avaliando os efeitos da restrição hídrica sobre plantas de *P. angulata*, foi constatado que a partir do quarto dia de suspensão de rega houve redução na frutificação, diminuição do número de folhas, aparecimento de manchas amarelas e abscisão. Segundo os autores *P. angulata* é eficiente na utilização da água estocada nos tecidos durante os três primeiros dias de estresse hídrico e a partir do quarto dia apresentava deficiência hídrica. Foi observado aumento na produção da biomassa radicular provavelmente, devido, à estocagem de assimilados nas raízes em resposta à redução da expansão foliar (SOUZA & AMORIM, 2009).

O domínio geocológico das caatingas, região marcada pelo clima semiárido que ocupa uma área correspondente a 54% da Região Nordeste e 11% do território brasileiro, dentro do denominado Polígono das Secas (ALVES, 2007). Uma maior compreensão dos efeitos da seca sobre *P. angulata* e outras plantas é importante para melhores práticas de gestão e esforços de melhoramento da agricultura nesse ecossistema.

2.3 A água e a restrição hídrica em sementes

A fase de semente é uma etapa de extrema importância no ciclo de vida das plantas superiores, garantindo a sobrevivência das espécies através de gerações. As sementes podem ser classificadas como ortodoxas ou recalcitrantes. Essas últimas são aquelas que não completam a secagem durante a maturação, sendo dispersas com alto teor de água e sensíveis à dessecação. Sementes recalcitrantes são adaptadas a ambientes onde não ocorre restrição hídrica podendo germinar rapidamente garantindo assim a proliferação da espécie por meio de um banco de plântulas (PAMMENTER & BERJAK, 2003).

Sementes classificadas como ortodoxas estão adaptadas a ambientes onde ocorre restrição hídrica e as sementes são capazes de tolerar grande desidratação possibilitando que suspendam o metabolismo aguardando condições ótimas de umidade para germinar. Desta forma as populações de plantas que escapam da seca vegetam durante as estações úmidas e durante a seca elas sobrevivem na forma de banco de sementes (PAMMENTER *et al.*, 1994). Mesmo sementes de plantas que evitam ou toleram grande depleção de água precisam de condições adequadas de umidade para garantir a germinação e o estabelecimento das plântulas, sendo este um estágio extremamente sensível à dessecação (BUITINK *et al.*, 2003).

Entre os fatores ambientais capazes de influenciar o processo germinativo, a água, a temperatura e o oxigênio são os de maior impacto (BOYER, 1982; PIMENTEL, 1999). Isto porque afetam diretamente as relações hídricas em sementes, o metabolismo e subsequente desenvolvimento de plântulas, implicando direta ou indiretamente em todas as demais etapas do metabolismo, incluindo reativação do ciclo celular e crescimento (DE CASTRO *et al.*, 2000). O estresse hídrico pode impedir a germinação, alterar a velocidade, o tempo e a uniformidade da germinação. Entretanto, os níveis de respostas em relação a estas variáveis, dependem tanto do grau de estresse quanto da tolerância ou resistência da espécie (KRANNER *et al.*, 2010).

Do ponto de vista econômico, a qualidade das sementes é de extrema importância na agricultura, uma vez que constituem a matéria-prima para propagação sendo cruciais para desenvolver e alcançar uma boa colheita. Vários aspectos influenciam o desempenho agrícola tais como longevidade, porcentagem e uniformidade de germinação e emergência principalmente sob estresses abióticos. Buscando a melhoria na qualidade de sementes emprega-se a técnica do *priming* (HEYDECKER *et al.*, 1973).

Priming de sementes são tratamentos pré germinativos que envolvem diversas técnicas baseadas na absorção controlada de água pela semente seguida por secagem.

Técnicas de embebição controlada possibilitam a reativação do metabolismo e reinício dos eventos germinativos durante as fases 1 e 2 do modelo trifásico de germinação de sementes ortodoxas (BRADFORD & NONOGAKI, 2007). A protrusão radicular é impedida evitando-se com isto a perda da tolerância à dessecação (BUITINK *et al.*, 2003; MAIA *et al.*, 2011). Com o impedimento da protrusão radicular é possível realizar posterior secagem, armazenamento e comercialização das sementes tratadas.

Os benefícios do *priming* incluem germinação mais rápida e uniforme, maior vigor de plântulas promovendo melhor crescimento em ambientes diversos, sob condições estressantes e quebra de dormência em algumas culturas (NASCIMENTO, 1998; VARIER *et al.*, 2010).

O sucesso da adaptação da planta ao estresse depende da sua detecção precoce, seguida por uma reação adequada. Se a planta já houver sido submetida previamente a um processo de aclimatação, a sua reação ao próximo estresse será bem sucedida (KNIGHT *et al.*, 1999).

Souza *et al.* (2011) avaliaram a germinação de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas de *P. angulata* em ambientes salinos e constataram a diminuição da germinação e do IVG, em ambos os tratamentos, observando entretanto que as sementes osmocondicionadas apresentaram maior tolerância ao estresse salino. O *priming* também foi efetivo na indução da tolerância a restrição hídrica em sementes de *Brassica napus*, *Helianthus annuus* e *Solanum lycopersicum* (DEMIR *et al.*, 2006; MOHAMMADI & AMIRI, 2010; ZHANG *et al.*, 2012).

2.4 Fisiologia molecular do estresse hídrico em sementes

A transdução de sinais dos estresses por seca e por sais consistem em cadeias vinculadas a homeostases iônicas e osmóticas, respostas a detoxificação (controle de danos e reparos) e regulação do crescimento com efeito sobre a reativação do metabolismo e do ciclo celular e crescimento (ZHU, 2002).

Genes envolvidos na resposta ao estresse podem ser amplamente categorizados em genes reguladores ou efetores. Os genes reguladores codificam sensores que percebem o sinal de estresse, hormônios que transmitem o sinal e fatores de transcrição, e com isso aumentam ou diminuem a expressão em consequência do estresse (XIONG *et al.*, 2002; BARTELS & SUNKAR, 2005). Genes que codificam proteínas envolvidas na mitogação

dos efeitos adversos causados pelo estresse em plantas, são chamados genes efetores. Portanto, os mecanismos de defesa começam com a percepção do estresse seguido da transdução de sinais, síntese de fatores de transcrição e finalmente aumento ou redução de expressão de genes produzindo proteínas e metabólitos protetores. Foram caracterizados muitos genes que desempenham papel importante durante estresses, e envolvidos em vários níveis regulatórios como percepção, sinalização, transcrição e produção de biomoléculas protetoras (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 2006).

A busca da melhoria na qualidade de sementes utilizadas na produção agrícola é consequência de mecanismos que se iniciam a nível subcelular. A causa mais citada de deterioração da semente é dano às membranas celulares e outros componentes subcelulares por radicais livres nocivos gerados pela peroxidação dos ácidos graxos insaturados e poliinsaturados de membrana. Durante o osmocondicionamento, ou *osmopriming*, esses radicais livres podem ser extintos ou convertidos em produtos menos nocivos por enzimas e moléculas antioxidantes como peroxidase, tioredoxina peroxidase, glutathione transferase, catalase, ascorbato peroxidase, glutathione redutase e superóxido dismutase (BRACCINI *et al.*, 2000; GALLARDO *et al.*, 2001).

Os mecanismos fisiológicos de sobrevivência sob estresse hídrico a nível molecular têm sido muito estudados em espécies vegetais cultivadas (SOEDA *et al.*, 2005; VINO CUR & ALTMAN, 2005; CORBINEAU, 2012). No entanto, os mecanismos de adaptação das espécies nativas, a exemplo da *P. angulata*, às condições de restrição hídrica natural da caatinga e semi-árido nordestinos ainda são pouco elucidados.

2.5 Quantificação da expressão gênica através da técnica de RT-qPCR

A qualidade fisiológica das sementes tem sido principalmente diagnosticada por teste de germinação. Uma desvantagem é que a germinação *per se* é o ponto final de um grande número de processos que ocorrem na semente antes da protrusão radicular e do desenvolvimento da plântula (TOOROP & HILHORST, 2003).

O desenvolvimento da biologia molecular nas últimas décadas possibilitou a utilização de ferramentas modernas que podem indicar mais sobre o estado interno da semente. A semente que não completa a germinação pode estar quiescente, dormente ou até morta. A avaliação de parâmetros moleculares pode excluir uma ou mais destas opções. Pode também indicar se a causa está no embrião ou no endosperma, que tipo de dormência

está envolvida, ou mesmo padronizar técnicas para superá-la uma vez que dados suficientes tenham sido recolhidos (BRADFORD & NONOGAKI, 2007).

RT-qPCR é uma técnica largamente utilizada para a análise quantitativa da expressão gênica. Tem sido desenvolvida pela combinação de PCR com técnicas fluorescentes. Isso depende de recolher dados ao longo da amplificação por PCR, o que é conseguido por monitorização do aumento da intensidade de fluorescência de um corante específico (SYBR green por exemplo), que se correlaciona com o aumento da concentração do produto de PCR (MULLIS & FALOONA, 1987).

A expressão gênica pode ser medida pela quantificação de cDNA convertido a partir de um RNA mensageiro correspondente a este gene em uma amostra tratada em relação a uma amostra controle calibradora que serve de referência fisiológica. A amostra calibradora é o cDNA provindo de células de tecido não tratado (ex. sementes embebidas em água).

Todas as quantificações são normalizadas com um gene de referência que é um gene cuja expressão deve ser estável em qualquer tratamento estudado permitindo que a variabilidade na concentração inicial e da qualidade do RNA total e na eficiência de conversão da reação de transcrição reversa sejam excluídas da análise (BURKARDT, 2000; BUSTIN *et al.*, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Osmocondicionamento e testes de germinação

O lote de sementes utilizado neste experimento foi proveniente do cultivo de 40 matrizes em casa de vegetação na Unidade Experimental Horto Florestal (UEFS) em 2010. Os frutos maduros foram colhidos em 29 de novembro de 2010 e despolpados e as sementes foram colocadas para secar em incubadora saturada com CaCl₂, (35% de umidade relativa; 20°C) até alcançar a estabilização da umidade em 02 de dezembro de 2010. As sementes foram separadas em porções de 500 sementes (~0.27g), acondicionadas em microtubos de 2mL, mantidas em vasilhame hermeticamente fechado contendo sílica gel e mantidos a temperatura de 4° C (geladeira).

Para determinar o teor de água, foram retiradas quatro repetições de 100 sementes. O método de secagem utilizado foi 105±2°C por 17 horas (ISTA, 2003). O teor de umidade

inicial da semente foi 25.17% e o teor de água após a secagem estabilizou-se em aproximadamente 7.8%.

Os ensaios de osmocondicionamento, germinação e quantificação da expressão gênica foram realizados no Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos – ICS-UFBA. Sementes de *P. angulata* foram submetidas a duas condições: osmocondicionadas e não osmocondicionadas.

3.1.1 Osmocondicionamento

Em 18 de maio de 2011 as sementes foram condicionadas em solução aerada de PEG 8000 (polietilenoglicol) apresentando potencial osmótico de -1.2 Mpa, previamente estabelecido como potencial de *priming* (SOUZA, 2009). As amostras de sementes de *P. angulata* foram acondicionadas em tubos *falcon*, contendo 25 ml de solução osmótica (PEG), conectado a um sistema de aeração artificial (bomba de aquário) (Figura 3a) durante 10 dias e mantidas em câmara de germinação (modelo Eletrolab) a 35°C, ajustada para um fotoperíodo de 12/12h (SOUZA, 2009). A solução de PEG foi trocada a cada dois dias. Após este período as sementes foram lavadas e colocadas para secar em temperatura ambiente até atingir o peso inicial (24h). O cálculo para preparação das soluções de PEG 8000 foi obtido de acordo com Villela & Beckert (2001).

3.1.2 Germinação de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas de *P. angulata* sob restrição hídrica

Para os experimentos de germinação, sementes de *P. angulata* osmocondicionadas (O) e não osmocondicionadas (N) foram dispostas em placas de Petri com 8.5 cm de diâmetro e seladas com filme plástico para evitar evaporação, contendo ao fundo duas camadas de papel germitest (previamente esterilizados em autoclave) e umedecidas com 2,5x o peso do papel por água destilada (controle) ou diferentes soluções de PEG.

Os testes de germinação foram realizados em quatro réplicas contendo 50 sementes, foram avaliados por 10 dias, sob temperatura constante de 35° C em câmara de germinação (modelo Eletrolab) e ajustada para um fotoperíodo de 12/12h.

Em 30 de maio de 2011 foi conduzido um teste de germinação utilizando sementes O de *P. angulata* e sementes N submetidas a diferentes potenciais osmóticos (-0.2, -0.4, -0.6, -0.8, -1.0 e -1.2 MPa), além do controle (0.0 MPa, germinação em água destilada).

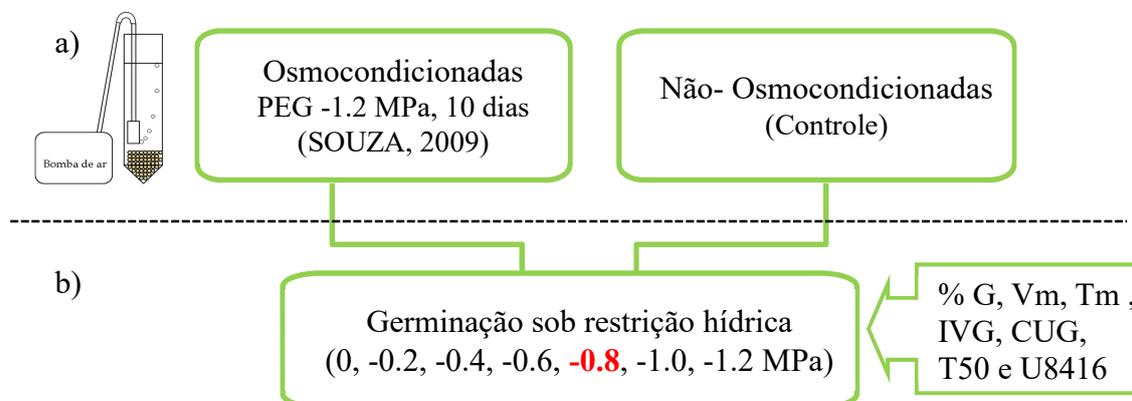


Figura 3. Fluxograma do experimento fisiologia da germinação de *Physalis angulata* sob restrição hídrica. a) Osmocondicionamento; b) Germinação sob restrição hídrica.

