



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE  
SANTANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOTECNOLOGIA**



**MANUELA OLIVEIRA DE SOUZA**

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES EM SEMENTES  
OSMOCONDICIONADAS E PLÂNTULAS DE *Physalis angulata* L. E  
PROSPECÇÃO DE CONSTITUINTES SECO-ESTEROIDAIIS EM PLANTAS  
SUBMETIDAS A ESTRESSE ABIÓTICO**

Feira de Santana, BA

2012

**MANUELA OLIVEIRA DE SOUZA**

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES EM SEMENTES  
OSMOCONDICIONADAS E PLÂNTULAS DE *Physalis angulata* L. E  
PROSPECÇÃO DE CONSTITUINTES SECO-ESTEROIDAIIS EM PLANTAS  
SUBMETIDAS A ESTRESSE ABIÓTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadores: Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana  
Profa. Dra. Claudinéia Regina Pelacani Cruz

Feira de Santana, BA

2012

Dedico este trabalho a Sérgio Luis de Moraes Pires, um amor, amigo, companheiro de todas as horas, sem o qual seria impossível a realização dessa tese.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela concessão da vida e de todas as formas bonitas de vida que eu posso sentir e enxergar.

A FAPESB e a CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado, no Brasil e na Holanda, respectivamente.

A minha querida orientadora Claudinéia, que com gentileza e sabedoria soube conduzir os quase quatro anos dessa trajetória. Sempre incentivando mesmo aqueles pequenos trabalhos que às vezes eu não acreditava. Uma pessoa com condutas elegantes sempre e profissionalismo sério. Muito obrigada!

A José Raniere pelo compromisso assumido com gentileza na orientação desse trabalho.

A minha mãe Terezinha Borges, pelo amor que venho recebendo ao longo da vida. Um exemplo de ser humano!

A Sérgio Luis minha gratidão pela cumplicidade e amor! A Marcello Pires pela torcida e amizade!

A Mario Augusto (Dindo querido) e Floracy (Dinda querida) por todas as coisas boas que me proporcionaram, carinho e amizade. Meus primos Ricardo e Hildo pelo incentivo!

A Jacinto e Alayde Pires pela torcida e todo apoio oferecidos!

A minha amiga-irmã Cíntia Luiza, uma menina de ouro. Obrigada por compartilhar o interesse por *Physalis*. Eu quero trabalhar com você até...

A Cimille Antunes pela valiosa ajuda durante os preparativos para o período que passei na Holanda.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, por compartilhar conhecimentos e experiências.

A Renato Delmondez de Castro por ter viabilizado essa grande experiência na Holanda. Muito obrigada!

A minhas irmãs Nair e Maria José, cunhados Murilo Sena e Marco Aurélio pelo incentivo e demonstração de amizades verdadeiras. Aos meus sobrinhos, Henrique, Gustavo e Guilherme, pelas alegrias diárias. A Pâmela Maria, pelo incentivo e amizade!

A Fernando Pinheiro pela gentileza em atender aos pedidos de ajuda, especialmente na formatação de alguns gráficos dos capítulos 1 e 2. Muito Obrigada!

A Amélia Borba Costa Reis, com quem venho construindo uma grande amizade, pelos agradáveis cafés e conversas! Obrigada Méa querida!

A querida Evani Strada pelo respeito, amizade e por compartilhar tantos momentos bons e difíceis, mas acima de tudo pela torcida!

A Odacir Strada pela amizade e pelas dicas para o cultivo de *Physalis* que muito me auxiliaram! Muito obrigada!

A queridíssima Aglacy Carvalho, por todo auxílio e carinho que recebi durante o período em Brasília.

A Therezinha Tomassini, pela realização das análises das fisalinas. Pela boa amizade, pelo aprendizado, e por compartilhar o interesse por *Physalis*. Muitíssimo obrigada!

A Wilco Ligterink um grande supervisor, pelas orientações recebidas para a execução de todo experimento realizado na Universidade de Wageningen.

A Henk Hilhorst pela gentileza que recebe os estudantes estrangeiros em seu Laboratório, pela cordialidade com os alunos.

A querida amiga Somayeh Yousefnejad pela amizade sincera, por compartilhar bons momentos na Holanda. شما از تشکر با!

Aos colegas do Laboratório de Química de produtos Naturais da Fiocruz (Rio de Janeiro), Claudia Valéria, Ivone Maria, Conceição Lopes, Deise Xavier pelo empenho na execução dos experimentos com as fisalinas. Muito obrigada a José Luiz Mazzei pelas valiosas contribuições ao Capítulo 3.

A Lygia Bahia por compartilhar bons momentos durante esse período.

A Tarcísio Kennedy pelas valiosas ajudas com as versões em inglês dos artigos e por ter sido amigo e professor de inglês antes da minha ida para a Holanda. Muito Obrigada!

A Alexandre Marques pela amizade e gentileza de sempre atender aos meus pedidos.

A Helton Carneiro, a personificação da eficiência. Obrigada pela paciência e dedicação com os estudantes da pós-graduação!

A Álvaro Henrique e Mina Villafort pela amizade e pelo apoio fundamental, que me ofereceram na Holanda

A Jucilayne e Tatiana Rittl por ter tornado ensolarado meus dias na Holanda.

Aos amigos, Débora Vidigal, Aníbal Coutinho, Júlio Oliveira, Charles Moreira, Davi, Carlos Veras, que me abraçaram como bons companheiros naquela terra fria.

A Enid Tomkinson, que me acolheu com carinho em sua casa em minha temporada na Holanda.

Aos amigos, Clarissa, Cristiane Brito, Érica, Ana Carolina Delfino, Paulo Ribeiro, Felipe do Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos da Universidade Federal da Bahia.

“Não me iludo, tudo permanecerá do jeito que tem sido, transcorrendo,  
transformando, tempo e espaço navegando todos os sentidos”.

Gilberto Gil

## RESUMO

Estresses abióticos como salinidade e restrição hídrica são considerados responsáveis por provocar alterações nos processos fisiológicos, comprometendo a germinação, o crescimento e o desenvolvimento dos vegetais. As sementes e plântulas sob estresse podem ser beneficiadas com o osmocondicionamento, uma técnica empregada para incrementar o desempenho germinativo, além de proporcionar maiores taxas de emergência das plântulas. Apesar de na literatura ser avaliada como prejudicial, a indução de estresses vem sendo oportunamente utilizada, nas últimas décadas, para modular a produção de importantes metabólitos nos vegetais. A avaliação da expressão gênica permite compreender como ocorre a regulação na síntese de proteínas capazes de proteger os tecidos vegetais dos efeitos causados por diferentes estresses. O objetivo principal deste trabalho foi compreender a contribuição do osmocondicionamento de sementes no incremento das taxas de germinação sob condições de estresse abiótico e obtenção de plântulas mais vigorosas; obter o perfil de expressão de genes relacionados a salinidade e produção de seco-esteróides de plantas de *Physalis angulata* submetidas a restrição hídrica e ao estresse salino. Sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas foram submetidas a diferentes soluções salinas. Foram avaliados parâmetros de germinação, além da expressão gênica de sementes e plântulas. O crescimento e o conteúdo seco-esteroidal foram estimados em plantas de *P. angulata* cultivadas sob condições controladas em casa de vegetação. O osmocondicionamento incrementou as taxas de germinação das sementes, além de induzir a expressão dos genes *APX*, *GST* e tioredoxina, relacionados a proteção contra o estresse oxidativo. Os tratamentos de estresses induziram o aumento do teor seco-esteroidal em folhas e diminuição em caules de *P. angulata*.

Palavras chave: Estresse salino. Expressão Gênica. Fisalinas. Osmocondicionamento. Restrição hídrica.

## ABSTRACT

Abiotic stresses as salt stress and water restriction are considered responsible for causing changes in physiological processes, with detrimental effects on the germination seeds, growth and development of plants. Priming seeds and seedlings can improve their performance, rate of germination and seedling emergence under normal and abiotic stress conditions. Although recognized as a particularly harmful, induction of stress has been used in recent decades due to modulate the production of secondary metabolites in plants. The evaluation of gene expression allows one to understand how the adjustment occurs in the synthesis of proteins able to protect the plant tissues from the effects caused by different stresses. The aim of this study was looking for how priming enhance seed germination rates under abiotic stress and to get more vigorous seedlings, from the expression profile of genes related to salinity and production of seco-steroidal plant *Physalis angulata* subjected to water restriction and salt stress. Primed and non primed seeds were subjected to different salt solutions. We evaluated parameters of germination, and gene expression in seeds and seedlings. The growth and the content of seco-steroid were evaluated in plants of *P. angulata* grown under experiments in greenhouse. Priming positively affected germination rates of seeds and seedlings to have provided the expression of some genes APX, GST and thioredoxin, which are related to protection against oxidative stress. The treatments performed induced an increase in the seco-steroidal content in leaves and decrease in stems of *P. angulata*.

Key words: Salt stress. Physalins. Gene expression. Priming. Water restriction.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS.....	7
CAPÍTULO 1 – Germinação de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas e crescimento inicial de <i>Physalis angulata</i> L. (Solanaceae) em ambientes salinos.....	14
1.1 INTRODUÇÃO.....	17
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
REFERÊNCIAS.....	28
CAPÍTULO 2 – Germinação, crescimento inicial e expressão gênica em sementes e plântulas de <i>Physalis angulata</i> L. submetidas a estresse salino.....	34
2.1 INTRODUÇÃO.....	37
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.2.1 Material vegetal e sementes.....	39
2.2.2 Osmocondicionamento e germinação.....	39
2.2.3 Extração de RNA.....	40
2.2.4 Síntese de cDNA.....	41
2.2.5 Desenho dos <i>primers</i> e reação de PCR em tempo real (qPCR).....	41
2.2.6 Crescimento, extração de RNA e ensaios de PCR em tempo real em plântulas.....	42
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
2.3.1 Osmocondicionamento e germinação.....	43
2.3.2 Expressão gênica em sementes de <i>P. angulata</i> .....	46
2.3.3 Crescimento e expressão gênica da parte aérea de plântulas de <i>P. angulata</i> .....	48
2.3.4 Desenvolvimento e expressão gênica das raízes de plântulas de <i>P. angulata</i> .....	52
2.4 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

CAPÍTULO 3 – Prospecção de constituintes seco-esteroidais de <i>Physalis angulata</i> L. submetidas a estresse abiótico.....	65
3.1 INTRODUÇÃO.....	68
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	71
3.2.1 Reagentes.....	71
3.2.2 Material vegetal.....	71
3.2.3 Planejamento experimental.....	71
3.2.4 Osmocondicionamento das sementes.....	72
3.2.5 Emergência e crescimento inicial.....	72
3.2.6 Análise de crescimento.....	73
3.2.7 Determinação dos constituintes seco-esteroidais (fiscalinas) em caules e folhas.....	73
3.2.7.1 Sistema cromatográfico.....	73
3.2.7.2 Determinação quantitativa das fiscalinas por CLAE.....	74
3.2.8 Análise estatística.....	75
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
3.3.1 Emergência e crescimento de <i>P. angulata</i> .....	75
3.3.2 Matéria seca de cada parte da planta.....	78
3.3.3 Quantificação de seco-esteróides em extratos de folhas e caules de <i>P. angulata</i> .....	79
3.4 CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS.....	84
CONCLUSÃO GERAL.....	92

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. *Physalis angulata* no período da floração (A) e frutificação (B), 45 dias após semeadura em casa de vegetação, Feira de Santana, Bahia, 2009.....6

**CAPÍTULO 1** – Germinação de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas e crescimento inicial de *Physalis angulata* L. (Solanaceae) em ambientes salinos.

Figura 1. Germinabilidade de sementes de *Physalis angulata* L. oriundas de sementes osmocondicionadas (OS) e não osmocondicionadas (NO). OS (◆) e NO (■)  
\* Significativo a 5% de probabilidade.....20

Figura 2. Polígonos de frequência relativa (FR%) da germinação de sementes de *Physalis angulata* L. para diferentes concentrações salinas. OS (◆) e NO (■).....24

Figura 3. Matéria seca total das plântulas de *Physalis angulata* L. oriundas de sementes osmocondicionadas (OS) e não osmocondicionadas (NO). OS (◆) e NO (■). \*Significativo a 5% de probabilidade.....26

**CAPÍTULO 2** – Germinação, crescimento inicial e expressão gênica em sementes e plântulas de *Physalis angulata* L. submetidas a estresse salino.

Figura 1. Germinação (%) de sementes não osmocondicionadas (NO) e osmocondicionadas (O) de *P. angulata* submetidas a diferentes concentrações de soluções salinas. \* diferente significativamente pelo teste t ( $p < 0,05$ ).....44

Figura 2.  $t_{50}$  (hr) (A) e  $u_{8416}$  (hr) (B) de sementes não osmocondicionadas (NO) e osmocondicionadas (O) de *P. angulata* submetidas a diferentes concentrações de soluções salinas. \* diferentes significativamente pelo teste t ( $p < 0,05$ ).....45

Figura 3. Expressão relativa dos genes *SOS1* (A) *HAK1* (B) em sementes de *P. angulata*, submetidas a diferentes tratamentos, osmocondicionadas (O), osmocondicionadas e submetidas a solução salina de 14 dS m<sup>-1</sup> (O + sol salina) não osmocondicionadas e submetidas a solução salina de 14 dS m<sup>-1</sup> (NO + sol. salina).....46

Figura 4. Expressão relativa dos genes *APX* (A) e *GST* (B) em sementes de *P. angulata*, submetidas a diferentes tratamentos, osmocondicionadas (O), osmocondicionadas e submetidas a solução salina de 14 dS m<sup>-1</sup> (O + sol salina) não osmocondicionadas e submetidas a solução salina de 14 dS m<sup>-1</sup> (NO + sol. salina).....47

Figura 5. Expressão relativa do gene tioredoxina em sementes de *P. angulata* submetidas a diferentes tratamentos, osmocondicionadas (O), osmocondicionadas e submetidas a solução salina de 14 dS m<sup>-1</sup> (O + sol salina) não osmocondicionadas e submetidas a solução salina de 14 dS m<sup>-1</sup> (NO + sol. salina).....48

Figura 6. Matéria fresca (A) e seca (B) da parte aérea de plântulas de *P. angulata*, submetidas a diferentes concentrações de soluções salinas. \* diferentes significativamente pelo teste t (p<0,05).....49

Figura 7. Expressão relativa dos genes *SOS1* (A) e *HAK1* (B) da parte aérea de plântulas de *P. angulata*, submetidas a diferentes concentrações de soluções salinas.....50

Figura 8. Expressão relativa dos genes *APX* (A) e *GST* (B) da parte aérea de plântulas de *P. angulata*, submetidas a diferentes concentrações de solução salina.....51

Figura 9. Expressão relativa do gene tioredoxina da parte aérea de plântulas de *P. angulata* submetidas a diferentes concentrações de solução salina.....51

Figura 10. Matéria fresca (A) e seca (B) das raízes de plântulas de *P. angulata*, submetidas a diferentes concentrações de soluções salinas. \*diferente significativamente pelo teste t ( $p < 0,05$ ).....52

Figura 11. Plântulas de *P. angulata* provenientes de sementes não osmocondicionadas (A) e osmocondicionadas (B) submetidas a solução salina CE 4 dS m<sup>-1</sup> por 10 dias.....54

Figura 12. Expressão relativa dos genes *SOS1* (A) *HAK1* (B) em raízes de plântulas de *P. angulata*, submetidas a diferentes concentrações de soluções salinas.....55

Figura 13. Expressão relativa dos genes *APX* (A) e *GST* (B) em raízes de *P. angulata*, submetidas a diferentes concentrações de soluções salinas.....56

Figura 14. Expressão relativa do gene tioredoxina de raízes de plântulas de *P. angulata*, submetidas a diferentes concentrações de soluções salinas.....56

### **CAPÍTULO 3** – Prospecção de constituintes seco-esteroidais de *Physalis angulata* L. submetidas a estresse abiótico

Figura 1. Fisalinas bioativas isoladas de *Physalis angulata*: (I) F = 5 $\beta$ , 6 $\beta$ -epoxi; (II) B =  $\Delta^{5,6}$ ; (III) D = 5 $\alpha$ -OH, 6 $\beta$ -OH e (IV) G =  $\Delta^{4,5}$ , 6 $\beta$ -OH .....70

## LISTA DE TABELAS

**CAPÍTULO 1** – Germinação de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas e crescimento inicial de *Physalis angulata* L. (Solanaceae) em ambientes salinos

Tabela 1. Velocidade média (dias<sup>-1</sup>), Índice de velocidade de germinação (IVG, sem.dia<sup>-1</sup>) e Coeficiente de uniformidade de germinação (CUG, sem.dias<sup>-2</sup>) de sementes osmocondicionadas (OS) e não osmocondicionadas (NO) de *Physalis angulata* L. submetidas a diferentes concentrações salinas.....22

**CAPÍTULO 2** – Germinação, crescimento inicial e expressão gênica em sementes e plântulas de *Physalis angulata* L. submetidas a estresse salino.

Tabela 1. *Primers* específicos utilizados nas reações de PCR em tempo real.....42

Tabela 2. Comprimento de raiz (cm) de plântulas *P. angulata*, submetidas a diferentes concentrações de soluções salinas.....53

**CAPÍTULO 3** – Prospecção de constituintes seco-esteroidais de *Physalis angulata* L. submetidas a estresse abiótico

Tabela 1. Taxa de emergência (% , média e desvio-padrão) de sementes após diferentes condições de tratamento pré-germinativo de *P. angulata*.....75

Tabela 2. Número de folhas, frutos, altura da planta (cm) e diâmetro dos caules (cm) de *P. angulata* provenientes de sementes sob tratamentos pré-germinativos distintos e submetidas a diferentes tipos de irrigação.....77

Tabela 3. Matéria seca (g.planta<sup>-1</sup>) de partes de *P. angulata* provenientes de sementes de diferentes tratamentos pré-germinativos e submetidas a diferentes tipos de irrigação.....78

Tabela 4: Teor de fisalinas em extratos etanólicos secos ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) de partes da planta de *P. angulata* provenientes de sementes de diferentes tratamentos pré-germinativos e submetidas a diferentes tipos de irrigação.....80

## INTRODUÇÃO GERAL

*Physalis angulata* L. pertence a família Solanaceae, possui hábito herbáceo, ereto medindo até um metro de altura (VASCONCELOS, 1998). As folhas são pubescentes com disposição alterna, formato ovalado a ovalado lanceolado ou amplamente ovalada a estreita elíptica (GONEM et al., 2000; SILVA & AGRA, 2005). As flores (Figura 1A) são solitárias ou em cimeiras, cálice soldado até a metade, permanente nos frutos, a corola é gamopétala amarela (1/4 do interior do tubo marrom), anteras azuladas ou violetas, dorsifixas (GONEM et al., 2000; SILVA & AGRA, 2005).

Os frutos (Figura 1B) apresentam cálice crescente, pequenos e arredondados, com coloração amarelo-alaranjado quando maduros envolvidos por sépalas em forma de balão (FREITAS & OSUÑA, 2006). A caracterização física e físico-química dos frutos de *P. angulata* demonstram teores significativos de vitamina C e atividade antioxidante mediana, o que constitui bom atrativo para aproveitamento comercial e tecnológico dos frutos, ainda pouco comercializados na maior parte do Brasil (OLIVEIRA et al., 2011).

As sementes são elípticas e achatadas, castanho-alaranjadas quando completamente maduras e esbranquiçadas quando ainda imaturas. O tegumento é glabro e reticulado na semente seca, quando embebido apresenta-se parcialmente liso, cuja testa permite a visualização do embrião. As plântulas de *P. angulata* são do tipo “epígeo-foliácea” com cotilédones foliáceos (SOUZA et al., 2010).

As formas mais comuns de propagação são pela via sexuada, com o emprego de sementes, e pela via assexuada, que utiliza diferentes métodos como estaquia e micropropagação, entretanto, o sistema mais utilizado e de maior produção é por sementes, já que elas possuem alto percentual de germinação (RUFATO et al., 2008). Altas temperaturas podem favorecer a germinação e conseqüentemente a produção de mudas da espécie. Estudos em laboratório demonstraram que a temperatura ótima para a germinação e desenvolvimento de plântulas é de 35°C (SOUZA et al., 2010).

Salinidade e restrição hídrica podem ser considerados como principais fatores abióticos responsáveis por provocar alterações nos processos fisiológicos,

comprometendo o crescimento e o desenvolvimento dos vegetais e conseqüentemente a produtividade (VILAGROSA et al., 2003; ZHANG et al., 2006; PENG et al., 2009; TIAN et al., 2011).

Os efeitos prejudiciais da alta salinidade podem ser observados na planta inteira, ou em partes dela e em fases de desenvolvimento diferentes. Muitas espécies desenvolveram mecanismos para excluir o sal dos seus tecidos ou ainda tolerar sua presença dentro das células (JACOBY, 1999; ASHRAF et al., 2008).

Algumas das estratégias utilizadas pelas plantas para controle das alterações causadas pela salinização são acúmulo seletivo ou exclusão de íons; controle da absorção de íons pelas raízes e transporte em folhas, compartimentalização de íons a nível celular e na planta inteira, síntese de solutos compatíveis, mudança na via fotossintética, alteração na estrutura da membrana, indução de hormônios vegetais e síntese de enzimas antioxidantes (ZHU, 2002; ASHRAF & FOOLAD, 2005).

Todos os processos importantes como fotossíntese, síntese de proteínas, produção de energia e metabolismo lipídico são afetados quando a planta está submetida a estresses abióticos (FLEXAS et al. 2004; CHAVES et al., 2009). A primeira resposta ao estresse salino/hídrico é uma redução no tamanho da folha que leva a diminuição da sua taxa de produção culminando com a senescência que ocorre de forma acelerada (MUNNS, 2002; PARIDA & DAS, 2005).

Em relação a capacidade que possuem de crescer em meio salino, as plantas são tradicionalmente classificadas como glicófitas ou halófitas (FLOWERS et al., 1977). As halófitas são tolerantes a altas concentrações de NaCl, algumas podem suportar quantidade de sal equivalente ao dobro da concentração da água do mar (FLOWERS & COLMER, 2008). No entanto, nem as plantas halófitas podem tolerar grandes quantidades de sal no citoplasma e, portanto, sob condições salinas precisam restringir o excesso de sais no vacúolo ou compartimentalizar os íons em diferentes tecidos a fim de facilitar as suas funções metabólicas (ZHU, 2003; ASHRAF & FOOLAD, 2005; FLOWERS & COLMER, 2008).

A tolerância ao déficit hídrico e ao sal podem ser explicados pelas adaptações funcionais e estruturais desenvolvidas pelas plantas como a regulação do crescimento, ajuste osmótico, mudanças na expressão gênica e na síntese de proteínas (XIONG & ZHU, 2002; MUNNS & TESTER, 2008; TAIZ & ZIEGER, 2009).

A expressão de genes que regulam a síntese de proteínas é capaz de proteger os tecidos vegetais dos efeitos causados pelo estresse oxidativo, muitas vezes consequência direta do estresse salino e restrição hídrica. Entre estas proteínas estão algumas enzimas antioxidantes como: ascorbato peroxidase (APX), glutathione-S-transferase (GST) e tioredoxina (ASHRAF et al., 2008; MIAN et al. 2011; NAKAUENE et al., 2012).

As plantas são atingidas por estresses abióticos em diferentes fases do desenvolvimento, sendo a germinação (quando a semente emite a radícula com comprimento cerca de 2 mm) e o estágio inicial de plântula as mais sensíveis e vulneráveis ao sal e a seca (SOSA et al., 2005; BELAQZIZ et al., 2009). As sementes e plântulas sob estresse podem ser beneficiadas com o osmocondicionamento, que é uma técnica que melhora o desempenho germinativo, proporcionando maiores e sincronizadas taxas de germinação (HEYDEKKER et al., 1973; IQBAL & ASHRAF, 2007; VARIER et al., 2010), além de proporcionar maiores taxas de emergência das plântulas (BRADFORD, 1986; FLORS et al., 2007). Os benefícios dessa técnica foram observados em *P. angulata* quando as sementes foram expostas ao estresse salino (SOUZA et al., 2011).

Agentes osmóticos como polietilenoglicol (PEG 6000 ou 8000), cloreto de sódio (NaCl), além de outros sais como o nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>) podem ser utilizados no osmocondicionamento, no entanto a escolha do agente osmótico deve levar em consideração a influência que este terá nos tecidos da semente.

O polietilenoglicol (PEG) é um agente osmótico orgânico que é utilizado para aumentar a concentração de soluto na solução, diminuindo desta forma, o potencial hídrico da mesma. O PEG com alto peso molecular (6000, 8000, 20000) é muito utilizado, uma vez que produz uma solução caracterizada como inerte, estável e sem efeitos tóxicos para a semente e, simula a deficiência hídrica sem penetrar no tegumento e sem alterar o metabolismo da semente (BRADFORD, 1986; VILLELA et al., 1991; KAYA et al., 2006; KULKARNI & DESHPANDE, 2007).

Apesar do amplo número de trabalhos relacionando o efeito do osmocondicionamento e a melhoria das taxas de germinação em diversas espécies vegetais incluindo *Arabidopsis thaliana*, *Brassica oleraceae* e *Solanum lycopersicum*, (SOEDA et al., 2005; BASSEL et al., 2008; AUGÉ et al., 2009) os mecanismos

moleculares e de expressão gênica subjacente ao efeito do condicionamento osmótico na germinação ainda não estão totalmente compreendidos.

Além das melhorias proporcionadas pelo osmocondicionamento durante as fases iniciais do desenvolvimento, as plantas podem desenvolver estratégias de sobrevivência em determinados níveis de salinidade e restrição hídrica e ainda sofrerem alterações no metabolismo, produzindo substâncias de alto valor biotecnológico (KUNZ et al., 2006; CAPANOGLU, 2010), como os metabólitos secundários.

*Physalis angulata* L. é uma espécie extensivamente utilizada na medicina popular devido à presença de metabólitos secundários do grupo dos seco-esteróides (fiscalinas) que ocorre naturalmente em isolados de caules e folhas (BASTOS et al., 2008). Extratos e infusões desta planta são popularmente utilizados para tratar doenças inflamatórias, como dor de garganta, reumatismo, hepatite e cervicite (BASTOS et al., 2008). Os efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores das fiscalinas B, D, F e G, já foram bem documentados por vários autores (VIEIRA et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2006; SOARES et al., 2006; DAMU et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2009).

A obtenção dos seco-esteróides com diversas propriedades terapêuticas (LEE et al., 2009; PINTO et al., 2010; YU et al., 2010; SUN et al., 2011) está vinculado a práticas extrativistas que gera a redução ou mesmo o risco de extinção da espécie. O acesso ao patrimônio genético é fiscalizado pelo CGEN (Conselho de Gestão do Patrimônio Genético) e regulado pela Medida Provisória nº 2.186-16/01 e pelos decretos 3.945/01 e 4.946/03 (AZEVEDO & SILVA, 2005). Apesar da medida provisória ter como objetivo a proteção do patrimônio genético brasileiro, por outro lado, dificulta as pesquisas em muitas instituições com amplo interesse nas espécies nativas brasileiras.

