

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDOS DO TRANSCRIPTOMA DE SEMENTES DE *SOLANUM
PANICULATUM* L. SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO
DURANTE A GERMINAÇÃO**

PEDRO BENTO DA SILVA

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

BOTUCATU – SP
Julho-2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDOS DO TRANSCRIPTOMA DE SEMENTES DE *SOLANUM
PANICULATUM* L. SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO
DURANTE A GERMINAÇÃO**

PEDRO BENTO DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

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

BOTUCATU – SP
Julho-2015

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

S586e Silva, Pedro Bento da, 1982-
Estudo do transcriptoma de sementes de *Solanum paniculatum* L. submetidas ao déficit hídrico durante a germinação / Pedro Bento da Silva. - Botucatu : [s.n.], 2015
ix, 53 f. : grafs., color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2015

Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva
Inclui bibliografia

1. Estatística - Análise. 2. Ácido ribonucleico. 3. Desidratação (Hídrica). 4. Genética vegetal. I. Silva, Edvaldo Aparecido Amaral da. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS DE BOTUCATU


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ESTUDOS DO TRANSCRIPTOMA DE SEMENTES DE SOLANUM PANICULATUM L.
SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO DURANTE A GERMINAÇÃO

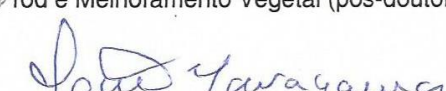
AUTOR: PEDRO BENTO DA SILVA

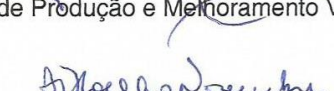
ORIENTADOR: Prof. Dr. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

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


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


Profa. Dra. JULIANA PEREIRA BRAVO
Dep Prod e Melhoramento Vegetal (pós-doutoranda) / Faculdade de Ciências Agrônomicas


Prof. Dr. JOAO NAKAGAWA
Dep de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu


Profa. Dra. ANA DIONISIA DA LUZ COELHO NOVENBRE
Departamento de Produção Vegetal -Sementes / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
- Usp


Prof. Dr. CLÁUDIO JOSÉ BARBEDO
Núcleo de Pesquisa em Sementes / Instituto de Botânica

Data da realização: 30 de julho de 2015.

OFEREÇO E DEDICO

Primeiramente a Deus, Criador do Céu e da Terra pelo dom da vida...

Aos meus amados pais, Manoel Bento (*in memorian*) e Edite Ribeiro pela educação e pelo
incentivo...

Aos meus irmãos: Francisco Bento, Maria Célia e Quitéria Bento pelo apoio, amor fraterno
e companheirismo de sempre...

AGRADECIMENTOS

A Deus, por se fazer Onipresente em todos os momentos da minha vida e pelas oportunidades colocadas em meu projeto de vida;

Aos meus pais, pelo dom da vida e em especial à mãe Edite Ribeiro pelo esforço feito para que pudesse realizar mais este sonho e aos meus irmãos Francisco Bento, Maria Célia e Quitéria Bento compreensão mesmo à distância;

À minha namorada Leidiane Coelho, por seu carinho, sua dedicação e seu companheirismo durante parte dessa jornada;

A Universidade Estadual Paulista – UNESP (Faculdade de Ciências Agrônomicas-Botucatu), pela oportunidade de crescimento profissional com a realização do doutorado;

Ao Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, pela orientação, pelos ensinamentos e conselhos que foram fundamentais para vida acadêmica e profissional;

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa durante o período de doutorado;

A todos os professores do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônomicas – UNESP/ Botucatu pelos ensinamentos;

Ao Prof. Dr. João Nakagawa, pela participação na banca de qualificação, defesa, pela atenção e ajuda;

Ao Dr. Alessandro de Melo Varani da (UNESP-JABOTICABAL), Dr. Marcio Luiz Aécio e ao Msc. Luiz Augusto Boveia, UNESP-Botucatu pela ajuda com as análises de bioinformática;

À Dr^a Juliana Pereira Bravo, pela paciência, ajuda e partilha dos seus conhecimentos, a quem não tenho palavras para agradecer;

À Dr^a Andrea Akemi Hoshino pelas palavras incentivadoras, pela amizade e pelos aconselhamentos;

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal e melhoramento em especial a Valéria Cristina pelo apoio e pela ajuda durante a condução do experimento, além de seus valiosos ensinamentos;

Aos meus amigos de república, Carlos Jorge, Rodrigo Repke, Breno Bezerra, Alexandre Carneiro, Wilson Dourado pelo apoio, pela paciência e pela amizade que se formou ao longo de nossa convivência diária;

Aos colegas do laboratório de sementes, Alexandre Carneiro, Camila Tomaz, Barbara Panoff, Denise Basso, Daiani Ajala, Helen Sígilia, Rubiana Rossi, Renake Teixeira e Tiago Alexandre.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

Índice	Página
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ANEXOS	IX
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. OBJETIVOS	6
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
3.1 <i>Solanum paniculatum</i> L.....	7
3.2 <i>Priming</i> em sementes.....	8
3.3 Estudos de expressão gênica em sementes por meio da técnica “RNA-Seq”.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Obtenção das sementes	14
4.2 Determinação do teor de água das sementes.....	15
4.3 Teste de germinação	15
4.4 <i>Priming</i>	15
4.5 Germinação em condições de déficit hídrico	15
4.6 Extração de RNA total.....	16
4.7 Verificação da Qualidade do RNA total.....	17
4.8 Sequenciamento de RNA.....	18
4.9 Análise de bioinformática	19
4.9.1 Validação dos transcritos relacionados a déficit hídrico via RT-PCR	20
4.9.2 <i>Priming</i> e Germinação em condições de déficit hídrico.....	20
4.9.3 Extração do RNA total e síntese de cDNA	21
4.9.4 Desenho de <i>primers</i> específicos	21
4.9.5 Quantificação da expressão relativa por PCR em tempo real	22
4.9.6 Análise estatística dos dados	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1 Teste de germinação	25
5.2 <i>Priming</i> e germinação em condição de déficit hídrico	26
5.3 Análise dos transcritos obtidos.....	28

5.4 Validação dos transcritos relacionados a déficit hídrico via RT-qPCR	39
6. CONCLUSÕES.....	42
7. REFERÊNCIAS.....	43
8. ANEXOS	53

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 1. Dados de concentração de RNA total, razão 260/280 e 260/230 extraídos de amostras de sementes de <i>Solanum paniculatum</i> L. amostras não condicionadas (NC) e condicionadas a -1,0MPa.	18
Tabela 2. <i>Primers</i> específicos e de normalização estudados em sementes de <i>Solanum paniculatum</i> L para análise de PCR em tempo real.	23
Tabela 3. Genes (mRNAs) em sementes de <i>Solanum paniculatum</i> L. relacionados ao estresse abiótico.	24
Tabela 4. Análise de enriquecimento funcional dos transcritos diferencialmente expressos de acordo com o termo GO-ID e suas categorias funcionais em sementes <i>Solanum paniculatum</i> L. não condicionadas (NC) e condicionadas a -1,0MPa.	32

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Integridade do RNA total (região 18S e 28S) extraído de sementes de <i>Solanum paniculatum</i> L. analisadas por Bionalyzer e utilizadas no sequenciamento.	18
Figura 2. Germinação de sementes de <i>Solanum paniculatum</i> L. incubadas na temperatura de 25 °C e em luz constante.	25
Figura 3. Porcentagem final de germinação de sementes não condicionadas (NC) condicionadas a -1,0MPa de <i>Solanum paniculatum</i> L. expostas a diferentes níveis de déficit hídrico.....	26
Figura 4. Índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes condicionadas não condicionadas (NC) condicionadas a -1,0MPa de <i>Solanum paniculatum</i> L. expostas a diferentes níveis de déficit hídrico.....	27
Figura 5. Tamanho dos transcritos (pb) expresso em porcentagem obtidos de sementes de <i>Solanum paniculatum</i> L. não condicionadas (NC) e condicionadas a -1,0MPa.	29
Figura 6. Porcentagem de transcritos que apresentaram codificação e não codificação (<i>coding and non-coding</i>) (A), porcentagem de transcritos que apresentaram acertos e não-acertos (<i>hit e non-hit</i>) (B), em sementes <i>Solanum paniculatum</i> L. não condicionadas (NC) condicionadas a -1,0MPa.	29
Figura 7. Porcentagem de transcritos que apresentaram e não apresentaram anotações (A) e porcentagem de transcritos que apresentaram respostas a estímulos e outras anotações (B), em sementes de <i>Solanum paniculatum</i> L. não condicionadas (NC) condicionadas a -1,0MPa.	30
Figura 8. Classificação funcional dos transcritos diferencialmente expressos que apresentaram estímulos, com base no GO, em sementes de <i>Solanum paniculatum</i> L. não condicionadas (NC) condicionadas a -1,0MPa.....	31
Figura 9. Níveis de expressão relativa dos genes mais expressos em sementes de <i>Solanum paniculatum</i> L. não condicionadas e condicionadas a -1,0MPa, validados por RT-qPCR.. *genes que se diferem estatisticamente do controle endógeno.	40

LISTA DE ANEXOS

Anexo	Página
Anexo 1. Tabela de comparação de médias para porcentagem final de germinação em déficit hídrico de sementes de <i>Solanum paniculatum</i> L. não condicionadas (NC) e condicionadas a -1,0MPa.	53
Anexo 2. Tabela para comparação de médias de índice de velocidade de germinação em déficit hídrico de sementes de <i>Solanum paniculatum</i> L. não condicionadas (NC) e condicionadas a -1,0MPa.	53