3.1.3 Germinação de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas de *P. angulata* em água após restrição hídrica.

Sementes osmocondicionadas em 19 de julho de 2011 e não osmocondicionadas foram submetidas ao estresse osmótico (-0.8MPa) por 10 dias consecutivos. Este potencial foi definido pois foi o primeiro potencial que causou o impedimento da germinação. Retiraram-se duas amostras de sementes de *P. angulata* para o teste de germinação: Uma delas fresca (sem processo de secagem) e a outra seca (secagem por 24h) (Figura 4).

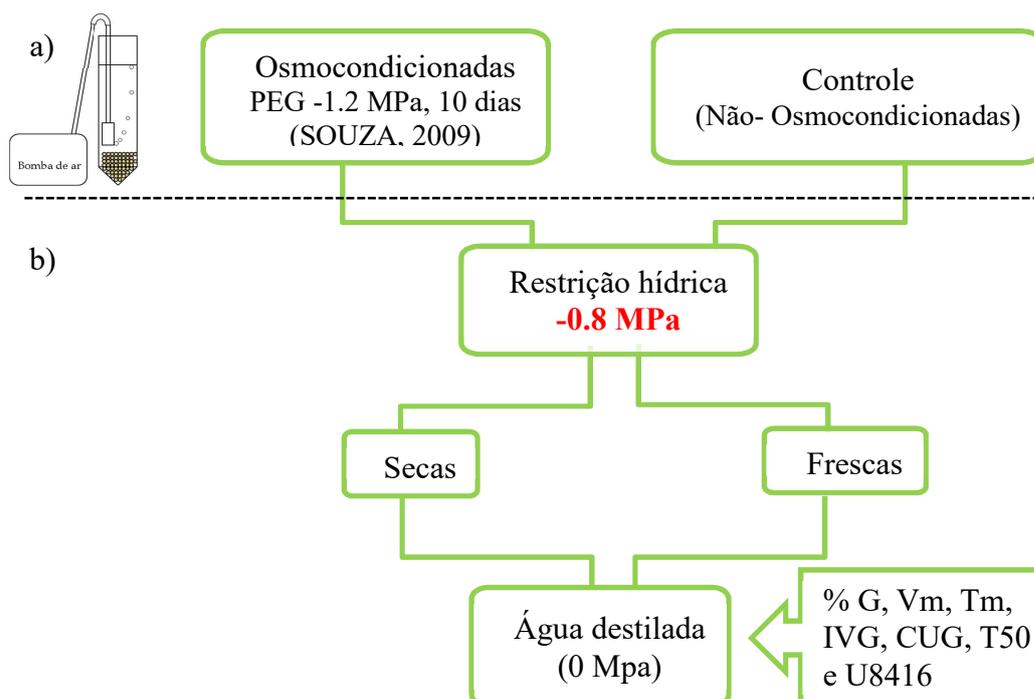


Figura 4. Fluxograma do experimento fisiologia da germinação de *Physalis angulata* sob restrição hídrica e posterior embebição em água destilada das não germinadas secas ou frescas. a) Osmocondicionamento; b) Germinação em água após restrição hídrica.

3.1.4 Avaliação dos parâmetros de germinação

O delineamento experimental dos testes de germinação foram inteiramente casualizado com quatro repetições de 50 sementes. Os valores de porcentagem de germinação obtidos foram transformados em $\arcseno(x/100)1/2$, analisados por ANOVA e comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o programa SISVAR (SCOTT & KNOTT, 1974; FERREIRA, 2011).

Para os testes de germinação foram consideradas sementes germinadas aquelas cuja protrusão radicular ultrapassou um milímetro de comprimento. Foram avaliados os seguintes índices: porcentagem de germinação, velocidade média de germinação (Vm), tempo médio de germinação (Tm), índice de velocidade de germinação (IVG), coeficiente de uniformidade de germinação (CUG) de acordo com Ranal & Santana (2006). Tempo de 50% de germinação (T50) e uniformidade (U8416) (JOOSEN *et al.*, 2010).

3.2 Desenho de *primers*

Os genes estudados foram identificados a partir da busca na literatura de genes associados à restrição hídrica durante a germinação e ao *osmopríming*. Para quantificar a expressão destes genes nos experimentos foi necessária a confecção de *primers* específicos para os genes de interesse. Foi realizada uma busca de regiões conservadas destes genes entre sequências de solanáceas depositadas em banco de dados público (NCBI¹, *Sol Genomics Network*²) devido a ausência destas sequências nucleotídicas da espécie em estudo. O sequenciamento do transcriptoma de folhas de *Physalis peruviana*³ contribuiu para a confecção de *primers* (Apêndice C) que foram usados para *P. angulata* (Figura 5).

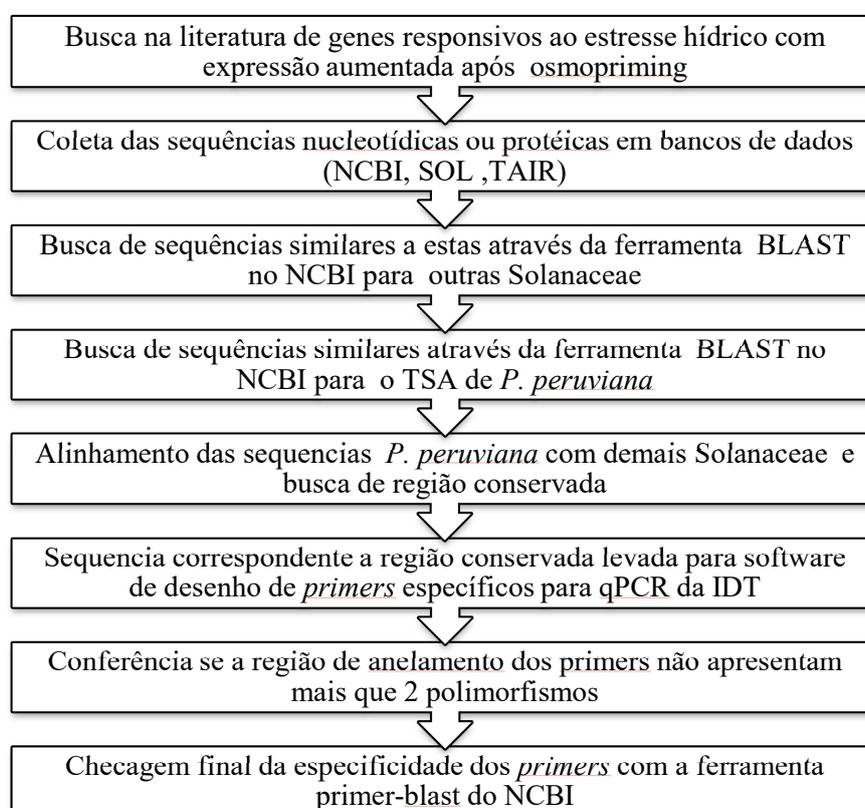


Figura 5. Fluxograma para desenho de *primers* específicos para uso em RT-qPCR para espécie *P. angulata* cujo genoma ou transcriptoma são desconhecidos.

As sequências nucleotídicas foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994) contido no programa Bioedit (HALL, 1999). Depois de localizada a região mais conservada dentre as sequências alinhadas, a sequência correspondente em *P. peruviana* foi levada para o programa de desenho de *primers* para

¹ NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

² Sol Genomics Network - <http://solgenomics.net>

qPCR do site IDT⁴. Dentre os parâmetros padronizados pelo site foi alterado apenas o tamanho do *amplicon* para 150pb \pm 40 e a temperatura de anelamento para 60°C \pm 1.

Foram utilizados três genes de referência com base na literatura que sugere genes estáveis para estudos de RT-qPCR em sementes e genes que apresentaram estabilidade neste experimento. São eles: Fosfatase Proteica 2A (PP2A), Metalotioneína (MTP) e Peptidil Prolil *cis trans* Isomerase (PPI) (DEKKERS *et al.*, 2011).

3.3 Extração de RNA total

Os estudos de expressão gênica basearam-se nos experimentos fisiológicos onde foram comparadas sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas sob restrição hídrica em PEG -0,8MPa ou em água destilada por 24h:

- Sementes osmocondicionadas em água (OA);
- Osmocondicionadas em PEG (OP);
- Não osmocondicionadas em água (NA);
- Não osmocondicionadas em PEG (NP).

Para a extração de RNA das sementes, foi utilizado o kit SV Total RNA Isolation System (Promega) seguindo instruções do protocolo do fabricante. Utilizou-se aproximadamente 50 sementes (30mg) trituradas em nitrogênio líquido com auxílio de cadinho e pistilo para cada extração. Em seguida a coluna foi eluída com 100µL de água livre de nucleases, posteriormente a solução foi congelada em N₂ líquido, seca em liofilizador e ressuspendida em 30µL de água.

Separou-se uma alíquota de 2µL do extrato de RNA para quantificação em espectrofotômetro (SmartSpec BioRad). A pureza e a concentração do RNA extraído foram determinadas através de leitura em espectrofotômetro onde as amostras de RNA foram diluídas 50x para um volume final de 100µL em tampão TE⁵. As leituras foram realizadas em comprimento de onda 260 e 280nm considerando-se que 1 unidade de DO260 equivale a 40 mg/mL de RNA. Foi realizado o cálculo da razão entre a DO em 260

³ *Physalis peruviana* database - <http://physalisdb.org/uchuva/db/index>

⁴ Integrated DNA Technologies - <http://www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>

⁵ TE - Tris/ EDTA, é uma solução tampão contendo uma mistura de base T (Tris) e EDTA

e 280nm para estimar o grau de pureza do RNA total. Somente foi utilizado RNA com a razão entre 1.7 e 2.0.

A ausência de DNA genômico nos extratos de RNA foi checada comparando amostras de cDNA com RNA que não sofreram transcrição reversa (controle negativo). Observando as curvas de amplificação em qPCR o controle negativo não deve ser detectado ou se detectado apresentar-se com uma diferença de no mínimo 5 ciclos de amplificação (NOLAN *et al.*, 2006).

Após a extração do RNA total, a sua integridade foi verificada em gel de agarose 1% em tampão TBE⁶ 0.5x. À amostra de RNA (5µL) foi adicionada 2µL de tampão de carregamento contendo azul de bromofenol (2.5mg/mL) e sacarose (400mg/mL). Foi acrescentado ao gel brometo de etídio na concentração final de 0.5 µg/mL. A corrida de eletroforese foi feita a 100V por 1 hora em cuba horizontal. A integridade do RNA foi avaliada no transiluminador de luz ultravioleta observando-se as bandas de RNA ribossomal 18 e 28S.

3.4 Confeção de cDNA

Para a confecção dos cDNAs foi utilizado 1µg de cada amostra de RNA total extraído com o uso do kit ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega), seguindo instruções do protocolo do fabricante.

O RNA foi preparado para a síntese acrescentando-se 1µL (0.5µg) de *random primers* incubado por 5 min à 70°C resfriado a 4°C por 5 min. Para a transcrição reversa, adicionou-se 3mM de MgCl₂; 0.5 mM de cada dNTPs; 1µL (1u) da enzima ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega), 4µL de tampão ImProm-IITM 5X e água para 15µL. A reação de transcrição reversa foi realizada no termociclador VeritiTM Thermal Cycler e o programa utilizado foi de 25°C por 5 min, 42°C por 60 min e 70°C por 15 min. Após sintetizados, os cDNAs foram armazenados a -20°C.

⁶ TBE - Tris/Borato/EDTA, é uma solução tampão contendo uma mistura de base T (Tris), ácido Bórico e EDTA

3.4 Reação quantitativa de PCR em tempo real (RT-qPCR)

As reações de qPCR foram realizadas em duplicatas técnicas e triplicatas biológicas em placas de 96 poços usando o reagente SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) no equipamento Applied 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Para cada reação de qPCR foi adicionado 5µL de amostra, 0.5µL de cada *primer* (a partir de uma solução de trabalho 10µM), 10µL de 2x SYBR Green PCR Master Mix e água para um volume final de 20µL.

O programa de corrida no qPCR consistiu de um primeiro passo 95°C por 3 min. Depois 40 ciclos alternando entre 15 seg a 95°C e 1 min a 60°C. Rotineiramente uma curva de dissociação foi realizada depois de cada reação de qPCR (entre 55° C e 95° C aumentando 0.5°C a cada 10 segundos). Para todas as reações apenas um pico foi observado confirmando a síntese de produto único que foi posteriormente confirmado pela análise dos produtos esperados em gel de agarose 3%.

Para determinação da eficiência de amplificação primeiramente os cDNAs de cada tratamento foram diluídos 15x e tomou-se uma alíquota de cada para fazer um *pool* de cDNAs. Em seguida, foi realizada uma diluição seriada deste *pool* (0, 2, 4, 8 e 16x), cada diluição foi analisada em duplicata. Subsequentemente, os valores de Ct foram representados em função do log da concentração do valor inicial e a partir da inclinação da reta de regressão a eficiência de amplificação é estimada.

Dentre os *primers* desenhados e com eficiência de amplificação satisfatória (85 a 115%) foram avaliadas suas respectivas estabilidades com uso do programa geNorm. Genes com alta estabilidade entre todas as repetições biológicas e tratamentos devem apresentar valor do geNorm $M \leq 0.5$ (HELLEMANS *et al.*, 2007).

As análises realizadas com GeNorm permitem o cálculo de fatores de normalização para cada amostra tecido/órgão com base na média geométrica do gene testado (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

Dados de RT-qPCR são não lineares e, normalmente, mostram heterogeneidade de variância através das repetições biológicas dentro de tratamentos e entre os tratamentos. Para tanto os valores de Cq das análises de expressão relativa devem ser transformadas para logaritmo na base dois (RIEU & POWERS, 2009). Após a transformação foi realizada análise de variância (ANOVA), com teste Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o programa SISVAR (SCOTT & KNOTT, 1974; FERREIRA, 2011).