Nesse contexto o desenvolvimento de protocolos de propagação eficientes de *P. angulata*, requer um melhor entendimento da germinação e do comportamento do crescimento vegetal, vinculados a compreensão da expressão de alguns genes que futuramente poderão ser utilizados em programas de melhoramento genético. Esses protocolos podem proporcionar a produção em larga escala da espécie fornecendo matéria prima suficiente para a condução de pesquisas, solucionando em parte o problema do extrativismo e os impedimentos que podem ser causados pelo CGEN.

O objetivo principal deste trabalho foi compreender a contribuição do osmocondicionamento de sementes no incremento das taxas de germinação sob condições de estresse abiótico e obtenção de plântulas mais vigorosas. Além de obter o perfil de expressão de genes relacionados a salinidade e avaliar a produção de seco-esteróides, de plantas de *P. angulata*, submetidas a restrição hídrica e ao estresse salino.

Para atender aos objetivos descritos, foram realizados ensaios de germinação no laboratório de sementes (LAGER) e de cultivo em campo no Horto Florestal, da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS); como também ensaios de expressão diferencial de genes na Universidade de Wageningen na Holanda e experimentos de fitoquímica no Laboratório de Produtos Naturais de Farmanguinhos, Rio de Janeiro. O presente trabalho será apresentado na forma de artigos científicos, abrangendo as áreas de fisiologia de sementes (Capítulo 1); fisiologia molecular (Capítulo 2) e química de produtos naturais (Capítulo 3).



Figura 1: *Physalis angulata* no período da floração (A) e frutificação (B), 45 dias após semeadura em casa de vegetação, Feira de Santana, Bahia, 2009.

## REFERÊNCIAS

ASHRAF, M.; ATHAR, H.R.; HARRIS, P.J.C.; KWON, T.R. Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Advances in Agronomy*, v. 97, p. 45-110. 2008.

ASHRAF, M. & FOOLAD, M.R. Pre-sowing seed treatment – a shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions. *Advances in Agronomy*, v. 88, p. 223–271. 2005.

AUGE, G.A.; PERELMAN, S.; CROCCO, C.D.; SÁNCHEZ, R.A.; BOTTO, J.F. Gene expression analysis of light-modulated germination in tomato seeds. *New Phytologist*, 183, p. 301-314. 2009.

AZEVEDO, C.M. do A. & SILVA, F. A. Regras para o Acesso Legal ao Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional. *Ministério do Meio Ambiente*. Departamento do Meio Ambiente. Brasília- DF. 2005.

BASTOS, G.N.; SILVEIRA, A.J.; SALGADO, C.G; PICANÇO-DINIZ, D.L., DO NASCIMENTO, J.L. *Physalis angulata* extract exerts anti-inflammatory effects in rats by inhibiting different pathways. *Journal of Ethnopharmacology*, 118, p. 246–251. 2008.

BASSEL, G.W.; FUNG, P.; CHOW, T.F.; FOONG, J.A.; PROVART, N.J.; CUTLER, S.R. Elucidating the germination transcriptional program using small molecules. *Plant Physiology*, 147, p.143–155. 2008.

BELAQZIZ R.; ROMANE A., ABBAD, A. Salt stress effects on germination, growth and essential oil content of an endemic thyme species in Morocco (*Thymus maroccanus* Ball.). *Journal of Applied Sciences Research*, v. 5, n. 7, p. 858-63. 2009.

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.

CAPANOGLU, E. The potential of priming in food production. *Trends in Food Science and Technology*, 21, p. 399-407. 2010.

CHAVES, M.M., FLEXAS, J., PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103, p. 551–560. 2009

DAMU, A.G., KUO, P.C., SU, C.R., KUO, T.H., CHEN, T.H., BASTOW, K.F., LEE, K.H., WU, T.S. Isolation, structures, and structure cytotoxic activity relationships of withanolides and physalins from *Physalis angulata*. *Journal of Natural Products*, 70, p. 1146–1152. 2007.

FLEXAS, J., BOTA, J., LORETO, F., CORNIC, G., SHARKEY, T.D. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology*, 6, p. 269–279. 2004.

FLORS, V.; PARADÍS, M.; GARCÍA-ANDRADE, J.; CEREZO, M.; BOSCH, G.C.; PILAR, G.A.P. A tolerant behavior in salt-sensitive tomato plants can be mimicked by chemical stimuli. *Plant Signaling and Behavior* v. 2, n. 1, p. 50-57. 2007.

FLOWERS, T.J. & COLMER, T.D. Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*. v.179, n.4, p.945-963, 2008.

FREITAS, T.A. & OSUÑA, J.T.A. Efeito do substrato e da luminosidade na germinação de sementes de *Physalis angulata* L. (Solanaceae). *Sitientibus* 6, p. 101-104. 2006.

GONEM, O.; YILDIRIM, A.; UYUGUR, F. N. A. New Record for the Flora of Turkey *Physalis angulata* L. (Solanaceae). *Turkish Journal of Botany*, v.24. p.299-301. 2000.

GUIMARÃES, E.T.; LIMA, M.S.; SANTOS, L.A.; RIBEIRO, I.M.; TOMASSINI, T.B.; Dos SANTOS, R.R.; Dos SANTOS, W.L.; SOARES, M.B. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* *in vitro* and *in vivo* models of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64, p. 84–87. 2009.

HEYDEKKER, W.; HIGGINS, J.; GULLIVER, R.L. Accelerated germination by osmotic seed treatment. *Nature*, 246, p. 42-44. 1973.

IQBAL, M. & ASHRAF, M. Seed treatment with auxins modulates growth and ion partitioning in salt-stressed wheat plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49, p. 1003-1015. 2007.

JACOBY, B. Mechanism involved in salt tolerance of plants. In: PESSARAKLI, M. (Ed.), *Handbook of Plant and Crop Stress*, 2<sup>o</sup>ed. New York: Dekker, 1999, p.97-123.

KAYA, M.D.; OKÇU, G.; ATAK, M.; ÇIKILI, Y.; KOLSARICI, O. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.) *European Journal of Agronomy*, v.24, n.4 p.291–295. 2006.

KULKARNI, M. & DESHPANDE, U. *In vitro* screening of tomato genotypes for drought resistance using polyethylene glycol. *African Journal of Biotechnology*, v.6, n.6, p. 691-696. 2007.

KUNZ, B. A.; CAHILL, D. M.; MOHR, P. G.; OSMOND, M. J.; VONARX, E. J. Plant responses to UV radiation and links to pathogen resistance. In: JEON, K.W. (Ed.). A survey of cell biology. *International Review of Cytology*, v. 255, New York: Academic Press, 2006, 1-40p.

LEE, H.Z; LIU, W.Z.; HSIEH, W.T.; TANG, F.Y.; CHUNG, J.G; LEUNG, H.W.C. Oxidative stress involvement in *Physalis angulata*-induced apoptosis in human oral cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, n. 3, p. 561-570. 2009.

MAGALHÃES, H.I.F.; VERAS, M.L.; PESSOA, O.D.L., SILVEIRA, E.R., MORAES, M.O., PESSOA, C., COSTA-LOTUFO, L.V. Preliminary investigation of structure-activity relationship of cytotoxic physalin. *Letters in Drug Design & Discovery*, v.3, n.1, p. 625-632. 2006.

MIAN, A.A.; SENADHEERA, P.; MAATHUIS, F.J.M. Improving crop salt tolerance: anion and cation transporters as genetic engineering targets. *Plant Stress* 5 (special issue 1), p. 64-72. 2011.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment*, v.25, n.2, p.239-250. 2002.

MUNNS, R. & TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review Plant Biology*, 59, p. 651-681. 2008.

NAKAUNE, M.; HANADAC A.; YIN, Y.G; MATSUKURA, C.; YAMAGUCHI, S.; EZURA, H. Molecular and physiological dissection of enhanced seed germination using short-term low-concentration salt seed priming in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry* 52, p. 28-37. 2012

OLIVEIRA, J.A.R. de; MARTINS, L. H. da S.; VASCONCELOS, M.A.M.; PENA, R. da S.; CARVALHO, A.V. Caracterização física, físico-química e potencial tecnológico de frutos de camapu (*Physalis angulata* L.). *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. v.5, n.2, p. 573-583. 2011.

PARIDA, A.K. & DAS, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.60, n.3, p.324-349. 2005

PENG, Z; WANG, M.C.; LI, F; LV, HJ; LI, CL; XIA, G.M. A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8, p. 2676-2686. 2009.

PINTO, N.B.; MORAIS, T.C.; CARVALHO, K.M.B.; SILVA, C.R.; ANDRADE G.M.; BRITO G.A.C.; VERAS M.L.; PESSOA, O.D.L.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Topical anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatitis in mice. *Phytomedicine*, 17, p. 740-743. 2010.

SILVA, K.N. & AGRA, M. F. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.15, n.4, p. 344-351. 2005.

SOARES, M.B.P.; BRUSTOLIM, D.; SANTOS, L.A.; BELLINTANI, M.C.; PAIVA, F.P.; RIBEIRO I.M.; TOMASSINI T.C.B; SANTOS, R.R. Physalins B, F e G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhybity lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. *International Immunopharmacology*, 6, p. 408-414, 2006.

SOEDA Y., KONINGS M.C., VORST, O., VAN HOUWELINGEN A.M.; STOOPEN G.M., MALIEPAARD C.A. Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. *Plant Physiology*, 137, p. 354-368. 2005.

SOSA, L.; LLANES A.; REINOSO H.; REGINATO M., LUNA, V. Osmotic and specific ion effect on the germination of *Prosopis strombulifera*. *Annals of Botany*, v. 96, n. 2 p. 261-267. 2005

SOUZA, C. L. M.. SOUZA, M.O; OLIVEIRA, M. F. OLIVEIRA, L.M.; PELACANI, C.R. Morfologia de sementes e desenvolvimento pós-seminal de *Physalis angulata* L. *Acta Botanica Brasilica*, v. 24, n.4, p.1082-1085. 2010.

SOUZA, M. O. S.; SOUZA, C. L. M.; PELACANI, C.R. Germinação de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas e crescimento inicial de *Physalis angulata* L. (Solanaceae) em ambientes salinos. *Acta Botanica Brasilica*, v.25, n.1, p. 105-112. 2011.

SUN, L.; LIU, J.; LIU P.; YU Y.; M.A, L.; HU, L. Immunosuppression effect of Withangulatin A from *Physalis angulata* via heme oxygenase 1-dependent pathways. *Process Biochemistry*, 46, p. 482-488. 2011.

TAIZ, L. & ZAIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2009, 819p.

TIAN, N.; WANG, J.; XU, Z.Q. Overexpression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene *AtNHX1* from *Arabidopsis thaliana* improves the salt tolerance of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*), *South African Journal of Botany*, 77, 160-169. 2011.

VASCONCELOS, A. G. Potencial biotecnológico de *Physalis angulata* L.: uma planta medicinal. Dissertação de mestrado em ciências biológicas. Rio de Janeiro: UFRJ, 1998. 122p.

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

VIEIRA, A.T.; PINHO, V.; LEPSCH, L.B.; SCAVONE, C.; RIBEIRO, I.M.; TOMASSINI, T.; SANTOS, R.R. dos; SOARES, M.B.; TEIXEIRA, M.M.; SOUZA, D.G. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of the natural secosteroids physalins in model of intestinal ischemia and reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology*. v. 146, n. 2, p. 244-251. 2005.

VILAGROSA, A.; BELLOT, J.; VALLEJO, V.R.; GIL-PELEGRÍN, E. Cavitation, stomatal conductance, and leaf dieback in seedlings of two co-occurring Mediterranean shrubs during an intense drought. *Journal of Experimental Botany*, 54, p. 2015-2024. 2003.

VILLELA, F.A.; DONI FILHO, L.D; SEQUEIRA, E.L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietilenoglicol 6.000 e da temperatura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 26, n.11/12, p.1957-1968. 1991.

XIONG, L. & ZHU, J. K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell & Environment*, v. 25, n. 2, p.131-139. 2002.

YU, Y.; SUN, L.; MA, L.; LI, J.; HU, L.; LIU, J. Investigation of the immunosuppressive activity of Physalin H on T lymphocytes. *International Immunopharmacology*, 10, p. 290-297. 2010.

ZHANG Y.Y.; WANG, L.L.; LIU, Y.L.; ZHANG, Q.; WEI, Q.P.; ZHANG, W.H. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton pump and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in the tonoplast. *Planta*, 224, p. 545–555. 2006.

ZHU, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, v. 53, p.247–273. 2002.

ZHU, J.K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*, v.6, n.5, p.441-445. 2003.

## CAPÍTULO 1

### **Germinação de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas e crescimento inicial de *Physalis angulata* L. (Solanaceae) em ambientes salinos<sup>1</sup>**

Manuela Oliveira de Souza<sup>2</sup>, Cíntia Luiza Mascarenhas de Souza<sup>2</sup> & Claudinéia Regina Pelacani<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Este artigo foi publicado na *Acta Botanica Brasílica*, v. 25, n. 1 p. 105-112. 2011

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), BR 116, km 03, CEP 4403-460, Feira de Santana, BA, BRASIL.

## RESUMO

(Germinação de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas e crescimento inicial de *Physalis angulata* L. (Solanaceae) em ambientes salinos). O gênero *Physalis* pertencente à família Solanaceae, possui 110 espécies, das quais 11 ocorrem no Brasil. *Physalis angulata* L. destaca-se no gênero pela presença de vitaesteróides, principalmente as fisalinas, encontradas em raízes, caules e folhas, com propriedades imunomoduladora, antimicrobiana e anticancerígena. Este trabalho teve por objetivo avaliar a germinabilidade de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas e o crescimento inicial de *P. angulata* em ambientes salinos. Foram realizados experimentos nos quais as sementes foram submetidas ao osmocondicionamento (PEG 6000) e colocadas para germinar em soluções com diferentes concentrações de NaCl (2, 4, 6, 10, 12, 14 e 16 dS m<sup>-1</sup>). O controle (0 dS m<sup>-1</sup>) foi realizado com água destilada. Os parâmetros avaliados foram a germinabilidade das sementes, o índice de velocidade de germinação das sementes, o coeficiente de uniformidade de germinação e a massa seca total das plântulas. Houve diminuição da germinabilidade e do IVG, em ambos os tratamentos. No entanto, as sementes osmocondicionadas apresentaram maior tolerância ao estresse salino. Apesar da redução significativa da massa seca em relação ao aumento da salinidade do meio, o osmocondicionamento como tratamento pré-germinativo poderia ser utilizado para favorecer a tolerância ao estresse salino, uma vez que a germinabilidade foi maior para sementes osmocondicionadas.

Palavras-chave: NaCl, massa seca, PEG 6000, salinidade, taxa de germinação.

## ABSTRACT

(Germination of osmoprimed and no osmoprimed seeds and initial growth of *Physalis angulata* (Solanaceae) in saline environments). The genus *Physalis* belongs to the Solanaceae family and bear 110 species, out which 11 occur in Brazil. *Physalis angulata* L. stands out in the genus due to the presence of vitasteroids, especially physalins, found in roots, stems and leaves, showing antimicrobial anticancer and immunomodulatory properties. This study aimed to evaluate the germination of osmotic priming treatment and no primed seeds and the initial growth of *P. angulata* in saline environments. The seeds were subjected to priming (PEG 6000) and incubated in solutions with increasing concentration of NaCl (2, 4, 6, 10, 12, 14 and 16 dS m<sup>-1</sup>). Distilled water was used as control (0 dS m<sup>-1</sup>). The evaluated parameters were seed germinability, rate of germination, coefficient of uniformity and total dry mass of seedlings. There were decrease germinability and IVG in both treatments. However, primed seeds showed higher tolerance to salt stress. Despite the significant reduction in dry mass with the increasing salinity, priming as a pre-germinative treatment could be used to foster tolerance, since the germinability was higher for primed seeds.

Keywords: NaCl, dry mass, PEG 6000, salinity, rate of germination.

## 1.1 INTRODUÇÃO

*Physalis* pertencente à família Solanaceae, inclui 110 espécies e ocupa lugar de destaque na família pela presença de metabólitos poli-oxigenados e vitaesteróides (TOMASSINI et al., 2000), substâncias às quais se atribuem várias atividades farmacológicas. O gênero é de fácil reconhecimento, especialmente pelo tipo de fruto, uma baya com o cálice persistente. Para o Brasil, são reconhecidas 11 espécies (D'ARCY et al., 2005), com distribuição nas várias regiões do país, especialmente na Amazônia e no Nordeste, onde são encontradas 6 espécies.

*Physalis angulata* L., também conhecida como camapú, mullaca ou juá de capote pode ser encontrada em quase todo território brasileiro. Na Bahia, existem registros em Seabra, Água Quente, Mucugê e Rio de Contas (MATOS, 2000). *P. angulata* tem sido utilizada pela medicina popular como anticoagulante, antileucêmico, antimutagênico, antiinflamatório, antiespasmódico, antiséptico, analgésico e no tratamento de diabetes, entre outros (LIN et al., 1992; CHIANG et al., 1992). Além de ser amplamente utilizada na medicina popular, esta espécie tem despertado grande interesse tanto pelo teor de fisalinas quanto por suas propriedades farmacológicas.

Nas regiões áridas e semiáridas, o excesso de sais no solo é um fator limitante na produção agrícola. No Brasil, estas áreas estão localizadas principalmente no semi-árido nordestino, local de grande ocorrência da espécie em estudo. Em geral, a salinização afeta negativamente não só a germinação, como o desenvolvimento da planta e a produtividade. Em casos mais extremos causa a deformidade e a morte das plantas (SILVA & PRUSKI, 1997). No entanto, os mecanismos de tolerância à salinidade nos vegetais ainda não estão completamente esclarecidos pelo fato de envolver alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares (ZHU 2002; ABREU et al., 2008).

A tolerância ao estresse salino varia de acordo com a espécie. Um dos mecanismos citados que proporcionam maior resistência a ambientes salinos é a capacidade das plantas em acumular íons nos vacúolos, ou ainda solutos orgânicos de baixo peso molecular, capazes de manter a absorção de água e a turgescência celular (MUNNS & TESTER, 2008).

O condicionamento osmótico “*priming*” consiste em um pré-tratamento, no qual as sementes são imersas em solução osmótica sob tempo e temperatura determinados de modo a restringir a quantidade de água absorvida (ANWAR et al., 1978; WIEN, 1997). Considerando o padrão trifásico, ocorrem as fases iniciais da germinação (fase I e II), com os eventos pré-metabólicos germinativos, sem ocorrer o estágio de emergência da radícula (fase III) (BRADFORD, 1986; BEWLEY & BLACK, 1994). Assim, quando semeadas, a emergência das plântulas será rápida, sincronizada e em maior porcentagem. As respostas ao condicionamento osmótico variam entre as espécies, e mesmo entre os lotes de sementes de uma mesma espécie (BROCKLEHURST & DEARMAN, 1983; NASCIMENTO, 1998).

A solução de polietilenoglicol (PEG) tem sido usada como meio osmótico para simular o estresse hídrico que poderia induzir a dormência secundária (BASKIN & BASKIN, 1998) Porém é necessário que a semente alcance determinado nível de umidade, cujo teor é variável com a espécie (Borges *et al.* 2002). Diversos benefícios têm sido relatados com o emprego do osmocondicionamento, dentre estes, a maior probabilidade de se obter uma maior germinação e emergência, particularmente em condições de estresse (WARREN & BENNETT 1997; MOHAMMADI, 2009).

Compreender como estes eventos influenciam no desenvolvimento de *P. angulata* torna-se importante para os ajustes nos protocolos de propagação da espécie, principalmente quando se analisa o efeito de tratamentos pré-germinativos, como é o caso do osmocondicionamento na germinação e desenvolvimento da plântula frente ao estresse salino.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a germinabilidade de sementes osmocondicionadas e o crescimento inicial de *P. angulata* L. em ambientes salinos.

## 1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos maduros de *P. angulata* foram coletados manualmente em janeiro de 2009, no Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (38°55'30,59" W; 12°16'17,07" S). As sementes foram extraídas sob água corrente até a separação completa da polpa. Estas foram colocadas para secar sobre papel

filtro em temperatura ambiente (condições de laboratório) e foram armazenadas, sob as mesmas condições, até o momento dos ensaios.

Foram utilizadas sementes de *P. angulata* em duas condições: osmocondicionadas e não osmocondicionadas. As sementes foram condicionadas em solução aerada de polietilenoglicol (PEG 6000; VILELA et al., 1991) apresentando potencial osmótico de -1,2 MPa, previamente estabelecido como potencial de *priming* da espécie (SOUZA, 2009). As amostras de sementes (1.000 sementes) de *P. angulata* foram colocadas em tubo de ensaio, contendo 25 ml de solução osmótica, conectado a um sistema de aeração artificial (bomba de aquário). As sementes foram condicionadas nesta solução durante 10 dias e mantidas em câmara de germinação (Eletrolab) a 35°C, ajustada para um fotoperíodo de 12 horas (SOUZA, 2009). A solução de PEG 6000 foi trocada a cada dois dias e no 10º dia, as sementes foram retiradas da solução e colocadas para secar em temperatura ambiente, por 24 horas para atingir o peso inicial.

Para os experimentos de germinação, as sementes de *Physalis angulata* osmocondicionadas (OS) e não osmocondicionadas (NO) foram dispostas em placas de Petri de vidro (6 x 6 cm), contendo ao fundo duas folhas de papel germitest (semi esterilizados em estufa de secagem a 105°C, por 4 horas), umedecidas com 3 ml de água destilada (controle) e diferentes concentrações de NaCl (2, 4, 6, 10, 12, 14 e 16 dS m<sup>-1</sup>). As concentrações de cada solução foram aferidas quanto à condutividade elétrica, em aparelho Bel Engineering, modelo W 12-D. As sementes foram acondicionadas em câmara de germinação (Eletrolab) a 35°C, ajustada para um fotoperíodo de 12 horas, por 10 dias. Cada tratamento foi constituído de quatro repetições com 25 sementes cada. As avaliações foram realizadas diariamente e foram consideradas germinadas as sementes que emitiram a radícula com comprimento cerca de 2 mm. As sementes germinadas foram transferidas para placa de Petri maior (9,5 x 9,5 cm) nas mesmas condições descritas acima, por 10 dias para análise do crescimento.

As variáveis avaliadas foram taxa de germinabilidade das sementes (%), frequência relativa (%), velocidade média (dias<sup>-1</sup>), índice de velocidade de germinação das sementes (IVG, sem.dias<sup>-1</sup>) e coeficiente de uniformidade de germinação (CUG, sem.dias<sup>-2</sup>) e massa seca total das plântulas (mg/plântula).

As plântulas com 20 dias após a germinação foram colocadas em estufa de ventilação forçada a 40°C por 5 dias. Após esse período, as amostras foram armazenadas em dessecador com sílica, e posteriormente pesadas em balança de precisão de 0,0001g. O peso da massa seca por repetição foi determinado e expresso em mg/plântula (NAKAGAWA, 1999).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso. Os dados de germinação e matéria seca foram submetidos a análise de variância pelo teste F e ajustaram-se equações de regressão como variáveis dependentes do nível de salinidade. Os dados de velocidade média, IVG e CUG foram submetidos à análise de variância e para comparação entre as médias utilizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade. A análise dos dados foi realizada por meio do programa computacional SISVAR (FERREIRA, 2000).

### 1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de germinabilidade demonstram uma tendência quadrática negativa, havendo um decréscimo da porcentagem de germinação de sementes de *P. angulata* osmocondicionadas e não osmocondicionadas, à medida que aumentou a concentração das soluções salinas (Fig. 1).

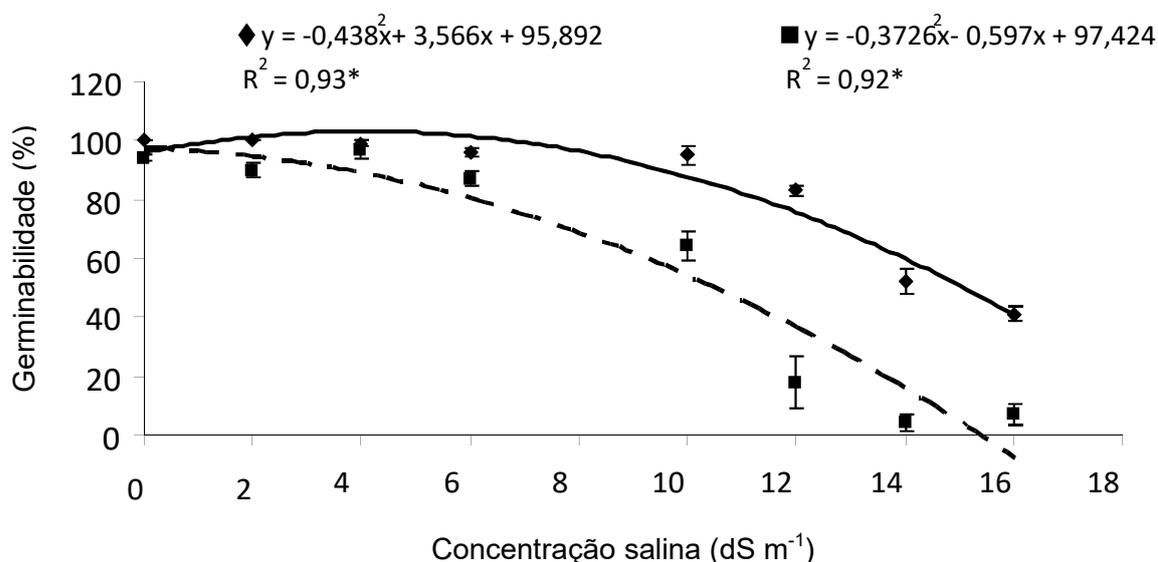


Figura 1. Germinabilidade de sementes de *Physalis angulata* L. oriundas de sementes osmocondicionadas (OS) e não osmocondicionadas (NO). OS (◆) e NO (■) \* Significativo a 5% de probabilidade.

A partir da concentração com CE de  $12 \text{ dS m}^{-1}$ , as sementes não osmocondicionadas apresentaram taxa de germinação de 18%, enquanto as sementes osmocondicionadas tiveram 83% de germinação. Nas duas maiores concentrações salinas, CEs 14 e  $16 \text{ dS m}^{-1}$ , as porcentagens de germinação foram, respectivamente de 52% e 41%, para sementes osmocondicionadas e 4% e 7% para sementes não osmocondicionadas. O osmocondicionamento proporciona maior tolerância ao estresse salino em sementes de *P. angulata*.