RESUMO

A planta de *Solanum paniculatum* pertence à família Solanaceae e apresenta crescimento e desenvolvimento em condições ambientais desfavoráveis, tais como estresse hídrico e salino, solos ácidos e solos com deficiência em nutrientes. Por tanto, o objetivo deste trabalho foi estudar o transcriptoma de sementes de *S. paniculatum* L induzidas a tolerar déficit hídrico. As sementes secas foram acondicionadas em tubos contendo 15 mL de solução de PEG 8000 com potencial osmótico de -0,4; -0,8; -1,0 e -1,2MPa e mantidas à temperatura de 15 °C durante 15 dias. Em seguida, as sementes foram colocadas para germinar em condições de déficit hídrico, que foi realizado pelo uso de meio germinativo contendo soluções de PEG 8000 nos potenciais de 0,0, -0,2, -0,4, -0,6, -0,8 e -1.0 MPa na temperatura de 25 °C e luz constante. Após a conclusão dessa etapa, o melhor tratamento (-1,0 MPa) foi utilizado para os estudos moleculares. Posteriormente, foi extraído o RNA total das sementes condicionadas e não condicionadas (NC). Em seguida a integridade do RNA foi verificada em Bioanalyzer e as bibliotecas foram preparadas utilizando o protocolo TruSeq RNA sample prep v2. O sequenciamento foi realizado no HiScanSQ (Illumina) e os dados gerados analisados pela plataforma CLC Genomics Workbench versão 6.0.2 (CLC bio, Denmark). Os *contigs* foram anotados usando o programa Blast2go e o enriquecimento funcional pelo GO e Bingo. Os genes diferencialmente obtidos foram validados via RT-qPCR. Observou-se aumento na porcentagem de germinação total das sementes condicionadas (-1,0 MPa) em relação às não condicionadas (NC). Foram gerados 34.640 transcritos, onde 208 transcritos foram diferencialmente expressos, porém, 23 apresentaram respostas a estresse em sementes de *S. paniculatum* L, associados com estresse abiótico (déficit hídrico, estresse térmico e estresse oxidativo). Entre estes, treze genes tiveram a expressão validada por RT-qPCR. Neste trabalho, nos discutimos o possível envolvimento destes genes na tolerância a estresse de sementes de *Solanum paniculatum* durante a germinação.

Palavras-chave: Expressão diferencial; RNA-Seq; *Priming*; Tolerância induzida.

STUDY OF THE TRANSCRIPTOME OF *SOLANUM PANICULATUM* L. SEEDS
SUBMITTED TO WATER DEFICIT DURING GERMINATION

Botucatu, 2015. 53 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura). Faculdade de
Ciências Agronômicas. Universidade Estadual Paulista

Author: Pedro Bento da Silva

Advisor: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

ABSTRACT

Solanum paniculatum L belongs to the Solanaceae family and presents growth and development in unfavorable environmental conditions such as drought and salt stress, acid soils and soils poor in nutrients. Therefore, the objective of this work was to study the *S. paniculatum* L seed transcriptome induced to tolerate drought stress. The dried seeds were placed in tubes containing 15 mL of PEG 8000 solution with osmotic potential of -0.4; -0.8; -1.0 and -1.2MPa followed by incubation at 15° C for 15 days. Then the seeds were subjected to germinate under drought conditions, which was generated by the use of germination medium containing PEG 8000 solutions at potentials of 0,0, -0,2, -0,4, -0,6, -0,8 and -1,0 MPa at 25° C under constant light. Following, RNA was extracted and had the quality verified in Bioanalyzer and libraries were prepared using the TruSeq RNA sample prep protocol v2. Sequencing was performed on HiScanSQ (Illumina) and the data generated were analyzed in CLC Genomics Workbench platform version 6.0.2 (CLC bio, Denmark). The contigs were recorded using Blast2go program and functional enrichment for GO and Bingo. We observed an increase in the percentage of germination under drought stress of seeds previously subjected to PEG treatment (-1,0MPa) in comparison with seeds that were not treated. There were generated 34.640 transcripts, where 208 were differentially expressed but only 102 transcripts were associated with stress. However, only twenty three transcripts have known function which are associated with response to stress (drought, heat and oxidative stress). Among those, thirteen genes had the expression validated by qPCR. Here, we discuss the possible involvement on these genes on stress tolerance in *Solanum paniculatum* seeds during germination.

Keywords: Differential expression; RNA-Seq; *Priming*; Induced tolerance

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é mundialmente conhecido pela sua biodiversidade, em função do um número elevado de espécies vegetais endêmicas. A biodiversidade brasileira está em risco devido ao aumento das atividades humanas, como a agricultura moderna, o aumento da população, o fogo, a produção de carvão e a mineração. Portanto, são necessárias ações que possibilitam a conservação, o uso sustentável e o retorno dos benefícios para a sociedade brasileira. Por exemplo, muitas espécies nativas são consideradas resistentes ou tolerantes às altas temperaturas e ao déficit hídrico. Estas características são desejáveis para melhorar a produção agrícola, introduzindo-as através do uso da biologia molecular moderna (transformação de plantas) em plantas de interesse econômico e a identificação de marcadores associados à tolerância e estresses e aos abióticos.

As plantas durante o ciclo de vida são expostas aos estresses bióticos e abióticos. A fase de estabelecimento da plântula pode ser considerada como uma fase sensível na vida das plantas superiores e dependente da qualidade das sementes. A resistência a estresse abiótico é uma característica única das sementes, que ainda é pouco explorada com o objetivo de gerar novos métodos (marcadores) para avaliar a qualidade de sementes, para auxiliar o desenvolvimento de novos materiais aos tolerantes a estresses ambientais durante a germinação e o estabelecimento da plântula em campo.

Além do componente genético, o desempenho das sementes pode ser influenciado positivamente por estresses ambientais, pois podem induzir tolerância cruzada em favor de um desenvolvimento subsequente, incluindo o desempenho da planta adulta (BOWLER; FLUHR, 2000; PASTORI; FOYER, 2002; CAPIATI et al., 2006). Há evidências de que tolerância cruzada ocorre em sementes. Este princípio é usado pela indústria de sementes como tratamento de condicionamento fisiológico (*priming*) que induz melhorias na qualidade e no vigor das sementes favorecendo a germinação da semente e o desenvolvimento das plântulas em condições adversas do campo (BALBINOT; LOPES, 2006; PATANÈA et al., 2009).

O princípio da tolerância cruzada baseia-se na hipótese de que a exposição das sementes ao estresse induz à expressão de genes (do embrião) que são comuns à resistência aos vários estresses (bióticos e abióticos) e que a atividade desses genes é preservada nas sementes, na plântula e na planta (BRUCE et al. 2007). Nesse processo, a hidratação das sementes é controlada permitindo que apenas as primeiras etapas do processo de germinação (fases I e II) sejam completadas. Assim, o processo germinativo é iniciado sem que ocorra a protrusão da radícula (fase III) (BRADFORD, 1986).

O estresse hídrico simulado pelo potencial de água das soluções osmóticas de PEG pode fazer com que a semente, durante o condicionamento, induza mecanismos de tolerância relacionados com proteção e reparo. O reparo ocorre quando a semente seca é hidratada na presença de agentes osmóticos, como o PEG, passa a ter a hidratação desacelerada, havendo mais tempo para reestruturação e reorganização de membranas reduzindo o nível de perda celular (VESELOVA et al., 2003; KAUSAR et al., 2009).

A planta de *Solanum paniculatum* L pertence à família Solanácea e apresenta crescimento e desenvolvimento em condições ambientais desfavoráveis, tais como estresse hídrico e salino, solos ácidos e solos pobres em nutrientes (VIDAL et al., 1999; LORENZI; MATOS, 2002; GARCIA et al., 2008). Estudar esta espécie e explorar seus mecanismos adaptativos pode levar ao conhecimento de estratégias importantes de sobrevivência em condições de estresse e permitir o desenvolvimento de técnicas aplicáveis ao melhoramento genético de plantas de espécies que não têm essas características (FAROOQ et al., 2009).

Entre as várias alternativas disponíveis para se entender a capacidade desta planta de se estabelecer em condições de estresse abiótico, há a combinação da técnica do *priming* e o estudo do transcriptoma, por meio da técnica de RNA-seq, durante a indução ao estresse (VASCONCELOS et al., 2010; KAWAHARA et al. 2012).

O uso desta técnica pode ajudar a compreensão do mecanismo molecular de tolerância desenvolvido por *S. paniculatum* L que predomina em regiões de regime hídrico irregular. Além disso, os conhecimentos dos principais genes poderão contribuir, no futuro, para a compreensão do efeito do estresse abiótico em outras plantas pertencentes à família Solanaceae, que são conhecidos principalmente por sua grande importância econômica, conferido ao seu maior e mais complexo gênero (*Solanum*), onde existem espécies com elevado grau de representatividade devido às suas respectivas contribuições para a economia do país, como é o caso da batata (*S. tuberosum* L.), o tomateiro (*S. esculentum* L.) e a berinjela (*S. melongena* L.) entre outras. Ainda neste gênero são encontradas plantas ornamentais e plantas invasoras de culturas (MARTINS, 1998).

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

Induzir tolerância a déficit hídrico em sementes de *Solanum paniculatum* L.

Estudar do transcriptoma de sementes de *Solanum paniculatum* L. submetidas ao déficit hídrico durante a germinação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Solanum paniculatum* L

O gênero *Solanum* contém 1500 espécies distribuídas por todo o mundo. As plantas desse gênero estão nas regiões tropicais e subtropicais e estima-se cerca de 1000 a 1100 espécies do gênero estão em regiões da América do Sul. Muitas espécies do gênero são conhecidas por sua importância econômica, como tomate (*S. lycopersicum* L), berinjela (*S. melongena* L) e batata (*S. tuberosum* L), além de plantas medicinais, ornamentais e invasoras como no caso do *S. paniculatum* L. (MARTINS, 1998; LORENZI; MATOS, 2002).

No território brasileiro o gênero *Solanum* é representado nas regiões Sudeste por 193 espécies, no Sul por 87 e na Nordeste por 80 espécies (MENTZ; OLIVEIRA, 2004). Obviamente, este gênero tem despertado interesse em estudos devido principalmente, os compostos de varias espécies de plantas que têm como característica grande variedade de produção de compostos glicoalcaloides (FERREIRA et al., 1996; LORENZI; MATOS, 2002; SCHMOURLO et al., 2005).

A planta de *Solanum paniculatum* L. é denominada de jurubeba, jurubeba verdadeira ou jurubebinha e é uma espécie nativa de quase todo Brasil, que ocorre em todo o território nacional e em outras áreas da América do Sul.