Para calcular a expressão relativa é necessário que os valores de Ct sejam transformados em valores de concentração:

$$\text{Concentração} = \text{eficiência média}^{(\text{controle}) - \text{média (amostras)}}$$

Após serem transformados em valores de concentração, é necessário calcular a média geométrica da concentração dos três genes referência, como forma de minimizar os possíveis valores discrepantes e as diferenças entre eles. Os valores de concentração do gene alvo são então divididos pela média geométrica dos genes referência, obtendo-se assim o valor de expressão:

$$\text{Expressão} = \text{Concentração do gene de alvo} \div \text{média geométrica (Conc.ref1, Concref2, Concref3)}$$

Os dados de expressão gênica foram então calculados por quantificação relativa, a qual necessita além do gene referência, uma amostra como referência, ou seja, como tratamento controle ou calibrador para a determinação da expressão (PFAFFL, 2001). Para isso, como controle interno da expressão foi estabelecido o Ct obtido das sementes NA, que recebeu valor de expressão igual a 1. Sementes NA foram definidas como amostra calibradora, pois são sementes que não sofreram tratamento prévio e foram submetidas a condição ótima para germinação (água destilada). A expressão relativa das sementes embebidas por 24 horas nos tratamentos osmocondicionadas em água (AO), não osmocondicionadas em PEG (NP) e osmocondicionadas em PEG (OP) foram então comparadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Osmocondicionamento, restrição hídrica e germinabilidade de sementes de *P. angulata*.

Houve diminuição progressiva da porcentagem de germinação das sementes O e N até o potencial de -0.8MPa , a partir do qual houve completo impedimento da germinação sem diferença significativa entre sementes O e N (Figura 6). A porcentagem de germinação, T_m, T₅₀ e IVG diferiram estatisticamente entre os tratamentos osmóticos no potencial de -0.6MPa , representando o limiar onde a restrição hídrica prejudica a germinabilidade de *P. angulata* (Tabela 1).

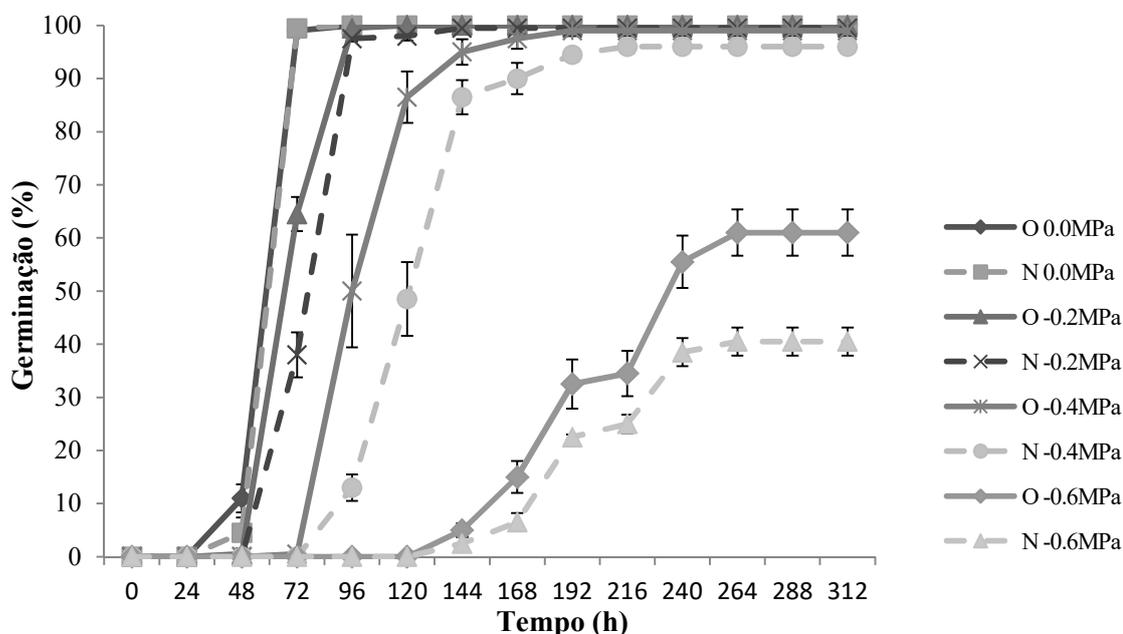


Figura 6. Efeito do *priming* em sementes de *P. angulata* sob estresse osmótico. Sementes osmocondicionadas (O) e não osmocondicionadas (N) embebidas em soluções osmóticas (0 a -0.6MPa) por 15 dias. Os dados representam a média de quatro repetições \pm erro padrão.

A redução na porcentagem e velocidade de germinação de sementes sob estresse osmótico pode estar relacionada, dentre outros fatores, à diminuição das atividades enzimáticas, diminuição da atividade respiratória e diminuição da energia disponível (BEWLEY & BLACK, 1994).

Sementes O são sementes que já sofreram um estresse prévio e quando embebidas em soluções de PEG, resultaram em maiores porcentagens de germinação do que em sementes N no potencial -0.6MPa (61 e 40.5%, respectivamente), maior uniformidade

(U8416: 74.55 e 65.11, respectivamente) e maior velocidade média (V_m) a partir do potencial -0.2MPa (Tabela 1), representando uma resposta positiva do *priming* sob a condição de restrição hídrica (Figura 6). Outros estudos relatam que o osmocondicionamento de sementes possibilitou maior velocidade de germinação e maior tolerância às adversidades climáticas, como déficit hídrico no solo, quando semeadas (BRADFORD, 1986; MOHAMMADI; POWELL *et al.*, 2000; AMIRI, 2010; VARIER *et al.*, 2010; ZHANG, M. *et al.*, 2012).

O osmocondicionamento (utilizando KNO_3) também aumentou a tolerância ao estresse osmótico durante a germinação de sementes de *Helianthus annuus* (PEG -0.9MPa) (DEMIR *et al.*, 2006). O pré tratamento osmótico (PEG) melhorou o desempenho da germinação sob estresse térmico e hídrico em sementes de *Spinacia oleracea* (CHEN *et al.*, 2010)

Tabela 1: Porcentagem de germinação, velocidade média de germinação (V_m), tempo médio de germinação (T_m), índice de velocidade de germinação (IVG), coeficiente de uniformidade de germinação (CUG), tempo de 50% de germinação (T_{50}) e uniformidade (U8416) de sementes osmocondicionadas (O) e não osmocondicionadas (N) de *Physalis angulata* embebidas em diferentes soluções osmóticas (0, -0.2 , -0.4 e -0.6MPa).

Tratamentos	Soluções Osmóticas			
	0MPa	-0.2MPa	-0.4MPa	-0.6MPa
	Germinação (%)			
O	100 aA	100 aA	99 aA	61.0 aB
N	100 aA	99 aA	96 aA	40.5 bB
	T_m (dias)			
O	3.9 aB	4.35 bB	5.67 bB	9.66 aA
N	3.94 aB	4.64 aB	6.53 aB	9.63 aA
	V_m (dias^{-1})			
O	0.25 aA	0.23 aA	0.18 aB	0.10 aB
N	0.25 aA	0.22 bA	0.15 bB	0.10 aB
	IVG			
O	12.93 aA	11.63 aA	8.90 aA	3.24 aB
N	12.78 aA	10.81 bA	7.52 bA	2.14 bB
	CUG			
O	10.83 aA	4.07 aB	1.79 aB	0.47 aB
N	10.84 aA	3.50 aB	1.05 aB	0.60 aB
	T_{50}			
O	54.24 aB	69.13 bB	97.49 aB	193.43 aA
N	56.85 aB	74.15 aB	118.84 aB	194.42 aA
	U8416			
O	10.46 aB	14.29 aB	28.67 aB	65.11 bA
N	6.06 aB	15.59 aB	39.16 aA	74.55 aA

*Médias seguidas de mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

4.2 Germinação de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas de *P. angulata* em água após déficit hídrico.

Os resultados de germinabilidade das sementes não germinadas após 10 dias de estresse em solução de PEG -0.8MPa, e que foram em seguida transferidas para embebição em água (0MPa, água destilada) foram apresentados na Figura 7. A imposição da restrição hídrica no potencial de -0.8MPa impossibilitou que as sementes completassem o processo germinativo. Todavia quando a disponibilidade hídrica foi restabelecida em água observou-se diferenças entre sementes O e N assim como diferenças entre sementes secas e frescas após o déficit hídrico.

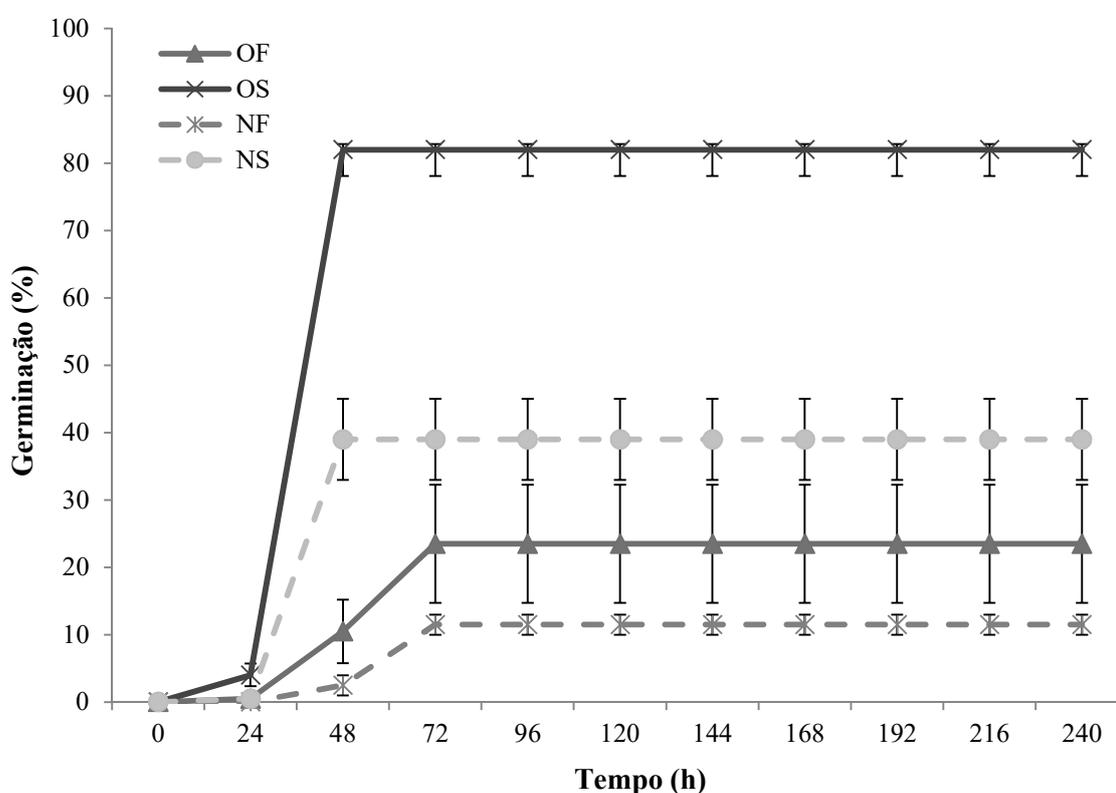


Figura 7. Parâmetro de germinabilidade: % Germinação, Tm, Vm, IVG e CUG de sementes osmocondicionadas frescas (OF), osmocondicionadas secas (OS), não osmocondicionadas frescas (NF) e não osmocondicionadas secas (NS) embebidas em água destilada após 10 dias embebidas em solução osmótica (-0.8MPa). Os dados representam a média de quatro repetições \pm erro padrão.

Sementes osmocondicionadas secas (OS) apresentaram maiores porcentagens de germinação (82%) do que as sementes não osmocondicionadas secas (NS) (39%) e também maior IVG (Tabela 2).

Tabela 2 Porcentagem de germinação, velocidade média de germinação (Vm), tempo médio de germinação (Tm), índice de velocidade de germinação (IVG), coeficiente de uniformidade de germinação (CUG), tempo de 50% de germinação (T50) e uniformidade (U8416) de sementes osmocondicionadas (O) e não osmocondicionadas (N) de *Physalis angulata* embebidas em água destilada após 10 dias de embebição em PEG (-0.8 MPa) frescas ou secas.

Tratamentos	Secagem	
	Seca	Fresca
	Germinação (%)	
O	82 aA	24 aB
N	39 bA	12 aB
	Tm (dias)	
O	2.95 aB	3.55 bA
N	2.99 aB	3.82 aA
	Vm (dias⁻¹)	
O	0.34 aA	0.28 aB
N	0.33 aA	0.26 bB
	IVG	
O	14.00 aA	3.42 aB
N	6.54 bA	1.54 aB
	CUG	
O	14.61 aA	3.94 aA
N	6.51 aA	2.25 aA
	T50	
O	29.10 bB	48.58 aA
N	32.49 bB	54.13 aA
	U8416	
O	4.83 aB	8.06 bA
N	5.39 aB	8.99 aA

*Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scot-Knott, a 5% de probabilidade.

Sugere-se que sementes pré-tratadas com o osmocondicionamento foram capazes manterem-se viáveis durante o déficit hídrico e sementes não tratadas perderam viabilidade.

Todos os parâmetros de germinabilidade, com exceção do CUG, apresentaram diferença significativa entre sementes secas e frescas. Observou-se também grande variação na porcentagem de germinação entre sementes osmocondicionadas secas e frescas (OS e OF), 82% e 24% respectivamente, sugerindo possivelmente ser uma dormência induzida pela restrição hídrica, sendo a secagem responsável pela quebra da dormência.

Em estudos futuros testes de viabilidade, como o do tetrazólio, podem ser mais conclusivos quanto à dormência ou a viabilidade.