A redução das taxas de germinação das sementes pode ser explicado pelo efeito osmótico da solução salina sobre a absorção de água pelas sementes, bem como um provável efeito tóxico do NaCl no embrião, principalmente em sementes não osmocondicionadas. Os sais de alta solubilidade, como o NaCl, são os mais nocivos, pois as sementes ao absorverem água do substrato, absorvem também os sais que em excesso, provocam toxidez, acarretando distúrbios fisiológicos e diminuição no potencial germinativo (FERREIRA, 1997). O aumento do teor de sais no substrato provoca redução do potencial hídrico, induzindo menor capacidade de absorção de água pelas sementes, com influência direta na germinação e no desenvolvimento das plântulas (REBOUÇAS et al., 1989; ASHRAF & FOOLAD, 2005; FLORS et al., 2007).

Os diversos efeitos causados em decorrência das altas concentrações dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  estão relacionados ao intumescimento do protoplasma, promovendo alterações no metabolismo, como diminuição de energia e distúrbios na assimilação de nitrogênio. Estas alterações refletem diretamente na produção de proteínas, principalmente aquelas que compõem membranas, além de enzimas específicas envolvidas no processo germinativo (LARCHER, 2000).

Os mecanismos de tolerância das sementes submetidas à salinidade dependem da habilidade do protoplasma na compartimentalização dos íons que entram na célula. A maior parte dos íons é acumulada nos vacúolos e são diversas as modificações no metabolismo da planta induzidas pela salinidade. Entre estas destacam-se as modificações no balanço iônico, o comportamento estomático e eficiência fotossintética, o déficit hídrico e o desequilíbrio nutricional (HEUER, 1997). Outro mecanismo para reduzir os efeitos tóxicos do  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  é a redução da transpiração que leva a interrupção do fluxo xilemático para minimizar a entrada de sódio e cloro na planta (FLORS et al., 2007).

O índice de velocidade de germinação (IVG) também mostrou um aumento em sementes osmocondicionadas de *P. angulata* (Tab. 1).

Tabela 1. Velocidade média (dias<sup>-1</sup>), Índice de velocidade de germinação (IVG, sem.dia<sup>-1</sup>) e Coeficiente de uniformidade de germinação (CUG, sem.dias<sup>-2</sup>) de sementes osmocondicionadas (OS) e não osmocondicionadas (NO) de *Physalis angulata* L. submetidas a diferentes concentrações salinas.

Tipos de Sementes	Níveis de NaCl (dS m <sup>-1</sup> )							
	0	2	4	6	10	12	14	16
<b>Velocidade média (dias<sup>-1</sup>)</b>								
OS	0,2 Aab	0,3 Aa	0,3 Aa	0,3 Aab	0,3 Aab	0,3 Aab	0,2Abc	0,2 Ac
NO	0,3 Aa	0,3Aa	0,3Aa	0,2Aab	0,2 Bab	0,2 Bab	0,1 Ab	0,2 Aab
<b>IVG (sem.dia<sup>-1</sup>)</b>								
OS	7,2 Aab	8,0 Aa	8,0 Aa	7,2 Aab	7,1 Aab	5,9 Ab	3,2 Ac	2,2 Ac
NO	6,5 Aab	6,8 Bb	7,4 Aa	5,7 Ab	3,7 Bc	0,9 Bd	0,2 Bd	0,3 Bd
<b>CUG (sem.dias<sup>-2</sup>)</b>								
OS	1,4 Ab	5,3 Ab	9,0 Aa	1,0 Ab	2,3 Ab	2,6 Ab	2,1 Ab	1,4Ab
NO	2,3 Aa	3,3 Aa	3,6 Ba	2,1 Aa	2,1 Aa	0,7 Bb	0,0 Bb	0,2 Bb

Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível 5% de probabilidade.

É possível observar que o IVG para as sementes osmocondicionadas manteve-se com valores semelhantes ao controle (7,2), até a concentração salina com CE 10 dS m<sup>-1</sup>. A partir desta CE houve um decréscimo significativo no IVG nas soluções salinas com CEs 12, 14 e 16 dS m<sup>-1</sup>. Estes resultados sugerem que as sementes tratadas com solução de PEG podem ter passado por um processo de adaptação à salinidade, pelo menos até a concentração salina com CE de 10 ds.m<sup>-1</sup>, como um processo de osmorregulação, que pode ser induzido por solutos orgânicos como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos livres e prolina, evitando também a desidratação (QUEIROGA et al., 2006). Já para as sementes não osmocondicionadas, além da diminuição progressiva da taxa de germinação (Fig. 1), foi possível também observar que o IVG sofreu decréscimo com o aumento da concentração salina, neste caso na solução salina com CE de 6 dS m<sup>-1</sup>. Nas

concentrações salinas mais elevadas, este índice foi ainda menor, com diminuição de até 0,3 para a solução salina com CE de 16 dS m<sup>-1</sup>).

Os polígonos de frequência relativa obtidos para a germinação de sementes de *Physalis angulata* são mostrados na Fig. 2. Observou-se que os polígonos obtidos tanto no controle como nas diferentes concentrações salinas apresentaram-se unimodais, principalmente para sementes osmocondicionadas. No entanto, em concentração salina com CE 6 dS m<sup>-1</sup>, observou-se um polígono polimoidal para sementes não osmocondicionadas. Esses resultados refletem uma maior uniformidade da germinação, corroborada pelos coeficientes de uniformidade obtidos (Tab. 1). Não houve diferença significativa para as sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas em quaisquer das soluções testadas quando se compara os CUGs entre as soluções salinas de um mesmo tratamento. Entretanto a comparação entre os tratamentos (osmocondicionadas e não osmocondicionadas) revela que a partir de CE 12 dS m<sup>-1</sup> as sementes não osmocondicionadas apresentaram a uniformidade do processo germinativo afetada pelas soluções salinas, o que não foi observado nas sementes submetidas ao osmocondicionamento. Vale ressaltar que para as sementes osmocondicionadas, o CUG alcançou um coeficiente máximo de 9,0 sem.dia<sup>-1</sup> em contraposição aos 3,6 sem.dia<sup>-1</sup> para as sementes não osmocondicionadas (Tab. 1, Fig. 2).

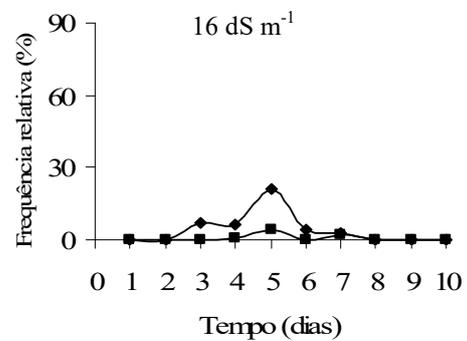
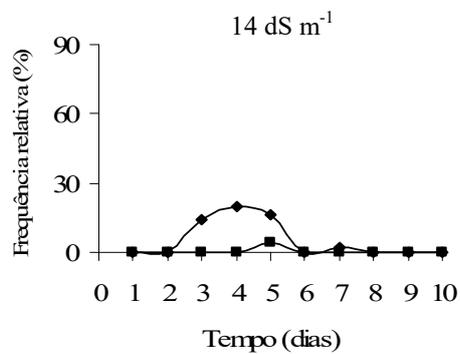
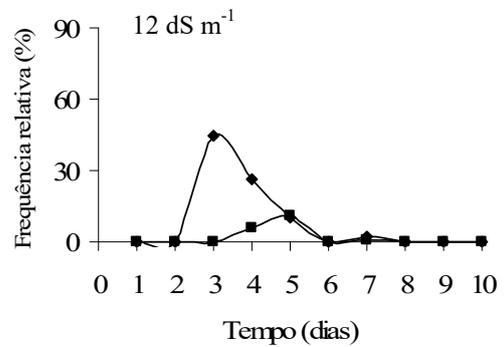
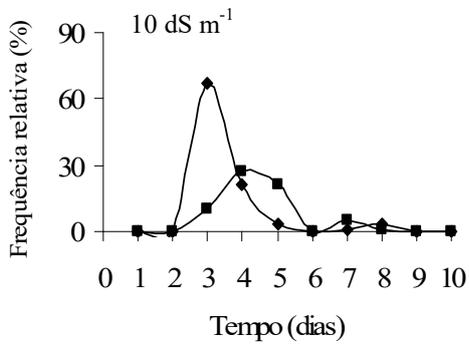
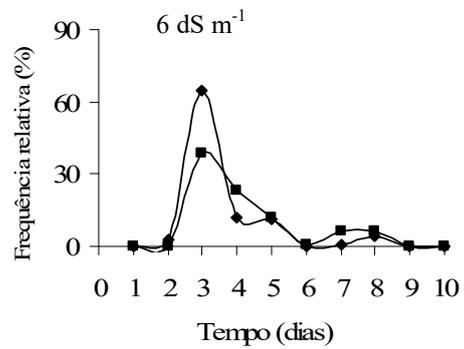
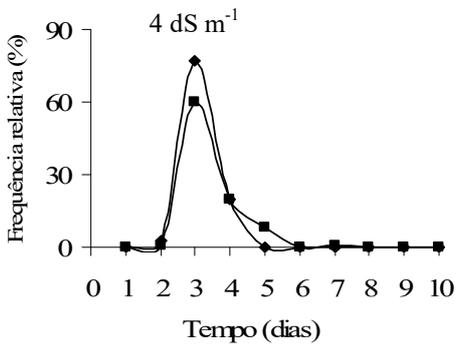
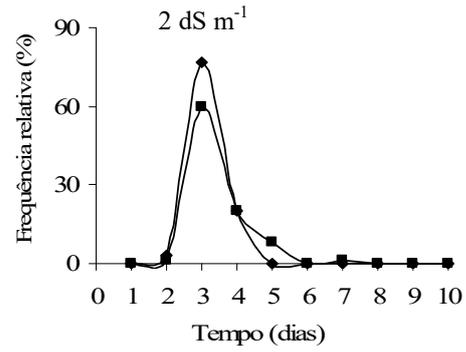
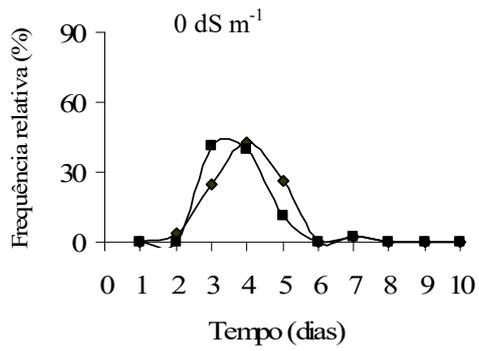


Figura 2. Polígonos de frequência relativa (FR%) da germinação de sementes de *Physalis angulata* L. para diferentes concentrações salinas. OS (◆) e NO (■).

O tempo médio para sementes osmocondicionadas, tanto para o controle como para concentrações salinas com até CE 12 dS m<sup>-1</sup> variou entre 3 a 3,7 dias. A partir da solução com CE 14 dS m<sup>-1</sup>, observa-se que os picos de germinação passam a ocorrer de 4 a 5 dias. Para as sementes não osmocondicionadas, observa-se que do controle até solução com CE 6 dS m<sup>-1</sup>, os picos de germinação apresentam-se de 3,7 a 4,2 dias. Em soluções salinas com CEs 10 e 12 dS m<sup>-1</sup>, este pico ocorreu entre 4,4 e 4,5, respectivamente. A germinação das sementes não osmocondicionadas apresentou um maior tempo médio à medida que a concentração das soluções salinas foi aumentando, ou seja, houve um efeito direto entre o número de sementes germinadas em função da maior concentração de sal, utilizada no meio para a germinação. Nas concentrações salinas mais elevadas (CEs 14 e 16 dS m<sup>-1</sup>), observou-se um atraso da germinação, em torno de 5 dias, para as sementes não osmocondicionadas (Fig. 2).

O osmocondicionamento mostrou-se eficiente na diminuição do tempo médio de germinação das sementes. No polígono de frequência relativa fica evidente que sementes osmocondicionadas tiveram um tempo médio de germinação menor que as sementes não osmocondicionadas (Fig 2). Estudos relatam que a principal vantagem do condicionamento das sementes é a maior velocidade de emergência das plântulas favorecendo a maior tolerância das sementes às adversidades climáticas, como deficit hídrico ou ainda excesso de sal no solo, por ocasião da semeadura (POWELL, 2000; CANTLIFFE, 2003). Segundo Sivritepe et al. (2003) o osmocondicionamento em sementes pode ser adotado como ferramenta tecnológica útil quando se pretende cultivar espécies sob condições de salinidade, e também em ensaios de avaliação de tolerância de espécies a estresse abiótico como a salinidade do meio de cultivo.

Houve diminuição progressiva da matéria seca de plântulas de *P. angulata*, oriundas de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas, à medida que ocorreu aumento na concentração das soluções salinas, demonstrado por tendência quadrática negativa (Fig. 3). A menor absorção de água pelas sementes atua reduzindo a velocidade dos processos fisiológicos e bioquímicos e, com isso, as plântulas resultantes desse meio, com menor grau de umidade, apresentam menor desenvolvimento, caracterizado pelo menor acúmulo de peso da matéria seca (REBOUÇAS et al., 1989). Observou-se que soluções salinas com CE a partir de 10

dS m<sup>-1</sup> levaram ao maior decréscimo na absorção de água pelas sementes acarretando uma redução gradual no peso da massa seca das plântulas, quando comparadas ao controle (CE 0 dS m<sup>-1</sup>). Este resultado evidenciou o efeito prejudicial do incremento de NaCl no substrato de germinação sobre o crescimento das plântulas de *P. angulata*.

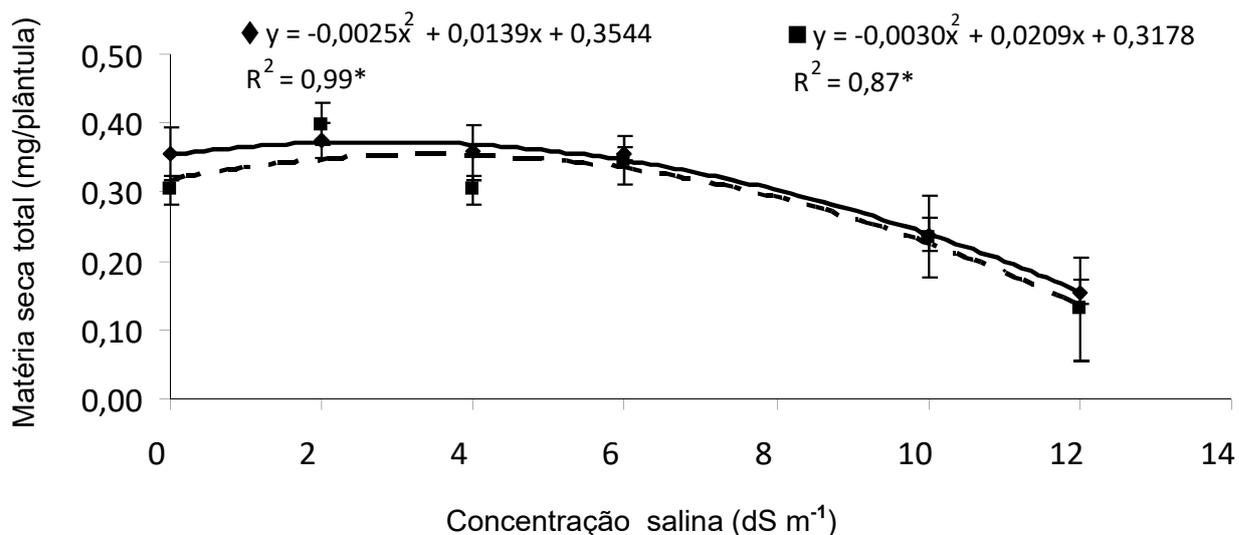


Figura 3. Matéria seca total das plântulas de *Physalis angulata* L. oriundas de sementes osmocondicionadas (OS) e não osmocondicionadas (NO). OS (◆) e NO (■). \*Significativo a 5% de probabilidade.

Bosco et al. (2009) observaram que em berinjela (*Solanum melongena* L.) os tratamentos com menores concentrações de sais proporcionaram maior produção de matéria seca. Entretanto, diferenças significativas não foram evidenciadas entre as CEs 1,7 e 6,03 dS m<sup>-1</sup>, para a produção de matéria seca de raiz e parte aérea. Esses resultados se devem à possível capacidade dessas plantas se ajustarem osmoticamente, acumulando no vacúolo os íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>, os quais chegam ao mesofilo foliar (NIU et al., 1995; ASHRAF & HARRIS, 2004), ou sintetizando e acumulando solutos orgânicos que restauram a osmolaridade da célula (MUNNS & TESTER, 2008). O acúmulo desses íons ou solutos permite a manutenção de um gradiente de potencial hídrico ao longo da planta, resultando na absorção e transporte de água até a parte aérea, mesmo que o solo esteja salinizado. As

espécies que possuem estes mecanismos são classificadas como moderadamente tolerantes à salinidade (SHANNON & GRIEVE, 1999).

As plântulas de *P. angulata* demonstraram diminuição no crescimento a partir da solução salina com CE de 10 dS m<sup>-1</sup>, nas quais tanto em plântulas provenientes de sementes osmocondicionadas como não osmocondicionadas, apresentaram 0,24 mg de matéria seca total. Em berinjela, no nível máximo de salinidade (CE de 14,10 dS m<sup>-1</sup>), as reduções de matéria seca foram de: 44,05% nas raízes e 69,70% na parte aérea (BOSCO et al., 2009). Em *P. angulata*, nessa mesma concentração salina, não foi possível observar desenvolvimento das plântulas em decorrência das anormalidades e efeitos nocivos acentuados, o que impossibilitou a obtenção da matéria seca. Em concentração salina com CE 12 dS ms<sup>-1</sup>, observou-se uma diminuição acentuada da massa seca tanto de plântulas oriundas de sementes osmocondicionadas (0,16 mg) como não osmocondicionadas (0,13 mg).

A avaliação da sensibilidade das plantas ao estresse salino é freqüentemente baseada nos dados de crescimento da planta (LIU & STADEN, 2001). Em 14 cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) irrigada com águas salinas (6,1 a 6,7 dS m<sup>-1</sup>) foi demonstrado que a batata é classificada como moderadamente tolerante à salinidade (LEVY, 1992). A explicação mais aceita para a inibição do crescimento pelo sal é a redução do potencial osmótico da solução de cultivo, podendo também ocasionar toxicidade iônica, desequilíbrios nutricionais ou ambos, devido à acumulação excessiva de certos íons nos tecidos vegetais. Além disso, as plantas fecham os estômatos para reduzir as perdas de água por transpiração, resultando em menor taxa fotossintética, o que constitui uma das causas do crescimento reduzido das espécies sob condições de estresse salino (FLOWERS, 2004; NAVARRO et al., 2007; MUNNS & TESTER, 2008).

Apesar da afirmação de que o osmocondicionamento possa ser eficaz nas primeiras fases do desenvolvimento das plântulas (GRAY et al., 1991; KHAN et al., 2009), vale ressaltar que neste trabalho, este fato não foi observado. Ficou evidente que tanto em plântulas provenientes de sementes osmocondicionadas como não osmocondicionadas ocorreu uma tendência semelhante de diminuição da matéria seca, apesar da taxa de germinação ter sido mais elevada em sementes osmocondicionadas.

## REFERÊNCIAS

ABREU, C.E.B.; PRISCO, J.T.; NOGUEIRA, A.R.C.; BEZERRA, M.A.; LACERDA C.F. & GOMES-FILHO, E. Physiological and biochemical changes occurring in dwarf-cashew seedlings subjected to salt stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology* v. 20 n. 2, p.105-118. 2008.

ASHRAF, M. & FOOLAD, M. R. Pre-sowing seed treatment-a shotgun approach to improve germination growth and crop yield under saline and none-saline conditions. *Advances in Agronomy* v. 88, 223-271. 2005.

ASHRAF, M. & HARRIS, P.J.C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* v. 166, p. 3-16. 2004.

ANWAR, A.K.; KAR-LING, T.; KNYPL, J.S.; BORKONSKA, B.; LOY, E.P. 1978. Osmotic conditioning of seed: physiological and biochemical changes. *Acta Horticulturae*, v. 1, n. 83, p. 267-278. 1978.

BASKIN, C.C & BASKIN, J.M. 1998. *Seeds - ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. London: Academic Press, 1998. 666 p.

BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1994. *Seeds: physiology of development and germination*. New York: Plenum Press., 1994. 455p.

BORGES, E.E.L.; PEREZ, S.C.J.G.; BORGES, R.C.G.; REZENDE, S.T.; GARCIA, S.R. 2002. Comportamento fisiológico de sementes osmocondicionadas de *Platymiscium pubescens* Micheli (Tamboril-da-Mata). *Revista Árvore*, v. 26, n. 5, p. 603-613. 2002.

BOSCO, M.R. de O.; OLIVEIRA, A.A.B.; HERNANDEZ, F.F.F.; LACERDA, C.F. 2009. Efeito do NaCl sobre o crescimento, fotossíntese e relações hídricas de plantas de berinjela. *Revista Ceres* v. 56 n. 3, 296-302.

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.

BROCKLEHURST, P.A. & DEARMAN, J. Interactions between seed priming treatments and nine seed lots of carrot, celery and onion. I. *Annals of Applied Biology* v. 102, n. 3, p. 577-584. 1983.

CANTLIFFE, D.J. Seed Enhancements. *Acta Horticulturae* 607: 53-59. 2003.

CHIANG, H.C.; JAW, S.M.; CHEN, C.F. Effects of Physalin B and Physalin F on Various Human Leukemia Cells *in vitro*. *Anticancer Research*, v. 12, p. 1155-1162. 1992.

D'ARCY, W.; ROJAS, C.B. & N.E.E, M.H. 2005. Solanaceae. *Flora of the Venezuelas Guyana* 9: 194-246. 2005.

FERREIRA, D.F. 2000. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: *Anais da Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria*. 2000. São Carlos: UFSCar. pp. 255-258. 2000.

FERREIRA, P.A. Aspectos físico-químicos do solo. In: H.R. Gheyji; J.E. Queiroz, J. E. & J.F. Medeiros. *Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada*. Campina Grande, UFPB/SBEA. Pp. 37-67. 1997.

FLOWERS, T.J. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* v. 55, p. 307-319. 2004.

FLORS, V.; PARADÍS, M.; GARCÍA-ANDRADE, J.; CERESO, M.; BOSCH, G.C.; PILAR, G.A.P. A tolerant behavior in salt-sensitive tomato plants can be mimicked by chemical stimuli. *Plant Signaling & Behavior*, v. 2, n.1, p. 50-57. 2007.

GRAY, D.; STECKEL, J.R.A.; DREW, R.L.K. & KEEFE, P.D. 1991. The contribution of seed characters to carrot plant and root size variability. *Seed Science and Technology*, v.19, n. 3, 655-664. 1991.

HEUER, B. Photosynthetic carbon metabolism of crops under salt stress. In: M. PESSARAKLI (ed.). *Handbook of photosynthesis*. New York Marcel Dekker. 1997.

KHAN, H.A.; AYUB, C.M.; PERVEZ, M.A.; BILAL, R.M., SHAHID, M.A. & ZIAF, K. 2009. Effect of seed priming with NaCl on salinity tolerance of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) at seedling stage. *Soil & Environment*, v. 28, n. 1, p. 81-87. 2009.

LARCHER, W. 2000. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos Rima.

LEVY, D. The response of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) to salinity: plant growth and tuber yields in the arid desert of Israel. *Annals of Applied Biology*, v. 120, p. 547-555. 1992.

LIN, Y.S.; CHIANG, H.S.; HONE, E.; SHIN, S.J. & WON, M.H. 1992. Immunomodulatory activity of various fractions derived from *Physalis angulata* L. extract. *American Journal of Chinese Medicine*, v.20, p. 233-243.

LIU, T. & STADEN, J. Growth rate, water relations and ion accumulation of soybean callus lines differing in salinity tolerance under salinity stress and its subsequent relief. *Plant Growth Regulation*, v. 34, p. 277-285. 2001.

MATOS, F.J.A. Plantas Mediciniais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. 2 ed. Fortaleza UFC. 2000.

MOHAMMADI, G.R. The influence of NaCl priming on seed germination and seedling growth of canola (*Brassica napus* L.) under salinity conditions. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, v. 5, n. 5, p. 696-700. 2009.

MUNNS, R. & TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review Plant Biology*, v. 59, p. 651-681. 2008.

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

NAKAGAWA, J. 1999. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: F.C KRZYZANOWSKY; R.D. VIEIRA & J. B. FRANÇA NETO (Eds.). *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina, ABRATES. pp 2-24. 1999.

NAVARRO, A.; BAÑON, S.; OLMOS, E.; SÁNCHEZ-BLANCO, M.J. Effects of sodium chloride on water potential components, hydraulic conductivity, gas exchange and leaf ultrastructure of *Arbutus unedo* plants. *Plant Science*, v. 172, p. 473-480. 2007.

NIU, X.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M.; PARDO, J.M. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology*, v. 109:735-742. 1995.

PASSAM, H.C.; KARAVITES, P.I.; PAPANDREOU, A.A.; THANOS, C.A. & GEORGHIOU, K. Osmoconditioning of seeds in relation to growth and fruit yield of aubergine, pepper, cucumber and melon in unheated greenhouse cultivation. *Scientia Horticulturae*, v. 38, p. 207-216. 1986.

POWELL, A.A., YULE, L.J., JINGH, H.C.; GROOTS, P.C. The influence of aerated hydration seed treatment on seed longevity as assessed by the viability equation. *Journal of Experimental Botany*, v. 51, p. 2031-2043. 2000.

QUEIROGA, R.C.F; ANDRADE NETO, R.C; NUNES, G.H.S; MEDEIROS, J.F; ARAÚJO, W.B.M. Germinação e crescimento inicial de híbridos de meloeiro em função da salinidade. *Horticultura Brasileira*, v. 24, p. 315-319. 2006.

REBOUÇAS, M.A.; FAÇANHA, J.G.V.; FERREIRA, L.G.R. & PRISCO, J.T. Crescimento e conteúdo de N, P, K e Na em três cultivares de algodão sob condições de estresse salino. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 1, n. 1, p. 79-85. 1989.

SHANNON, M.C. & GRIEVE, C.M. Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia Horticulturae*, v. 78, n. 1-4, p. 5-38. 1999.

SIVRITEPE, N.; SIVRITEPE, H.O.; ERIS, A. The effect of NaCl priming on salt tolerance in melon seedling grown under saline conditions. *Scientiae Horticulturae*, v. 97, p. 229-237. 2003.

SILVA, M.J.; SOUZA, J.G.; BARREIRO-NETO, M.; SILVA, J.V. Seleção de três cultivares de algodoeiro para tolerância à germinação em condições salinas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 27, n. 9, p. 1311-1317. 1992.

SILVA, D. & PRUSKI, F.F. *Recursos hídricos e desenvolvimento sustentável da agricultura*. Brasília, MMA, SBH, ABEAS. 1997.

SOUZA, C.L.M. Germinabilidade de sementes de *Physalis angulata* L. (Solanaceae) sob condições de estresses abióticos. Dissertação de Mestrado. Feira de Santana – Bahia. 2009. 53p.