A planta de *S. paniculatum* L. é perene, arbustiva, ereta atingindo de 2 a 3 m de altura, ramificada, com folhas pecioladas de tonalidade verde-escura na face superior, com inflorescências cimosas e de flores azuis aparece na parte terminal dos ramos, onde se concentram muitas folhas aproximadas, elevando-se longos pedúnculos, com até 15 cm de comprimento. O fruto é uma baga esférica, amarelada quando madura, presa a um pedúnculo comprido e nos caules têm pelos e espinhos (PANIZZA. 1997; GARCIA et al., 2008). Os frutos são pequenos, de cor amarela quando maduros e são essências para alimentação de morcegos frugívoros que dispersam as sementes na natureza (LORENZI; MATOS, 2002).

Esta espécie é considerada uma planta colonizadora, surgindo imediatamente após a alteração da vegetação e a formação de clareiras (ARAÚJO et al., 2001). É uma planta resistente às intempéries bióticas e abióticas, adaptadas às áreas de solos com deficiência de nutrientes, salinos e regiões de variações de regime hídrico e pode ocupar pomares, estradas e ao longo de rodovias (LORENZI; MATOS, 2002). Os frutos são consumidos pelo homem em diferentes regiões do país como condimentos, em forma de conservas, aditivos para aguardente ou para a fabricação de bebidas fermentadas. As mudas podem ser usadas como porta-enxerto para plantas jovens de tomate (*Solanum lycopersicum*) para garantir rusticidades às futuras plantas (BRASIL, 2010).

A planta de *Sonalum paniculatum* L é utilizada na medicina alternativa, pelo seu valor medicinal (MASIA-VELA et al., 2002) as folhas, as flores, os caules e os frutos são ricos em inibidores de ácidos gástricos, que podem ser usados para diferentes fins: xaropes, infusões, extratos, tinturas e elixir. Geralmente, são indicados em caso de bronquite, tosse, artrite, artrose, anemia e úlceras, (SUS, 1999) e para controle de parasitas intestinais (BOTION et al., 2005).

3.2 Priming em sementes

A eficiência da germinação das sementes e do estabelecimento precoce das plântulas em campo são essências para a agricultura comercial. A rapidez e a uniformidade da plântula levam a um estabelecimento bem sucedido, uma vez que desenvolve um sistema radicular profundo antes das camadas superiores (camada arável) do solo secar, endurecer, provenientes de período de déficit hídrico após a semeadura (HARRIS, 1996). No entanto, sementes secas e armazenadas muitas vezes apresentam

germinação lenta e desuniforme, principalmente quando o armazenamento é realizado de forma inadequada.

Além disso, as sementes germinam e as plântulas são sensíveis à desidratação devido ao estresse abiótico, em parte, à perda progressiva da tolerância à dessecação após hidratação da semente. Mudanças futuras nas condições climáticas (padrões de chuvas e temperaturas extremas), presumivelmente, podem agravar ainda mais (LEPRINCE et al., 2000). Contudo, o *priming* é umas das alternativas, frequentemente usada, para melhorar a qualidade e o desenvolvimento das sementes, plântula e planta.

A hidratação das sementes durante a germinação geralmente implica em três fases distintas: Fase I é um processo físico em que ocorre absorção de água devido ao gradiente de energia, de maior potencial (menos negativo) para um de menor potencial (mais negativo), ocorre em sementes viáveis e não viáveis. Fase II, a fase lenta, com pouca absorção de água, mas envolve transição da fase lenta ao estado de germinação. Fase III que é caracterizada pelo aumento da absorção de água e pela a protrusão da raiz (BEWLEY et al 2013).

O *priming* em sementes é uma hidratação parcial pré-semeadura que oferece a possibilidade de aprimorar a qualidade de sementes, possibilitando o aumento da taxa de germinação, velocidade e uniformidade de emergência da plântulas, (BRADFORD, 1986). O *priming*, essencialmente envolve o início do metabolismo da germinação pela hidratação controlada das sementes até a segunda fase do padrão trifásico de germinação, em que vários processos metabólicos são ativados, mas sem permitir que ocorra a protrusão da raiz (HEYDECKER et al., 1973; McDONALD, 1999).

As técnicas comumente usadas incluem hidratação das sementes em soluções de baixo potencial hídrico, com o uso de agentes osmóticos como Polietileno Glicol-PEG e com a água (FAROOQ et al, 2008; KORKMAZ; KORKMAZ, 2009).

Notavelmente, a germinação propriamente dita contém apenas as fases I e II e III do padrão trifásico (NONOGAKI et al., 2007). Assim, o condicionamento pode ser considerado como um tipo especial de germinação, em que frequentemente a fase II é prolongada (RUSSELL et al., 2000; MYINT et al., 2010).

Efeitos positivos do *priming* sobre a porcentagem final, a uniformidade e o índice de velocidade de germinação em condições ambientais adversas têm sido relatados para as sementes varias espécies, como as de milho (*Zea mays*), as de soja (*Glycine max*), as de espinafre (*Spinacia oleracea*), as de pimenta (*Capsicum*

annuum), e as de trigo (*Triticum aestivum*) (IQBAL; ASHRAF, 2007; FAROOQ et al., 2008; KORKMAZ; KORKMAZ, 2009).

Os agentes osmóticos comumente utilizados são o PEG (polietilenoglicol) e os sais inorgânicos $MnSO_4$, $MgCl_2$, $NaCl$ e $NaNO_3$. O PEG é bastante utilizado por não ser fitotóxico, não atravessar o sistema de membranas, devido ao tamanho da sua molécula (6000 e 8000), embora, a imersão das sementes em PEG, sem aeração suplementar causa a falta de oxigênio (HARDEGREE; EMMERICH, 1994). Os sais inorgânicos podem ser usados, embora quando em contato com a água, suas moléculas se dissociam e podem passar através das membranas celulares e, assim, influencia ou alterar os mecanismos celulares independentes do estresse osmótico. Por exemplo, durante o *priming* das sementes de girassol (*Helianthus annuus*) e do amaranto (*Amaranthus cruentus*) com $NaCl$ houve efeito tóxico que impediu a germinação dessas sementes (DAMIRKAYA et al., 2006; MOOSAVI et al., 2009).

O Mecanismo celular de sementes no que se refere à germinação, bem como a tolerância ao estresse, não são ainda totalmente elucidados. O *priming* quando aplicado nas sementes induz tolerância às condições adversas. No entanto, essa técnica consiste em uma exposição inicial ao estresse abiótico (temperatura, restrição hídrica ou condição de salina) que amplia a tolerância a um estresse biótico ou abiótico subsequente (CONRATH et al., 2006; BRUCE et al., 2007).

O processo que é utilizado para exposição inicial ao estresse abiótico é chamado de aclimação ou rusticidade e é aplicado em mudas ou plantas. O condicionamento fisiológico de sementes, por outro lado, é um processo de germinação parcial, em que o estresse moderado é utilizado para evitar a protrusão radicular. Isso a indução de diferentes mecanismos celulares de tolerância a estresse. Assim, o condicionamento de sementes e a aclimação de mudas podem induzir uma “memorização” mediada por proteínas, fatores de transcrição. Além disso, essa memória muitas vezes é mantida com o crescimento da planta (BRUCE et al., 2007; CHINNUSAMY; ZHU, 2009).

No caso do condicionamento osmótico, (*osmopriming*), de sementes a exposição inicial ao estresse moderado, permite que as sementes adquiram tolerância ao estresse, que não é perdida mesmo quando as mesmas são secas (HEYDECKER et al., 1973; McDONALD, 1999). Aparentemente, o condicionamento fisiológico em sementes favorece a tolerância cruzada que é uma condição favorável da

planta em relação a um desenvolvimento subsequente, que pode permitir maior tolerância a estresse (SOEDA et al., 2005; CHEN;ARORA, 2011).

O estudo do transcriptoma e do proteoma após o *priming* das sementes de repolho (*Brassica oleracea*), de arábida (*Arabidopsis thaliana*) e de canola (*Brassica napus*) revelou que a maioria dos genes e das proteínas com expressão alterada durante a germinação, apresentou padrões semelhantes (SOEDA et al., 2005; KUBALA et al., 2015). Na verdade, muitos eventos relacionados à germinação após o *priming* como (transcrição e tradução, respiração e energia, mobilização de reservas antecipadas e reparo do DNA), muitas vezes são restritos, devido à redução de água em comparação com ao estado de germinação (SCHWEMBER, A. R.; BRADFORD, 2010; KUBALA et al., 2015).

Resposta a estresse em sementes condicionadas tem sido relatada em diversas espécies, tais como, Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), tomate (*S. esculentum* L), espinafre (*Spinacia oleracea*) e canola (*Brassica napus*) (CHEN;ARORA, 2011;. CHEN et al, 2012). O aumento da velocidade de germinação não é a única estratégia utilizada por sementes condicionadas para tolerar situações de estresse subsequente. De acordo com Bruce et al. (2007), o *priming* é considerado como uma situação pré-germinativa de exposição a determinado estresse que pode induzir a semente a armazenar uma memória de tal situação. Assim, a melhoria da tolerância ao estresse durante à germinação, também, pode ser uma manifestação de “tolerância cruzada” ou induzida pelo condicionamento fisiológico (WAHID et al., 2008; MEI; SONG, 2008; PATADE et al., 2009; SRIVASTAVA et al., 2010).

3.3 Estudos de expressão gênica em sementes por meio da técnica “RNA-Seq”

Nas últimas décadas o uso e a aplicação de técnicas avançadas de biológica molecular têm possibilitado o entendimento da relação das sementes com as condições adversas de seus habitats. Como, por exemplo, as sementes dos biomas de Cerrado e da Caatinga que germinam e originam plântulas que se desenvolvem em condições adversas variações de temperaturas, de disponibilidade de água e da qualidade dos solos (acidez e deficiência de nutrientes). Evidentemente, testando diferentes parâmetros moleculares é possível deduzir quais mecanismos podem estar envolvidos nas espécies de plantas desses ambientes em particular. Além disso, é possível inferir sobre quantos e quais grupos ou grupos de genes estão relacionados com esse mecanismo de

sobrevivências das espécies nestes biomas. Uma vez compreendida a expressão destes genes, essa informação pode ser utilizada para a determinação ou verificação de mecanismos de tolerâncias a déficit hídrico, em sementes de inúmeras espécies.

Em sementes, a análise de transcriptoma tem sido empregada para a identificação de genes de resposta aos estresses bióticos e abióticos, uma vez que tem a função de compreender o funcionamento do gene e dos mecanismos moleculares envolvidos nesses eventos biológicos (PATANÈA et.al., 2009; YANG et al., 2010). Neste contexto, técnicas para auxiliar estudos do transcriptoma aliadas ao sequenciamento de RNA-Seq podem gerar um número de informação e fornecer indicações da função dos genes e nível de expressão na semente.