A melhora no desempenho germinativo de sementes através do osmocondicionamento é uma técnica que precisa ser otimizada, pois existe grande variação da resposta aos tratamentos entre espécies. Portanto devem ser estudados o agente osmótico, a concentração e o tempo de exposição ideais para resultar no envigoramento ou *priming*. Outra variável a ser analisada é a secagem após o osmocondicionamento, algumas espécies respondem melhor quando semeadas diretamente e outras, precisam da secagem para alcançar a máxima germinação (HEYDECKER & GIBBINS, 1978).

Sementes de *Brassica napus* submetidas ao PEG -1.5MPa por quatro semanas apresentaram dormência induzida pelo estresse hídrico apresentando germinação de apenas 20% quando embebidas em água sendo 80% consideradas dormentes. A dormência é quebrada submetendo as sementes ao frio (4°C por dois dias) (FEI *et al.*, 2009).

O osmocondicionamento pode ser utilizado como um tratamento pré-germinativo em sementes de *P. angulata* uma vez que a germinação e a velocidade de germinação apresentaram-se superiores em sementes osmocondicionadas quando transferidas para água (0 MPa) após o estresse osmótico (-0.8MPa).

As sementes OS desenvolveram mecanismos de proteção a nível celular e molecular durante o osmocondicionamento, que as permitiram sobreviver ao estresse hídrico, mantendo-se viáveis para germinar quando embebidas em água (VARIER *et al.*, 2010). Sugere-se que o osmocondicionamento induziu a expressão de genes responsivos ao estresse osmótico e acumularam proteínas, enzimas e outras moléculas osmoprotetoras na semente tornando-as mais resistente ao estresse (GALLARDO *et al.*, 2001; SOEDA *et al.*, 2005).

4.3 Expressão Gênica

4.3.1 Qualidade e quantificação de RNA total

As amostras de RNA analisadas em espectrofotômetro apresentaram boa qualidade com valores de A260/280 variando de 1.7 a 2.0, indicando ausência de contaminação protéica (Tabela 3). Além disso, as mesmas foram avaliadas em gel de agarose 1% para verificação da integridade das bandas. Observou-se que as subunidades de RNA

ribossômico 18 e 28S estavam íntegras e que não houve contaminação com DNA genômico (Figura 8).

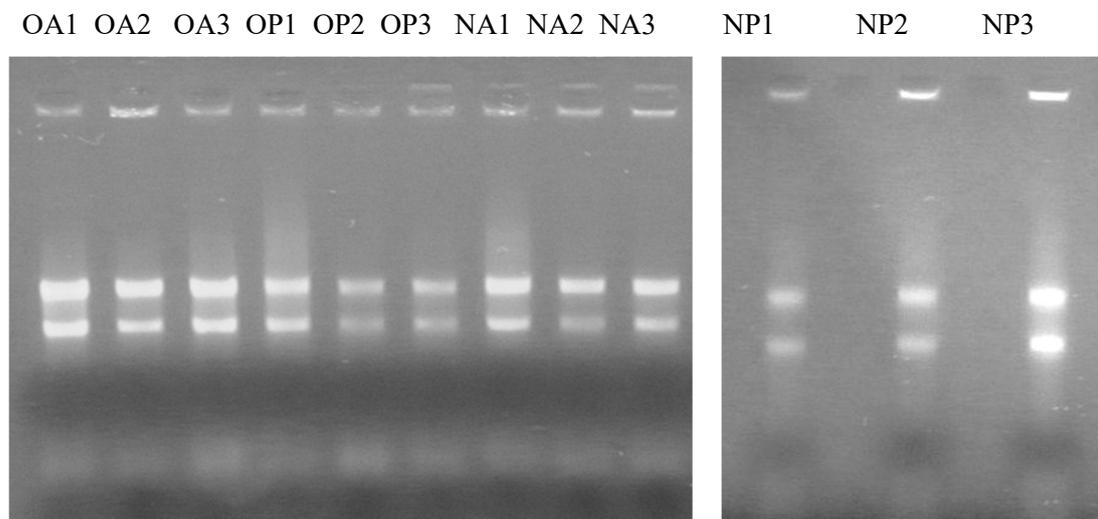


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose de RNAs extraídos dos tratamentos a serem quantificados em RT-qPCR

Tabela 3. Quantificação em espectrofotômetro

	NA1	NA2	NA3	NP1	NP2	NP3
ug/mL	194.6	131.2	137.4	112.0	130.0	119.9
260/280	1.8	1.7	1.9	1.9	1.9	1.8
	OA1	OA2	OA3	OP1	OP2	OP3
ug/mL	237	182,6	197,8	204,6	137,1	162,8
260/280	1.8	1.7	1.8	1.8	1.7	1.7

Triplicatas biológicas dos tratamentos: NA não osmocondicionadas em água; NP não osmocondicionadas em PEG; OA osmocondicionadas em água e OP osmocondicionadas em PEG.

4.3.2 *Primers* para RT-qPCR: especificidade e eficiência da reação de amplificação

Entre os *primers* desenhados para genes responsivos a restrição hídrica, 13 pares de *primers* (APX, CAT1, PP2A, HSP17, HSP18, LEA2, LOX, MTP, PPI, TIP41, TPRP, TPX1 e HAK1) (Apêndice C) apresentaram eficiência de amplificação dentro do limite de 85 a 115% (Tabela 3). Estes *primers* também apresentaram amplificação específica constatadas pelos picos únicos nas curvas de dissociação (Apêndice B) e bandas específicas com tamanhos de fragmentos esperados na eletroforese em gel de agarose (Apêndice A).

4.3.3 Seleção de genes referência

Na avaliação do melhor gene referência para a normalização da expressão gênica em sementes de *P. angulata*, o gene MTP foi considerado o mais estável, com valor M igual a 0.252. Quando se considerou o par de genes com melhor estabilidade, os genes MTP e PPI foram sugeridos pelo geNorm. Contudo foi acrescentado o gene PP2A (M=0,288) (Tabela 4) para garantir maior estabilidade e por ser um gene de referência com comprovada estabilidade em tomate (DEKKERS *et al.*, 2011). Para mensurar a expressão gênica com eficácia, os genes alvo devem ser normalizados não apenas com um gene referência, mas sim com no mínimo, os três melhores eleitos pelo programa (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

Tabela 4. Estabilidade Gênica dos genes de referência

Gene Referência	M	CV
MTP	0.252	0.009
PP2A	0.347	0.165
PPI	0.265	0.106
Média	0.288	0.119

4.3.4 Expressão relativa do gene LEA em sementes osmocondicionadas de *P. angulata* submetidas à restrição hídrica

Proteínas LEA são comumente expressas durante a maturação de sementes e são associadas à tolerância à dessecação, longevidade e restrição hídrica durante a germinação. LEAs possuem características de chaperonas moleculares que desempenham papel de retenção de água, na proteção da integridade de membranas, proteção do DNA, e previne agregação de proteínas durante o déficit hídrico (BATTAGLIA *et al.*, 2008; CARUSO *et al.*, 2002; TUNNACLIFFE & WISE, 2007).

O nível de expressão do gene que codifica para as proteínas LEA foi baixo nas sementes NP, OA e OP em relação ao controle (NA) (Figura 9). O nível de expressão mais baixo nas sementes osmocondicionadas sob estresse osmótico, contraria o resultado esperado, por ter as proteínas LEA função osmoprotetora (KALEMBA & PUKACKA, 2007). Portanto esta proteína provavelmente não participa na resposta ao estresse hídrico em sementes de *P. angulata* ou poderia participar se o estresse fosse mais prolongado do que 24h.

Comparando sementes OA e sementes NA, apesar de ambas estarem embebidas em água as OA apresentaram expressão 1.7x mais baixa do que as NA (Tabela 5). Acredita-se

que a proteína quantificada neste experimento possua expressão limitada a maturação em sementes sendo responsável pela manutenção da semente em estágio seco tendo sua expressão rapidamente reduzida após a embebição (KALEMBA & PUKACKA, 2007). Portanto sugere-se que a baixa expressão de sementes OA comparadas com NA seja devido à redução na expressão da proteína LEA ter sido iniciada no momento do osmocondicionamento.

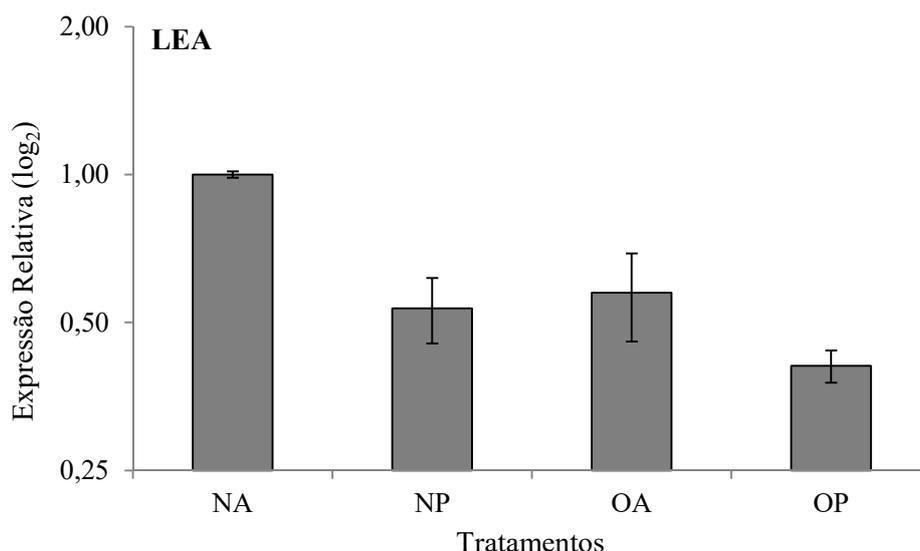


Figura 9. Expressão relativa da proteína LEA em sementes osmocondicionadas de *P. angulata* submetidas a estresse osmótico. (NA) Sementes não osmocondicionadas embebidas em água; (NP) sementes não osmocondicionadas em PEG; (OA) sementes osmocondicionadas em água; (OP) sementes osmocondicionadas em PEG. Empregando como calibrador sementes NA.

Tabela 5. Expressão relativa da proteína LEA

Tratamentos	Médias	Erro Padrão	Ativado/suprimido
NA	1.00 a	0.01	-
NP	0.53 b	0.08	-1.9x
OA	0.57 b	0.12	-1.7x
OP	0.41 b	0.03	-2.5x

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scot-Knott, a 5% de probabilidade.

Eixos embrionários de sementes recalcitrantes de *Acer saccharinum* podem tornar-se tolerantes à dessecação (teor de umidade de 10%) por pré-tratamento com ABA e retardantes de crescimento, aumentando as concentrações de ABA endógenas e induzindo a síntese proteínas LEA (BEARDMORE; WHITTLE, 2005).

A origem da tolerância à dessecação tem sido sugerida como surgida pela ativação de mecanismos de proteção específicos em semente no tecido vegetativo (ILLING *et al.*, 2005; OLIVER; MISHLER, 2000). A observação de que um gene homólogo a LEA6, específico de sementes em *A. thaliana*, é expresso em tecidos vegetativos de plantas ressuscitantes em desidratação (ILLING *et al.*, 2005).

As proteínas LEA são uma grande família de proteínas com muitas cópias de genes espalhados pelo genoma submetidos a diferentes regulações espaço-temporais (HUNDERTMARK & HINCHA, 2008). A LEA estudada neste experimento é similar a proteína At2g46140 de *Arabidopsis thaliana* que corresponde a LEA grupo 2 (Pfam), sendo o grupo mais hidrofóbico e portanto pode desempenhar uma função na proteção de membranas (HUNDERTMARK & HINCHA, 2008).

Diversas proteínas LEA apresentaram redução durante o estudo com expressão gênica durante osmopriming em *B. oleraceae*. Entretanto quando foram secadas lentamente após o osmopriming apresentaram significativo aumento destas proteínas (SOEDA *et al.*, 2005).

A baixa expressão da proteína LEA em sementes OA de *P. angulata* pode ser resultado de uma secagem rápida das sementes, porém esta análise só seria possível se fosse realizada a quantificação da expressão gênica em sementes O e N secas.

4.3.5 Expressão relativa dos genes *Heat Shock* em sementes osmocondicionadas de *P. angulata* submetidas a estresse osmótico

HSPs são responsáveis pela manutenção da estrutura tridimensional das proteínas que são alteradas por choque térmico (DELSENY *et al.*, 2001). No entanto, o estresse osmótico também ocasiona desnaturação proteica e as HSP atuam preservando e reparando estruturas macromoleculares durante a desidratação ou reidratação (HELM; ABERNETHY, 1990; VIERLING, 1991). Os domínios α -cristalinos das HSPs funcionam como chaperonas moleculares, prevenindo a agregação de várias proteínas sob uma ampla gama de condições de estresse por interações seletivas de sua superfície hidrofóbica com outras proteínas (REDDY *et al.*, 2006).

A expressão das proteínas HSP foram induzidas pelo estresse osmótico (Figura 10a e 10b). A proteína HSP17 no tratamento NP foi 6.7x mais expressa, enquanto que sementes OP apresentaram uma indução de apenas 3.4x. Não houve diferença de expressão entre sementes NA e OA apresentando uma redução de 1.3x (Tabela 6).

A proteína HSP18 apresentou padrão de expressão similar a proteína HSP17 entretanto a indução de NP e OP foi 7.5x e 2.2x respectivamente (Tabela 7). Portanto a indução desta proteína foi maior do que a HSP17 em sementes NP, entretanto a indução em OP foi inversa sendo maior em HSP17 do que HSP18, 3.4x e 2.2x.respectivamente.