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

VILLELA, F.A.; DONI FILHO, L.D; SEQUEIRA, E.L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietilenoglicol 6.000 e da temperatura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 26, n.11/12, p. 1957-1968. 1991.

WARREN, J.E. & BENNETT, M.A. Seed hydration using the drum priming system. *HortScience* v. 32, n. 7, p. 1220-1221.1997

WIEN, H.C. The physiology of vegetable crops. *Peppers*. New York: Cab International.1997.

YOKOI, S.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Salt stress tolerance of plants. *Jircas Working Report*, v. 23, p. 25-33. 2002.

ZHU, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, v. 53, p.247-273. 2002.

## CAPÍTULO 2

### **Germinação, crescimento inicial e expressão gênica em sementes e plântulas de *Physalis angulata* L. submetidas a estresse salino**

Manuela Oliveira de Souza<sup>1</sup>, Wilco Ligterink<sup>2</sup>, Claudinéia Regina Pelacani<sup>1</sup>, Renato Delmondez de Castro<sup>3</sup>, Henk W. M. Hilhorst<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), BR 116, km 03, CEP 4403-460, Feira de Santana, BA.

<sup>2</sup> Universidade de Wageningen, Laboratório de Sementes e Fisiologia Vegetal, Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB, Wageningen, Holanda.

<sup>3</sup> Universidade Federal da Bahia (UFBA), Instituto de Ciências da Saúde – ICS. Departamento de Biofunção. Av. Reitor Miguel Calmon, s/n- Vale do Canela, CEP 40160-100, Salvador, BA.

## RESUMO

Sementes osmocondicionadas e plântulas derivadas destas podem melhorar seu desempenho germinativo e o crescimento inicial quando sob condições de estresse abiótico. Este estudo objetivou avaliar o efeito do estresse salino na germinação de sementes osmocondicionadas e a expressão gênica em sementes e plântulas de *P. angulata*. Após o condicionamento durante 10 dias, a germinação das sementes foi realizada em bandejas plásticas contendo água ou 15 mL de solução de NaCl (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 dS m<sup>-1</sup>). Além das taxas de germinação avaliou-se massa fresca e seca da parte aérea e raízes de plântulas. O RNA total foi extraído das sementes e plântulas. As reações foram realizadas utilizando equipamento MyiQ com iniciadores específicos do gene, cDNA e SYBR *green* iQ Supermix (Bio Rad, Hercules, EUA). Os genes alvo selecionados para este estudo foram: *APX*, *GST*, tioredoxina, *HAK1* e *SOS1*. Na solução salina com CE 14 dS m<sup>-1</sup> as sementes osmocondicionadas (O) apresentaram germinação de 72%, as sementes não osmocondicionadas (NO) não germinaram. Em geral, a expressão de *APX* foi maior em sementes osmocondicionadas, que pode ter contribuído para a manutenção dos altos percentuais de germinação mesmo em concentrações salinas elevadas. A salinidade teve significativo impacto no crescimento inicial das plântulas. Na parte aérea das plântulas houve aumento na expressão dos genes *SOS1* e *HAK1* nas concentrações salinas mais altas. As expressões relativas de *APX*, *GST* e tioredoxina aumentaram em raízes das plântulas oriundas de sementes osmocondicionadas. O osmocondicionamento é uma técnica importante para incrementar a germinação de sementes de *P. angulata*, bem como a tolerância ao estresse salino em plântulas. Pode-se afirmar que existe uma correlação entre germinação, crescimento inicial, osmocondicionamento e expressão dos genes *APX*, *GST* e tioredoxina.

Palavras chave: Salinidade. Solanaceae. *Priming*. Expressão do gene alvo.

## ABSTRACT

Primed seeds and seedlings from these can improve their performance, rate of germination and initial growth under abiotic stress conditions. This study aimed at evaluate the effect of salt stress on primed seed germination and gene expression in seeds and seedlings of *P. angulata*. After priming for 10 days, seed germination was performed in plastic trays containing water or 15 mL of NaCl solution (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 and 16 dS m<sup>-1</sup>). Besides the germination rates were evaluated fresh and dry weight of shoots and roots of seedlings. Total RNA was extracted from the whole seeds and seedlings treated. Reactions were performed using an instrument MyiQ with gene specific primers, cDNA and iQ SYBR Green Supermix (Bio Rad, Hercules, USA). The target genes selected for this study were: APX, GST, thioredoxin, HAK1 and SOS1. At EC 14 dS ms<sup>-1</sup> the primed seeds had a germination rate of 72% in contrast with the non primed seeds did not germinate. The relative expression of APX was higher in primed seeds and this may have contributed to the maintenance of high germination rates in primed seeds even at high salt concentrations. Salinity had a significant impact on the growth of seedlings. The relative expression of SOS1 and HAK1 increased as there was an increase in the salt concentration of the shoot. APX, GST and thioredoxin increased expression in roots of seedlings from primed seeds. Priming is an important technique to improve seed germination *P.angulata* as well as salt tolerance in seedlings. We and can say that there is a correlation between the germination and early growth as the result of priming and the expression of APX, GST and thioredoxin.

Key words: Salt stress. Solanaceae. Priming. Target gene expression.

## 2.1 INTRODUÇÃO

Em muitas espécies a salinidade afeta a germinação e o desenvolvimento inicial, que são considerados os estádios mais sensíveis e vulneráveis ao estresse abiótico (SOSA et al., 2005; BELAQZIZ et al., 2009). Atraso na germinação (FOOLAD, 2004) e inibição do crescimento devido a salinidade é causado por baixo potencial hídrico externo, desequilíbrio de íons e toxicidade (MUNNS, 2002, KHAJEH-HOSSEINI et al., 2003; MIRANDA et al., 2010). Em plantas que são submetidas à estas condições, ocorre diminuição na absorção de água e absorção excessiva de íons (AKRAM et al., 2010).

Entretanto, soluções salinas podem ser usadas para aumentar a porcentagem de germinação e emergência de plântulas de hortaliças e plantas ornamentais pelo condicionamento osmótico que envolve o controle da embebição em uma solução de sal e desidratação subsequente (HEYDEKKER et al. 1973; IQBAL & ASHRAF 2007; VARIER et al., 2010). Esse pré-tratamento germinativo, osmocondicionamento ou *priming*, pode ainda aumentar a resistência e tolerância de sementes ao frio, altas temperaturas (YOON et al., 1997), seca (WANG et al., 2003) e sal (SIVRITEPE et al., 2003). Além dos sais, outros agentes osmóticos como o polietilenoglicol (PEG 6000 ou 8000), podem ser utilizados no osmocondicionamento, porém, a escolha da substância deve levar em consideração a influência que esta terá nos tecidos da semente.

A manutenção do processo metabólico necessário para a germinação sob estresse pode ser atribuído à expressão de genes específicos. Aumento da salinidade do meio é, muitas vezes, associada com a expressão de genes envolvidos na homeostasia da água, transporte de íons inorgânicos e com os mecanismos de transdução de sinal (BERTORELLO & ZHU, 2009; PENG et al., 2009). Nesse contexto, surge interesse em investigar os eventos moleculares nas fases de germinação e desenvolvimento inicial da plântula, e entender os efeitos reais do *priming* na tolerância à salinidade.

A expressão e atividades de proteínas antiportes são altamente reguladas pelo estresse salino (BERTORELLO & ZHU, 2009), por exemplo, *SOS1* (proteína muito sensível ao sal), que é um membro da família de proteínas antiporte SOS. Estas proteínas atuam na exportação do  $\text{Na}^+$  e regulam a homeostase celular.

Quando as plantas são submetidas a ambientes salinos são capazes de aumentar a expressão destes genes e compartimentar principalmente os íons de sódio (MUNNS & TESTER, 2008). Os transportadores de alta afinidade para o K<sup>+</sup> (*HKT1*, *HAK1*-alta afinidade K<sup>+</sup>), e de baixa afinidade para cátions (*LCT1*) e canais de cátions-não seletivos são considerados os sistemas de transporte mais específicos para regular o influxo celular do Na<sup>+</sup> (DEVENPORT & TESTER, 2000; AMTMANN et al, 2001). As proteínas *HAKs* captam o Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> em ambientes salinos (MIAN et al., 2011).

O estresse salino leva ao estresse oxidativo, com alta produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), e grave comprometimento da germinação e crescimento de plântulas. A habilidade das plantas amenizarem a produção de EROs é característica importante na regulação da tolerância ao estresse (FLORS et al., 2007; PENG et al., 2009).

Os sistemas antioxidantes enzimáticos existentes nas sementes são entre outros, superóxido dismutase (*SOD*), ascorbato peroxidase (*APX*), glutatona peroxidase (*GPX*) e catalase (*CAT*) (BESSE & BUCHANAN, 1997; APEL & HIRT, 2004; DOS SANTOS & REY, 2006). Tioredoxina também pode fornecer proteção antioxidante permitindo desintoxicação fotoquímica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzidos no cloroplasto durante o estresse (DIETZ et al., 2006).

Embora haja amplo conhecimento dos mecanismos fisiológicos e moleculares que regulam a tolerância ao sal particularmente em *Arabidopsis thaliana* (PENG et al., 2009; TIAN et al., 2011), esse conhecimento não é claro para muitas espécies selvagens como *Physalis angulata* (Solanaceae), amplamente utilizado na medicina popular devido à presença de seco-esteróide (fiscalinas), que ocorre naturalmente em caules e folhas (BASTOS et al., 2008). O efeito anti-inflamatório e imunomodulador de fiscalinas B, D, F e G, tem sido bem documentado (VIEIRA et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2006; SOARES et al., 2006; DAMU et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2009, LEE et al. 2009; PINTO et al., 2010; YU et al., 2010).

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da salinidade na germinação, crescimento inicial de *P. angulata* e na expressão de genes relacionados a sementes osmocondicionadas e plântulas submetidas a estresse salino.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Material vegetal e sementes

As sementes de *P. angulata* foram obtidas de frutos (coloração amarela) em estágio uniforme de maturação, a partir de plantas cultivadas em casa de vegetação (Feira de Santana, Bahia, Brasil 38°55'30,59"W; 12°16'17,07"S) em dezembro de 2010. Após beneficiamento as sementes foram submetidas à dessecação em solução saturada de cloreto de potássio, proporcionando umidade relativa de 11%, a temperatura de 20°C. O conteúdo de água foi determinado em amostras de 200 sementes pela diferença entre o peso das sementes frescas e secas após 17 horas em estufa a 103°C (ISTA, 2007). As sementes foram armazenadas em tubos de 5 ml a 4°C até que fossem utilizadas para os experimentos.

### 2.2.2 Osmocondicionamento e germinação

Foram utilizadas sementes de *P. angulata* em duas condições: osmocondicionadas (O) e não osmocondicionadas (NO). Para o osmocondicionamento amostras de 1000 sementes foram colocadas em tubos de 50 ml contendo 25 ml de PEG 8000 (Sigma) a -1,2 MPa (VILELA & BECKERT 2001) e mantidas em estufa a 35°C no escuro. Foram realizados testes prévios de condicionamento osmótico para a obtenção dos resultados com a utilização de PEG 6000 e PEG 8000, como os resultados foram semelhantes entre os dois agentes osmóticos, foi adotado o uso de PEG 8000. Após 10 dias de condicionamento osmótico, as sementes foram lavadas em água destilada e mantido à temperatura ambiente para atingir o peso inicial. As sementes foram dispostas em bandejas de plástico (15 x 21cm) com papel de filtro, contendo 15 mL de água ou solução de NaCl (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 dS m<sup>-1</sup>). Os testes de germinação foram realizados em 4 repetições de 50 sementes por tratamento (ISTA, 2007) e a germinação foi acompanhada durante 10 dias a 35°C e fotoperíodo de 12 horas. As sementes foram consideradas germinadas quando as radículas emergiram pelo menos 2mm. As variáveis relacionados com a germinação, tais como G<sub>max</sub> (%), a taxa de

germinação ( $t_{50}$ ) e uniformidade ( $u_{8416}$ ) foram calculados com o software Germinator (JOOSEN et al., 2010).

### 2.2.3 Extração de RNA

A partir dos resultados dos experimentos descritos no item 2.2.2 foram estabelecidos os tratamentos para os ensaios moleculares. O RNA total foi extraído de sementes inteiras nas seguintes condições: 1. sementes secas, 2. sementes osmocondicionadas (O), 3. sementes osmocondicionadas submetidas a solução salina (O + sol. salina), 4. sementes não osmocondicionadas e expostas a solução salina (NO + sol. salina). O tempo de exposição à solução de cloreto de sódio com CE 14 dS m<sup>-1</sup> foi de 24 horas.

Para cada tratamento foram armazenadas 50 sementes em freezer a -80°C. Estas sementes foram maceradas em nitrogênio líquido com dismembrador a 1.200 rpm por 2 minutos e adicionado ao tubo 1,5 mL de fenol clorofórmio (5:1), 5 mL de tampão TLE (0.18 Tris, 0.09 M LiCl, 4,5 mM EDTA, 1% SDS ajustado para pH 8,2) e 5 µL de β-mercaptoetanol que foi adicionado ao tampão. Após centrifugar por 10 minutos o sobrenadante foi transferido para novos tubos contendo 1000 µL de solução fenol-clorofórmica (1:1), submetido a nova centrifugação e lavada com 1000 µL de clorofórmio para remover o fenol residual. As amostras de RNA foram precipitadas durante a noite a -20°C em 100 µL de 10M LiCl. Após o período noturno, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos em centrífuga a 4°C, o sobrenadante foi removido e adicionado etanol gelado a 70%. Nova centrifugação foi efetuada por 5 minutos a 4°C sendo posteriormente removido o sobrenadante. As amostras foram colocadas para secar em temperatura ambiente e após 15 minutos foram ressuspensas em 20 µL de água DEPC.

O RNA total foi armazenado a -80°C. A qualidade do RNA foi analisado em gel de agarose a 1,2% corado com gel *red*. A concentração e a pureza do RNA total foi avaliada em NanoDrop-ND 1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies, New Zealand) utilizando alíquota de 1 µL da solução de RNA total. A pureza do RNA foi estimada a partir da relação absorvância A<sub>260</sub>/280nm que é uma estimativa de contaminação, principalmente por proteínas e fenóis.

#### 2.2.4 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit cDNA iScript (Bio Rad, Hercules, CA, EUA), seguindo as recomendações descritas no protocolo do fabricante. As reações foram preparadas por meio da mistura de 1µg de RNA total com o iScript mix da reação e iScript transcriptase reversa e realizada em termociclador (iCycler, Bio Rad, Hercules, CA, EUA), com a seguinte sequência de programação: 5 min a 25°C, 30 min a 42°C e 5 min a 85°C. Um controle negativo também foi incluído para verificação de contaminação dos reagentes e da água utilizada nas reações.

#### 2.2.5 Desenho dos *primers* e reação de PCR em tempo real (qPCR)

Os genes alvos selecionados para este estudo foram: ascorbato peroxidase (APX); glutationa-S-transferase (GST); tioredoxina; *high-affinity potassium transporter protein 1 (HAK1)* e *salt overly sensitive 1 (SOS1)*. Os genes de referência foram: SGN-U 584254 e proteína fosfatase 2A (SGN-U 567355) (Tabela 1).

Os *primers* foram desenhados baseados nas sequências de espécies pertencentes a família Solanaceae, depositadas nos bancos de dados GenBank/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e *Sol genomics network* (<http://solgenomics.net/>), utilizando o programa *GeneFisher* (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/old.html>)(GIEGERICH et al., 1996).

Estes *primers* foram testados em reação de PCR semiquantitativa, no qual foi possível visualizar amplificação das bandas de interesse através do gel de agarose a 1,2%. As reações de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas no equipamento iCycler iQ (Bio Rad, Hercules, CA, EUA) utilizando 0,5 µl de cada *primer forward* e *reverse* específicos, 5 µl de cDNA e 10 µl de iQ SYBR *green* Supermix (Bio Rad, Hercules, CA, EUA). Os ciclos de amplificação foram: 3 min a 95°C, em seguida, 40 ciclos de 15s a 95°C seguido de 1 min 60°C. Um controle negativo foi empregado para cada par de primer testado. As reações de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas em 3 repetições biológicas e 2 repetições técnicas para cada tratamento. Os valores de mudança de expressão gênica (mRNA) nos diferentes tratamentos em relação ao controle (sementes secas) foram

calculados utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) e plotados em gráficos para comparação.

Tabela 1. *Primers* específicos utilizados nas reações de PCR em tempo real

Gene	<i>Forward</i> (sequências de 5' para 3')	<i>Reverse</i> (sequências de 5' para 3')
APX	AGGACCTGATGTTCCCTTTTAC	AAGGTATGGGCACCAGAGAG
GST	AGYCCTCTGCTTTTGCAGATG	AAGGATCAGAAGGGAGCAAAGG
Tioredoxina	GGYGTYGAWGAAATCCTCTG	TTCCAGCTCCATCAGCAAG
<i>HAK1</i>	CGTGAGACCTGAAGAAAGGTTT	CAAACCTCTACGTCGTCCATGTG
<i>SOS1</i>	CCTTGTTGTGCTGTGAAGT	TCGGCTTTGGTATTGCTTT
SGN-U 584254	GAGAGTCATGCCTAGTGGTTGG	CGAAGACAAGGCCTGAAATGTG
SGN-U 567355	CGATGTGTGATCTCCTATGGT	AAGCTGATGGGCTCTAGAAAT

## 2.2.6 Crescimento, extração de RNA e ensaios de PCR em tempo real (qPCR) em plântulas

As plântulas foram obtidas de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas que foram dispostas em bandejas plásticas (15 x 21 cm) contendo ao fundo papel germitest com 15 ml de água (controle) ou solução salina (2, 4, 6 e 8 dS m<sup>-1</sup>). Após 10 dias da semeadura todas as bandejas contendo as plântulas foram fotografadas com câmera digital (Nikon D80 with Nikkor AF-S 60 mm f/2.8 G Micro ED; Nikon). As raízes das plântulas obtidas foram medidas a partir dessas fotografias utilizando o programa *Image J* (RASBAND, 2009). As plântulas foram separadas em partes aéreas e raízes, pesadas em balança analítica para obtenção da matéria fresca. O peso seco foi obtido depois da secagem durante 24 horas a 104°C. O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 plântulas para cada tratamento. Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

Plântulas com idade de 10 dias provenientes de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas foram submetidas as seguintes concentrações salinas 2, 4, e 6 dS m<sup>-1</sup>, além do controle (água).

As plântulas foram separadas em parte aérea e raiz, acondicionadas em tubos eppendorf e mantidas em freezer -80°C. O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido com dismembrador a 200 rpm durante 1 minuto, cuja extração de

RNA foi feita utilizando RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), seguindo-se as recomendações do fabricante. Os RNAs totais foram analisados em gel de agarose a 1,2% e quantificados em NanoDrop-ND 1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies, New Zealand) utilizando alíquotas de 1 µL da solução de RNA total.

Os *primers* utilizados para as reações de qPCR com as plântulas foram os mesmos empregados para os experimentos com sementes (Tabela 1). Os valores de mudança de expressão gênica (mRNA) nos diferentes tratamentos em relação ao controle (plântulas cultivadas em água) foram calculados utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) e plotados em gráficos para comparação.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Osmocondicionamento e germinação

A taxa de germinação das sementes de *P. angulata* diminuiu à medida que aumentou a concentração salina em ambas as condições das sementes não osmocondicionadas e osmocondicionadas (Figura 1). A diferença entre os resultados das sementes submetidas ao estresse salino tornou-se mais evidente a partir da solução salina com condutividade elétrica (CE) de 12 dS m<sup>-1</sup>, na qual sementes osmocondicionadas apresentaram taxa de germinação de 87%, enquanto 20% das sementes não osmocondicionadas germinaram (Figura 1).

Na solução salina com CE de 14 dS m<sup>-1</sup>, as sementes osmocondicionadas apresentaram taxa de germinação de 72% em contraposição com as sementes não osmocondicionadas que não germinaram. Esses dados são consistentes com o trabalho realizado por Souza et al. (2011), que também demonstraram os benefícios causados pelo osmocondicionamento em sementes de *P. angulata*, com a obtenção de altas taxas de germinação, melhor uniformidade e maior índice de velocidade de germinação em condições salinas.

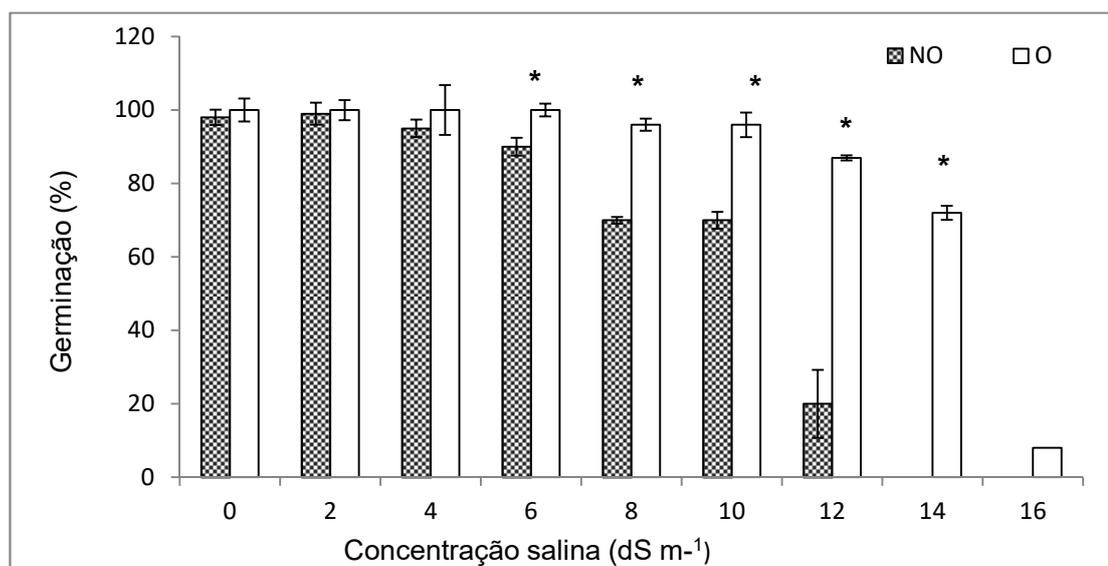


Figura 1. Germinação (%) de sementes não osmocondicionadas (NO) e osmocondicionadas (O) de *P. angulata* submetidas a diferentes concentrações de soluções salinas. \* diferentes significativamente pelo teste t ( $p < 0,05$ ).

O tempo que 50% das sementes levam para germinar em um determinado período de avaliação é representado pelo  $t_{50}$  (Figura 2A). As sementes osmocondicionadas apresentaram menor  $t_{50}$  que as sementes não osmocondicionadas. Sementes de *Brassica oleraceae* também germinaram mais rapidamente quando foram previamente osmocondicionadas (SOEDA et al., 2005).

O tempo gasto que 16% a 84% das sementes germinaram ( $u_{8416}$ ) representa a uniformidade (Figura 2B), e pode-se observar que este parâmetro foi maior em sementes osmocondicionadas em todos os níveis de salinidade, com destaque para as sementes submetidas a maiores concentrações salinas e a partir de 8 dS m<sup>-1</sup>. O osmocondicionamento como técnica para melhorar o desempenho germinativo das sementes já foi comprovado em várias culturas (McDONALD, 2000; NAKAUNE et al., 2012), com utilização do polietilenoglicol e cloreto de sódio como agentes osmóticos que controlam a entrada de água na célula e permitem que a semente retome o processo germinativo em condições propícias (SIVRITREPE et al., 2003; SOEDA et al., 2005; VARIER et al., 2010, NAKAUNE et al., 2012).

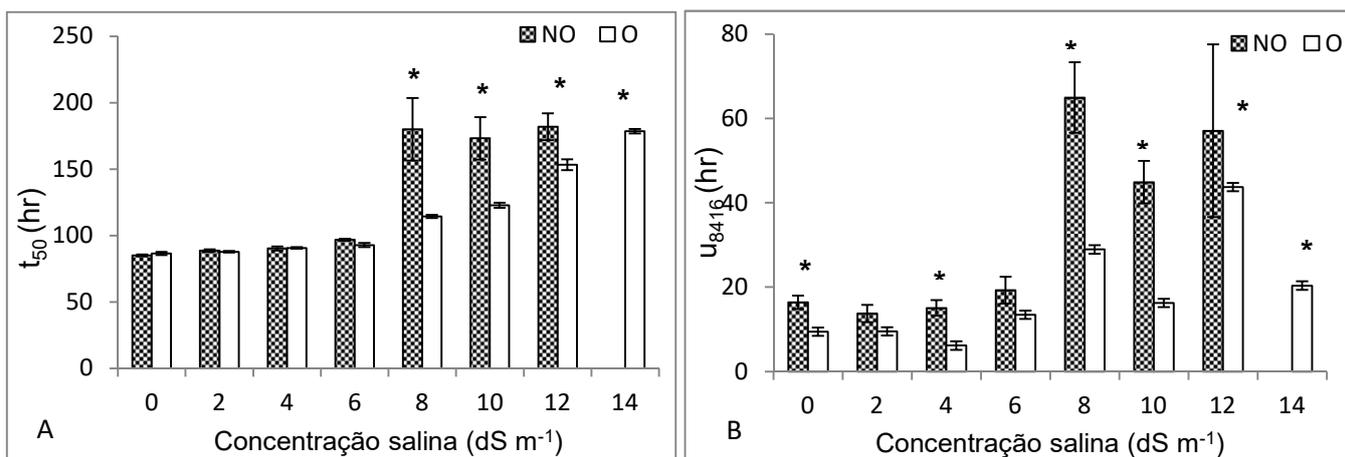


Figura 2.  $t_{50}$  (hr) (A) e  $u_{8416}$  (hr) (B) de sementes não osmocondicionadas (NO) e osmocondicionadas (O) de *P. angulata* submetidas a diferentes concentrações de soluções salinas. \*diferentes significativamente pelo teste t ( $p < 0,05$ ).

Estudos tem demonstrado que o osmocondicionamento é uma técnica útil, principalmente para lotes de sementes com baixo vigor de espécies economicamente importantes (SOEDA et al., 2005; FLORS et al., 2007; VARIER et al., 2010). A agricultura têm se beneficiado com os efeitos dessa técnica, que pode ser estendido para estudos com sementes de espécies com significativas propriedades terapêuticas, tal como *P. angulata*. Estes estudos possibilitariam melhor uniformidade da germinação em experimentos de campo, visando a produção em larga escala, além de maiores taxas de germinação, especialmente em condições ambientais adversas.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que é recomendável a utilização do osmocondicionamento como pré-tratamento germinativo, utilizando o PEG como agente osmótico a fim de padronizar e diminuir o tempo de germinação, especialmente quando as sementes são submetidas a altas concentrações salinas.

As porcentagens de germinação finais de *Physalis peruviana* e *P. ixocarpa* diminuíram com o aumento da concentração de NaCl. Apesar de ambas as espécies terem germinado nos diferentes níveis de salinidade, *P. peruviana* apresentou maiores taxas de germinação que *P. ixocarpa* (YILDIRIM et al., 2011). Segundo os autores, *P. peruviana* é tolerante ao estresse salino durante a germinação, mas torna-se sensível quanto à emergência e os estágios iniciais das plântulas.