A técnica de sequenciamento de alto rendimento usadas em biologia celular e vegetal, de forma eficiente, têm transformado os estudos aplicados ao mapeamento e à quantificação do transcriptoma. Designado como RNA-Seq (*RNA sequencing*), este método, considerado revolucionário na área de sequenciamento, está livre de algumas limitações das técnicas anteriores, tais como o conhecimento prévio do genoma das espécies em estudos, tal como exigido por microarranjos. Além disso, o RNA-Seq facilita as análises complexas, anteriormente inacessíveis do transcriptoma, tais como a expressão específica de alelos, novos promotores e isoformas (ZHANG et al., 2002; PAN et al., 2008). Uma das vantagens é a ausência de “ruídos” ou quase total e possibilidade de detectar um número elevado de cópias de mRNA por célula (XU et al., 2012).

Tecnologias de sequenciamento de alto rendimento usadas em biologia celular e vegetal, de forma eficiente, têm transformado os estudos aplicados ao mapeamento e à quantificação do transcriptoma. Designado como RNA-Seq (*RNA sequencing*), este método considerado revolucionário, na área de sequenciamento, está livre de algumas limitações das tecnologias anteriores, tais como conhecimento prévio do genoma das espécies em estudos, tal como exigido por microarranjos. Além disso, o RNA-Seq facilita as análises complexas, anteriormente inacessíveis do transcriptoma, tais como a expressão específica de alelos, novos promotores e isoformas (ZHANG et al., 2002; PAN et al., 2008). Uma das suas grandes vantagens é a ausência quase total de “ruídos” e a capacidade de detectar um número elevado de cópias de mRNA por célula (XU et al. 2012).

O método de sequenciamento de RNA-seq consiste, das seguintes etapas: um contingente de RNA totais, como por exemplo, com a calda poli (A) é

convertida em uma biblioteca contendo fragmentos de cDNA; logo em seguida, estes fragmentos recebem adaptadores (*inserto*) ligados em suas extremidades (bases de DNA) (VAN VLIET, 2010). Posteriormente, cada molécula com ou sem amplificação é sequenciadas (sequenciamento single-end) ou ambas as extremidades (sequenciamento *pareid-end*) gerando uma sequência curta (*reads*), na ordem de 30 a 400 pares de base; esses “*reads*” são alinhados a um genoma de referência (ou outro transcriptoma) ou até mesmo remontados para as espécies que não têm um genoma de referência, a fim de criar um mapa em escala genômica que é composto pela estrutura transcricional ou o nível de expressão de cada gene individualmente (WANG et al., 2009; OSHLACK et al., 2010; VAN VLIET, 2010).

Em princípio, a técnica de sequenciamento de nova geração de alto rendimento podem ser utilizadas para o sequenciamento de RNA, os sistemas Illumina IG18-21,23 Applied Biosystems SOLiD e Roche 454 Life Science, têm sido aplicados para este fim (PAN et al., 2008; SHENDURE; JI, 2008). Devido às vantagens das s abordagens existentes a respeito desse tipo de sequenciamento, o RNA-Seq revolucionou a maneira pela qual os transcriptomas dos eucariontes são investigados, aplicados inicialmente em leveduras, plantas modelos como *Arabidopsis thaliana*, ratos e seres humanos. Nas décadas atuais, estudos têm abordado, de modo fidedigno, complexos processos significativos para compressão de expressão gênica em plantas de arroz, soja, tomate, beterraba e outras plantas cultivadas (WANG et al., 2009; Xu et al., 2012; GAO et al., 2013) e as respostas aos estresses biótico e abiótico (VASCONCELOS et al., 2010; KAWAHARA et al., 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das sementes

O trabalho foi realizado no Laboratório de Análise Sementes do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal, da Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu.

Frutos maduros de *S. paniculatum* L. foram coletados de cinco matrizes na região de Lavras, MG (latitude 21° 14' 43'' S, longitude 45° 59' 59'' W Gr. e 918 m de altitude). A polpa foi retirada manualmente e passada por uma peneira sob água corrente, para a separação das sementes. As sementes foram secas em ambiente de laboratório (23±2°C, 60% UR) até atingirem 8% de água e armazenadas em câmara fria a 4 °C por aproximadamente dois anos.

4.2 Determinação do teor de água das sementes

A determinação do teor de água das sementes foi realizada, utilizando-se quatro amostras de 0,5 g de sementes cada, pelo método de estufa a 103 ± 2 °C por 17 horas (BRASIL, 2009). As sementes foram semeadas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro sobre duas folhas de papel Germitest® umedecidas com 5 mL de água destilada e mantidas à temperatura de 25 °C, sob luz constante, utilizando-se quatro repetições de 25 sementes.

A germinação foi avaliada diariamente durante 17 dias, usando como critério a raiz primária com comprimento igual ou superior a 1 mm.

4.3 Teste de germinação

As sementes de *S. paniculatum* L foram esterilizadas em uma solução hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos, posteriormente lavadas em água corrente por três minutos e secas em papel

4.4 Priming

As sementes secas foram acondicionadas em tubos contendo 15 mL de solução de PEG 8000 com potenciais de -0,4; -0,8; -1,0 e -1,2MPa, calculados de acordo com Villela e Beckert (2001) e mantidas em germinador, do tipo BOD, na temperatura de 15 °C durante 15 dias, com luz constante. As soluções osmóticas foram trocadas após 24 horas e, também, aos 5 e 10 dias de incubação. A fim de evitar alterações nos potenciais, estas soluções foram monitoradas a cada 48h utilizando um Refratômetro manual de precisão modelo 103, BIOBRIX . Para manter a aeração da solução, foi feito um orifício na tampa dos tubos e, em seguida, os mesmos foram colocados em agitador (Multifunctional mixer modelo MR-II, marca Biomixer) durante todo o período de condicionamento.

4.5 Germinação em condições de déficit hídrico

Após o condicionamento fisiológico, as sementes foram lavadas em água corrente durante um minuto para retirada de resíduo de PEG e avaliadas quando à germinação em condição de déficit hídrico. Para isso, foram colocadas duas

folhas de papel Germitest® em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, umedecidas com 6 mL de solução de PEG 8000 nos potenciais osmóticos de 0,0; -0,2; -0,4; -0,6; -0,8 e 1,0 MPa e incubadas em BOD a 25°C com luz constante. Para manter constante o potencial osmótico do meio germinativo, o substrato (papel Germitest) e a solução de PEG foram trocados a cada três dias. Diariamente, foram avaliados a germinação em (porcentagem) raiz primária com comprimento igual ou superior a 1 mm, durante 30, com os dados foram calculados a germinação em (%) e o índice de velocidade de germinação (MAGUIRE, 1962).

Com base nos resultados da germinação das sementes submetidas ao condicionamento sob diferentes potenciais osmóticos em condição de déficit hídrico, o condicionamento em solução osmótica de -1,0 MPa foi selecionado como tratamento a ser utilizado para os estudos moleculares. Como critério, considerou-se o potencial de condicionamento osmótico que permitiu porcentagem de germinação superior na simulação de déficit hídrico.

4.6 Extração de RNA total

Para a extração de RNA 100 sementes sem tratamento (NC) e 100 sementes submetidas ao condicionamento osmótico em solução de PEG 8000 a -1,0 MPa, nas condições já descritas, foram acondicionadas em tubos plásticos de 1,5 mL, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em *deep freezer* à temperatura de -80 °C, até o momento da extração do RNA total.

Para extração de RNA, foi utilizado o Kit NucleoSpin RNA Plant® da Macherey-Nagel. Conforme descrito no protocolo, foram transferidos aproximadamente 100mg de sementes maceradas em nitrogênio líquido para um microtubo de 1,5mL. Em capela, foram adicionados 350µL de tampão de extração e 3,5 µL de β-mercaptoetanol a amostra e homogeneizada com um agitador Vortex. Para redução da viscosidade, as amostras foram filtradas no NucleoSpin Filter® e coletadas em tubos coletores de 2mL em centrífuga por um minuto a 11.000 rpm. Os filtrados de cada amostra foram transferidos para microtubos de 1,5mL e adicionados 350 µL de Etanol 70%. Logo após as amostras foram transferidas para colunas de NucleoSpin RNA Plant® e coletadas em tubos coletores de 2mL em centrífuga por 30 segundos a 11.000 rpm. O filtrado foi descartado e a coluna de filtração foi acondicionada em outros tubos coletores. Em cada amostra, foram adicionadas 350 µL de Membrane

Desalting Buffer® na coluna de filtração e centrifugadas por um minuto a 11.000 rpm até a membrana da coluna de filtração ficar seca. Adicionou-se no centro da membrana de sílica da coluna de filtração 95 µL de DNase reaction mix® e deixado em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos. Todas as colunas de NucleoSpin RNA Plant® foram submetidas à lavagem com 200µL de tampão e centrifugadas por 30 segundos a 11.000 rpm. Logo após foram acondicionadas em novos tubos coletores as colunas de filtração e foram submetidas a uma segunda lavagem adicionando 600 µL de tampão RA3 e centrifugadas por 30 segundos a 11.000 rpm. Após o descarte da solução do tubo coletor, adicionou-se 250 µL de tampão em colunas de NucleoSpin RNA Plant® e centrifugado por dois minutos a 11.000 rpm até secar a membrana por completo. Transferidas as colunas de NucleoSpin RNA Plant® para novos microtubos de 1,5 mL, foram adicionados 20 µL de água livre de RNase-free nas colunas de NucleoSpin RNA Plant® e centrifugadas por um minuto a 11.000 rpm. Os RNAs extraídos foram quantificados em espectrofotômetro Nanodrop-2000 (Thermo Scientific) e seus resultados expressos em ng/µL.