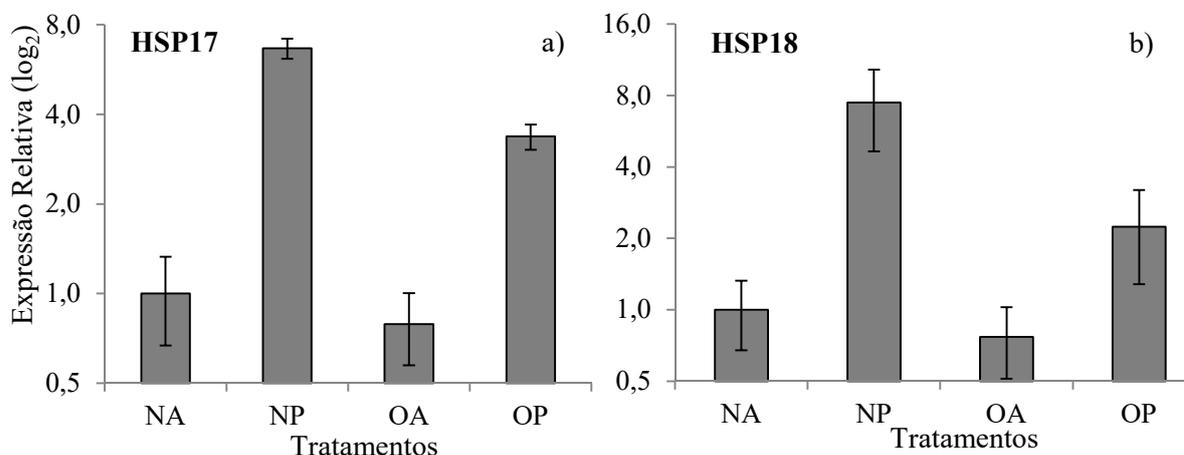


Figura 10. Expressão relativa de proteínas a) HSP17 e b) HSP18 em sementes osmocondicionadas de *P. angulata* submetidas a estresse osmótico. (NA) Sementes não osmocondicionadas embebidas em água por 24h; (NP) sementes não osmocondicionadas embebidas PEG por 24h; (OA) sementes osmocondicionadas em água por 24h; (OP) sementes osmocondicionadas em PEG por 24h. Empregando como calibrador sementes NA.

Tabela 6. Expressão relativa da proteína HSP17

Tratamento	Média	Erro padrão	Ativado/suprimido
NA	1.00 b	0.33	-
NP	6.66 a	0.52	6.7x
OA	0.79 b	0.21	-1.3x
OP	3.37 a	0.33	3.4x

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scot-Knott, a 5% de probabilidade.

Tabela 7. Expressão relativa da proteína HSP18

Tratamentos	Médias	Erro Padrão	Ativado/suprimido
NA	1.00 b	0.33	-
NP	7.47 a	2.82	7.5x
OA	0.77 b	0.26	-1.3x
OP	2.24 b	0.96	2.2x

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scot-Knott, a 5% de probabilidade.

Conforme observado nos experimentos fisiológicos, sementes osmocondicionadas apresentam maior tolerância ao estresse osmótico resultando em maior viabilidade quando embebidas em água após o estresse osmótico (Figura 7).

A expressão de proteínas sHSP foram induzidas em estudos com proteoma de sementes osmocondicionadas de *A. thaliana*, *Glycine max*, *Zea mays*, *B. oleraceae* e *Beta vulgaris* (GALLARDO *et al.*, 2001; SOEDA *et al.*, 2005; CATUSSE *et al.*, 2011).

4.3.6 Expressão relativa do gene TPRP-F1 em sementes osmocondicionadas de *P. angulata* submetidas a estresse osmótico

PRP é um gene que codifica para proteínas ricas em prolina com função estrutural na parede celular (CASSAB, 1998). Há diminuição da expressão gênica de PRP ao final do desenvolvimento da semente e antes do início das fases de armazenagem e dessecação.

Estes processos têm sido correlacionados com o aumento do nível de ABA no embrião de milho (JONES & BRENNER, 1987).

O osmocondicionamento manteve o nível de expressão de TPRP-F1 elevado em sementes OA e OP (1.2x e -1.4x) (Tabela 8), entretanto sementes NP sofreram alta redução (4.1x) na expressão desta proteína (Figura 11). A elevada expressão em sementes OP em relação a NP pode indicar uma participação deste gene no envigoroamento de sementes osmocondicionadas de *P. angulata*.

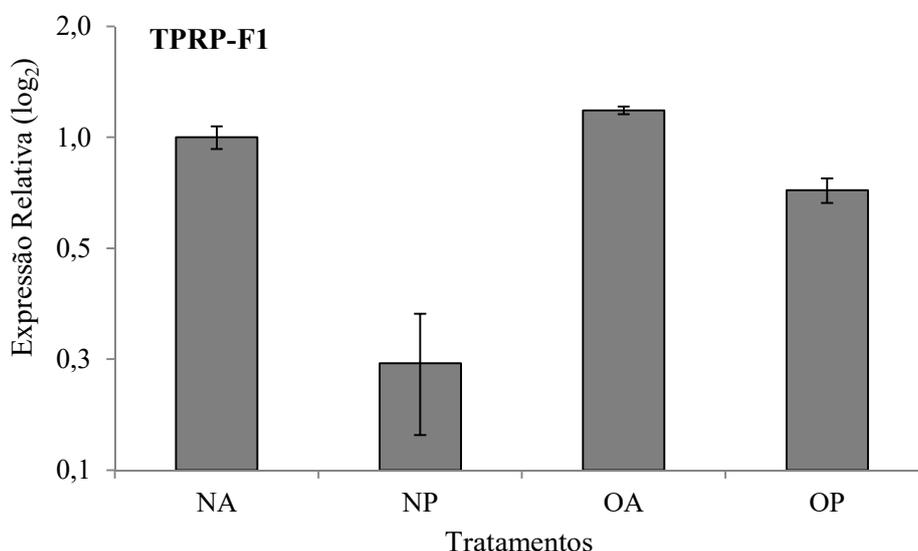


Figura 11. Expressão relativa da proteína TPRP-F1 em sementes osmocondicionadas de *P. angulata* submetidas a estresse osmótico. (NA) sementes não osmocondicionadas embebidas em água por 24h; (NP) sementes não osmocondicionadas embebidas PEG por 24h; (OA) sementes osmocondicionadas em água por 24h; (OP) sementes osmocondicionadas em PEG por 24h. Empregando como calibrador sementes NA.

Tabela 8. Expressão relativa da proteína TPRP-F1

Tratamentos	Médias	Erro Padrão	Ativado/suprimido
NA	1.00 a	0.07	-
NP	0.24 b	0.09	-4.1x
OA	1.18 a	0.03	1.2x
OP	0.72 a	0.06	-1.4x

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scot-Knott, a 5% de probabilidade.

A presença de PRP pode modificar a estrutura da parede celular e protegê-la o durante o desenvolvimento embriogênico tardio onde as proteínas PRPs podem contribuir para a estabilidade e defesa do embrião em desenvolvimento (JOSÉ-ESTANYOL *et al.*, 2005). A Proteína PRP foi regulada pelo estresse salino, estresse hídrico e aplicação de hormônios exógenos em sementes de soja (HE *et al.*, 2002).

4.2.7 Expressão relativa do gene *Tap Interaction Protein* em sementes osmocondicionadas de *P. angulata* submetidas a estresse osmótico

TIP41 participa na via de sinalização do programa de crescimento celular em resposta a nutrientes em leveduras (TOR - *target of rapamycin*), interagindo com TAP42 e regulando-a negativamente (JACINTO *et al.*, 2001; ROHDE *et al.*, 2003). A principal função da TOR, conservada entre eucariotos, é promover o crescimento celular em resposta às condições favoráveis. Em células de animal e levedura, TOR regula numerosos processos biológicos, incluindo transcrição e tradução dos componentes ribossomais, que colectivamente contribui para o crescimento celular.

Sementes NP e OP apresentaram expressão elevada em relação ao controle entretanto o osmocondicionamento OP induziu variação na expressão desta proteína em relação às sementes NP (Figura 12).

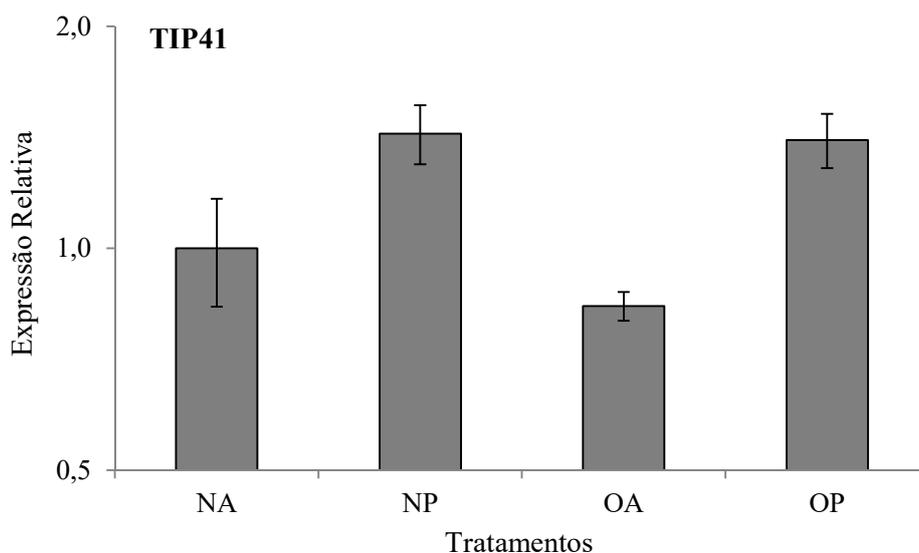


Figura 12. Expressão Relativa da proteína TIP41 em sementes osmocondicionadas de *P. angulata* submetidas a estresse osmótico. (NA) sementes não osmocondicionadas embebidas em água por 24h; (NP) sementes não osmocondicionadas embebidas PEG por 24h; (OA) sementes osmocondicionadas em água por 24h; (OP) sementes osmocondicionadas em PEG por 24h. Empregando como calibrador sementes NA.

Tabela 9. Expressão Relativa da proteína TIP41

Tratamentos	Médias	Erro Padrão	Ativado/suprimido
NA	1.00 b	0.17	-
NP	1.43 a	0.13	1.4x
OA	0.83 b	0.04	-1.2x
OP	1.40 a	0.12	1.4x

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scot-Knott, a 5% de probabilidade.

Silenciamento de genes TOR resultaram em diminuição em tamanho de órgãos e células, produção de sementes e de resistência ao estresse osmótico em plântulas de *A. Thaliana* (DEPROST *et al.*, 2007).

TIP41 é um gene considerado altamente estável sendo indicado como um gene de referência para experimentos com RT-qPCR em sementes de tomate, entretanto ele mostrou variação sendo regulado pelo estresse (DEKKERS *et al.*, 2011).

A expressão elevada do gene TIP41 em sementes de *P. Angulata* sob restrição hídrica pode estar relacionada com a desaceleração do crescimento celular em resposta ao estresse aplicado. Entretanto para fins agrônômicos deseja-se que a semente germine mesmo sob a condição de estresse e desta forma a via TOR pode ser alvo de estudos adicionais visando a melhoria do desempenho germinativo de *P. angulata*.

4.3.8 Expressão relativa do gene Lipoxigenase em sementes osmocondicionadas de *P. angulata* submetidas a estresse osmótico

Lipoxigenases catalisam a adição de oxigênio molecular para os ácidos graxos poli-insaturados para produzir um hidroperóxido de ácido graxo insaturado. LOXs são presentes normalmente em sementes e são responsáveis pela mobilização de reservas lipídicas durante a germinação (SIEDOW, 1991).

A expressão da enzima LOX apresentou redução em todos tratamentos sendo significativa a redução em sementes submetidas ao estresse osmótico 3.5x em NP e 2.4x em OP (Figura 13). Em água sementes OA apresentaram expressão menor do que as NA apesar de não significativa (Tabela 10).

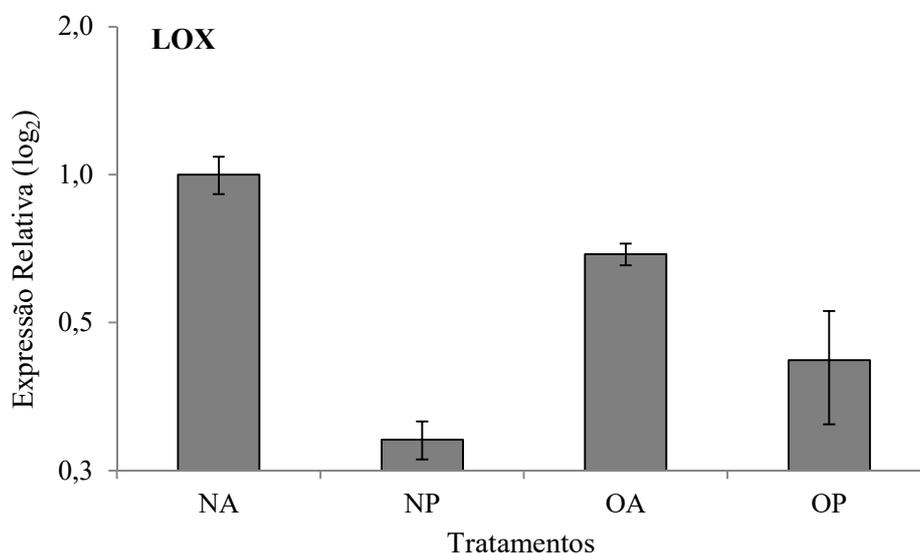


Figura 13. Expressão relativa da enzima LOX em sementes osmocondicionadas de *P. angulata* submetidas a estresse osmótico. (NA) sementes não osmocondicionadas embebidas em água por 24h; (NP) sementes não osmocondicionadas embebidas PEG por 24h; (OA) sementes osmocondicionadas em água por 24h; (OP) sementes osmocondicionadas em PEG por 24h. Empregando como calibrador sementes NA.

Tabela 10. Expressão relativa da enzima LOX

Tratamentos	Médias	Erro Padrão	Ativado/suprimido
NA	1.00 a	0.09	-
NP	0.29 b	0.03	-3.5x
OA	0.69 a	0.04	-1.5x
OP	0.42 b	0.11	-2.4x

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scot-Knott, a 5% de probabilidade.

Durante a germinação enzimas LOXs são sintetizados e o acúmulo máximo de proteína LOX e os correspondentes mRNAs duram de algumas horas até alguns dias após a germinação. Os mRNAs de LOX sintetizados durante a germinação também podem ser

encontrados na planta madura. Os níveis de LOX foram aumentados pela aplicação ABA, ou por estresses, tais como fermento, infecção patogénica ou déficit hídrico (MELAN *et al.*, 1993; PORTA *et al.*, 1999).