Em estudos com *Physalis peruviana*, submetidas a diferentes níveis de salinidade, Miranda et al. (2010) afirmaram que esta espécie pode ser considerada

como moderadamente tolerante as condições salinas. Uma vez que parâmetros como taxas de crescimento relativo e assimilação líquida foram estimulados pelo que os autores denominaram de estresse salino moderado, com concentração de 30mM NaCl, que corresponde a solução salina com CE em torno de 3,5 dS m<sup>-1</sup>.

### 2.3.2 Expressão gênica em sementes de *P. angulata*

O gene *SOS1* codifica uma proteína antiporte de membrana Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, responsável pela exclusão do sódio do apoplasto (LIU et al., 2000). *HAK1* é um transportador de alta afinidade com o K<sup>+</sup>, que também regula o influxo de Na<sup>+</sup> na célula (AMTMANN et al., 2001). A expressão relativa do gene *SOS1* (Figuras 3A) em sementes não apresentou diferenças entre os tratamentos. No entanto, a expressão de *HAK1* foi maior em sementes O e NO submetidas a solução salina. A expressão foi medida em sementes que foram expostas a solução salina durante 24 horas, provavelmente este tempo não tenha sido suficiente para aumentar a expressão de *SOS1*.

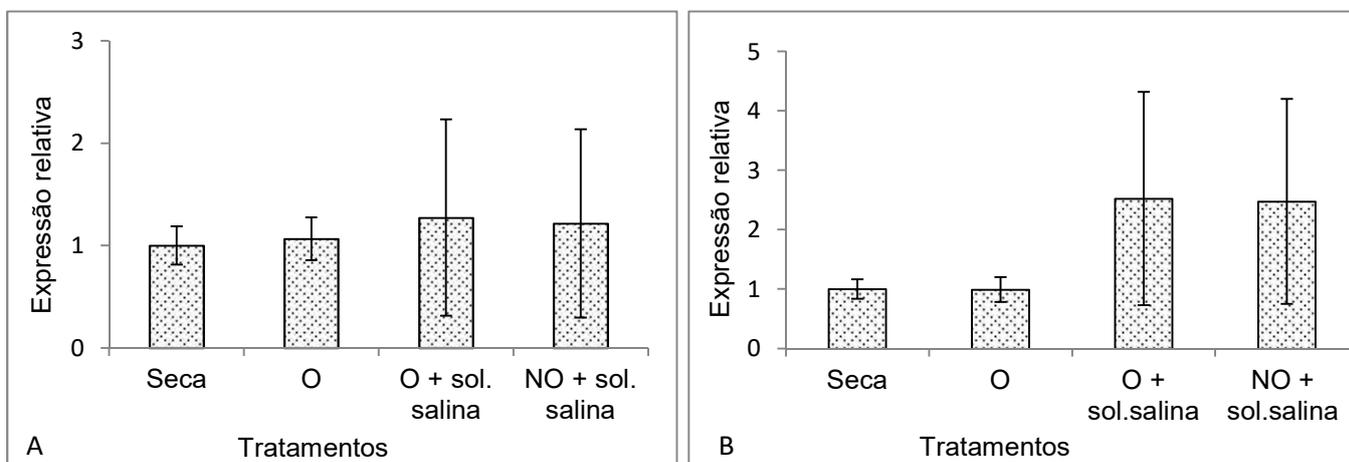


Figura 3. Expressão relativa dos genes *SOS1* (A) *HAK1* (B) em sementes de *P. angulata*, submetidas a diferentes tratamentos, osmocondicionadas (O), osmocondicionadas e submetidas a solução salina de 14 dS m<sup>-1</sup> (O + sol. salina) não osmocondicionadas e submetidas a solução salina de 14 dS m<sup>-1</sup> (NO + sol. salina)

Para investigar a influência do osmocondicionamento na tolerância ao estresse salino em sementes de *P. angulata* foi medida a expressão relativa dos genes

ascorbato peroxidase (*APX*), glutationa-S-transferase (*GST*) e tioredoxina, que codificam importantes enzimas detoxificadoras.

Sementes osmocondicionadas (O) e não osmocondicionadas (NO) submetidas a solução salina apresentaram maiores expressões do gene *APX* (Figura 4A). A regulação positiva de *APX* pode ter contribuído para a manutenção das altas taxas de germinação em sementes O mesmo em concentrações salinas altas (Figura 1). A absorção lenta de água durante o osmocondicionamento faz com que as sementes reparem os danos no DNA, garantindo a formação de RNAs livres de erros de replicação e transcrição, o que não acontece com as sementes não osmocondicionadas (VARIER et al., 2010).

Não houve efeito do osmocondicionamento na expressão dos genes *GST* e tioredoxina, já que a expressão em todos os tratamentos foi inferior ao controle (sementes secas) (Figura 4B e Figura 5).

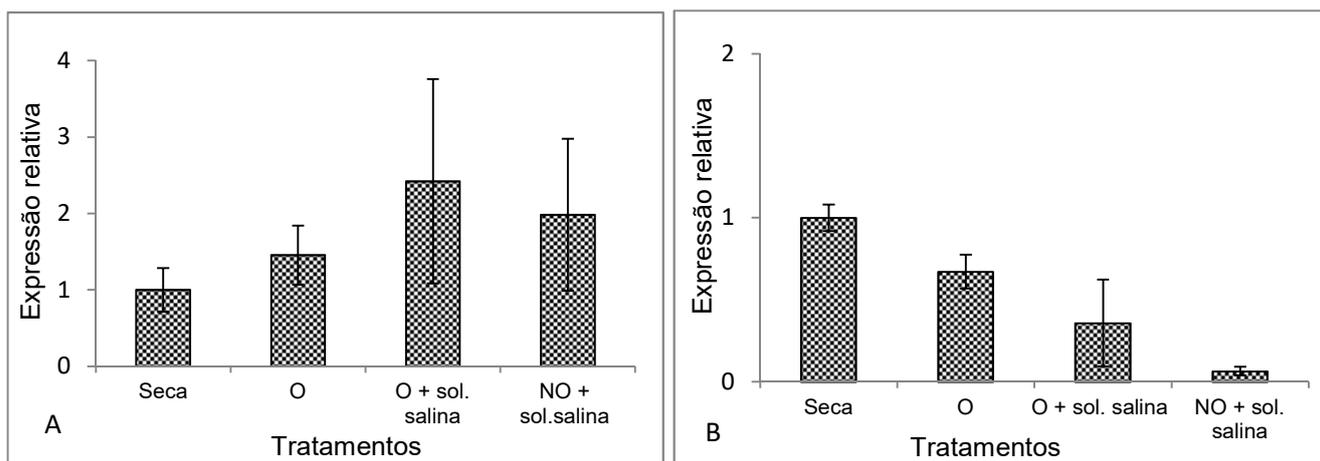


Figura 4. Expressão relativa dos genes *APX* (A) e *GST* (B) em sementes de *P. angulata*, submetidas a diferentes tratamentos, osmocondicionadas (O), osmocondicionadas e submetidas a solução salina de  $14 \text{ dS m}^{-1}$  (O + sol salina) não osmocondicionadas e submetidas a solução salina de  $14 \text{ dS m}^{-1}$  (NO + sol. salina).

De acordo com Varier et al. (2010), durante a embebição, a energia metabólica da semente osmocondicionada e seca é maior do que da semente não osmocondicionada, tendo a técnica do osmocondicionamento efeito positivo no vigor das sementes. Segundo Soeda et al. (2005) a expressão dos genes que codificam componentes do maquinário protéico como fatores de iniciação, tradução e alongamento aumentam durante o osmocondicionamento. Este fato pode explicar porque as sementes O apresentaram as maiores taxas de germinação (Figura 1).

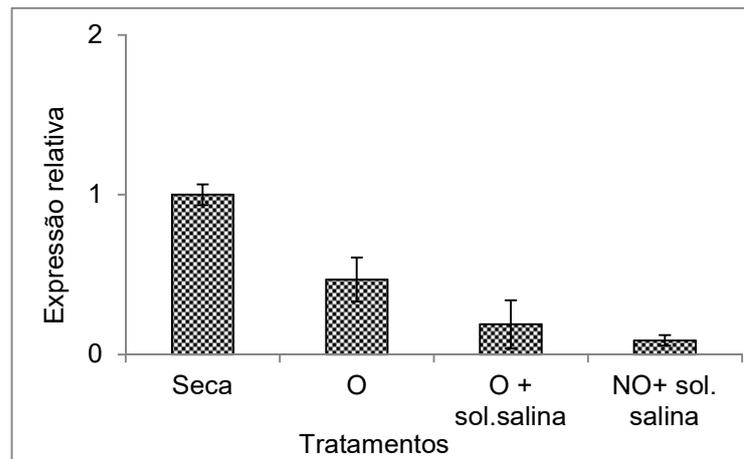


Figura 5. Expressão relativa do gene tioredoxina em sementes de *P. angulata* submetidas a diferentes tratamentos, osmocondicionadas (O), osmocondicionadas e submetidas a solução salina de 14 dS m<sup>-1</sup> (O + sol. salina) não osmocondicionadas e submetidas a solução salina de 14 dS m<sup>-1</sup> (NO + sol. salina).

### 2.3.3 Crescimento e expressão gênica da parte aérea de plântulas de *P. angulata*

A salinidade teve impacto significativo no crescimento inicial das plântulas de *P. angulata*. Tanto para matéria fresca quanto seca, plântulas de sementes osmocondicionadas produziram mais matéria seca do que plântulas provenientes de sementes não osmocondicionadas. No entanto, a magnitude da resposta ao tratamento variou com a dosagem do sal aplicado. Houve uma tendência de estimular a produção de matéria seca em concentrações salinas mais amenas entre 2 e 4 dS m<sup>-1</sup>. Na dosagem mais elevada (8 dS m<sup>-1</sup>), independente do tratamento inicial das sementes, as matérias fresca e seca da parte aérea foram afetadas (Figura 6A e Figura 6B).

Estes resultados mostram que mesmo sob condições salinas, a planta cresce e a depender da concentração da solução, ocorre um estímulo para que o crescimento ocorra, o qual pode ser atribuído aos mecanismos que impedem que os íons atuem como substâncias tóxicas. A produção de biomassa foi ainda estimulada por salinidade moderada, podendo-se sugerir o desenvolvimento de mecanismos morfológicos e fisiológicos em *P. angulata*, principalmente o de ajustamento osmótico para manter o potencial hídrico dos tecidos e a síntese de proteínas envolvidas na proteção contra os radicais livres.

As diferenças mais acentuadas entre parte aérea (hipocótilo+ cotilédone) de plântulas crescidas a partir de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas ocorreu a partir de 2 dS m<sup>-1</sup>, no qual houve aumento da matéria fresca a medida que a concentração salina aumentou (Figura 6A e 6B). Os valores de matéria fresca obtidos de plantas oriundas de sementes osmocondicionadas foram 4,8; 5,41 e 5,97 mg em soluções salinas com CE de 2, 4 e 6 dS ms<sup>-1</sup>. Em solução salina com CE de 6 dS ms<sup>-1</sup>, os valores de matéria seca da parte aérea de plântulas provenientes de sementes não osmocondicionadas e osmocondicionadas foram 0,23mg e 0,28 mg respectivamente (Figura 6B).

O acúmulo de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> nos tecidos tem sido relacionado a redução do crescimento da planta (GARCÍA-LEGAZ et al., 2005). Em estudos de salinidade com *Phlomis purpurea*, Alvarez et al. (2012) observaram que a redução do crescimento das plantas foi baixo, em solução salina com CE de 4 dS ms<sup>-1</sup>, refletindo na tolerância desta espécie a este nível de salinidade.

O estresse salino reduziu significativamente as matérias fresca e seca de duas espécies de *Physalis*. As massas frescas de *P. peruviana* e *P. ixocarpa* foram reduzidas em 75%-60% a 30 mM (3,5 dS m<sup>-1</sup>) de NaCl e 100%-72% a 60 mM (7 dS m<sup>-1</sup>, respectivamente (YILDIRIM et al., 2011). Já na parte aérea de *P. angulata*, observa-se incremento das matérias fresca e seca em solução salina com CE de 4 dS m<sup>-1</sup>. Na solução salina com CE 8 dS m<sup>-1</sup> ocorreu redução de ambas as matérias fresca e seca, independente se as plântulas foram provenientes de sementes osmocondicionadas ou não osmocondicionadas.

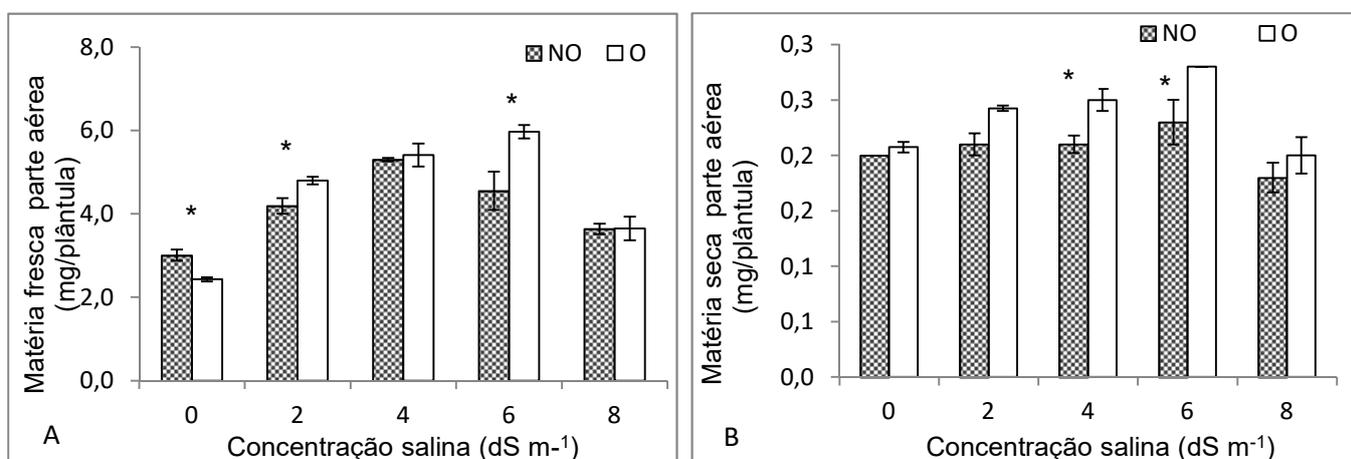


Figura 6. Matéria fresca (A) e seca (B) da parte aérea de plântulas de *P. angulata*, submetidas a diferentes concentrações de soluções salinas. \* diferentes significativamente pelo teste t (p<0,05)

*SOS1* e *HAK1* foram regulados positivamente, a medida que ocorreu aumento na concentração das soluções salinas as quais as plântulas foram submetidas (Figuras 7A e 7B). No entanto, a expressão foi maior na parte aérea de plântulas oriundas de sementes osmocondicionadas (Figuras 7A e 7B).

Estes resultados, podem em parte ser explicados, pelo fato do osmocodicionamento exercer importante papel na expressão de proteínas que mantêm a organização das membranas celulares. Muitos genes expressos durante o osmocondicionamento codificam proteínas de membranas, o que provavelmente proporcionou efeito benéfico na manutenção das funções celulares e na regulação dos íons presentes em maiores quantidades durante o estresse salino (VARIER et al., 2010). Estudos com *Arabidopsis thaliana* mostraram que *SOS1* não é essencial para o crescimento da planta e desenvolvimento normais, mas é crítico para desenvolver tolerância ao sal (WU et al., 1996; SHI & ZHU, 2002). Estudos com tomate mostraram que o silenciamento do gene *SOS1* provocou efeitos negativos no crescimento das plantas sob estresse salino (OLÍAS et al., 2009).

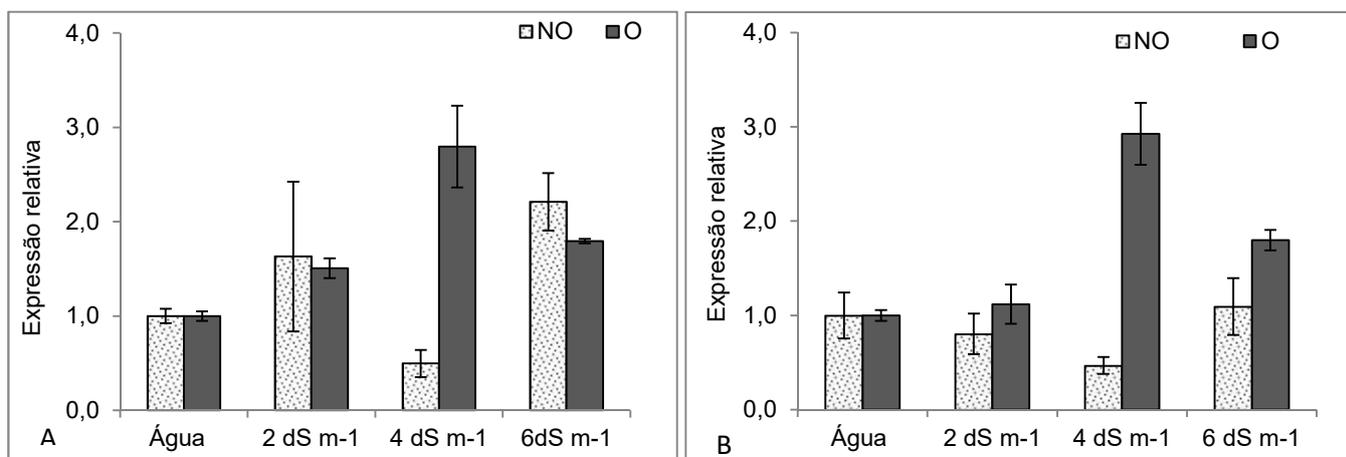


Figura 7. Expressão relativa dos genes *SOS1* (A) e *HAK1* (B) da parte aérea de plântulas de *P. angulata*, submetidas a diferentes concentrações de soluções salinas.

A expressão dos genes *APX*, *GST* e tioredoxina foi positiva principalmente em plântulas oriundas de sementes osmocondicionadas (Figuras 8A, 8B e Figura 9). A solução com CE de 4 dS m<sup>-1</sup>, proporcionou aumento da expressão desses genes que codificam enzimas antioxidantes. Portanto o osmocondicionamento também exerceu proteção na parte aérea das plântulas expostas a solução salina.

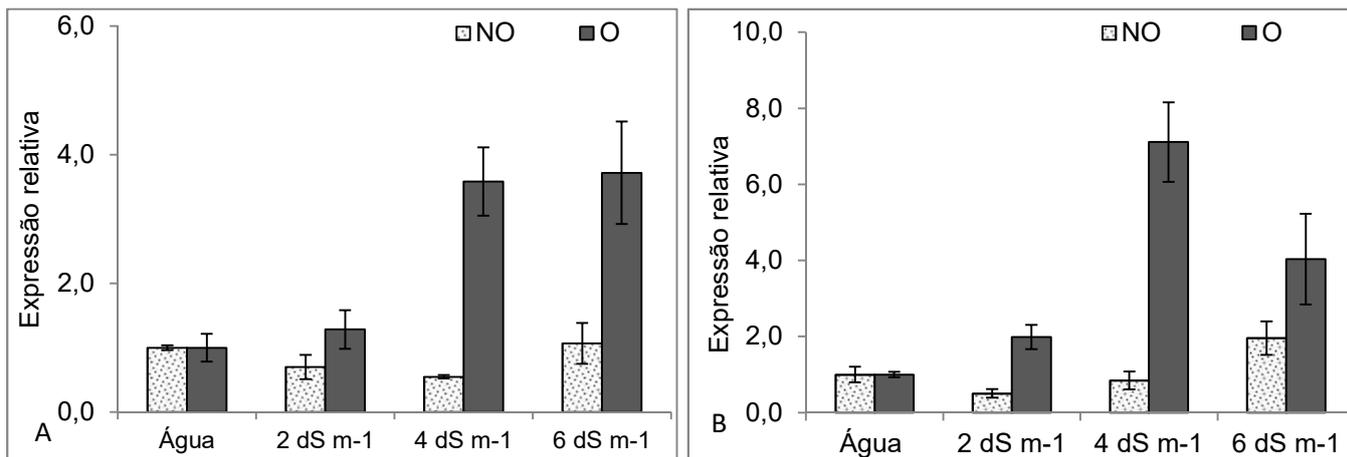


Figura 8. Expressão relativa dos genes APX (A) e GST (B) da parte aérea de plântulas de *P. angulata*, submetidas a diferentes concentrações de solução salina.

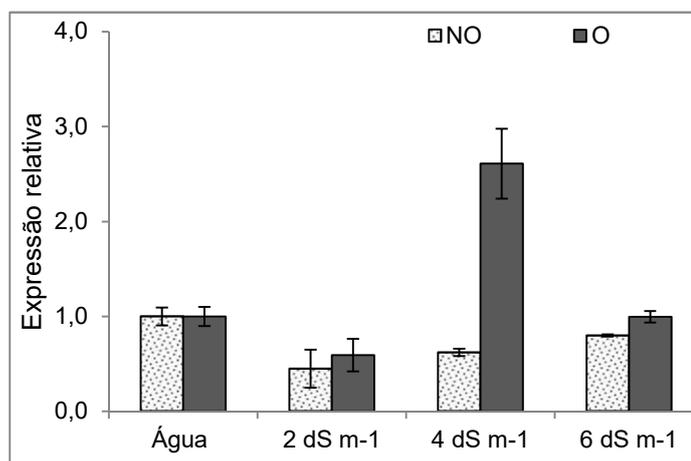


Figura 9. Expressão relativa do gene tioredoxina da parte aérea de plântulas de *P. angulata* submetidas a diferentes concentrações de solução salina.

O aumento da concentração das espécies reativas de oxigênio (EROs) imposta por diferentes tipos de estresse incluindo o salino, desencadeia mecanismos para minimizar os efeitos causados pela presença dos EROs nos tecidos vegetais. Entre esses mecanismos estão a ação das enzimas antioxidantes (MUNNS & TESTER, 2008). Estas enzimas incluem entre outros a glutathione peroxidase (GPX), glutathione-S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e tioredoxina (McFARLAND et al., 1999; WEDDERBURN et al., 2000; APEL & HIRT, 2004; ASHRAF et al., 2008).

A produção de EROs em compartimentos celulares como mitocôndrias e cloroplastos pode mudar o transcriptoma nuclear, indicando que há um sinal

transmitido a partir dessas organelas para o núcleo. Apesar da identidade desse sinal permanecer desconhecida, sensores de EROs podem ser ativados, induzindo a cascata de sinalização, e em última análise alterar o nível de expressão gênica. Finalmente, EROs podem mudar a expressão gênica alterando as atividades de fatores de transcrição (APEL & HIRT, 2004).

#### 2.3.4 Desenvolvimento e expressão gênica das raízes de plântulas de *P. angulata*

Os resultados de matéria fresca e seca de raízes de plântulas oriundas de sementes não osmocondicionadas foram maiores que de raízes de plântulas oriundas de sementes osmocondicionadas (Figura 10A e Figura 10B). Em trabalhos anteriores Souza et al. (2011) afirmaram que o osmocondicionamento não teve efeito na massa seca das plântulas de *P. angulata*. Entretanto, vale ressaltar que no referido trabalho, foi realizada a avaliação da matéria seca total e não das partes aéreas e raízes separadas.

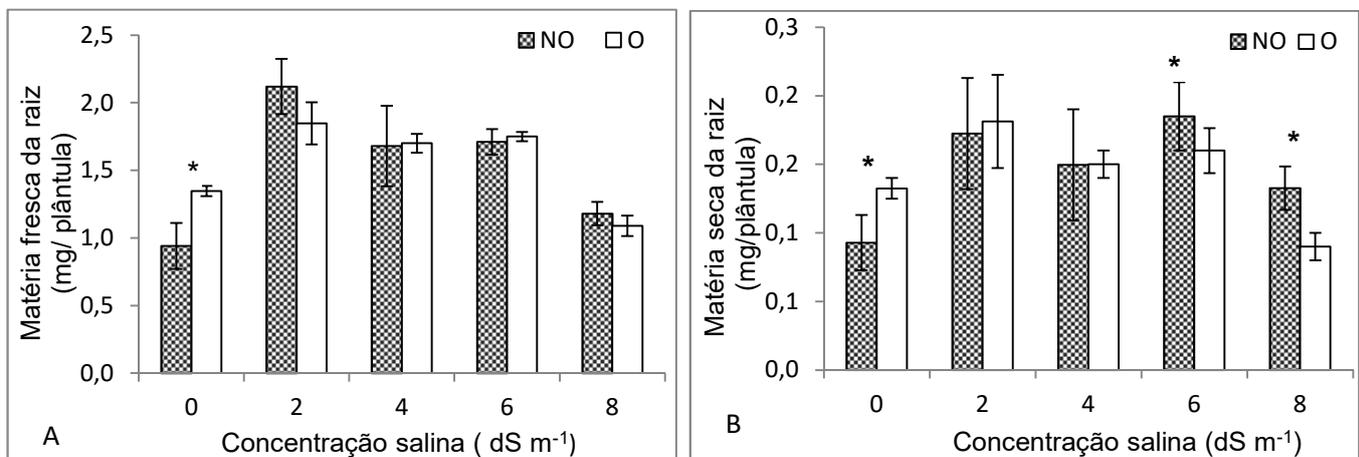


Figura 10. Matéria fresca (A) e seca (B) das raízes de plântulas de *P. angulata*, submetidas a diferentes concentrações de soluções salinas. \* diferente significativamente pelo teste t ( $p < 0,05$ ).

Os comprimentos das raízes de *P. angulata* não apresentaram diferenças significativas entre as plântulas oriundas de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas submetidas as diferentes concentrações de soluções salinas, exceto em 6 dS m<sup>-1</sup>, na qual as raízes provenientes de plântulas osmocondicionadas apresentaram maiores comprimentos (Tabela 2). As raízes de *P. angulata* podem ter sido capazes de ajustarem-se osmoticamente mantendo os

íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  em níveis suportáveis, diminuindo o potencial hídrico e mantendo o metabolismo celular sem efeitos tóxicos.

Tabela 2. Comprimento de raiz (cm) de plântulas *P. angulata*, submetidas a diferentes concentrações de soluções salinas

Concentração salina ( $\text{dS m}^{-1}$ )	Tipos de sementes	
	NO	O
0	2,95	3,12
2	2,09	2,67
4	2,73	3,04
6	2,50	3,38 *
8	2,33	1,90

\* Diferença estatística entre sementes não osmocondicionadas (NO) e osmocondicionadas (O).

Sódio no solo inibe a captação de potássio pela raiz, um elemento mineral essencial para todas as plantas. Altas concentrações de sais de sódio dificultam absorção de água das plantas. O acúmulo de sódio no citoplasma das células vegetais pode inibir enzimas metabólicas e pode causar estresse oxidativo (KATIYAR-AGARWAL et al., 2006).