4.7 Verificação da Qualidade do RNA total

Para as amostras que foram enviadas para o sequenciamento, observa-se a concentração de RNA total foi 75 e 80 ng/µL para as amostras não condicionadas (NC) e condicionadas a -1,0 MPa, respectivamente. As amostras de RNA total usadas na validação dos transcritos, diferencialmente expressos relacionados ao déficit hídrico, apresentaram concentrações em torno de 100 ng/µL. As razões de contaminação por proteínas (260/280) que indicam contaminação por proteína apresentam valores próximo do valor de (>1,8) e a razão de contaminantes por resíduos de extração (260/230) de aproximadamente 2 indica que não houve contaminação residual durante o procedimento e a extração de RNA (Tabela 1). As amostras de RNA foram analisadas no Bionalyzer e apresentaram valores de RINs de 7,10 e 7,60 sementes não condicionadas (NC) e sementes condicionadas a -1,0MPa (C), respectivamente (Figura 1). Estes valores demonstram RNA de qualidade e recomendável para material de origem vegetal a ser sequenciado, de acordo com o protocolo da empresa que realiza o sequenciamento (Illumina).

Tabela 1. Dados de concentração de RNA total, razão 260/280 e 260/230 extraídos de amostras de sementes de *Solanum paniculatum* L. amostras não condicionadas (NC) e condicionadas a -1,0MPa.

Amostras utilizadas para o sequenciamento via RNA-seq			
Amostras	RNA [] ng / μ L	260/280	260/230
1 (NC)	75	1,75	1,90
2 (-1,0 MPa)	80	1,79	1,99

Amostras utilizadas para validação dos transcritos			
Amostras	RNA [] ng / μ L	260/280	260/230
1 (NC)	119	1,70	1,83
2(NC)	130	1,65	1,90
3(NC)	100	1,78	1,89
1 (-1,0 MPa)	120	1,79	1,90
2 (-1,0 MPa)	100	1,70	1,95
3 (-1,0 MPa)	110	1,75	1,99

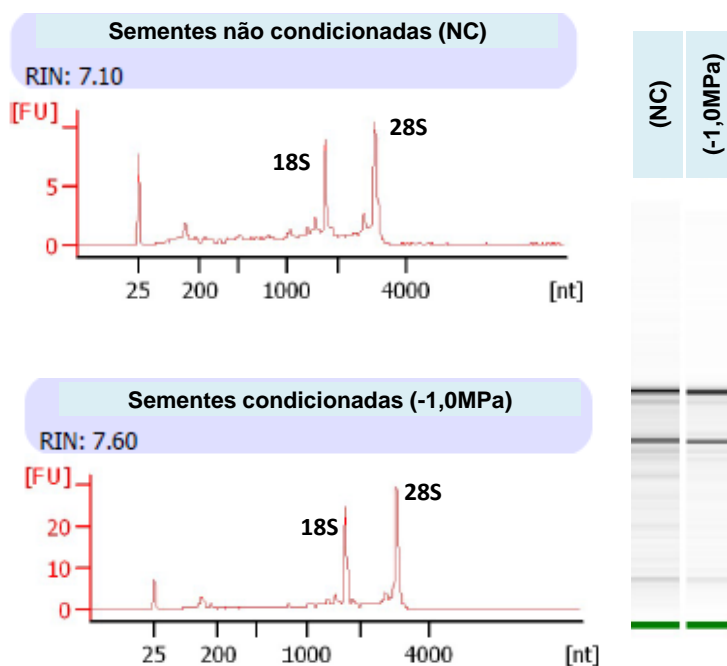


Figura 1. Integridade do RNA total (região 18S e 28S) extraído de sementes de *Solanum paniculatum* L. analisadas por Bionalyzer e utilizadas no sequenciamento.

4.8 Sequenciamento de RNA

As amostras contendo RNA extraído de sementes submetidas ao condicionamento osmótico e das sementes não condicionadas de *Solanum paniculatum* L. foram sequenciadas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP de Jaboticabal usando a plataforma Illumina (HiScan), seguindo a meto proposto pela

empresa. Após a verificação da qualidade dos RNAs, os mesmos foram sequenciados usando os kits, comercialmente disponíveis para o sequenciamento, e o equipamento de sequenciamento da plataforma HiScan (Illumina). Inicialmente, os RNAs totais foram preparados para sequenciamento (obtenção apenas dos mRNAs), seguido da construção de uma biblioteca de cDNA, ligação de adaptador, validação da biblioteca de cDNA, clusterização e sequenciamento. Todas estas etapas foram realizadas seguindo rigorosamente as orientações do fabricante do equipamento de sequenciamento, dos kits e os utilizados na clusterização, no sequenciamento e nas análises dos dados.

4.9 Análise de bioinformática

Inicialmente, a análise de bioinformática foi realizada no Departamento de Tecnologia FCAV/UNESP-Jaboticabal. A plataforma da empresa Illumina que disponibiliza, juntamente com o equipamento de sequenciamento, um *pipeline* para a análise de bioinformática. Portanto, as sequências obtidas foram filtradas usando parâmetros de pureza da empresa Illumina, para a remoção de *primers*, vetores, adaptadores e longas sequências de bases repetidas. Como não foi utilizado genoma de referência, a estratégia utilizada foi a montagem *de novo*, para identificação de novos transcritos associados à tolerância ao estresse hídrico durante a germinação. A reconstrução independente do genoma foi obtida por meio de montagem de transcritos consenso diretamente a partir dos *reads* obtidos. Os dados gerados foram analisados pela plataforma CLC Genomics Workbench versão 6.0.2 (CLC bio, Denmark), para a montagem do transcriptoma de referência e quantificação da expressão por valores de RPKM (*Reads per Kilobase per Million of mapped reads*).

De posse dos dados já normalizados, com o auxílio da equipe de Bioinformática e Biofísica Computacional do Departamento de Física e Biofísica, da UNESP-Botucatu-SP foram realizadas a anotação e as análises dos transcritos diferencialmente expressos.

A Análise global de expressão dos *contigs* de transcritos foi realizada por meio da plataforma Blast2GO, usada para pesquisa genômica funcional em espécies não-modelo. Para auxiliar o GO-ID nas análises de enriquecimento, o programa utilizado foi o BINGO com o *plugging* Cytoscape como descrito por Maere et al. (2005) (<http://www.psb.ugent.be/cbd/papers/BiNGO/Home.html>). O método estatístico disponibilizado pelo BINGO para comparações das frequências de categorias

funcionais entre dois grupos de genes, especificamente quando um subgrupo é um subgrupo do outro, é o teste de hipergeométrico. Esse teste se baseia na distribuição hipergeométrica, distribuição de probabilidades discretas que descreve a probabilidade de se retirar x elementos do tipo C em uma mesma sequência de n extrações de uma população finita de tamanho N , com K elementos do tipo C e $N-K$ elementos de outro tipo, sem reposição.

No entanto, o enriquecimento de uma categoria funcional em subgrupo em relação ao grupo de referência pode ser modelado por uma distribuição hipergeométrica e, por conseguinte, o teste de significância da comparação das frequências de um determinado processo biológico de dois grupos de genes distintos, pode ser feito por um teste hipergeométrico. Logo, essa significância, é equivalente a probabilidade de se obter x genes pertencente a uma categoria funcional C em um subgrupo n genes retirado do grupo referência de tamanho N com K genes pertencentes a C :

$$P_c = \sum_{i=x}^n \frac{\binom{K}{i} \binom{N-K}{n-i}}{\binom{N}{n}}$$

P_c é probabilidade de se obter um número observado de genes pertencentes a C no subgrupo de n genes igual ou maior esperado de genes pertencentes a C em subgrupo de n genes selecionado aleatoriamente a partir do grupo referência com N genes.

4.9.1 Validação dos transcritos relacionados a déficit hídrico via RT-PCR

4.9.2 Priming e Germinação em condições de déficit hídrico

Para a validação dos transcritos obtidos através do RNA-Seq, as sementes foram acondicionadas em tubos plásticos de 15 mL a (-1,0MPa) a 15°C por 15 dias, conforme metodologia descrita no item 3.4. Em seguida, o RNA total foi novamente extraído conforme descrito no item 3.6.

4.9.3 Extração do RNA total e síntese de cDNA

As reações foram incubadas em termociclador (PCR convencional) (Prime Thermal Cycler-Techne) a 25 °C por 10 minutos, para a ativação inicial da enzima, a 37°C por 60 minutos para a síntese de cDNA, seguido da inativação da enzima a 95°C por cinco minutos e finalizando a ciclagem sob 4°C constante. O cDNA foi diluído em uma solução de uso na proporção de 1:20 e em seguida foi quantificada em espectrofotômetro do tipo Nanodrop-2000 (*ThermoScientific*), posteriormente, as amostras foram armazenadas em *deep freezer* a -80°C.

As reações foram incubadas em termociclador (PCR convencional) (Prime Thermal Cycler-Techne) a 25 °C por 10 minutos, para a ativação inicial da enzima, a 37°C por 60 minutos para a síntese de cDNA, seguido por inativação da enzima a 95°C por cinco minutos e finalizando a ciclagem sob 4°C constante. O cDNA foi diluído em uma solução de uso na proporção de 1:20 e em seguida foi quantificada em espectrofotômetro do tipo Nanodrop-2000 (*ThermoScientific*), posteriormente, as amostras foram armazenadas em *deep freezer* a -80°C.

4.9.4 Desenho de *primers* específicos

Tomando como base os transcritos identificados e associados a estresse hídrico, foram confeccionados *primers* específicos para estudar a expressão dos genes de interesse em sementes não tratadas e em sementes submetidas ao condicionamento osmótico (Tabela 2). Também foram confeccionados *primers* para genes de referência utilizados como normalizadores das reações. Como genes (mRNA) de referências, foram usados os *Contig34 (Cytochrome P450 87A3-like)*, *Contig327 (Heat shock cognate 70 kDa protein 2-like)* e *Contig416 (Subtilisin-like protease-like)*, sendo estes escolhidos pelo nível de estabilidade da expressão dentro do total de transcritos obtidos de acordo com a método descrito por Dekkers et al. (2012).

Para o desenho dos *primers* foi utilizado o software PerlPrimer (<http://perlprimer.sourceforge.net>). Após a confecção, foi verificada a especificidade dos *primers* através da ferramenta BLAST no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os parâmetros utilizados para desenho dos *primers* foram: *amplicon* de 100 a 200 pares de bases, temperatura de anelamento de 60°C ± 1 e número de bases de 20 a 24 pares (Tabela 3).