A expressão gênica de LOX1 (AT1G55020) foi reduzida em sementes de *A. thaliana* protrudidas tratadas com PEG e reestabelecendo à tolerância a dessecação (MAIA *et al.*, 2011).

Osmocondicionamento de sementes de tomate melhorou o desempenho germinativo de sementes envelhecidas e submetidas a estresse salino. Os resultados sugerem que os efeitos do *priming* na melhoria de sementes de tomate, sob condições de estresse, podem estar relacionados com a redução da peroxidação lipídica e lixiviação de eletrólitos durante a fase de embebição (ZHANG *et al.*, 2012).

4.3.9 Expressão relativa dos genes de enzimas antioxidantes em sementes osmocondicionadas de *P. angulata* submetidas a estresse osmótico

A causa mais citada de deterioração da semente é a lesão celular causada pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) que através da peroxidação de ácidos graxos insaturados e poliinsaturados inviabiliza o funcionamento normal da célula e consequentemente dos tecidos. Esses radicais livres são neutralizados pelas enzimas antioxidantes quando são convertidos em produtos menos nocivos para as células (VARIER *et al.*, 2010).

O estresse hídrico induz o estresse oxidativo através da produção de espécies reativas de oxigênio tais como superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (SMIRNOFF, 1993; ZHANG & KIRKHAM, 1995). O escape de elétrons do sistema de transporte de elétrons no cloroplasto e mitocôndria é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs). Eles são altamente tóxicos e podem danificar importantes estruturas celulares, tais como lípidos, proteínas de DNA, e RNA (SMIRNOFF, 1993). O estresse hídrico age sobre a planta, modificando a condição redox na célula, de modo que a adaptabilidade da planta a condições de estresse hídrico depende da sua capacidade para responder à carga oxidativa aumentada (PASTORI & FOYER, 2002).

Para lidar com níveis elevados de EROS, as plantas dispõem de diferentes mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Neste último são encontradas moléculas redutoras tais como caroteno, tocoferol, ácido ascórbico, Fe²⁺ e glutatona, enquanto a maquinaria antioxidante enzimática é constituída por superóxido dismutase (SOD),

ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), glutationa redutase (GR), glutationa peroxidase (GPX), glutationa-S-transferase (GST) e tiorredoxina peroxidase (TPX) (HERBETTE *et al.*, 2002).

4.3.10 Expressão relativa do gene Tiorredoxina Peroxidase em sementes osmocondicionadas de *P. angulata* submetidas a estresse osmótico

Peroxirredoxinas são proteínas que reduzem peróxidos de hidrogênio usando compostos redutores disulfídricos como doadores de elétrons. Peroxirredoxinas (PRXs) têm sido classificadas em dois grupos dependendo da presença de (1-Cys PRX) ou (2-Cys PRX) dois resíduos conservadas de cisteína. A 2-Cys PRX, também é nomeada como tiorredoxina peroxidase, possuindo atividade peróxido redutora com a utilização de tiorredoxina como doador de elétrons (PEDRAJAS *et al.*, 2000).

A expressão da enzima TPX1 foi induzida pelo estresse osmótico aumentando 3.3x em sementes NP e 2x em sementes OP (Tabela 11). Em água a expressão em sementes OA se manteve inalterada (Figura 14).

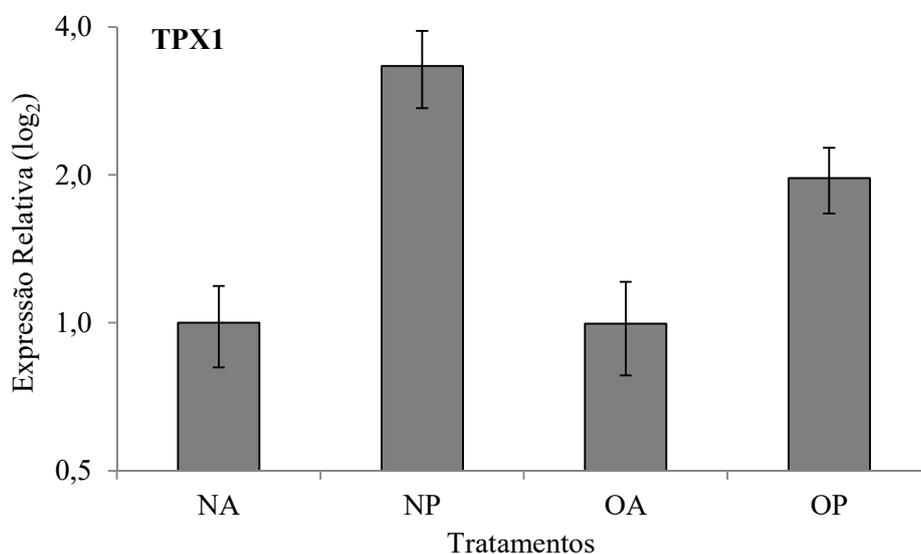


Figura 14. Expressão relativa da enzima TPX1 em sementes osmocondicionadas de *P. angulata* submetidas a estresse osmótico. (NA) sementes não osmocondicionadas embebidas em água por 24h; (NP) sementes não osmocondicionadas embebidas PEG por 24h; (OA) sementes osmocondicionadas em água por 24h; (OP) sementes osmocondicionadas em PEG por 24h. Empregando como calibrador sementes NA.

Tabela 11. Expressão relativa da enzima TPX

Tratamentos	Médias	Erro Padrão	Ativado/suprimido
NA	1.00 b	0.19	-
NP	3.33 a	0.60	3.3x
OA	1.00 b	0.22	-
OP	1.97 a	0.30	2.0x

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scot-Knott, a 5% de probabilidade.

Haslekas *et al.* (1998) mostraram o aumento na expressão do gene da peroxiredoxina em *Arabidopsis* durante a maturação das sementes e redução durante a germinação. Soeda *et al.* (2005) confirmaram este padrão de expressão em sementes *Brassica oleracea* que apresentaram níveis menores de RNA para este gene após o osmocondicionamento quando secas rapidamente e mais alto quando secas lentamente.

A expressão gênica de peroxiredoxinas foi aumentada em sementes de *Medicago truncatula* e *Arabidopsis thaliana* protrudidas tratadas com PEG e assim restabelecendo a tolerância a dessecação (BUTINK *et al.*, 2003; MAIA *et al.*, 2011).

4.3.11 Expressão relativa do gene Catalase em sementes osmocondicionadas de *P. angulata* submetidas a estresse osmótico

CAT catalisa a reação de conversão de H₂O₂ em água e oxigênio, esta enzima está localizada principalmente nos peroxissomos e glioxissomos (SCANDALIOS *et al.*, 1997). A maior expressão da enzima CAT em sementes que não foram osmocondicionadas e germinadas em água deve-se a maior atividade metabólica em água e metabolismo restrito em PEG. Gallardo *et al.* (2001) mostraram expressão alta da catalase em sementes de *Arabidopsis* durante o osmopríming, porém durante a germinação em água a expressão foi maior.

A expressão da enzima catalase foi reduzida em todos os tratamentos em relação ao controle NA. Sementes OP apresentaram a maior redução 1.8x, seguida de 1.6x em OA e 1.4x em NP (Figura 15).

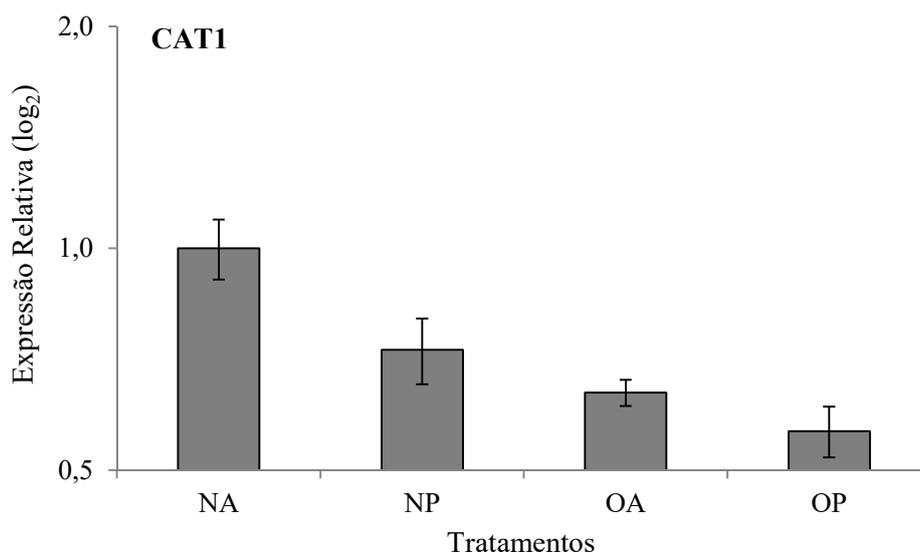


Figura 15. Expressão relativa da enzima Catalase em sementes osmocondicionadas de *P. angulata* submetidas a estresse osmótico. (NA) sementes não osmocondicionadas embebidas em água por 24h; (NP) sementes não osmocondicionadas embebidas PEG por 24h; (OA) sementes osmocondicionadas em água por 24h; (OP) sementes osmocondicionadas em PEG por 24h. Empregando como calibrador sementes NA.

Tabela 12. Expressão relativa da enzima CAT1

Tratamentos	Médias	Erro Padrão	Ativado/suprimido
NA	1.00 a	0.09	-
NP	0.73 b	0.07	-1.4x
OA	0.64 b	0.03	-1.6x
OP	0.56 b	0.04	-1.8x

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scot-Knott, a 5% de probabilidade.

A concentração da catalase, em análise proteômica, apresentou aumento durante hidropriming em sementes de girassol (BAILLY *et al.*, 2000). A atividade enzimática da catalase foi aumentada em hidropriming e osmopriming em sementes de tomate (EL-ARABY & HEGAZI, 2004).

Kibinza *et al.* (2011) demonstraram que a catalase é determinante na recuperação e subsequente germinação da semente de girassol após o *priming*. Portanto sugere-se que outras enzimas participam na proteção oxidativa de sementes de *P. angulata* sob estresse osmótico além da catalase, como a TPX e a APX que foram ativadas neste presente estudo.

4.3.12 Expressão relativa do gene Ascorbato Peroxidase em sementes osmocondicionadas de *P. angulata* submetidas a estresse osmótico

APX juntamente com outras redutases podem desintoxicar H_2O_2 usando ascorbato como um doador de elétrons através da via Halliwell-Asada (HALLIWELL, 1987).

Entre todos os genes avaliados este foi o que apresentou maior expressão em sementes OP em relação aos outros tratamentos (Figura 16). Sementes NP foi o único tratamento com diferença significativa entre os outros tratamentos apresentando redução de 1.3x (Tabela 13).

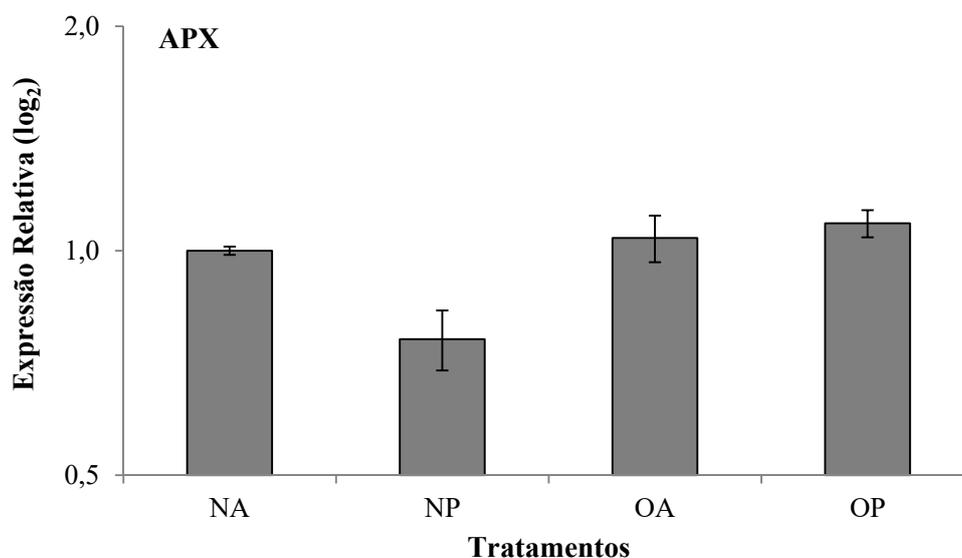


Figura 16. Expressão relativa da enzima APX em sementes osmocondicionadas de *P. angulata* submetidas a estresse osmótico. (NA) sementes não osmocondicionadas embebidas em água por 24h; (NP) sementes não osmocondicionadas embebidas PEG por 24h; (OA) sementes osmocondicionadas em água por 24h; (OP) sementes osmocondicionadas em PEG por 24h. Empregando como calibrador sementes NA.

Tabela 13. Expressão relativa da enzima APX

Tratamentos	Médias	Erro Padrão	Ativado/suprimido
NA	1.00 a	0.01	-
NP	0.76 b	0.07	-1.3x
OA	1.04 a	0.07	-
OP	1.09 a	0.05	1.1x

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scot-Knott, a 5% de probabilidade.

A manutenção da expressão elevada em sementes OP em relação à NP é um forte indicativo do potencial protetor da APX agindo para proteger a semente sob o estresse e mantendo-a viável para germinar depois em água. A expressão da APX foi aumentada durante o osmopriming em *Brassica oleraceae* (SOEDA *et al.*, 2005).