As alterações causadas pelo estresse salino/oxidativo resultam em modificações moleculares na célula e no padrão arquitetônico e fenotípico da planta. Alterações no fenótipo molecular incluem modificações nos padrões de expressão do gene e nas proteínas sintetizadas, desarranjos no citoesqueleto devido a aumentos desproporcionais no tamanho da célula, levando a desorganização celular e acarretando comprometimento das funções fisiológicas (BERTORELLO & ZHU, 2009). O aumento no comprimento das raízes de *P. angulata* representa uma adaptação fisiológica que poderá beneficiar a planta em uma situação de estresse salino/hídrico, quando raízes com maior comprimento são capazes de absorver a água disponível em camadas mais profundas do solo.

Apesar do comprimento das raízes das plântulas provenientes de sementes não osmocondicionadas e osmocondicionadas, não mostrarem diferenças significativas (Tabela 2), é possível observar nas figuras 11A e 11B, as diferenças fenotípicas, especialmente nas raízes das plântulas que foram cultivadas em solução salina com CE  $4 \text{ dS m}^{-1}$  oriundas das sementes nas duas condições

avaliadas. O grau de adaptação celular e fisiológica impostos as plantas é proporcional à magnitude e duração do estresse, sendo que essa capacidade adaptativa será crucial para a sobrevivência da espécie em condições adversas.

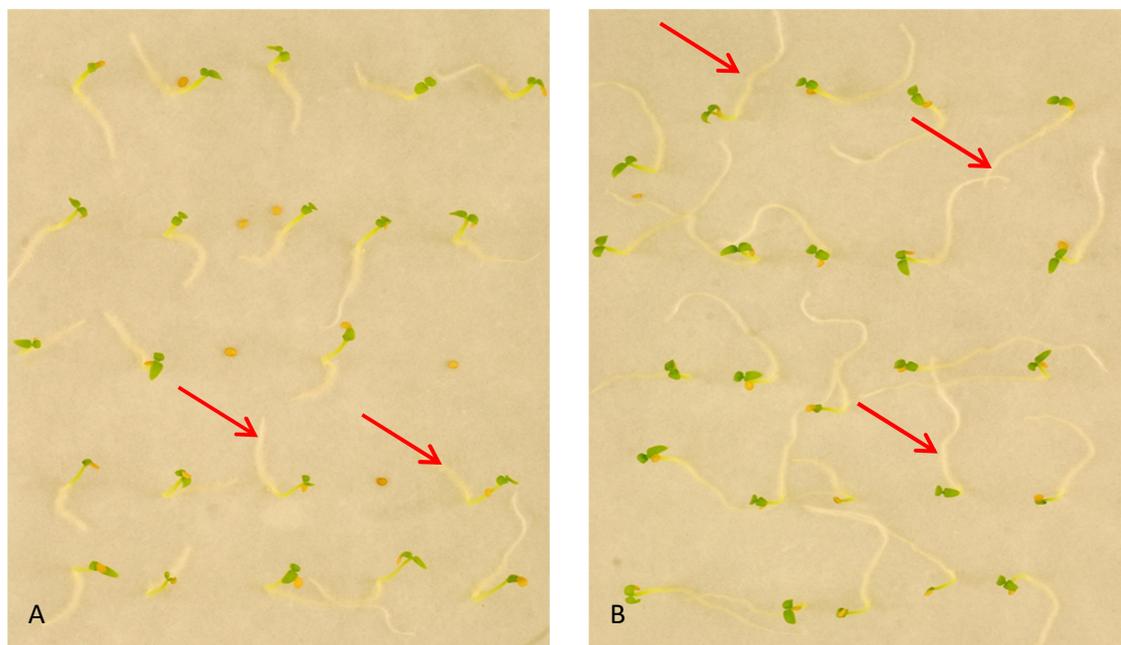


Figura 11. Plântulas de *P. angulata* provenientes de sementes não osmocondicionadas (A) e osmocondicionadas (B) submetidas a solução salina CE 4 dS m<sup>-1</sup> por 10 dias

A expressão do gene *SOS1* foi regulado positivamente, particularmente, nas concentrações de 2 e 6 dS m<sup>-1</sup> em raízes oriundas de plântulas de sementes osmocondicionadas (Figura 12A). No entanto para *HAK1* a expressão foi maior a partir de 4 dS m<sup>-1</sup> (Figura 12B).

Em estudos com tomate, Olías et al. (2009) mostraram que além de sua principal ação na extrusão do Na<sup>+</sup> para fora dos tecidos radiculares, *SOS1* é crítico para o particionamento desse íon em órgãos vegetais, além de participar da retenção do Na<sup>+</sup> nos caules de tomate, impedindo alcançar tecidos fotossintéticos.

De acordo com SU et al. (2002), o estresse salino aumenta a expressão de membros da família dos genes *AKT* e *KAT*, entre eles o *HAK1*. Estas proteínas são canais de potássio, também importantes na regulação homeostática. Estes canais com alta afinidade pelo K<sup>+</sup> possuem afinidade pelo Na<sup>+</sup>. Inclusive podendo transportar Na<sup>+</sup>, principalmente quando as relações K<sup>+</sup>: Na<sup>+</sup> são baixas (PARDO & QUINTERO 2002). A função dos canais *HAK* é competitivamente inibida pela presença de altas concentrações Na<sup>+</sup>, desse modo compartilhando a via de

transporte dos dois cátions monovalentes (SANTA-MARIA et al., 1997; MIAN et al. 2011). Isso pode em parte explicar o nível de expressão alto nas raízes de *P. angulata* a medida que houve aumento das concentrações das soluções salinas.

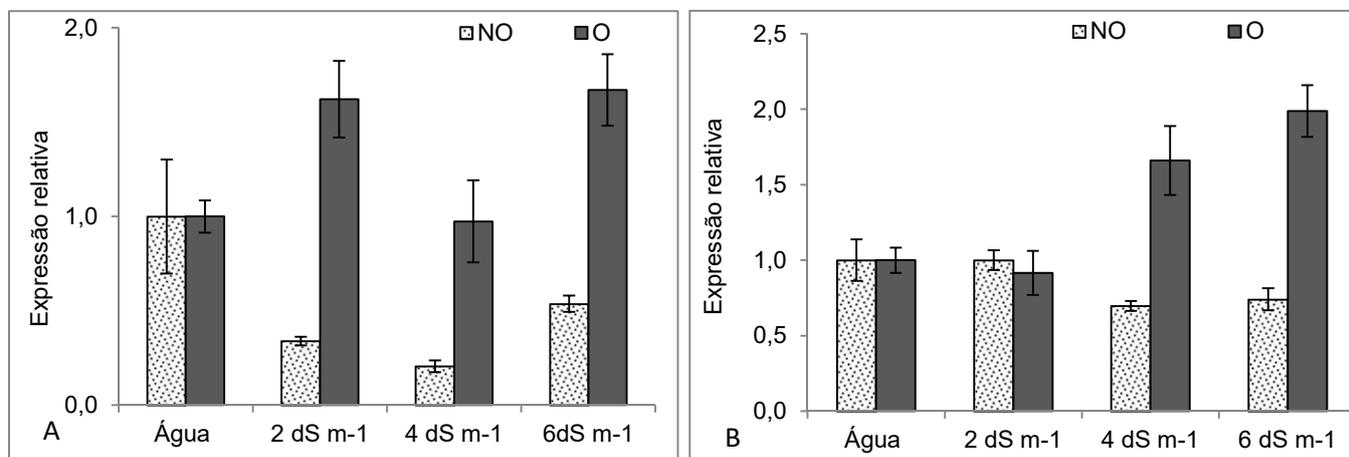


Figura 12. Expressão relativa dos genes *SOS1* (A) *HAK1* (B) em raízes de plântulas de *P. angulata*, submetidas a diferentes concentrações de soluções salinas.

A expressão relativa dos genes *APX*, *GST* e tioredoxina foi positivamente regulada particularmente nas raízes provenientes de plântulas osmocondicionadas (Figura 13A, Figura 13B e Figura 14). A partir desses resultados é possível afirmar que provavelmente o osmocondicionamento favoreceu nas maiores concentrações salinas, a expressão de *APX*, *GST* e tioredoxina auxiliando na manutenção da atividade celular/meristemática das raízes. O aumento da expressão desses genes provavelmente contribuiu para a síntese de enzimas antioxidantes, que protegeram as raízes do efeito da salinidade e danos oxidativos.

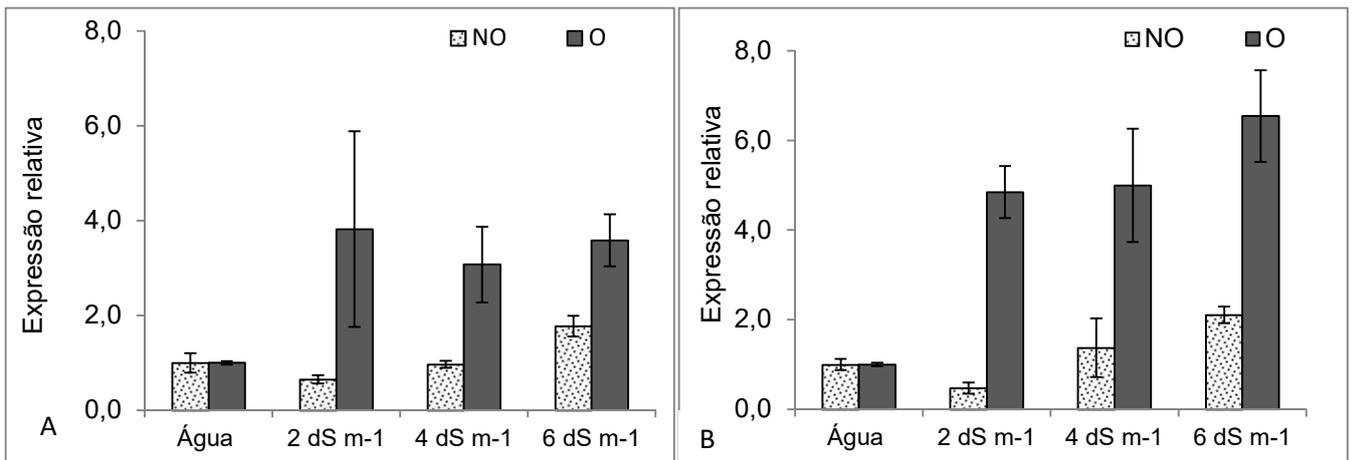


Figura 13. Expressão relativa dos genes APX (A) e GST (B) em raízes de *P. angulata*, submetidas a diferentes concentrações de soluções salinas.

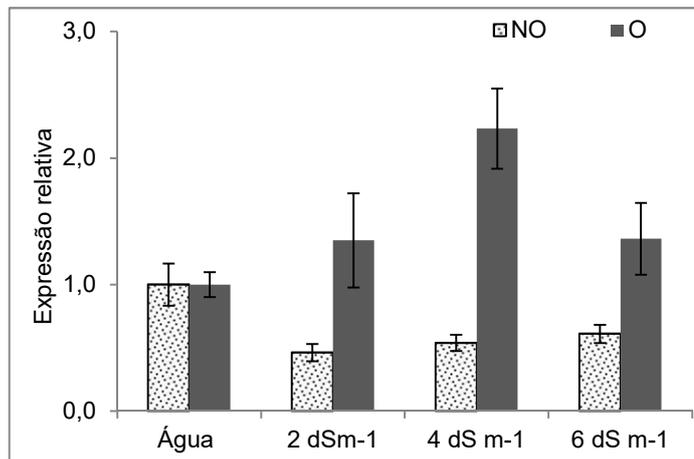


Figura 14. Expressão relativa do gene tioredoxina de raízes de plântulas de *P. angulata*, submetidas a diferentes concentrações de soluções salinas.

## 2.4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados possibilitam afirmar que o osmocondicionamento é uma técnica que proporciona incremento na germinação de sementes de *P. angulata*, submetidas ao estresse salino; induz genes que codificam proteínas antioxidantes protetoras das partes aéreas e das raízes de plântulas contra os danos oxidativos, na maioria das vezes, irreversíveis para a sobrevivência do vegetal.

## REFERÊNCIAS

AKRAM, M.; ASHRAF, M.Y.; AHMAD, R.; WARAICH, E.A.; IQBAL, J.; MOHSIN, M. Screening for salt tolerance in maize (*Zea mays* L.) hybrids at an early seedling stage. *Pakistan Journal of Botany*, v. 42, n. 1, p. 141-154. 2010.

ÁLVAREZ, S.; GÓMEZ-BELLOT, M.J.; CASTILLO, M.; BANÓN, S.; SÁNCHEZ BLANCO, M. J. Osmotic and saline effect on growth, water relations, and ion uptake and translocation in *Phlomis purpurea* plants. *Environmental and Experimental Botany* v. 78. p. 138-145. 2012.

AMTMANN, A.; FISCHER, M.; MARSH, E. L.; STEFANOVIC, A.; SANDERS, D.; SCHACHTMAN, D.P. The wheat cDNA LCT1 generates hypersensitivity to sodium in a salt-sensitive yeast strain. *Plant Physiology*, 126, p. 1061-1071. 2001.

APEL, K. & HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, p. 373-399. 2004.

ASHRAF, M.; ATHAR, H.R.; HARRIS, P.J.C.; KWON, T.R. Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Advances in Agronomy*, v. 97, p. 45-110. 2008.

BASTOS, G.N.; SILVEIRA, A.J.; SALGADO, C.G.; PICANÇO-DINIZ, D.L.; DO NASCIMENTO, J.L. *Physalis angulata* extract exerts anti-inflammatory effects in rats by inhibiting different pathways. *Journal of Ethnopharmacology*, 118, p. 246–251. 2008.

BELAQZIZ, R.; ROMANE A.; ABBAD, A. Salt stress effects on germination, growth and essential oil content of an endemic thyme species in Morocco (*Thymus maroccanus* Ball.). *Journal of Applied Sciences Research*, v. 5, n. 7, p. 858-63. 2009.

BERTORELLO, A.M. & ZHU, J.K. SIK1/SOS2 networks: decoding sodium signals via calcium-responsive protein kinase pathways. *European Journal of Physiology*, 458, p. 613–619. 2009.

BESSE, I. & BUCHANAN, B.B. Thioredoxin-linked plant and animal processes: the new generation. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 38, p. 1-11. 1997.

DAMU, A.G.; KUO, P.C.; SU, C.R.; KUO, T.H., CHEN, T.H., BASTOW, K.F., LEE, K.H., WU, T.S. Isolation, structures, and structure cytotoxic activity relationships of withanolides and physalins from *Physalis angulata*. *Journal of Natural Products*, 70, p.1146-1152. 2007.

DAVENPORT, R.J. & TESTER, M. A weakly voltage dependent, nonselective cation channel mediates toxic sodium influx in wheat. *Plant Physiology*, 122, p. 823-834. 2000.

DIETZ, K.J.; JACOB, S.; OELZE M.L.; LAXA, M.; TOGNETTI, V.; DE MIRANDA S.M.; BAIER, M.; FINKEMEIER, I. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, n. 8, p. 1697-1709. 2006.

DOS SANTOS, C.V. & REY, P. Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *Trends in Plant Science*, v. 11, n. 7, 2006.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* v. 35, n. 6, p. 1039-1042. 2011.

FLORS, V.; PARADÍS, M.; GARCÍA-ANDRADE, J.; CEREZO, M.; BOSCH, G.C.; PILAR, G.A.P. A tolerant behavior in salt-sensitive tomato plants can be mimicked by chemical stimuli. *Plant Signaling and Behavior* v. 2, n. 1, p. 50-57. 2007.

FOOLAD, M.R. Recent advances in genetics of salt tolerance in tomato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76, p. 101-119. 2004.

GARCÍA-LEGAZ, M.F.; LÓPEZ-GÓMEZ, E.; MATAIX BENEYTO, J.; TORRECILLAS, A.; SÁNCHEZ- BLANCO, M.J. Effects of salinity and rootstock on growth, water relations, nutrition and gas exchange of loquat. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, v. 80, n. 2 199-203. 2005.

GIEGERICH, R.; MEYER, F.; SCHLEIERMACHER, C. GeneFisher-software support for the detection of postulated genes. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.*, v. 4, p. 68-77. 1996.

GUIMARÃES, E.T., LIMA, M.S., SANTOS, L.A., RIBEIRO, I.M., TOMASSINI, T.B., Dos SANTOS, R.R., Dos SANTOS, W.L., SOARES, M.B. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64, p. 84-87. 2009.

HEYDEKKER, W.; HIGGINS, J.; GULLIVER, R.L. Accelerated germination by osmotic seed treatment. *Nature*, 246, p. 42-44. 1973.

IQBAL, M. & ASHRAF, M. Seed treatment with auxins modulates growth and ion partitioning in salt-stressed wheat plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49, p.1003-1015. 2007.

ISTA. *International Rules for Seed Testing Association*, Bassersdorf, Switzerland, 2007.

JOOSEN, R.V.; KODDE J.; WILLEMS L.A.; LIGTERINK W.; VAN DER PLAS, L.H.; HILHORST, H.W. GERMINATOR: a software package for high-throughput scoring and curve fitting of *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Journal*, v. 62, p. 148-159. 2010.

KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; KIM, K.; AGARWAL, M.; FU, X.; HUANG, A.; ZHU, J.K. The plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter *SOS1* interacts with RCD1 and functions in oxidative stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National*

*Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 49, p. 18816-18821. 2006.

KHAJEH-HOSSEINI, M.; POWELL, A.A.; BINGHAM, I.J. The interaction between salinity stress and seed vigour during germination of soybean seeds. *Seed Science and Technology*, v. 31, n. 3, p. 715-725. 2003.

LEE, H.Z.; LIU, W.Z.; HSIEH, W.T.; TANG, F.Y.; CHUNG, J.G.; LEUNG, H.W.C. Oxidative stress involvement in *Physalis angulata*-induced apoptosis in human oral cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, n. 3, p. 561-570. 2009.

LIVAK, K.J. & SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25, p. 402-408. 2001.

LIU, J.; ISHITANI, M.; HALFTER, U.; KIM, C.S.; ZHU, J.K. The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 97, p. 3730-3734. 2000.

McDONALD, M. B. Seed priming. In: BLACK, M. & BEWLEY, J. D. (Eds). *Seed Technology and Its Biological Basis*. Sheffield: Sheffield Academic Press, UK, 2000. p. 287-325.

McFARLAND, V.A.; INOUE, L.S.; LUTZ, C.H.; JARVIS, A.S.; CLARKE, J.U.; MCCANT, D.D. Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 37, n. 2, p. 236-241. 1999.

MAGALHÃES, H.I.F.; VERAS, M.L.; PESSOA, O.D.L.; SILVEIRA, E.R.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V. Preliminary investigation of structure-activity relationship of cytotoxic physalin. *Letters in Drug Design & Discovery*, v. 3, n. 1, p. 625-632. 2006.

MIAN, A.A.; SENADHEERA, P.; MAATHUIS, F.J.M. Improving crop salt tolerance: anion and cation transporters as genetic engineering targets. *Plant Stress* 5 (special issue 1), p. 64-72. 2011.

MIRANDA, D.; FISCHER, G.; ULRICHS, C. Growth of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) plants affected by salinity. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 83, p. 175-181. 2010.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment*, v. 25, n. 2, p. 239-250. 2002.

MUNNS, R. & TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review Plant Biology*, 59, p. 651-681. 2008.

NAKAUNE, M.; HANADAC A.; YIN, Y.G; MATSUKURA, C.; YAMAGUCHI, S.; EZURA, H. Molecular and physiological dissection of enhanced seed germination using short-term low-concentration salt seed priming in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 52, p. 28-37. 2012.

OLÍAS, R.; ELJAKAOUI, Z.; LI, J.; MORALES, P.A.; MARÍN-MANZANO, M.C; PARDO, J.M.; BELVER, A. The plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1, is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na<sup>+</sup>, *Plant Cell and Environment*, v. 32, n. 7, p. 904-916. 2009.

PARDO, J.M. & QUINTERO, F.J. Plants and sodium ions: keeping company with the enemy. *Genome Biology* v.3, n.6, 1017.1-1017.4. 2002

PENG, Z; WANG, M.C.; LI, F; LV, HJ; LI, CL; XIA, G.M. A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8, p. 2676-2686. 2009.

PINTO, N.B.; MORAIS, T.C.; CARVALHO, K.M.B.; SILVA, C.R.; ANDRADE G.M.; BRITO G.A.C.; VERAS M.L.; PESSOA, O.D.L.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Topical

anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatitis in mice. *Phytomedicine*, 17, p. 740-743. 2010.

RASBAND, W.S. *Image J*. US National Institutions of Health, Bethesda, Maryland, USA. URL: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. 2009.

SANTA-MARÍA, G.E.; RUBIO, F.; DUBCOVSKY, J.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *The Plant Cell*, 9, p. 2281-2289. 1997.

SHI, H.Z. & ZHU, J.K. Regulation of expression of the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene AtNHX1 by salt stress and abscisic acid. *Plant Molecular Biology*, v. 50, n. 3, p. 543–550. 2002.

SIVRITEPE, N.; SIVRITEPE, H.O.; ERIS, A. The effect of NaCl priming on salt tolerance in melon seedling grown under saline conditions. *Scientae Horticulturae*, 97: 229-237. 2003.

SOARES, M.B.P., BRUSTOLIM, D. SANTOS, L.A.; BELLINTANI, M. C.; PAIVA, F.P., RIBEIRO I.M., TOMASSINI T.C.B; SANTOS, R.R. Physalins B, F e G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhybity lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. *International Immunopharmacology*, 6, p. 408-414, 2006.

SOEDA Y.; KONINGS M.C.; VORST, O.; VAN HOUWELINGEN A.M.; STOOPEN, G.M.; MALIEPAARD, C.A. Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. *Plant Physiology*, 137, p. 354-368. 2005.

SOSA, L.; LLANES A.; REINOSO H.; REGINATO M., LUNA, V. Osmotic and specific ion effect on the germination of *Prosopis strombulifera*. *Annals of Botany*, v. 96, n. 2 p. 261-267. 2005.

SOUZA, C.L.M. Germinabilidade de sementes de *Physalis angulata* L. (Solanaceae) sob condições de estresses abióticos. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 2009. 53p.

SOUZA, M. O. S.; SOUZA, C. L. M.; PELACANI, C.R. Germinação de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas e crescimento inicial de *Physalis angulata* L. (Solanaceae) em ambientes salinos. *Acta Botanica Brasílica*, v. 25, n. 1, p. 105-112. 2011.

SU, H.; GOLLDACK, D.; ZHAO C.; BOHNERT, H.J. The expression of HAK-type K(R) transporters is regulated in response to salinity stress in common ice plant. *Plant Physiology*, 129, p. 1482-1493. 2002.

TIAN, N., WANG, J., XU, Z.Q. Overexpression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene AtNHX1 from *Arabidopsis thaliana* improves the salt tolerance of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*), *South African Journal of Botany* 77, 160–169. 2011.

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

VILLELA, F. A. & BECKERT, O. P. Potencial osmótico de soluções aquosas de polietilenoglicol 8000. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 23, n.1, p.267-275. 2001.

VIEIRA, A.T.; PINHO, V.; LEPSCH, L.B.; SCAVONE, C.; RIBEIRO, I.M.; TOMASSINI, T.; SANTOS, R.R. dos; SOARES, M.B.; TEIXEIRA, M.M., SOUZA, D.G. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of the natural secosteroids physalins in model of intestinal ischemia and reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology*. v. 146, n. 2, p. 244-251. 2005.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218, p. 1-14. 2003.

WEDDERBURN, J.; MCFADZEN, I.; SCAGER, R.C.; BESSLEY, A.; HEATH, C.; HORNSBY, M.; LOWE, D. Biomarkers: the application of a suite of techniques to determine environmental quality. *Marine Environmental Research*, v. 50, n. 1-5, p. 431-441. 2000.

WU, S.J.; DING, L.; ZHU, J.K. SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *The Plant Cell* v. 8, n. 4 p. 617-627. 1996.

YILDIRIM, E.; KARLIDAG, H.; DURSUN, A. Salt tolerance of physalis during germination and seedling growth. *Pakistan Journal of Botany*, v. 43, n. 6, p. 2673-2676. 2011.

YOON, B.-H.; LANG, H.J.; COBB, B.G. Priming with salt solution improves germination of Pansy seed at high temperatures. *HortScience* v. 32 n. 2, p. 248-250. 1997.

YU, Y.; SUN, L.; MA, L.; LI, J.; HU, L.; LIU, J. Investigation of the immunosuppressive activity of Physalin H on T lymphocytes. *International Immunopharmacology*, 10, p. 290-297. 2010.

## CAPÍTULO 3

### **Prospecção de constituintes seco-esteroidais de *Physalis angulata* L. submetidas a estresse abiótico**

Manuela Oliveira de Souza<sup>1</sup>, Cíntia Luiza Mascarenhas<sup>1</sup>, Claudinéia Regina Pelacani<sup>1</sup>, Marcio Soares<sup>2</sup>; José Luiz Mazzei<sup>2</sup>, Ivone Maria Ribeiro<sup>3</sup>; Conceição Pereira Rodrigues<sup>3</sup> e Therezinha Coelho Barbosa Tomassini<sup>3</sup>

---

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), BR 116, km 03, CEP 4403-460, Feira de Santana, BA, Brasil.

<sup>2</sup>Plataforma de Métodos Analíticos e <sup>3</sup>Laboratório de Química de Produtos Naturais PN2, Farmanguinhos-Fiocruz, Rua Sizenando Nabuco,100, CEP 21041-250. Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

## RESUMO

*Physalis angulata* L. é uma planta medicinal com atividades farmacológicas comprovadas. A fisiologia do estresse nessa planta pode assumir papel importante na indução ou maximização da produção das fisalinas, metabólitos secundários bioativos descritos como imunossupressores, antimalárico e leishmanicida. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do osmocondicionamento de sementes no crescimento de plantas de *P. angulata*, bem como no conteúdo de seco-esteróides quando as mesmas foram submetidas a estresse abiótico. Plantas de *P. angulata* foram cultivadas de sementes sem tratamento pré-germinativo (NO) e osmocondicionadas em solução de PEG 6000 (O). Após 45 dias, foram submetidas aos tratamentos de restrição hídrica e estresse salino em campo durante 13 dias. A emergência das plântulas e o crescimento após aplicação dos tratamentos de estresse foram avaliados. Fisalinas F, B, D e G em extratos etanólicos secos de caules e folhas foram quantificadas através de CLAE/DAD. A taxa de emergência foi 15% maior em sementes osmocondicionadas. Os tipos de irrigação testados mostraram influenciar significativamente nos números de folhas, de frutos, altura da planta e diâmetro do caule, independente das sementes não osmocondicionadas ou osmocondicionadas de origem. A biomassa dos frutos, caules e raízes foi afetada igualmente pela restrição hídrica e estresse salino. Houve aumento nos teores de fisalinas em extratos etanólicos secos em folhas e diminuição em caules. O estresse salino proporcionou o aumento de todas as fisalinas analisadas principalmente em folhas de plantas provenientes de sementes osmocondicionadas. Apesar da redução da biomassa em relação aos tratamentos realizados, a aplicação do estresse possibilitou o aumento desses metabólitos bioativos.