4.9.5 Quantificação da expressão relativa por PCR em tempo real

Para a quantificação da expressão relativa dos genes alvo e dos normalizadores, foram utilizados 5,0 μL de *CtSybr Green qPCR Ready Mix* (*Sigma Life Science*), 0,25 μL dos *primers Forward* e *Reverse* a 10 mM, 2,75 μL de H_2O e 2,0 μL de cDNA, totalizando 10,0 μL para o volume da reação.

Para calcular a eficiência de amplificação dos *primers* foi realizada uma reação de PCR para cada gene com um *pool* de cDNA das amostras, os dados foram submetidos ao software *LinReg PCR* (RAMAKERS et al., 2003). Esta plataforma realiza a correção da linha de base e uma regressão linear para cada curva de amplificação. Além disso, o programa define um conjunto de pontos em cada curva com os dados melhor correlacionados, podendo obter o valor do *threshold*, o ciclo de quantificação (Cq) e a reta cuja inclinação é utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação em cada curva ($E = 10^{\text{slope}}$). Valores ideais de E ($1,8 \leq E \leq 2$) e correlação ($R \geq 0,995$) foram considerados.

A amplificação dos fragmentos alvo foi realizada em termociclador *Eco Real-Time* (*Illumina*), com uma etapa inicial de incubação a 50°C durante 2 minutos, seguida de desnaturação a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 15 segundos e pareamento a 60°C por 1 minuto. No final do processo foi realizada a curva de *melting* seguindo os passos: 15 segundos a 95°C, 65°C e 95°C, respectivamente. Os dados obtidos foram analisados no programa *EcoStudy* versão 5.0 da *Illumina*.

Foram utilizadas três repetições biológicas e três repetições técnicas para cada amostra. Para mensurar a expressão gênica foi utilizado o cálculo do $\Delta\Delta\text{Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), que se baseia na reação exponencial da PCR. Para tal, a expressão $ER = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, onde ER representa o nível de expressão gênica; Ct representa o ciclo de amplificação, no qual cada amostra apresenta amplificação exponencial; ΔCt se refere à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra amplificada para o gene referência; $\Delta\Delta\text{Ct}$ representa a diferença entre o ΔCt da amostra de interesse em determinado tempo e o ΔCt da amostra de referência.

Tabela 2. Primers específicos e de normalização estudados em sementes de *Solanum paniculatum* L para análise de PCR em tempo real.

Contigs	Nomes	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Contig339	Malateglyoxysomal-like	TCCACAACCTATGCCAACTTCC	TTTCTCTGCCCTCTCAAACAC
Contig1056	Poly [ADP-ribose] polymerase 3-like	TCCACAACCTATGCCAACTTCC	TTTCTCTGCCCTCTCAAACAC
Contig2688	Aspartic proteinase	TCAACCGAAACACAAAGGAAG	TTTACCACCGATCAGAACATCA
Contig3417	GDSL-like esterase Lipase at5g03820-like	ATGCCTCAACATTGAAGCCT	AGAGCCTTCCCAACAAGATG
Contig3929	DnaJ-like protein 2 homolog	ATATTTGTTCCGAGTGCCGA	GTAACATCCCTTTCTCAACTTTCA
Contig7098	Thiamine thiazole synthase chloroplastic-like	AACCCGTTAAATCAACTCACCA	CGTCATTTCCCTAGCAACAATC
Contig10620	Chalcone-flavonone isomerase like	AAGAATGAAGTGATGGTGGATGA	CTATGTCTGTTATTCCATGTCCCA
Contig 9460	Citrateglyoxysomal-like	CCAGAGTTTATTGAGGGCGT	CTTCTTCAGCAAGCTTCTTAATCA
Contig6576	Heat shock factor-like protein hsf30	AGAAAGCAGTATCCACAGCAA	TTAGCCTCAGTATTTCCATCCTC
Contig14206	Galactinol synthase	TCAACTACTCAAAGCTTCGCAT	TATCGCATAACAATCCGCC
Contig 8235	Heat shock cognate 70 kDa protein 2-like	TTCAACTTTCCTCCCAACAG	CAATATCACAGAAATTCGCAGG
Contig6440	Phenylalanine ammonia-lyase 1-like	GTACAATGCTGTGAAATTCCCT	GAATGGTCAATCATGCTGTCA
Contig21837	9-divinyl ethersynthase-like	GGTTACACGACAAATTCATCCC	AGAACACTTTCATGCCTCCAT
Contig34	cytochrome P450 87A3-like	TGTATTCTCAAGCTGTCCACT	TTATACCACCTCCAAATGCCA
Contig327	Heat shock cognate 70 kDa protein 2-like	AGATTACCATCACCAACGACA	GCATAGTTCTCCAAAGCATTCT
Contig416	Subtilisin-like protease-like	TGGTGTTGGAGTCGTTGTAG	TGGTGTTGGAGTCGTTGTAG

Tabela 3. Genes (mRNAs) em sementes de *Solanum paniculatum* L. relacionados ao estresse abiótico.

Contigs	Nome	Tamanho em (pb)	Descrição
Contig 339	Malateglyoxysomal-like	1168	ciclo do glioxilato
Contig 1056	Poly [ADP-ribose] polymerase 3-like	2445	Ribosilação de ADP
Contig 2688	Aspartic proteinase	1599	Processo metabólico lipídico
Contig3417	GDSL-like esterase Lipase at5g03820-like	1199	Processo metabólico lipídico
Contig3929	DnaJ-like protein 2 homolog	1168	Resposta ao calor
Contig7098	Thiamine thiazole synthase chloroplastic-like	1094	Processo Biossintéticatiazole
Contig10620	Chalcone-flavonone isomerase like	545	Biossíntese de antocianina
Contig 9460	Citrateglyoxysomal-like	389	Ciclo do glioxilato
Contig6576	Heat shock factor-like protein hsf30	595	Resposta ao calor
Contig14206	Galactinol synthase	637	Biossíntese da ranfinose
Contig 8235	Heat shock cognate 70 kDa protein 2-like	1152	Resposta ao calor
Contig6440	Phenylalanine ammonia-lyase 1-like	1488	Biossíntese dos flavonoides
Contig21837	9-divinyl ethersynthase-like	1115	Processos de oxirredução
Contig34	Cytochrome P450 87A3-like	1676	Normalizador
Contig327	Heat shock cognate 70 kDa protein 2-like	989	Normalizador
Contig416	Subtilisin-like protease-like	2737	Normalizador

4.9.6 Análise estatística dos dados

Os dados médios da germinação em água a 25°C foram submetidos a análise de regressão usando *software* Sigma Plot v. 12.0. Os dados dos médios da germinação obtidos após o condicionamento foram submetidos a teste de Anova a 0,05 pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey em 0,05 usando o *software* SISVAR versão 5.3 (Ferreira, 2010), Anexos (1 e 2).

Os dados de expressão gênica obtidos pela técnica de Real Time foram analisados utilizando o programa REST®, que realiza a quantificação comparativa pelo método de “*Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test*”, ou seja, a quantificação relativa é realizada comparando um grupo de amostras com um grupo controle (PFAFFL et al., 2002).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste de germinação

As sementes de *S. paniculatum* L após serem secas apresentaram 8% de teor de água. A avaliação da germinação ocorreu durante 17 dias, com porcentagem final de germinação de 99%. A germinação das sementes iniciou-se aos sete dias após a hidratação e foram necessários, aproximadamente, 14 dias para ocorrer 50% da germinação (Figura 2).

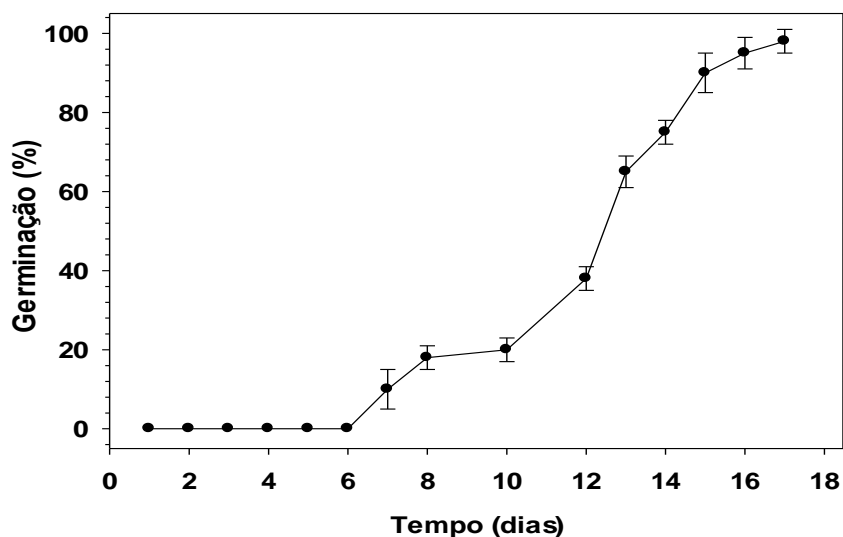


Figura 2. Germinação de sementes de *Solanum paniculatum* L. incubadas na temperatura de 25 °C e em luz constante.

5.2 Priming e germinação em condição de déficit hídrico

De acordo com a Figura 3, quando as sementes foram condicionadas em PEG, e posteriormente, submetidas à germinação em condições de déficit hídrico, observou-se que em água (0,0 MPa) a germinação foi superior a 90% tanto nas sementes condicionadas como nas sementes não condicionadas (NC). Nos potenciais de meio germinativo de -0,2 a -0,4 MPa todos os tratamentos (-0,4, -0,8, -1,0 e -1,2 MPa) proporcionaram uma porcentagem de germinação superior à testemunha (NC). No entanto, à medida que o potencial osmótico do meio germinativo diminuiu a germinação nestes tratamentos tende a se igualar nos meios germinativos de -0,6 a -0,8 MPa.

De modo geral, houve diferença significativa no potencial de condicionamento -1,0 MPa conferindo tolerância a déficit hídrico nas sementes devido à germinação superior em condições de estresse promovido pelo PEG, quando comparadas com as não condicionadas. Em análises, nas sementes condicionadas a -1,0 MPa, observou-se diferença uma germinação superior 90 % no potencial de meio germinativo de -0,4 MPa, sendo superior aos demais tratamentos, enquanto nas sementes não condicionadas notou-se germinação em torno de 30% (Figura 3).