6 CONCLUSÕES

- O osmocondicionamento pode ser utilizado como um tratamento pré-germinativo em sementes de *P. angulata* uma vez que a germinação e a velocidade de germinação apresentaram-se superiores em sementes osmocondicionadas quando transferidas para água destilada após restrição hídrica.
- Enzimas antioxidantes (TPX e APX) e chaperoninas (sHSP) estão possivelmente contribuindo para a proteção das sementes de *P. angulata* durante restrição hídrica em diferentes vias como a proteção contra EROS, estabilidade de macromoléculas e redução da lixiviação de solutos através da membrana.
- A indução da expressão dos genes TPX, APX, HSP17, HSP18 e TPRP-F1 em sementes sob restrição hídrica podem representar um importante marcador para o aumento da tolerância ao déficit hídrico em sementes de *P. angulata* e possivelmente outras culturas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J. J. A. GEOECOLOGIA DA CAATINGA NO SEMI-ÁRIDO DO NORDESTE BRASILEIRO. **Climatologia e Estudos da Paisagem**, v. 2, n. 1, p. 58, 2007.

BAILLY, C.; BENAMAR, A.; CORBINEAU, F.; CÔME, D. Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. **Seed Science Research**, v. 10, p. 35-42, 2000.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and Salt Tolerance in Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, n. 1, p. 23-58, 2005.

BASTOS, G. N. T.; SANTOS, A. R. S.; FERREIRA, V. M. M. *et al.* Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. on mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 241-245, 2006.

BATTAGLIA, M.; OLVERA-CARRILLO, Y.; GARCIARRUBIO, A.; CAMPOS, FRANCISCO; COVARRUBIAS, A. A. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. **Plant physiology**, v. 148, n. 1, p. 6-24, set 2008.

BEARDMORE, T.; WHITTLE, C.-A. Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple (*Acer saccharinum*) embryonic axes. **Tree physiology**, v. 25, n. 8, p. 965-72, ago 2005.

BERJAK, PATRICIA; PAMMENTER, N. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 22-55, 2000.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1994. p. 445p

BOYER, J. S. Plant productivity and environment. **Science**, v. 218, n. 4571, p. 443-448, 1982.

BRACCINI, A. L.; REIS, M. S.; MOREIRA, M. A.; SEDIYAMA, C. S.; SCAPIM, C. A. Biochemical changes associated to soybean seeds osmoconditioning during storage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 433-447, 2000.

BRADFORD, K. J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **HortScience**, v. 21, n. 5, p. 1105-1112, 1986.

BRADFORD, K.; NONOGAKI, H. **Seed Development Dormancy and Germination**. Oxford: Blackwell, 2007. v. 27

BRANCH, L. C.; SILVA, M. F. DA. Folk medicine of Alter do Chão, Pará, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 13, n. 5-6, p. 737-779, 1983.

BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. **Cell**, v. 1385, n. 96, 1997.

BUITINK, J.; VU, B. L.; SATOUR, P.; LEPRINCE, O. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. **Seed Science Research**, v. 13, n. 4, p. 273-286, 1 dez 2003.

BURKARDT, H. J. Standardization and quality control of PCR analyses. **Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC**, v. 38, n. 2, p. 87-91, fev 2000.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A; *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-22, abr 2009.

CARUSO, A.; MORABITO, D.; DELMOTTE, F.; KAHLEM, G.; CARPIN, S. Dehydrin induction during drought and osmotic stress in *Populus*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 1033-1042, 2002.

CASSAB, G. I. Plant Cell Wall Proteins. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 49, p. 281-309, jun 1998.

CASTRO, R. D. DE; LAMMEREN, A. M. VAN; GROOT, S. P.; BINO, R. J.; HILHORST, H. W. Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. **Plant physiology**, v. 122, n. 2, p. 327-36, fev 2000.

CATUSSE, J.; MEINHARD, J.; JOB, CLAUDETTE; *et al.* Proteomics reveals potential biomarkers of seed vigor in sugarbeet. **Proteomics**, v. 11, n. 9, p. 1569-80, maio 2011.

CHEN, K.; ARORA, R.; ARORA, U. Osmopriming of spinach (*Spinacia oleracea* L. cv. Bloomsdale) seeds and germination performance under temperature and water stress. **Seed conservation: Turning Science into Practice**, v. 38, p. 45-57, 2010.

CHIANG, H.-C.; JAW, S.-M.; CHEN, P.-M. Inhibitory effects of physalin B and physalin F on various human leukemia cells in vitro. **Anticancer research**, v. 12, n. 4, p. 1155-1162, 1992.

CORBINEAU, F. Markers of seed quality: from present to future. **Seed Science Research**, v. 22, n. S1, p. S61-S68, 5 jan 2012.

DEKKERS, BAS J.W.; WILLEMS, L.; BASSEL, G. W. *et al.* Genes for RT-qPCR normalization in seed research. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, p. 28-37, 2011.

DELSENY, M.; BIES-ETHEVE, N.; CHRISTEL, C. *et al.* Late Embryogenesis Abundant (LEA) protein gene regulation during Arabidopsis seed maturation. **Plant Physiology**, v. 427, p. 419-427, 2001.

DEMIR, M.; OKC, G.; ATAK, M.; YAKUP, C. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **European Journal of Agronomy**, v. 24, p. 291-295, 2006.

DEPROST, D.; YAO, L.; SORMANI, R. *et al.* The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. **EMBO reports**, v. 8, n. 9, p. 864-70, set 2007.

EHLERINGER, J. R.; COOPER, T. A. On the role of orientation in reducing photoinhibitory damage in photosynthetic-twig desert shrubs. **Plant Cell and Environment**, v. 15, n. 3, p. 301-306, 1992.

EL-ARABY, M. M.; HEGAZI, A. Z. Responses of tomato seeds to hydro and osmo-priming, and possible relations of some antioxidant enzymes and endogenous polyamine fractions. **Egyptian Journal of Biology**, v. 6, p. 81-93, 2004.

FARIA, J. M. R. **Desiccation tolerance and sensitivity in *Medicago truncatula* and *Inga vera* seeds**. 135f. Tese (PhD em Plant Physiology) - Wageningen University and Research Centre, Wageningen. 2006.

FEI, H.; FERHATOGLU, Y.; TSANG, E.; HUANG, D.; CUTLER, A. J. Metabolic and hormonal processes associated with the induction of secondary dormancy in *Brassica napus* seeds. **Botany**, v. 87, n. 6, p. 585-596, jun 2009.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A COMPUTER STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciências e agrotecologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FREITAS, T. A. **Influência do substrato e da luminosidade na germinação, crescimento e caracterização físico-química do fruto de camapu (*Physalis angulata* L.)**. 87f. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 2004.

GALLARDO, K.; JOB, C; GROOT, S. P. *et al.* Proteomic analysis of arabidopsis seed germination and priming. **Plant physiology**, v. 126, n. 2, p. 835-48, jun 2001.

GODBOLD, D. L. Stress concepts and forest trees. **Chemosphere**, v. 36, n. 4-5, p. 859-864, fev 1998.

GUIMARÃES, E. T.; LIMA, M. S.; SANTOS, LUANA A. *et al.* Effects of seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., Solanaceae, on the viability of *Leishmania* sp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 945-949, 2010.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, n. 41, p. 95-98, 1999.

HALLIWELL, B. 1. Oxidative Stress in Chloroplasts. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 44, p. 327-340, 1987.

HASLEKAS, C.; STACY, R. A.; NYGAARD, V.; CULIANEZ-MACIA, F. A.; AALLEN, R. B. The expression of a peroxiredoxin antioxidant gene, *Atper1*, in *Arabidopsis thaliana* is seed-specific and related to dormancy. **Plant molecular biology Biol**, v. 36, p. 833-845, 1998.

HAWKES, G. J.; LESTER, R. N.; NEE, M.; ESTRADA, N. **Solanaceae III taxonomy chemistry evolution**. Royal Botanic Gardens/ Linnean Society of London. Londres, 1991. 483p.

HE, C.-Y.; ZHANG, J.-S.; CHEN, S.-Y. A soybean gene encoding a proline-rich protein is regulated by salicylic acid, an endogenous circadian rhythm and by various stresses. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 6-7, p. 1125-1131, maio 2002.

HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; PAEPE, A. DE; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome biology**, v. 8, n. 2, p. R19, jan 2007.

HELM, K. W.; ABERNETHY, R. H. Heat Shock Proteins and Their mRNAs in Dry and Early Imbibing Embryos of Wheat. **Plant physiology**, v. 93, n. 4, p. 1626-33, ago 1990.

HERBETTE, S.; LENNE, C.; LEBLANC, N. *et al.* Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 9, p. 2414-2420, 22 maio 2002.

HEYDECKER, W.; GIBBINS, B. M. The “priming” of seeds. **Acta Horticulturae**, v. 83, p. 213-223, 1978.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; GULLIVER, R. L. Accelerated germination by osmotic seed treatment. **Nature**, v. 246, 1973.

HSEU, Y.-C.; WU, C.-R.; CHANG, H.-W. *et al.* Inhibitory effects of *Physalis angulata* on tumor metastasis and angiogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 762-771, 2011.

HUNDERTMARK, M.; HINCHA, D. K. LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. **BMC genomics**, v. 9, p. 118, jan 2008.

HUNZIKER; VERLANG; RUGGELL; GANTNER. **The genera of Solanaceae**. [S.l: s.n.], 2001.

ILLING, N.; DENBY, K. J.; COLLETT, H.; SHEN, A.; FARRANT, JILL M. The signature of seeds in resurrection plants: a molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. **Integrative and comparative biology**, v. 45, n. 5, p. 771-87, nov 2005.

ISTA. International rules for seed testing. **Seed Science And Technology**, v. 27, n. supplement, p. 1-333, 2003.

JACINTO, E.; GUO, B.; ARNDT, K. T.; SCHMELZLE, T.; HALL, M. N. TIP41 Interacts with TAP42 and Negatively Regulates the TOR Signaling Pathway. **Molecular Cell**, v. 8, n. 5, p. 1017-1026, nov 2001.

JACKSON, R. B.; SPERRY, J. S.; DAWSON, T. E. Root water uptake and transport: using physiological processes in global predictions. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 11, p. 482-488, 2000.

JANUÁRIO, A. H.; FILHO, E. R.; PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, S.; SATO, D. N.; FRANÇA, S. C. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). **Phytotherapy research**, v. 16, n. 5, p. 445-8, 2002.

JONES, R. J.; BRENNER, M. L. Distribution of Abscisic Acid in Maize Kernel during Grain Filling. **Plant physiology**, v. 83, n. 4, p. 905-9, abr 1987.

JOOSEN, R. V. L.; KODDE, J.; WILLEMS, L. A. J. *et al.* GERMINATOR: a software package for high-throughput scoring and curve fitting of Arabidopsis seed germination. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 62, n. 1, p. 148-59, 1 abr 2010.

JOSÉ-ESTANYOL, M.; PÉREZ, P.; PUIGDOMÈNECH, P. Expression of the promoter of HyPRP, an embryo-specific gene from *Zea mays* in maize and tobacco transgenic plants. **Gene**, v. 356, p. 146-52, 15 ago 2005.

KALEMBA, E. M.; PUKACKA, S. Possible roles of LEA proteins and sHSPs in seed protection: a short review. **Biological Letters**, v. 44, n. 1, p. 3-16, 2007.

KIBINZA, S.; BAZIN, J.; BAILLY, C. *et al.* Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant science**, v. 181, n. 3, p. 309-15, set 2011.

KNIGHT, H.; BRANDT, S.; KNIGHT, M. R. A history of stress alters drought calcium signalling pathways in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 16, n. 1998, p. 681-687, 1999.

KRANNER, I.; MINIBAYEVA, F. V.; BECKETT, R. P.; SEAL, C. E. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **The New phytologist**, v. 188, n. 3, p. 655-73, nov 2010.

LARCHER, W. Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants. **Plant Biosystems**, v. 134, n. 3, p. 279-295, 2000.

LEVITT, J. Responses of plants to environmental stresses. **Physiological ecology**, v. 2, n. 4051, p. 132, 1980.

LISSNER, R. A.; VELA, H. A. Introdução do Cultivo de *Physalis* (*Physalis angulata* L.) de Base Agroecológica na Região Central do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 645-648, 2009.

LIU, Q.; ZHAO, N.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. **Chinese Science Bulletin**, v. 45, n. 11, p. 970-975, jun 2000.

LOPES, D. C. D. X. P.; FREITAS, Z. M. F.; SANTOS, E. P. S.; TOMASSINI, T. C. B. Artigo Atividades antimicrobiana e fototóxica de extratos de frutos e raízes. **Clinical Laboratory**, v. 16, n. 2, p. 206-210, 2006.

MAGALHÃES, H. I. F. Atividade antitumoral (*in vitro e in vivo*) das fisalinas isoladas de *Physalis angulata* L. 118f. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.** 2005.

MAGALHÃES, H. I. F.; VERAS, M. L.; TORRES, M. R. *et al.* *In-vitro* and *in-vivo* antitumour activity of physalins B and D from *Physalis angulata*. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 58, n. 2, p. 235-41, fev 2006.

MAIA, J.; DEKKERS, BAS J W; PROVART, N. J.; LIGTERINK, W.; HILHORST, HENK W M. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds and its associated transcriptome. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e29123, jan 2011.

MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S.; CHAVES, M. M. Growth, photosynthesis and water-use efficiency of two C4 Sahelian grasses subjected to water deficits. **Journal of arid environments**, v. 45, n. 2, p. 119-137, jun 2000.

MATOS, F. J. **Plantas Medicinais: Guia de Selecao E Emprego de Plantas Usadas Em Fitoterapia No Nordeste Do Brasil.** 2 edição. Fortaleza: UFC Edições , 2007. 346p.

MELAN, M. A.; DONG, X.; ENDARA, M. E. *et al.* An *Arabidopsis thaliana* Lipoyxygenase Gene Can Be Induced by Pathogens , Abscisic Acid , and Methyl Jasmonate '. **Plant physiology**, v. 81, p. 441-450, 1993.

MOHAMMADI, G. R.; AMIRI, F. The Effect of Priming on Seed Performance of Canola (*Brassica napus* L.) Under Drought Stress. **Stress: The International Journal on the Biology of Stress**, v. 9, n. 2, p. 202-207, 2010.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, n. 1, p. 335-350, 1987.

NASCIMENTO, W. M. Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças: potencialidades e implicações. **Horticultura Brasileira**, v. 16, n. 2, p. 106-109, 1998.

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nat. Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1559-1582, nov 2006.