Palavras chave : Fisalinas. Osmocondicionamento. Restrição hídrica. Salinidade.

## ABSTRACT

*Physalis angulata* L. is a medicinal plant with confirmed therapeutic action. The physiology of stress in this plant can take an important role in the induction or maximization of physalin production, bioactive secondary metabolites described as immunosuppressor, antimalarial and leishmanicidal. The aim of this study was to evaluate the effect of seed priming on growth of *P. angulata*, and the content of seco-steroids when they were subjected to abiotic stress. *P. angulata* plants were cultivated from non priming seeds and priming seeds in PEG 6000 solution and after 45 days, were subjected to water restriction and salt stress in the field during 13 days. Seedling emergence and growth after stress treatment application were assessed. Physalin F, B, D e G in ethanol extracts of stems and leaves were quantified by HPLC/PDA. The emergence rate was 15% higher in primed seeds. The types of irrigation tested proved to significantly influence the numbers of leaves, fruit, plant height and stem diameter, in plants from priming and non priming seeds. The biomass of fruits, stems and roots was also affected by water restriction and salt stress. There was an increase in physalins contents in dry ethanol extracts in leaves and decrease in stems. Salt stress provided increase of all physalins analyzed particularly in leaves of plants from priming seeds. Despite of the biomass reduction by the treatments performed, stress application enabled the increase of these bioactive metabolites.

Key words: Physalins. Priming. Water restriction. Salt stress.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Apesar de notadamente reconhecida como prejudicial às plantas (FLOWERS, 2004; SAIRAM & TYAGI, 2004), a indução de estresses vem sendo utilizada para modular a produção de metabólitos fisiologicamente importantes, sem os quais provavelmente, a planta não sobreviveria. Através da indução de estresses nas plantas, também é possível incrementar o teor de substâncias farmacologicamente desejáveis (ABREU & MAZZAFERA, 2005; CAPANOGLU, 2010). Este procedimento pode ser importante para potencializar a atividade de fitoterápicos ou a produção de materiais advindos do aproveitamento de plantas medicinais, como derivados de drogas vegetais ou fitofármacos. Dentre os fatores que podem levar à variação no conteúdo de metabólitos secundários nos vegetais destacam-se os estresses abióticos como estresse osmótico, restrição hídrica e salinidade (HARBORNE & WILLIAMS, 2000; TAIZ & ZIEGER, 2009).

A germinação e as fases iniciais do desenvolvimento são as mais afetadas por estresses abióticos e, por isso, tratamentos pré-germinativos vêm sendo utilizados para melhoria da qualidade de sementes e estabelecimento de plântulas de espécies cultivadas, referindo-se ao termo *priming*, envigoramento ou condicionamento fisiológico (HEYDECKER & COOLBEAR, 1977; ROBERTS & ELLIS, 1989; MARCOS FILHO, 2005). No tratamento pré-germinativo, as sementes são embebidas em água ou em uma solução osmótica por determinado período, até entrarem em equilíbrio com o potencial osmótico da solução (HEYDECKER & COOLBEAR 1977; ROBERTS & ELLIS, 1989; MARCOS FILHO, 2005). Esta técnica tem proporcionado superiores e sincronizadas taxas de germinação de sementes (HEYDECKER et al, 1973; IQBAL & ASHRAF, 2007; VARIER et al., 2010), além de proporcionar maiores taxas de emergência de plântulas (BRADFORD, 1986; FLORS et al., 2007).

Essas possibilidades técnicas de cultivo abrem um vasto campo de atuação especialmente na exploração econômica de espécies vegetais com grande potencial terapêutico, visando à produção de metabólitos secundários, farmacologicamente ativos. Os metabólitos secundários têm distribuição restrita nos vegetais e sua produção é, frequentemente, afetada pelas condições ambientais (TORSSEL, 1997; KUTCHAN, 2001; SIMÕES et al., 2007; GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Nesse contexto, a fisiologia do estresse pode assumir papel importante uma vez que a condução de experimentos visam induzir ou maximizar a produção de metabólitos secundários. Um exemplo notável de planta medicinal com atividades farmacológicas comprovadas é a *Physalis angulata* L. Extrato aquoso liofilizado de raízes de *P. angulata* apresentou atividade anti-inflamatória e imunomoduladora (BASTOS et al., 2008). Extrato da planta em acetato de etila induziu a morte celular por apoptose de células orais humanas cancerígenas (Lee et al., 2009). Frações clorofórmica e metanólica de extrato etanólico de caule evidenciaram atividade antineoplásica ao inibirem a proliferação celular *in vitro* de cepas J774 (*mouse monocytic cell line*), SP 2/0 (*mouse myeloma*), Eilich carcinoma (*sarcoma induced by methyl chlolanthrene*), P3653 (*mouse plasmocytoma*), Neuro -2 a (*mouse neuroblastoma*), MK2 (*monkey epithelial cells*) and BW (*mouse lymphoma*) (RIBEIRO et al., 2002).

As atividades farmacológicas em espécies do gênero *Physalis* estão relacionadas aos vitaesteroides (TOMASSINI et al., 2000), tendo sido as fisalinas F, B, D e G – derivados seco-esteróides do tipo 13,14-seco 16,24-ciclo ergostano, carbonilados em C-15 – já isoladas de *P. angulata*, as substâncias relacionadas à atividade terapêutica da espécie (SOARES et al., 2003). São moléculas de estruturas bastante complexas envolvendo diferenciadas funções químicas que podem colaborar e mesmo evidenciar possibilidades de sucesso nas respectivas aplicações ao tratamento das disfunções orgânicas (JANUÁRIO et al., 2002; VIEIRA et al., 2005; DAMU et al., 2007). As fisalinas F (Figura 1-I) e B (Figura 1-II) apresentaram ação leishmanicida com potencial de ação *in vitro* e *in vivo* ao inibir a leishmaniose cutânea (GUIMARÃES et al., 2009). Ensaio com extrato revelaram a possibilidade da fisalina D (Figura 1-III) associar-se com a parede celular de *Mycobacterium tuberculosis* inibindo seu crescimento (JANUÁRIO et al., 2002). Fisalinas D e F apresentaram atividade antimalárica (SÁ et al., 2011). As fisalinas B, F e G também inibiram *in vitro* a atividade de esplenócitos e a rejeição ao transplante alogênico *in vivo* (SOARES et al., 2006) além de serem imunossupressoras de macrófagos e inibidoras na morte induzida por lipopolisacarídeos (SOARES et al., 2003).

Apesar dos diversos trabalhos científicos envolvendo ação terapêutica dos seco-esteróides produzidos por *P. angulata*, existe carência na compreensão de

como as oscilações ambientais influenciam na produção dessas substâncias e dos mecanismos que regulam a síntese das fisalinas. Neste sentido, este trabalho objetivou avaliar o efeito do osmocondicionamento de sementes no crescimento e no desenvolvimento de plantas de *P. angulata*, bem como no conteúdo de seco-esteróides quando as mesmas foram submetidas a estresse abiótico.

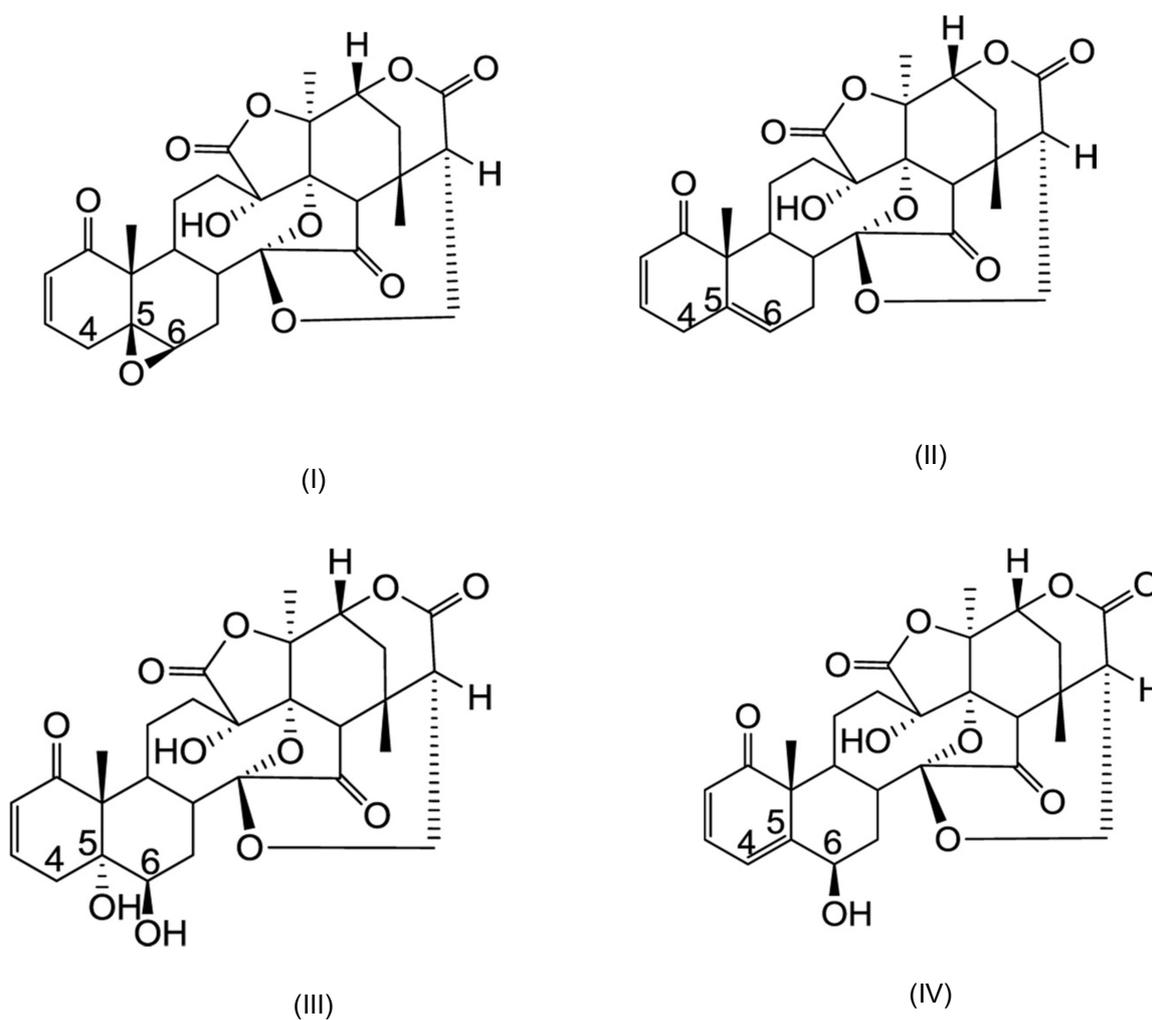


Figura 1: Fisalinas bioativas isoladas de *Physalis angulata*: (I) F = 5 $\beta$ , 6 $\beta$ -epoxi; (II) B =  $\Delta^{5,6}$ ; (III) D = 5 $\alpha$ -OH, 6 $\beta$ -OH e (IV) G =  $\Delta^{4,5}$ , 6 $\beta$ -OH (SOARES et al., 2003).

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Reagentes

Etanol (EtOH), metanol (MeOH), clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) (Tedia, Fairfield), carvão ativo e acetato de chumbo tri-hidratado (Pb(AcO)<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O) (Merck, Darnstadt) grau reagente (ACS) e água destilada foram aplicados na extração, purificação e enriquecimento dos seco-esteroides. Ácido trifluoracético e acetonitrila grau HPLC/UV foram adquiridos da Tedia (Fairfield) e aplicados na análise cromatográfica, juntamente à água ultrapurificada (18,1 MΩ-cm resistividade) obtida em equipamento NanoPure Diamond (Barnstead/Thermolyne).

### 3.2.2 Material vegetal

As sementes de *P. angulata* foram obtidas de frutos (coloração amarela), coletados em estágio uniforme de maturação, a partir de plantas cultivadas em casa de vegetação na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (Bahia, Brasil). Após beneficiamento, as sementes foram submetidas à dessecação em solução saturada de cloreto de potássio, sob condições de umidade relativa de 11% e temperatura de 20°C. O conteúdo de água das sementes foi monitorado por diferença entre os pesos fresco e seco do lote. Após a secagem foram separados sub-lotes de 500 sementes, estocadas em tubos de polipropileno (5 mL) e mantidos em refrigerador (4°C) até a execução dos ensaios.

### 3.2.3 Planejamento experimental

O delineamento experimental dos experimentos em casa de vegetação foi em blocos casualizados em arranjo fatorial 2 x 3, no qual 2 representa os tipos de condicionamentos pré-germinativos – osmocondicionadas (O) e não osmocondicionada (NO) – e 3 as diferentes condições de irrigação, totalizando 6 tratamentos. Cada tratamento constituiu-se de 4 repetições, cada uma delas com 7 vasos contendo uma planta por vaso. Para a determinação quantitativa das fisalinas

por CLAE, foram reunidas as matérias secas (caules e folhas) de todas as plantas de cada um dos tratamentos.

#### 3.2.4 Osmocondicionamento das sementes

O osmocondicionamento foi realizado expondo as sementes de *P. angulata* em solução de polietilenoglicol (PEG 6000), preparado no potencial osmótico de -1,2 MPa, previamente estabelecido como potencial de *priming* da espécie (SOUZA, 2009). Amostras de 1.000 sementes foram colocadas em tubos de 25 mL com solução osmótica acoplada a um sistema de aeração e mantidas por 10 dias em câmara de germinação a 35°C (SOUZA et al., 2010). Após este período as sementes foram removidas da solução osmótica, lavadas e secas a temperatura ambiente, até que fosse alcançado o peso constante. A solução de PEG 6000 foi preparada de acordo com Villela et al. 1991.

#### 3.2.5 Emergência e crescimento inicial

Sementes O e NO foram semeadas em recipientes de polietileno contendo 15 kg de substrato (uma mistura 1:1 de terra vegetal humificada e areia lavada). A taxa de emergência das plântulas (%) foi avaliada após 10 e 20 dias da semeadura. Em seguida foi realizado o desbaste, deixando uma planta por vaso e mantidas em estufa Van der Hoover (40% de luminosidade), na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (Bahia, Brasil). Durante todo o período, os vasos foram irrigados até atingir sua capacidade de campo.

Aos 45 dias de cultivo, as plantas foram separadas em grupos e submetidas aos seguintes tratamentos de irrigação: (1) com rega diária – manutenção da capacidade máxima de umidade (100% de irrigação) (controle); (2) irrigadas com 50% da necessidade diária das plantas e (3) plantas irrigadas com solução aquosa de NaCl 0,9%, com condutividade elétrica (CE) 10 dS.m<sup>-1</sup>. A média dos volumes utilizados nos grupos controle, 50% da água e solução salina foram 316 mL, 158 mL e 316 mL, respectivamente. As plantas foram mantidas nessas condições durante 13 dias, quando os efeitos da restrição hídrica e da irrigação com solução salina foram visualizados pela observação do ponto de murcha da parte aérea.

### 3.2.6 Análise de crescimento

Após o período de aplicação dos tratamentos de estresse foram analisados as seguintes variáveis: número de folhas e de frutos, altura da planta e diâmetro do caule. Para a medição da altura da planta, foi utilizada uma régua milimetrada, medindo-se desde a superfície do solo, até o ápice da maior folha esticada na posição vertical. O diâmetro de caule (mm) foi medido na altura da superfície do solo com auxílio de paquímetro digital (Cosa 111-101EB). Após a avaliação do crescimento, folhas, caules, flores e raízes foram separados e colocados para secar em estufa de circulação forçada de ar a  $40^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ , durante 8 dias, e a matéria final foi determinada. Alíquotas de folhas secas, bem como de caules secos, foram reunidas, moídas e destinadas para a análise do teor de fisalinas como descrito a seguir.

### 3.2.7 Determinação dos constituintes seco-esteroidais (fisalinas) em caules e folhas

Alíquotas de 50 g do material moído foram extraídas com 3 x 200 mL de etanol. A solução obtida foi filtrada e evaporada em rotavapor sob pressão reduzida em banho de  $40^{\circ}\text{C}$ . O resíduo foi seco em dessecador até peso constante. Alíquotas foram separadas para a análise do teor de fisalinas por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE).

#### 3.2.7.1 Sistema cromatográfico

Os seco-esteroidais foram quantificados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por espectroscopia de UV/Visível (varredura com detector de arranjo de diodos - DAD) nos comprimentos de onda de 225 e 310 nm sob as seguintes condições operacionais: uma coluna Hibar 250 x 4 mm com fase LiChrospher 100 RP18 5  $\mu\text{m}$  (Merck, Darmstadt), e uma pré-coluna Supelcosil C18 2 cm, fase móvel composta por ácido trifluoracético 0,05% (Tedia, Fairfield) em água (A) e acetonitrila (Tedia, Fairfield) (B). Gradiente de fase a vazão de 1 mL/min: 0 a 3 min com 3%B, 3-6 min com 3-10%B, 6-9 min com 10%B, 9-12 min com 10-18%B, 12-15 min com 18%B, 15-18 min com 18-21%B, 18-21 min com 21%B, 21-45

min com 21-35%B, 45-55 min com 35%B, 55-70 min com 35-80%B, 70-75 min com 80%B, retornando em 75-78 min de 80 para 3%B, 78-85 min mantendo a 3%B. Temperatura do forno de colunas a 30°C; amostrador (injetor automático) à temperatura ambiente. Varredura do espectro de DAD em 200-800 nm com resolução de 1 nm. Volume de injeção de 20 µL. Imediatamente antes da injeção tanto as amostras quanto as soluções de material de referência foram diluídas apropriadamente em metanol e filtradas por centrifugação em microtubo, através de membrana PVDF (Durapore) 0,2 µm. Soluções metanólicas de fisalinas F, B, D e G a 1 mg/mL foram injetadas para caracterização qualitativa do tempo de retenção que foram de 55,5, 66,8, 38,5 e 39,67 min, respectivamente.

### 3.2.7.2 Determinação quantitativa das fisalinas por CLAE

Para o preparo das soluções de material de referência (fisalina D), foi pesada com precisão de 0,01 mg, uma alíquota de 5 mg de fisalina D em balão volumétrico de 5 mL avolumando com MeOH, havendo solubilização total. A partir desta solução, alíquotas (2500, 200, 100 e 50 µL) foram transferidas separadamente para balões de 5 mL, e o volume completado com o mesmo solvente resultando nas concentrações de 500, 40, 20 e de 10 µg/mL, respectivamente. Da primeira diluição, uma alíquota de 1000 µL foi transferida para balão volumétrico de 5 mL, e o volume completado com o mesmo solvente resultando na concentração de 100 µg/mL. Estas soluções foram injetadas no sistema CLAE em triplicata para determinar a curva de calibração e verificar sua linearidade e validade por teste ANOVA.

Para o preparo das amostras de extratos de caules e folhas três alíquotas de 10 mg foram pesadas, com precisão de 0,01 mg, independentemente, em microtubos de polipropileno. Imediatamente antes da injeção no sistema CLAE, as alíquotas foram diluídas com 400µL de metanol (Tedia, Fairfield) e sonicadas (banho de ultrassom) por 2 min.

### 3.2.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância, comparando-se as médias pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1 Emergência e crescimento de *P. angulata*

Aos 10 dias após a semeadura (Tabela 1), observou-se que sementes previamente osmocondicionadas apresentaram uma taxa de emergência superior às das sementes não osmocondicionadas, chegando a 15% a mais de plântulas emergidas em relação às sementes que não foram osmocondicionadas. Este comportamento foi mantido também na segunda contagem (20 dias após semeadura), evidenciando que o osmocondicionamento das sementes mostrou-se eficiente para a taxa de emergência de plântulas de *P. angulata*.

Tabela 1. Taxa de emergência (% , média e desvio-padrão) de sementes após diferentes condições de tratamento pré-germinativo de *P. angulata*.

Tempo após a semeadura (dias)	Tipos de sementes	
	NO <sup>a</sup>	O
10	64 ± 11,38	78 ± 11,02 *
20	79 ± 13,10	89 ± 8,11 *

<sup>a</sup> NO = sementes não osmocondicionadas; O = sementes osmocondicionadas. \* Significativamente ( $p < 0,05$ , ANOVA) diferentes dos respectivos períodos de avaliação. (N = 7)

Estes resultados são corroborados por autores que afirmam a importância do osmocondicionamento nos estádios iniciais do desenvolvimento da planta, permanecendo até 30 dias após a semeadura (PATANÈ et al., 2009; DANTAS et al., 2010). Diversos benefícios têm sido relatados com o emprego desta técnica, dentre estes, a maior probabilidade de se obter melhor germinação e emergência, particularmente em condições de estresse (BRADFORD, 1986; WARREN & BENNETT, 1997; SOEDA et al., 2005). Em pimentão, foram avaliadas as alterações

nas isoenzimas catalase e glucose-6-fosfato desidrogenase, utilizando-se eletroforese e observou-se que essas enzimas são eficientes em acompanhar a melhoria no desempenho das sementes de pimentão, ocasionada pelo condicionamento osmótico (JOSÉ et al., 1999).

A exposição de sementes, de algumas espécies cultivadas, a soluções osmóticas com potenciais mais negativos (pré-condicionamento), impõe um tipo de estresse osmótico inicial, que pode induzir tolerância a outros tipos de estresses, como temperatura sub ou supra ótima, déficit hídrico e salinidade (WARREN & BENNETT, 1997; BRUGGINK & VAN DER TOORN, 1995; CAYUELA et al., 1996). Alguns trabalhos relatam que durante o pré-condicionamento osmótico a semente hidrata-se lentamente, o que permite maior tempo para o reparo das macromoléculas e balanço metabólico mais favorável no início da germinação. Incrementos nas atividades enzimáticas e metabólicas, síntese de DNA, produção de ATP, reparos de danos de membrana, possibilitam a formação de tecidos de maneira mais ordenada, reduzindo os riscos de danos ao eixo embrionário (KHAN, 1992). Estas são características inerentes ao condicionamento osmótico e parecem estar relacionadas com o aumento do vigor das sementes durante a germinação subsequente.

Na fase de crescimento, observou-se que os tipos de irrigação testados durante o cultivo das plantas de *P. angulata* mostraram influenciar significativamente ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey, nos números de folhas, de frutos, altura da planta e diâmetro do caule (Tabela 2).

Não houve influência dos tipos de semente (NO e O) ( $p > 0,05$ ) sobre as variáveis analisadas (Tabela 2), exceto sobre o número de folhas e em uma única condição de irrigação (nas plantas controle com 100% de irrigação), em que as plantas oriundas de sementes osmocondicionadas apresentaram redução do número de folhas. Apesar de estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), esta redução foi única e menos intensa que as observadas em outras condições, devendo ser considerada de baixa relevância.

Tabela 2. Número de folhas, frutos, altura da planta (cm) e diâmetro dos caules (cm) de *P. angulata* provenientes de sementes sob tratamentos pré-germinativos distintos e submetidas a diferentes tipos de irrigação.

Sementes Irrigação	NO <sup>a</sup>			O		
	100% água	50% água	NaCl aq.	100% água	50% água	NaCl aq.
Folhas	155 ± 15,6	123 ± 8,5 <sup>b</sup>	123 ± 5,3 <sup>b</sup>	140 ± 13,1 <sup>c</sup>	114 ± 5,8 <sup>b</sup>	134 ± 4,8
Frutos	29 ± 4,1	20 ± 7,3 <sup>b</sup>	20 ± 5,8 <sup>b</sup>	25 ± 3,3	20 ± 2,6	25 ± 4,7
Altura da planta (cm)	62 ± 2,3	52 ± 9,1	57 ± 10,2	67,4 ± 5,5	51,6 ± 9,6 <sup>b</sup>	54,6 ± 8,4 <sup>b</sup>
Diâmetro do caule (cm)	13 ± 0,6	11,6 ± 0,8 <sup>b</sup>	11,7 ± 0,6 <sup>b</sup>	12,3 ± 1,6	11,3 ± 0,7	11,2 ± 0,6

<sup>a</sup>Tratamento pré-germinativo: NO = sementes não osmocondicionadas; O = sementes osmocondicionadas. Valores significativamente ( $p < 0,05$ , ANOVA e teste de Tukey) diferentes <sup>b</sup> das irrigadas com a manutenção da capacidade máxima de umidade ou <sup>c</sup> das respectivas sementes não osmocondicionadas são indicados. (N = 7)

O número de folhas não foi afetado ( $p > 0,05$ ) quando as plantas oriundas de sementes osmocondicionadas foram irrigadas com solução salina (Tabela 2). A ocorrência de estresse hídrico e salino durante a fase inicial do desenvolvimento pode promover redução do crescimento, do número de ramos e folhas, diminuição da superfície fotossintética e, conseqüentemente, menor produção de flores e de frutos (KARAMANO et al., 1982; BOUTRAA & SANDERS, 2001). Os rendimentos das plantas cultivadas em solo sob estresse hídrico ou salino irão depender dos mecanismos adaptativos que lhes permitem manter o crescimento e atividade fotossintética alta. Isso se reflete nos níveis de produção desejáveis mesmo sob condições de estresses prolongados. Ao produzirem menos frutos, sementes e folhas, reduz-se o valor econômico de tais plantas (DaMATTA, 2007).

De um modo geral, a restrição hídrica em plantas de *P. angulata* (Tabela 2) afetou significativamente ( $p < 0,05$ ) o número de lançamentos foliares, além da altura e do diâmetro do caule, enquanto que o estresse salino afetou principalmente a altura e o diâmetro do caule em plantas provenientes de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas, respectivamente.

Segundo Koyro (2000), a redução do número de folhas destaca-se entre as mudanças morfológicas ocorridas durante o estresse salino. A expansão foliar pode sofrer reduções significativas a medida que as plantas são expostas a irrigação com elevada salinidade, sendo esse mecanismo dependente da capacidade da planta em evitar a concentração excessiva dos íons nos tecidos transpiratórios e produzir novas folhas em uma taxa bem mais rápida (MIRANDA et al., 2010).

O número de frutos de plantas provenientes de sementes osmocondicionadas foi menor, quando irrigadas sobre restrição hídrica e com solução salina, mas apenas de plantas oriundas de sementes não osmocondicionadas. Embora não observado significativamente, o tratamento osmótico pode ter efeitos positivos para a manutenção e maior formação de frutos, não comprometendo a translocação de solutos na planta ou mesmo a formação e desenvolvimento de folhas.

As plantas controle provenientes das sementes osmocondicionadas mostraram um crescimento maior (67,4 cm) que aquelas submetidas à restrição hídrica (51,6 cm) e a solução salina (54,6 cm). Apesar da redução na altura da planta, não houve diferença significativa entre o controle e os diferentes tipos de irrigação em plantas originadas de sementes não osmocondicionadas (Tabela 2). A redução da altura da planta pode estar associada ao declínio na expansão e crescimento celular, devido a baixa pressão de turgor, além da senescência foliar que ocorre sob estresses hídrico e salino (JALEEL et al., 2008).