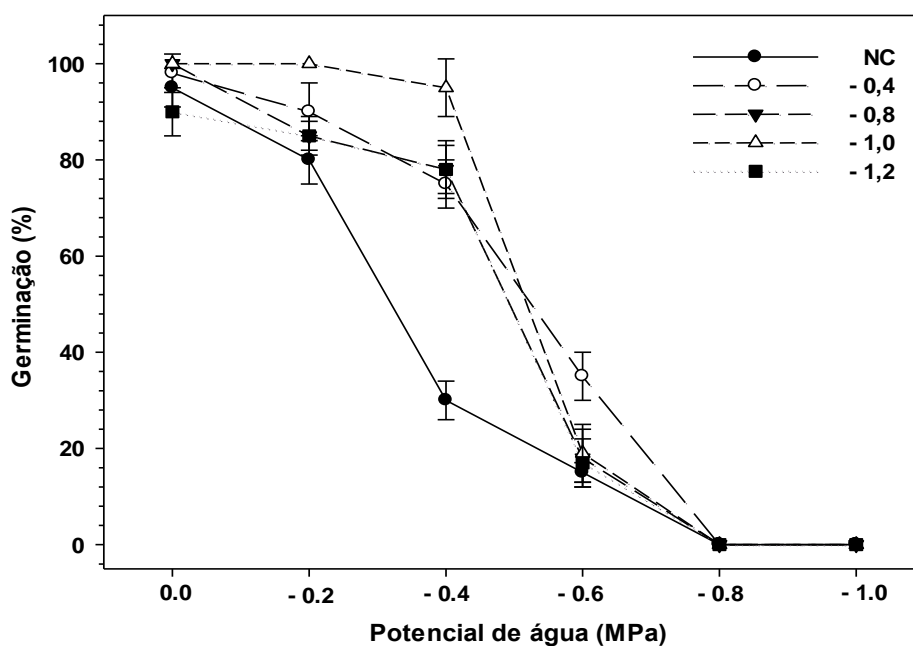


Figura 3. Porcentagem final de germinação de sementes não condicionadas (NC) condicionadas a -1,0MPa de *Solanum paniculatum* L. expostas a diferentes níveis de déficit hídrico.

Conforme os dados de índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes condicionadas e não condicionadas (NC) na figura 4, de modo geral, verificou-se redução drástica na medida em que o potencial do meio germinativo diminuiu, havendo uma estabilização a partir de $-0,8\text{MPa}$.

Como descrito para algumas solanáceas, é provável que as sementes de *S. paniculatum* apresentem resistência à germinação causada pelo endosperma micropilar, sendo necessário auxílio de degradação enzimática desta região, para que a germinação ocorra. Estes efeitos foram observados por Anese et al. (2011), em outra solanácea (*Solanum lycocarpum*), onde o condicionamento auxiliou na redução da força de ruptura do endosperma, na germinação e no vigor das sementes. Mahammadi e Amiri (2010) condicionaram sementes de duas cultivares de canola (*Brassica napus* L.) e as colocaram para germinação em condições de déficit hídrico e observaram um incremento médio na porcentagem final de germinação das sementes condicionadas quando comparadas ao tratamento controle (NC).

Em sementes de canola (*Brassica napus* L.) submetidas ao condicionamento por sete dias, Kubala et al. (2015), observaram um aumento na porcentagem de germinação final superior às sementes do tratamento controle.

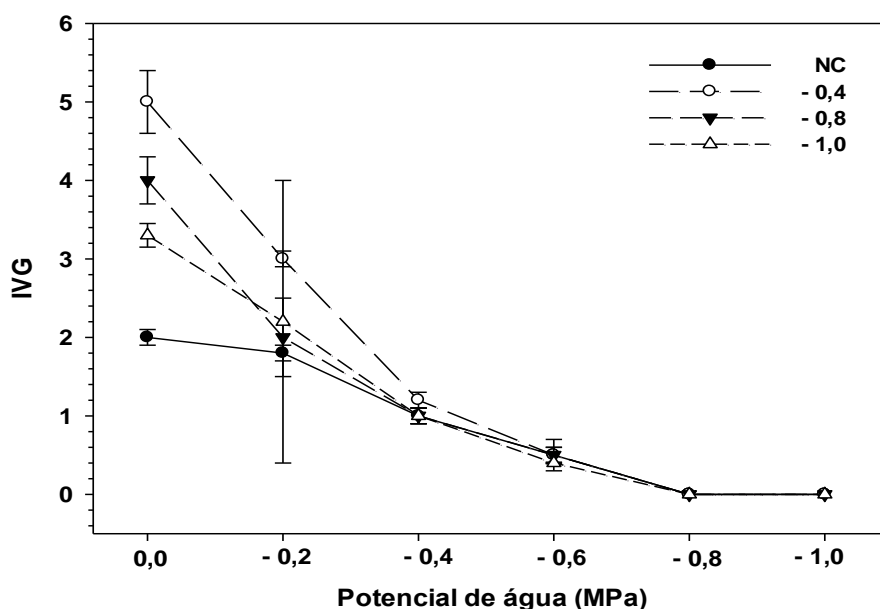


Figura 4. Índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes condicionadas não condicionadas (NC) condicionadas a $-1,0\text{MPa}$ de *Solanum paniculatum* L. expostas a diferentes níveis de déficit hídrico

De acordo com Wahid et al. (2008), essa melhoria da tolerância ao estresse à germinação pós-priming, pode ser uma manifestação de tolerância cruzada induzida pelo condicionamento fisiológico, assim o *priming* é considerado como uma situação de estresse pré-germinativo na qual as sementes após serem submetidas ao estresse causado durante o condicionamento “armazenam” ou “memorizam” esta situação que permite tolerar condições adversas subsequentes (BRUCE et al., 2007).

O *priming* aumentar a taxa de germinação das sementes, o crescimento da plântula, desenvolvimento da planta, mas a sua eficácia pode variar de acordo com a cultura e o tipo de produtos utilizados para o *priming* (JISHA et al., 2013). Souza et al. (2010) observaram reduções significativas na germinação de sementes de (Solanácea) *Physalis angulata* L. que foram condicionadas e submetidas e avaliaram quanto a germinação em condições de estresse salino (meio germinativo), onde verificaram um decréscimo da porcentagem de germinação final e do IVG tanto para as sementes condicionadas quanto para as não condicionadas.

Lopes e Macedo (2008) obtiveram reduções significativas na porcentagem final de germinação em sementes de couve chinesa (*Brassica pekinensis*) em meio germinativo negativo (condições de estresse salino), à medida que o potencial do meio germinativo diminuiu.

Em outras pesquisas, em diferentes espécies, também foi observado tolerância das sementes a estresse hídrico, quando as sementes de eucalipto (*Eucalyptus grandis*) (FRAIZ, 2011) e sementes de sorgo (*Sorghum bicolor*) (PATANÈ; CAVALLARO 2009), foram previamente condicionadas.

5.3 Análise dos transcritos obtidos

O total de transcritos gerados foi de 34.640, para as sementes condicionadas a -1,0 MPa e para as sementes não condicionadas. De acordo com o número pares de bases, os transcritos foram agrupados em oito classes, das quais apresentaram tamanhos de fragmentos que variaram entre 0 a >5000 pares de bases (pb). Os maiores fragmentos compõem as classes >5000 pb, 59 (0, 17%), 4001-5000 95 (0, 27%) e a classe 3001-4000 pb que representam 329 (0,95%) transcritos.

Os transcritos presentes em 2001-3000 pb representam 1.411 (4,07 %). E por fim, as quatro classes de 1001-2000, 501-1000, 250-500 e 0-49 que

foram as mais abundantes apresentaram tamanhos de fragmentos de 5.745 (16,58%), 7.895 (22,79%), 13.568 (39,16%) e 5.538 (15,98%), respectivamente (Figura 5).

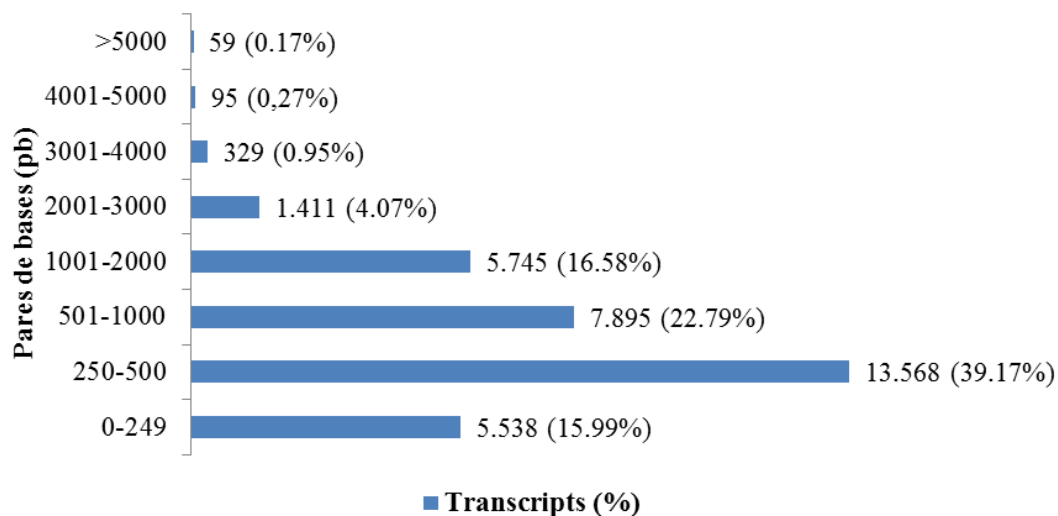


Figura 5. Tamanho dos transcritos (pb) expresso em porcentagem obtidos de sementes de *Solanum paniculatum* L. não condicionadas (NC) e condicionadas a -1,0MPa.

Do total de transcritos (34.640), dos quais 54,79% (18.981) apresentaram codificação (*coding*) e 45,20% (15.659) não apresentaram codificação (*non-coding*) (Figura 6A). No entanto, observa-se que dos 18.981, que codificaram alguma proteína, apenas 25 aproximadamente 0,08%, não apresentaram acertos (*non-hit*), o que indica codificação de proteínas desconhecidas e 18.956 codificaram proteínas conhecidas (100 % de *hits*) (Figura 6B).