OLIVER, M. J.; MISHLER, B. D. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. **Plant Ecology**, n. 1982, p. 85-100, 2000.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P; FARRANT, J M; SMITH, M. T.; ROSS, G. Why do stored hydrated recalcitrant seeds die? **Seed Science Research**, v. 4, p. 187-191, 1994.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, PATRICIA. **Orthodox and Recalcitrant Seeds.**

PASTORI, G. M.; FOYER, C. H. Common Components , Networks , and Pathways of Cross- Tolerance to Stress . The Central Role of “Redox ” and Abscisic Acid-Mediated Controls. **Plant Physiology**, v. 129, n. June, p. 460-468, 2002.

PEDRAJAS, J. R.; MIRANDA-VIZUETE, A; JAVANMARDY, N.; GUSTAFSSON, J. A; SPYROU, G. Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 21, p. 16296-301, 26 maio 2000.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 1 maio 2001.

PIMENTEL, C. Relações hídricas em dois híbridos de milho sob dois ciclos de deficiência hídrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 11, p. 2021-2027, 1999.

PORTA, H.; RUEDA-BENÍTEZ, P.; CAMPOS, F; *et al.* Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions. **Plant & cell physiology**, v. 40, n. 8, p. 850-8, ago 1999.

POWELL, A A; YULE, L. J.; JING, H. C. *et al.* The influence of aerated hydration seed treatment on seed longevity as assessed by the viability equations. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 353, p. 2031-43, dez 2000.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. D. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 1, p. 1-11, mar 2006.

REDDY, G. B.; KUMAR, P. A.; KUMAR, M. S. Chaperone-like activity and hydrophobicity of alpha-crystallin. **IUBMB life**, v. 58, n. 11, p. 632-41, nov 2006.

RIBEIRO, I. M.; SILVA, M. T. G.; SOARES, R. D. A.; *et al.* *Physalis angulata* L. antineoplastic activity, in vitro, evaluation from its stems and fruit capsules. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, p. 21-23, 2002.

RIEU, I.; POWERS, S. J. Real-time quantitative RT-PCR: design, calculations, and statistics. **The Plant cell**, v. 21, n. 4, p. 1031-3, abr 2009.

ROHDE, J. R.; CARDENAS, M. E.; CAROLINA, N. The Tor Pathway Regulates Gene Expression by Linking Nutrient Sensing to Histone Acetylation. **Molecular and Cellular biology**. v. 23, n. 2, p. 629-635, 2003.

SCANDALIOS, J. G.; GUAN, L.; POLIDOROS, A. N. **Catalases in Plants: Gene Structure , Properties , Regulation , and Expression**. In: Scandalios JG, ed. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory, 343-406p, 1997.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance.pdf. **Biometrics**, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SIEDOW, J. N. PLANT LIPOXYGENASE: STRUCTURE AND FUNCTION. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 145-188, 1991.

SMIRNOFF, B. Y. N. Tansley Review No . 52 The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **Review Literature and Arts of the Americas**, n. 52, p. 27-58, 1993.

SOARES, M. B. P.; BRUSTOLIM, D.; SANTOS, L. A.; *et al.* Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 408-414, 2006.

SOEDA, Y.; KONINGS, M. C. J. M.; VORST, O. *et al.* Gene Expression Programs during *Brassica oleracea* Seed Maturation, Osmopriming, and Germination Are Indicators of Progression of the Germination Process and the Stress Tolerance Level 1. **Plant physiology**, v. 137, p. 354-368, 2005.

SOUZA, C. L. M. D. **Germinabilidade de sementes de *Physalis angulata* L. (Solanaceae) sob condições de estresses abióticos.** 67f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 2009.

SOUZA, N. K. DOS R.; AMORIM, S. M. C. DE. Crescimento e desenvolvimento de *Physalis angulata* Lineu submetida ao déficit hídrico. **Water**, v. 7, n. 1, p. 65-72, 2009.

SOUZA, N. K. DOS R.; JÚNIOR, J. DOS P. A.; AMORIM, S. M. C. Efeito do estresse salino sobre a produção de fitomassa em *Physalis angulata* L. (Solanaceae). **Revista Acadêmica**, v. 5, n. 4, p. 379-384, 2007.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673-80, 11 nov 1994.

TOMASSINI; BARBI, N. S.; RIBEIRO, IVONE M.; XAVIER, D. C. D. Gênero *Physalis* - uma revisão sobre vitaesteróides. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 47-57, 2000.

TOOROP, P. E.; HILHORST, HENK W. M. Molecular Biology in Seed Diagnostics. In: SMITH, R. D.; DICKIE, J. B.; LININGTON, S. H.; PRITCHARD, H. W.; PROBERT, R. J. (Eds.). **Seed conservation: Turning Science into Practice.** Kew: Royal Botanic Gardens, 2003. p. 507-515.

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

TURNER, N. C. Crop water deficits: a decade of progress. **Advances in Agronomy**, v. 39, n. 39, p. 1-51, 1986.

VANDESOMPELE, J.; PRETER, K. DE; PATTYN, F. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. 34.1-34.11, 18 jun 2002.

VARIER, A.; VARI, A. K.; DADLANI, M. The subcellular basis of seed priming. **Current Science**, v. 99, n. 4, p. 450-456, 2010.

VERSLUES, P. E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, JIANHUA; ZHU, J.K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 45, n. 4, p. 523-39, fev 2006.

VIERLING, E. The Roles of Heat Shock Proteins in Plants. **Environment**, v. 42, p. 579-620, 1991.

VILLELA, F. A.; BECKERT, O. P. Comunicação Técnica : **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p. 267-275, 2001.

VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 123-132, 2005.

XIONG, L.; LEE, H.; ISHITANI, M.; ZHU, J.-K. Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in Arabidopsis. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 10, p. 8588-96, 8 mar 2002.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, n. 1, p. 781-803, 2006.

ZHANG, J.; KIRKHAM, M. B. WATER RELATIONS OF WATER-STRESSED , SPLIT-ROOT. **American Journal of Botany**, v. 82, n. 10, p. 1220-1229, 1995.

ZHANG, M.; WANG, Z.; YUAN, L. *et al.* Osmopriming improves tomato seed vigor under aging and salinity stress. **Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 23, p. 6305-6311, 2012.

ZHU, J. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual review of plant biology**, v. 53, p. 247-73, jan 2002.

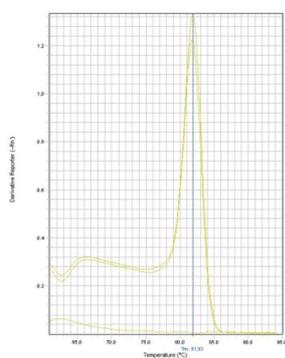
8 APÊNDICES

8.3 APÊNDICE A - Eletroforese dos produtos de PCR

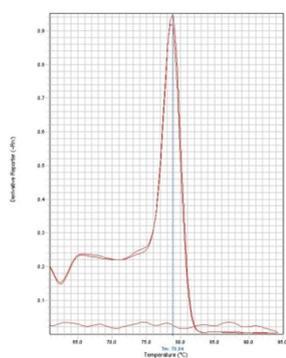


Figura 12. Eletroforese dos produtos de amplificação específica dos genes que foram quantificados identificando-os através dos seus fragmentos com tamanho esperado.

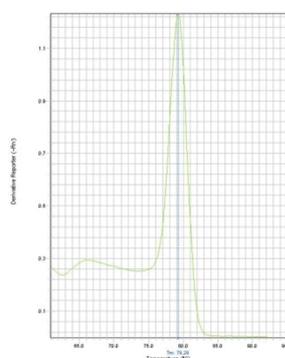
8.4 APÊNDICE B - Curvas de dissociação dos *amplicons*



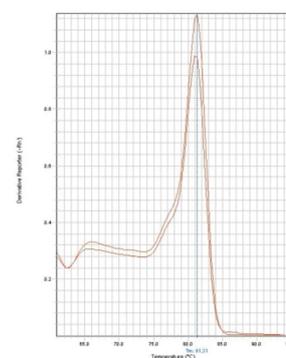
APX



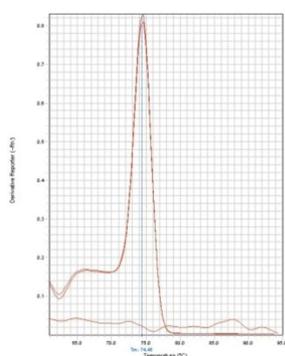
CAT1



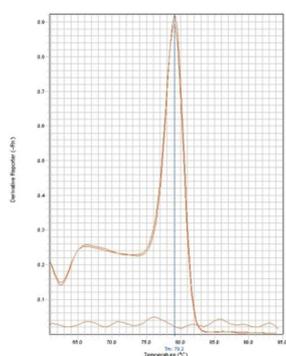
TPRP-F1



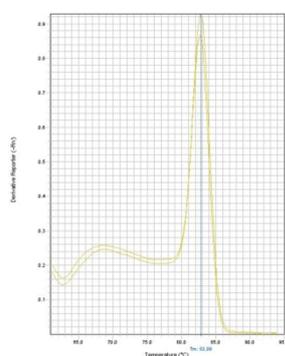
HSP17



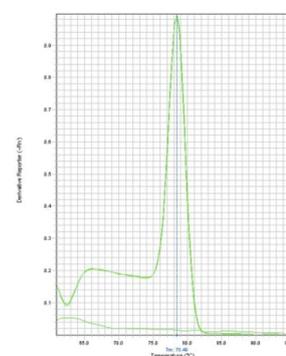
HSP18



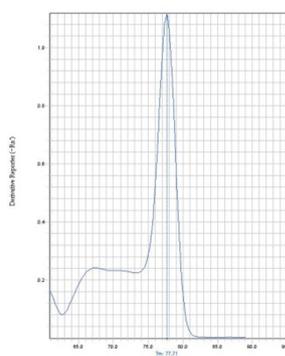
LEA



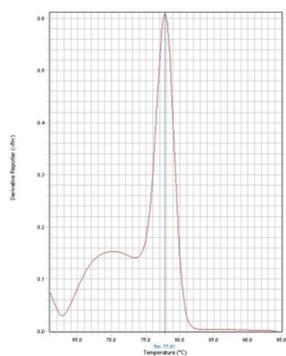
PPI



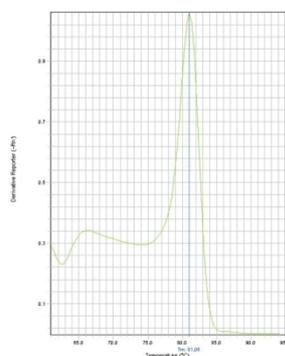
TIP



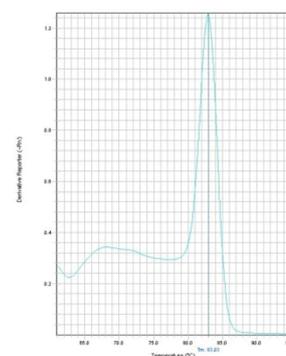
PP2A



TPX1



LOX



MTP

8.2 APÊNDICE C - *Primers utilizados*

Gene Alvo	Nº Acesso ⁷ <i>S. lycopersicum</i>	Nº Acesso ⁸ <i>P. Peruviana</i>	Sigla	Sequencia	Td	F	E	R ²
Ascorbato Peroxidase	SGN-U574728	Php00a03410.12365	APX	F AGGACCTGATGTTCCCTTTCAC R AAGGTATGGGCACCAGAGAG	91,9	168	89	99
Catalase 1	SGN-U578839	Php00a01953.09464	CAT1	F CTTTGACCCTCTTGATGTAAC R CCTCCGAATAGTAAAGACCAG	78,8	164	111	98
Fosfatase Protéica 2A *	SGN-U567355	Php00s.F7LC7MZ04I8OUO	PP2A	F CGAATTATCTCTTCATGGGCG R GCGTTTCCATACTTCCTCAG	77,7	184	107	96
<i>Heat Shock Protein 17,6</i>	SGN-U578134	Php00s.F6U9T4102ER2KW	HSP17	F GACGTGTTTGATCCATTCAG R CCTCTTCGATCTCCACTTTC	81,3	169	107	96
<i>Heat Shock Protein 18,7</i>	SGN-U566729	-	HSP18	F CTGAAGATTACTGGTGAAGAGAG R CCATGGATGACTTCACATAATC	74,5	133	106	98
<i>Late Embryogenesis Abundant</i>	SGN-U577361	Php00s.F6U9T4102C5D13	LEA2	F CCTTACTCTGTTCCCTATTCCC R ACCTTCACTGGCACATC	79,2	140	92	99
Lipoxigenase	SGN-U590203	Php00a05388.15341	LOX	F GGAATGGGACAGGGTTTATG R TGCTCTCGGTATTAGGATCTG	81,0	167	88	100
Metalotioneína*	SGN-U143485	-	MTP	F TCGTGCTGTGGAGGAACTGTGG R AGCTTGTCTTCTCAGGTCCCACCC	83,0	151	91	100
Peptidil Prolil Isomerase*	SGN-U577630	Php00a09119.19072	PPI	F GGGTTCATGTGTCAAGGAG R TTCCAGGTCCAGCATTAG	82,8	145	93	99
<i>Tap Interacting Protein</i>	SGN-U584254	-	TIP41	F GAGAGTCATGCCTAGTGGTTGG R CGAAGACAAGGCCTGAAATGTG	78,5	172	96	96
Proteína rica em Prolina	SGN-U143835	Php00a05138.15091	TPRP-F1	F TGGACGTATTAGGTGGACTG R AGCTTGAGTCTAATGGTTGTG	79,3	130	100	100
Tioredoxina Peroxidase	SGN-U593370	-	TPX1	F CGAAAACCTTCCCTGAGAAC R CCCTCCAGATTCAACATTAGC	77,0	179	99	99

*Gene de referência; **Td** Temperatura de dissociação do fragmento °C; **F** fragmento de amplificação; **E** eficiência de amplificação; **R²** ajuste da regressão linear.

⁷ Sol Genomics Network - <http://solgenomics.net>

⁸ *Physalis peruviana* database - <http://physalisdb.org/uchuva/db/index>