### 3.3.2 Matéria seca de cada parte da planta

O tratamento pré-germinativo (osmocondicionamento) não teve contribuição significativa ( $p > 0,05$ , teste F) sobre a matéria seca das partes das plantas analisadas (Tabela 3). Como seria esperada, a redução de algumas das variáveis analisadas na Tabela 2 pelas duas condições estressantes de irrigação teve consequência também sobre a redução de massa seca de folhas, frutos e caules na planta (Tabela 3).

Tabela 3. Matéria seca ( $\text{g.planta}^{-1}$ ) de partes de *P. angulata* provenientes de sementes de diferentes tratamentos pré-germinativos e submetidas a diferentes tipos de irrigação.

Sementes	NO <sup>a</sup>			O		
	100% água	50% água	NaCl aq.	100% água	50% água	NaCl aq.
Folhas	3,75 ± 0,3	2,95 ± 0,3 <sup>b</sup>	3,72 ± 0,2	3,37 ± 0,4	2,83 ± 0,3 <sup>b</sup>	3,40 ± 0,1
Flores	0,06 ± 0,1	0,05 ± 0,1	0,04 ± 0,1	0,05 ± 0,1	0,06 ± 0,1	0,05 ± 0,1
Frutos	1,85 ± 0,4	1,15 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,28 ± 0,5 <sup>b</sup>	1,97 ± 0,5	1,15 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,41 ± 0,3 <sup>b</sup>
Caules	4,67 ± 0,4	4,20 ± 0,6	3,97 ± 0,6 <sup>b</sup>	4,98 ± 0,8	3,42 ± 0,6 <sup>b</sup>	3,55 ± 0,5 <sup>b</sup>
Raízes	3,23 ± 0,3	2,27 ± 0,5 <sup>b</sup>	2,51 ± 0,2 <sup>b</sup>	3,29 ± 0,5	2,14 ± 0,5 <sup>b</sup>	2,67 ± 0,4 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Tratamento pré-germinativo: NO = sementes não osmocondicionadas; O = sementes osmocondicionadas. <sup>b</sup> Valores significativamente ( $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Tukey) diferentes das irrigadas com a manutenção da capacidade máxima de umidade. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as sementes de diferentes tratamentos pré-germinativos (NO e O). (N = 7).

A restrição hídrica (50% água) afetou igualmente a matéria seca das folhas, frutos, caules e raízes reduzindo o peso por planta. Tal redução poderia ser esperada, pois o déficit hídrico gera diminuição na absorção de água pelas raízes, inibindo a atividade meristemática e o alongamento celular, tendo como resultado a redução no crescimento e desenvolvimento da cultura (CHARTZOULAKIS & KLAPAKI, 2000), como já observado no crescimento de mudas de *Beta vulgaris* L. (beterraba) (SADEGHIAN & YAVARI, 2004).

A matéria seca dos frutos, caules e raízes também foi afetada pelo estresse salino (Tabela 3). Segundo Souza et al. (2007) *P. angulata* é pouco tolerante a alta salinidade, apresentando redução significativa da produção de matéria seca da parte aérea e radicular em solução nutritiva hidropônica. A redução do volume das raízes nas plantas expostas a salinidade pode ser uma característica favorável limitando a sua capacidade de acumular íons tóxicos na parte aérea ou em toda a planta (MUNNS, 2002; ALARCÓN et al., 2006; MIRANDA et al., 2010).

A diminuição do potencial osmótico da solução do solo, a toxicidade iônica e os desequilíbrios nutricionais causados pelo estresse salino são os principais fatores responsáveis por inibir o crescimento das plantas. Neste contexto, as plantas tendem a reduzir a atividade estomática, prevenindo a perda de água por transpiração levando, por consequência, à diminuição da taxa fotossintética e à redução do crescimento do vegetal (FLOWERS, 2004).

### 3.3.3 Quantificação de seco-esteróides em extratos de folhas e caules de *P. angulata*

Os seco-esteróides analisados em folhas e caules de plantas submetidas aos 13 dias de restrição hídrica e estresse salino apresentaram diferenças nas suas concentrações (Tabela 4).

Tabela 4. Teor de fisalinas em extratos etanólicos secos ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) de partes da planta de *P. angulata* provenientes de sementes de diferentes tratamentos pré-germinativos e submetidas a diferentes tipos de irrigação.

Sementes	NO <sup>a</sup>			O		
	100% água	50% água	NaCl aq.	100% água	50% água	NaCl aq.
<b>Folhas</b>						
Fisalina F	13,2 ± 3,4	29,4 ± 15,0	22,1 ± 3,1	20,3 ± 3,6	18,2 ± 1,3	38,1 ± 2,4 <sup>b,c</sup>
Fisalina B	16,6 ± 4,6	37,1 ± 19,3	25,4 ± 3,4	26,2 ± 4,4	31,4 ± 1,9	51,3 ± 3,2 <sup>b,c</sup>
Fisalina D	11,0 ± 1,4	20,8 ± 6,5 <sup>b</sup>	9,3 ± 1,3	11,3 ± 2,2	10,7 ± 0,5 <sup>c</sup>	17,8 ± 2,3 <sup>b,c</sup>
Fisalina G	2,3 ± 0,4	7,0 ± 2,8 <sup>b</sup>	3,5 ± 0,5	3,0 ± 1,0	5,6 ± 0,4 <sup>b</sup>	6,4 ± 1,0 <sup>b,c</sup>
<b>Caule</b>						
Fisalina F	43,2 ± 3,0	20,6 ± 2,7 <sup>b</sup>	7,6 ± 1,1 <sup>b</sup>	25,7 ± 11,4	11,5 ± 1,0 <sup>c</sup>	17,2 ± 2,6 <sup>c</sup>
Fisalina B	45,2 ± 3,1	24,2 ± 3,5 <sup>b</sup>	7,7 ± 1,2 <sup>b</sup>	29,1 ± 12,7	22,8 ± 1,4	16,0 ± 2,2 <sup>c</sup>
Fisalina D	42,6 ± 3,3	18,7 ± 1,0 <sup>b</sup>	3,5 ± 0,5 <sup>b</sup>	17,4 ± 7,7 <sup>c</sup>	8,9 ± 1,4 <sup>c</sup>	8,1 ± 1,2 <sup>c</sup>
Fisalina G	5,0 ± 0,4	6,0 ± 0,4	0,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	4,3 ± 2,6	3,5 ± 1,1 <sup>c</sup>	1,7 ± 0,3 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Tratamento pré-germinativo: NO = sementes não osmocondicionadas; O = sementes osmocondicionadas.

Valores significativamente ( $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Tukey) diferentes <sup>b</sup> das irrigadas com a manutenção da capacidade máxima de umidade ou <sup>c</sup> das respectivas sementes não osmocondicionadas são indicados. (N = 3).

Os efeitos mais significativos ( $p < 0,05$ ) da restrição hídrica e do estresse salino foram qualitativamente comuns entre si, mas houve aumento nas folhas enquanto que nos caules a diminuição do teor de fisalinas foi observada.

As folhas de plantas irrigadas com 50% da quantidade de água (restrição hídrica) apresentaram maiores teores das fisalinas F e B (sementes não osmocondicionadas) ou somente de B (sementes osmocondicionadas). Sobre o teor no caule, o efeito foi de diminuição de F, B e D independente de plantas provenientes de sementes não osmocondicionadas ou osmocondicionadas (Tabela 4).

O estresse salino teve dois efeitos mais evidentes sobre o teor de todas as quatro fisalinas, dependente do tratamento pré-germinativo: (i) o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nas folhas de plantas advindas de sementes osmocondicionadas, alcançando valores maiores também que os encontrados com mesma irrigação sobre as plantas de sementes não osmocondicionadas; (ii) a diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) nos caules de plantas que partiram de sementes não tratadas, tendo consequência sobre um aparente aumento do teor nos extratos dos caules das plantas quando oriundas de sementes osmocondicionadas.

Uma extração alternativa de fisalinas a partir de partes secas e moídas da planta envolve o uso de soro fisiológico (NaCl 0,90 g/100 mL de água) a quente (TOMASSINI et al., 2006) com rendimento comparável ao método tradicional. Este processo tecnológico evidencia como essas substâncias apresentam afinidade com a solução salina. Esse comportamento incomum pode ser uma das razões pelas quais a solução salina possibilitou um aumento nas concentrações desses seco-esteroides nas folhas das plantas que foram submetidas ao estresse salino.

Restrição da disponibilidade da água e estresse salino provocam o aumento do conteúdo de metabólitos nas plantas (KRISHNA, 2003; KAGALE et al., 2007) e há trabalhos que utilizaram cloreto de sódio (NaCl) como elicitador para a indução de metabólitos secundários (ABROL et al., 2011). NaCl 50 mM foi considerado suficiente para induzir a produção *in vitro* de metabólitos secundários em *Swertia chirata* (ABROL et al., 2011). O termo elicitador refere-se a produtos químicos de várias fontes, bióticos ou abióticos, bem como fatores físicos, que podem desencadear uma resposta em organismos vivos, resultando em acúmulo de produtos (ZHAO et al. 2001; YU et al. 2002). As vias biossintéticas e rotas metabólicas utilizadas por cada espécie são bastante específicas (JAHANGIR et al., 2009) e alguns desses produtos fazem parte do metabolismo secundário das plantas e têm função de proteger ou minimizar os efeitos do estresse no vegetal. Em *P. angulata* não está muito claro se, ou como, as fisalinas agem na proteção das plantas diante das condições ambientais adversas. Mas, pelos resultados, ficou evidente que a aplicação do estresse salino levou ao aumento na produção dessas substâncias, principalmente em folhas de plantas provenientes de sementes osmocondicionadas.

Tanto o aumento do teor de fisalinas em extratos nas folhas quanto a diminuição no caule foram em condições diferentes das que afetaram a matéria seca (Tabelas 2 e 3). Assim o efeito encontrado, principalmente de aumento, no teor de seco-esteróides (Tabela 4) parece não ser consequência da diminuição da matéria seca. Uma hipótese alternativa seria de efeitos sobre a biossíntese dessas substâncias

No presente trabalho, as fisalinas F e B aparentemente apresentaram resultados similares. A solução de NaCl foi o tratamento que induziu o aumento dessas fisalinas, em folhas, sendo que houve diferença significativa no tratamento em folhas oriundas de sementes osmocondicionadas. No entanto, uma

proporcionalidade entre os teores das quatro fisalinas, com  $B > F > D > G$ , é mantida, encontrando-se indistintamente ( $p > 0,05$ ) nas folhas e caules, com poucas exceções: a razão variando entre 1,0:0,7:0,3:0,1 e 1,0:1,0:0,8:0,2 entre os teores de fisalinas B, F, D e G. As diferentes proporções não podem ser atribuídas aos efeitos de tratamento pré-germinativo ou de estresse na irrigação pois são poucas e não correspondem aos experimentos em que os efeitos foram encontrados. A razão deve corresponder ao realmente encontrado em cada parte da planta, uma vez que parece não ser devido à seletividade do solvente de extração (etanol). As fisalinas apresentam maior solubilidade em solventes polares (o etanol neste caso) que outros esteróides, sendo estas propriedades diferenciadas entre si em ordem inversa ao teor encontrado nos extratos ( $D > G > F > B$ ). Esta observação é importante, pois demonstra que o tratamento pré-germinativo e o estresse na irrigação não afetaram a interconversão entre as fisalinas. Os efeitos observados devem ser atribuídos sobre as etapas que levam ou antecedem à primeira síntese de fisalinas. A fisalina B é uma das poucas fisalinas que apresentam matrizes de esqueleto que conduzem a biossíntese de outras substâncias afins, sendo precursora biogenética da maioria das outras fisalinas (TOMASSINI et al., 2002; 2006).

Parte dos resultados apresentados está de acordo com a observação de que alguns metabólitos secundários podem aumentar quando as plantas estão crescendo sob diferentes tipos de estresse (JAHANGIR et al. 2009). O aumento ou a diminuição na produção de metabólitos podem divergir entre as espécies, pois ainda que submetidas ao mesmo tipo de estresse, variam sua resposta metabólica secundária. Plantas de *Brassica oleracea* submetidas ao estresse salino proporcionaram aumento do conteúdo de glucosinolatos, indicando o envolvimento destes compostos na sua resposta ao estresse (LOPEZ-BERENGUER et al., 2008). Brassinosteróides em muitas espécies de *Brassica* têm uma ampla gama de atividades biológicas e capacidade de conferir tolerância às plantas em estresses bióticos e abióticos (KRISHNA, 2003).

Apesar da vasta quantidade de referências que revelam importantes propriedades terapêuticas de *P. angulata*, nenhum relato foi encontrado até então a respeito da indução das fisalinas nessa espécie em campo ou em laboratório, principalmente em plantas submetidas a estresses abióticos. Além disso, estudos

avaliando o efeito do osmocondicionamento na síntese de metabólitos secundários são escassos, ou quase inexistentes. Nesse contexto este trabalho ganha um caráter exploratório, permitindo avaliar como a produção das fisalinas pode ser influenciada por diferentes tipos de estresses. É possível prever que o estresse salino e a restrição hídrica induzem o aumento das fisalinas F, B, D e G em folhas, cultivadas em casa de vegetação.

Estes resultados tornam-se fundamentais para a condução de experimentos futuros que visem o plantio para posterior extração desses esteroides bioativos. A importância dessa espécie em aplicações terapêuticas justifica o desenvolvimento de estudos objetivando principalmente melhor entendimento dos processos bioquímicos que regulam a produção das fisalinas. Em parte estes estudos podem ser desenvolvidos visando identificar em qual estágio do desenvolvimento a planta atinge maior valor de produção dos seco-esteróides.

### 3.4 CONCLUSÃO

O envigoreamento nas taxas de emergência das plântulas de *P. angulata* oriundas de sementes osmocondicionadas foi evidente. Estresses abióticos induzem o aumento das fisalinas F, B, D e G. O efeito mais pronunciado ocorreu pelo estresse salino levando ao aumento de todas as fisalinas em folhas de plantas provenientes de sementes osmocondicionadas.

## REFERÊNCIAS

ABROL, E.; VYAS, D.; KOUL, S. Metabolic shift from secondary metabolite production to induction of anti-oxidative enzymes during NaCl stress in *Swertia chirata* Buch-Ham. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 34, n. 2, p. 541-546. 2012.

ABREU, I.N.; MAZZAFERA, P. Effects of water and temperature stress of activity constituent of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.43, n.3 p. 241-248. 2005.

ALARCÓN, J.J.; MORALES, M.A.; FERRÁNDEZ, T.; SÁNCHEZ-BLANCO, M.J. Effects of water and salt stresses on growth, water relations and gas exchange in *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, v. 81, n. 5, p. 845-853. 2006

BASTOS, G.N.; SILVEIRA, A.J.; SALGADO, C.G.; PICANÇO-DINIZ, D.L.; DO NASCIMENTO, J.L. *Physalis angulata* extract exerts anti-inflammatory effects in rats by inhibiting different pathways. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 118, p. 246–251. 2008.

BOUTRAA, T.; SANDERS, F.E. Influence of water stress on grain yield and vegetative growth of two cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science*, v. 187, n. 4, p. 251-257. 2001.

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.

BRUGGINK, G. T.; VAN DER TOORN, P. Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. *Seed Science Research*, v. 5, p. 1-4, 1995.

CAPANOGLU, E. The potential of priming in food production. *Trends in Food Science and Technology*, v. 21, p. 399-407. 2010.

CAYUELA, E., PEREZ-ALFOCEA, F., CARO, M., BOLARIN, M.C. Priming of seeds with NaCl induces physiological changes in tomato plants grown under salt stress. *Plant Physiology*, v. 96, p. 231-236. 1996

CHARTZOULAKIS, K. & KLAPAKI, G. 2000. Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Scientia Horticulturae*, v. 86, p. 247-260. 2000.

DaMATTA, F.M. Ecophysiology of tropical tree crops: an introduction. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 19, n. 4, p. 239-244. 2007.

DAMU, A.G.; KUO, P.C.; SU, C.R.; KUO, T.H.; CHEN, T.H.; BASTOW, K.F.; LEE, K.H.; WU, T.S. Isolation, structures, and structure cytotoxic activity relationships of withanolides and physalins from *Physalis angulata*. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 1146–1152. 2007.

DANTAS, I.B.; GUIMARÃES, R.M.; VON PINHO, E.V. de R.; CARVALHO, M.L.M.de. Osmotic priming methodologies in relation to the physiological performance of rangpur lime seeds (*Citrus limonia* Osbeck). *Revista Brasileira de Sementes*, v. 32, n. 3 p. 141-151. 2010.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* v. 35, n. 6, p. 1039-1042. 2011.

FLORS, V.; PARADÍS, M.; GARCÍA-ANDRADE, J.; CEREZO, M.; BOSCH, G.C.; PILAR, G.A.P. A tolerant behavior in salt-sensitive tomato plants can be mimicked by chemical stimuli. *Plant Signaling and Behavior*, v. 2, n. 1, p. 50-57. 2007.

FLOWERS, T.J. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, p. 307–319. 2004.

GOBBO-NETO, L. & LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381. 2007.

GUIMARÃES, E.T.; LIMA, M.S., SANTOS; L.A., RIBEIRO, I.M.; TOMASSINI, T.B.; DOS SANTOS, R.R.; DOS SANTOS, W.L.; SOARES, M.B. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 64, p. 84-87. 2009.

HARBORNE, J.B. & WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, p. 481-504, 2000.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; GULLIVER, R.L. Accelerated germination by osmotic seed treatment. *Nature*, v. 246, p. 42-44. 1973.

HEYDECKER, W. & COOLBEAR, P. Seed treatments for improved performance; survey and attempted prognosis. *Seed Science Technology*, v.5, n. 2. p. 353-425. 1977.

IQBAL, M. & ASHRAF, M. Seed treatment with auxins modulates growth and ion partitioning in salt-stressed wheat plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 49, p. 1003-1015. 2007.

JAHANGIR, M.; ABDEL-FARIDA, I.B.; KIM H.K.; CHOIA, Y.H.; VERPOORTEA R. Healthy and unhealthy plants: The effect of stress on the metabolism of Brassicaceae. *Environmental and Experimental Botany*, v. 67, p. 23-33. 2009.

JALEEL C.A.; MANIVANN P.; LAKSHMANAN, G.M.A.; GOMATHINAYAGAM, M.; PANNEERSELVAM, R. Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 61, p. 298-303. 2008.

JANUÁRIO, A.H.; RODRIGUES-FILHO, E.; PIETRO, R.C.L.R.; KASHIMA, S.; SATO, D.N.; FRANÇA, S.C. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). *Phytotherapy Research*, v. 16, p. 445-448, 2002.

JOSÉ, S.C.B.R.; VIEIRA, M.G.G.C.; GUIMARÃES, R.M.; REGIANE, R. Alterações fisiológicas e bioquímicas de sementes de pimentão submetidas ao osmocondicionamento, utilizando diferentes agentes osmóticos e meios de embebição. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 21, n. 2, p. 217-223, 1999.

KHAN, A. A. Preplant physiological seed conditioning. *Horticultural Review*, v.13, n. 13, p.131-181, 1992.

KAGALE, S.; DIVI, U.K.; KROCHKO, J.E.; KELLER, W.A., KRISHNA, P. Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta* v. 225, n. 2, p. 353-364. 2007.

KARAMANO, A. J.; ELSTON, J.; WADSWORTH, R. M. Water stress and leaf growth of field beans (*Vicia faba*, L.) in the field: water potentials and laminar expansion. *Annals of Botany*, v. 49, n. 6, p. 815-826, 1982.

KOYRO, H.W. Effect of high NaCl-salinity on plant growth, leaf morphology, and ion composition in leaf tissues of *Beta vulgaris* ssp *maritima*. *Journal of Applied Botany - Angewandte Botanik* v. 74, p. 67-73. 2000.

KRISHNA, P. Brassinosteroid-mediated stress responses. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 22, n. 4, p. 289-297. 2003.

KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiology*, v. 125, p. 58-60. 2001.

LEE, H.Z; LIU, W.Z.; HSIEH, W.T.; TANG, F.Y.; CHUNG, J.G; LEUNG, H.W.C. Oxidative stress involvement in *Physalis angulata*-induced apoptosis in human oral cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, n. 3, p. 561-570. 2009.

LOPEZ-BERENGUER, C.; MARTINEZ-BALLESTA, M.C.; GARCIA-VIGUERA, C.; CARVAJAL, M. Leaf water balance mediated by aquaporins under salt stress and

associated glucosinolate synthesis in broccoli. *Plant Science*, v. 174, n. 3, p. 321-328. 2008.

MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MIRANDA, D.; FISCHER, G.; ULRICH, C. Growth of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) plants affected by salinity. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, v. 83, p. 175-181. 2010.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment*, v. 25, n. 2, p. 239-250. 2002.

PATANÈ, C.; CAVALLARO, V.; COSENTINO, S. L. Germination and radicle growth in unprimed and primed seeds of sweet sorghum as affected by reduced water potential in NaCl at different temperatures. *Industrial Crops and Products* v. 30, n. 1, p.1-8. 2009.

RIBEIRO, I.M.; SILVA, M.T.G.; SOARES, R.D.A.; STUTZ, C.M.; BOZZA, M.; TOMASSINI, T.C.B. *Physalis angulata* L. antineoplastic activity, *in vitro*, evaluation from its stems and fruit capsules. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 12(Supl), p. 21-22. 2002.

ROBERTS, E.H. & ELLIS, R.H. Water and seed survival. *Annals of Botany*, v. 63, p. 39-52. 1989.

SÁ, M.S.; MENEZES, M. DE, KRETTLI, A.U.; RIBEIRO, I.M.; TOMASSINI, T.C.B.; SANTOS, R.R.; AZEVEDO JR. W.F.; SOARES, M.B.P. Antimalarial activity of Physalins B, D, F, and G. *Journal of Natural Products*, v. 74, p. 2269–2272. 2011.

SADEGHIAN, S.Y. & YAVARI, N. Effect of water deficit stress on germination and early seedling growth in sugar beet. *Journal of Agronomy and Crop Science*, v. 190, n. 2, p. 138–144. 2004.

SAIRAM, R.K. & TYAGI, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science*, v. 86, p. 407-421. 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G., MELLO, J. C. P. DE, MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universitária/UFRGS/Ed. UFSC, 2007. 821 p.

SOEDA Y., KONINGS M.C., VORST, O., VAN HOUWELINGEN A.M.; STOOPEN G.M., MALIEPAARD C.A. Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. *Plant Physiology*, 137, p. 354-368. 2005.

SOARES, M.B.P.; BELLINTANI, M.C.; RIBEIRO, I.M.; TOMASSINI, T.C.B.; DOS SANTOS, R.R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. *European Journal of Pharmacology*, v. 459, p. 107-11. 2003.

SOARES, M.B.P., BRUSTOLIM, D. SANTOS, L.A.; BELLINTANI, M. C.; PAIVA, F.P., RIBEIRO I.M., TOMASSINI T.C.B; SANTOS, R.R. Physalins B, F e G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibity lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. *International Immunopharmacology*, v. 6, p. 408-414, 2006.

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

SOUZA, C.L.M. Germinabilidade de sementes de *Physalis angulata* L. (Solanaceae) sob condições de estresses abióticos. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 2009. 53 p.

SOUZA, C. L. M.. SOUZA, M.O; OLIVEIRA, M. F. OLIVEIRA, L.M.; PELACANI, C.R. Morfologia de sementes e desenvolvimento pós-seminal de *Physalis angulata* L. *Acta Botanica Brasilica*, v. 24, n. 4, p. 1082-1085. 2010.

TAIZ, L. & ZAIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2009, 819p.

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

TOMASSINI, T.C.B.; DOS SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P.; XAVIER, D.C.D.; BARBI, N.S.; RIBEIRO, I.M.; SOARES, R.O.A.; FERNANDEZ-FERREIRA, E.P. Process for isolating physalins from plants and pharmaceutical composition containing physalins. U.S. Patent Application U.S. 2002/0103386 A1. 2002.

TOMASSINI, T.C.B.; RIBEIRO, I.M.; AMARAL, A.C.F.; SOARES, M.B.P.; DOS SANTOS, R.R. Process for obtaining dry steroids derivative from ergostane. Patente Internacional PCT WO 2006/045171 A2. 2006.

TORSSELL, K.B.G. Chemical ecology, in: TORSSELL, K.B.G. (Ed.). *Natural Product Chemistry, a Mechanistic Biosynthetic and Ecological Approach*, Swedish Pharmaceutical Press, 1997, p. 42–79.

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

VIEIRA, A.T.; PINHO, V.; LEPSCH, L.B.; SCAVONE, C.; RIBEIRO, I.M.; TOMASSINI, T.; SANTOS, R. R. DOS; SOARES, M.B.; TEIXEIRA, M.M.; SOUZA, D.G. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of the natural secosteroids physalins in model of intestinal ischemia and reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology*. v. 146, n. 2, p. 244-251. 2005.

VILLELA, F. A. & BECKERT, O. P. Potencial osmótico de soluções aquosas de polietilenoglicol 8000. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 23, n. 1, p. 267-275. 2001.

WARREN, J.E. & BENNETT, M.A. 1997. Seed hydration using the drum priming system. *HortScience* v. 32 n.7, p. 1220-1221.

YU, L.J.; LAN, W.Z; QIN, W.M.; XU, H.B. High stable production of taxol in elicited synchronous cultures of *Taxus chinensis* cells. *Process Biochemistry*. v. 38, p. 207-210. 2002.

ZHAO, J.; FUJITA, K.; YAMADA, J.; SAKAI, K. Improved  $\beta$ -thujaplicin production in *Cupressus lusitanica* suspension cultures by fungal elicitor and methyl jasmonate, *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 55, p. 301–305. 2001.

## CONCLUSÃO GERAL

O osmocondicionamento de sementes como tratamento pré-germinativo de *P. angulata* pode ser recomendado, utilizando o PEG como agente osmótico, a fim de padronizar e diminuir o tempo de germinação, especialmente quando as sementes são submetidas a altas concentrações salinas.

Plântulas provenientes de sementes osmocondicionadas foram beneficiadas com o incremento da biomassa sob condições de salinidade. Além de ter sido observado aumento de massa fresca e seca principalmente da parte aérea das plântulas, foi observado aumento na expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes como *APX*, *GST* e tioredoxina.

As plântulas de *P. angulata* oriundas de sementes osmocondicionadas apresentaram melhor fenótipo do que plântulas originadas de sementes não osmocondicionadas.

Com o estresse salino e a restrição hídrica os teores de fisalinas aumentaram em folhas e diminuíram em caules. O efeito mais pronunciado ocorreu pelo estresse salino levando ao aumento de todas as fisalinas em folhas de plantas provenientes de sementes osmocondicionadas.