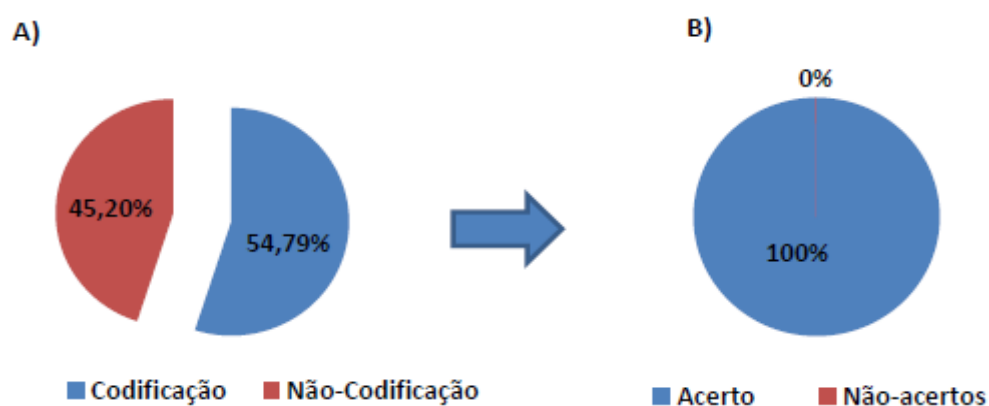


Figura 6. Porcentagem de transcritos que apresentaram codificação e não codificação (*coding and non-coding*) (A), porcentagem de transcritos que apresentaram acertos e não-acertos (*hit e non-hit*) (B), em sementes *Solanum paniculatum* L. não condicionadas (NC) condicionadas a -1,0MPa.

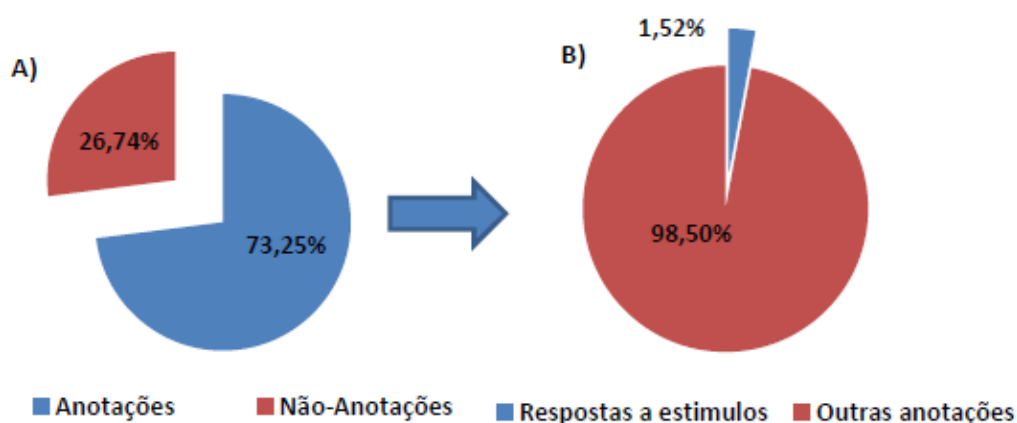


Figura 7. Porcentagem de transcritos que apresentaram e não apresentaram anotações (A) e porcentagem de transcritos que apresentaram respostas a estímulos e outras anotações (B), em sementes de *Solanum paniculatum* L. não condicionadas (NC) condicionadas a -1,0MPa.

Do número total de transcritos que apresentaram *hit* (18.956), 5.070 (26,74%) não apresentaram anotação (Figura 7A). Contudo, aproximadamente 73,25% (13.886) apresentaram alguma anotação, dos quais 1,52% (208) transcritos foram diferencialmente expressos, apresentaram respostas a estímulos, e 98,50% (13.678) outros tipos de anotação (Figura 7B).

Os dados diferencialmente expressos foram submetidos a uma análise de super-representação ou “*overrepresentation analysis* (ORA)” e posteriormente, submetidos ao programa (BINGO; Bioinformatics-2005) usados para a descoberta de termos do Gene Ontology Consortium (GO) significativamente representada entre os transcritos mais expressos. Foram encontrados 208 transcritos diferencialmente expressos e a partir destas análises, observaram-se as seguintes categorias funcionais: resposta ao estresse (49%), outros estímulos (30%), respostas aos estímulos abióticos (11%), respostas químicas (6%) e por fim, respostas aos estímulos bióticos (4%) (Figura 8). Contudo, a categoria funcional mais relevante foi resposta a estresse que engloba 102 transcritos, todavia, 23 genes apresentam anotações relacionadas a estresse. Não menos importante, as demais categorias não são relacionadas aos objetivos do trabalho, logo, o enfoque principal foi para a categoria de maior valor expressivo (Figura 8).

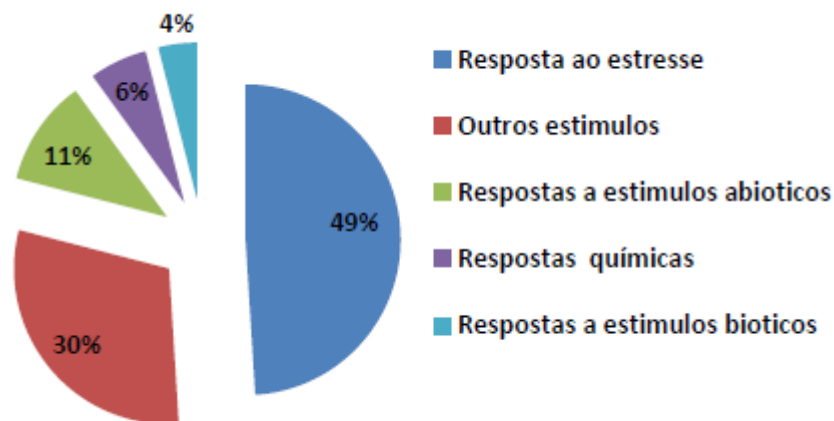


Figura 8. Classificação funcional dos transcritos diferencialmente expressos que apresentaram estímulos, com base no GO, em sementes de *Solanum paniculatum* L. não condicionadas (NC) condicionadas a -1,0MPa.

De modo geral, estresses limitam as produtividades das plantas, sobretudo, apresentam um importante papel na determinação de ocorrências das espécies vegetais nos diversos dos tipos de ambientes encontrados no mundo. Além disso, seus efeitos, tanto em caráter ambiental como do ponto de vista agrícola, têm sido voltados às atenções dos pesquisadores devido aos impactos em que as mudanças climáticas podem causar nas formas de vida no planeta (ALLEY et al., 2007).

Após a análise de enriquecimento funcional, de acordo com o número GO-ID, foram encontradas três categorias e diferentes subcategorias como: *Componente celular* (GO: 9514), *Função molecular* (GO:45430 e GO:3950) e, por fim *Processos biológicos* (GO:9718, GO:9804, GO:55114, GO:6629 e GO52837). Assim, de acordo com o GO, as funções apresentaram *Componente celular* (GO: 9514), as subcategorias apresentaram processos relacionados a mecanismos de defesa a condições adversas como estresse abiótico (temperatura, déficit hídrico e salinidade) e estresse oxidativo (proteção das membranas contra danos de moléculas geradas em rotas de metabolismos secundários) (Tabela 4).

Estas categorias também foram observadas em estudos de expressão diferencial em sementes de arábida (*Arabidopsis cvi*), em algodão (*Gossypium australe*), canola (*Brassica napus* L.) e arroz (*Oryza sativa*) (CADMAN et al., 2006; TAO et al., 2013; KUBALA et al., 2015; YANG et al., 2015).

Tabela 1. Análise de enriquecimento funcional dos transcritos diferencialmente expressos de acordo com o termo GO-ID e suas categorias funcionais em sementes *Solanum paniculatum* L. não condicionadas (NC) e condicionadas a -1,0MPa.

Componente celular					
GO-ID	Contigs	Transcritos (mRNA)	Descrição	RPKM	
				NC	-1,0MPa
GO:9514	Contig339	Malateglyoxysomal-like	Atividade do ciclo do glicoxalato	555,777	868,950
	Contig9460	Citrateglyoxysomal-like		90,320	336,850
Função molecular					
GO:45430	Contig10620	Chalcone-flavonone isomerase like	Atividade da chalcona isomerase	24,110	238,668
GO:3950	Contig1056	Poly [ADP-ribose] polymerase 3-like	Atividade da ADP-ribosiltransferase	36,721	306,271
GO:45735	Contig1638	11s seed storage globulin	Atividade de reserva de nutrientes	451,587	2644,155
	Contig1426	2s sulfur-rich seed storage protein 2-like		615,46	1782,100
	Contig1042	Vicilin-like antimicrobial peptides 2-2-like		116,759	487,015
Processos biológicos					
GO:9718	Contig14206	Galactinol synthase	Compostos biosintético de Antocianina	18,242	127,580
GO:9804	Contig3929	DnaJ-like protein 2 homolog	Resposta ao Calor/choque térmico	100,326	245,450
	Contig8235	Heat shock factor-like protein hsf30		342,839	757,956
	Contig6576	Heat shock cognate 70 kDa protein 2-like		33,507	228,905
GO:55114	Contig21837	9-divinyl ethersynthase-like	Processos de oxirredução	4,272	105,540
	Contig6440	Phenylalanine ammonia-lyase 1-like		93,253	683,590
	Contig3485	Peroxidase 12-like		171,219	350,372
	Contig14743	Ribulose biphosphate carboxylase small Chloroplastic-like		7,623	135,177
	Contig5245	Protein creg1-like		63,269	292,950
	Contig5548	Benzoquinone reductase		1619,811	28,709
	Contig52	Cysteine protease cp8		2680,174	6359,814
GO:6629	Contig1054	Glutathione peroxidase	Processos de metabolismos de lipídios	6049,925	7274,910
	Contig2688	Aspartic proteinase		117,219	272,880
	Contig3417	GDSL-like esterase Lipase at5g03820-like		100,959	1534,950
GO:52837	Contig7098	Thiamine thiazole synthase chloroplastic-like	Processos de biossíntese da thiazole	59,297	290,100
GO:71786	Contig2730	Reticulon-like protein b13-like	Organização de retículo endoplasmático	204,638	430,284

A enzima *Malate glyoxisomal-like*, apresentou nível de expressão de uma vez e meia nas sementes condicionadas em relação às não condicionadas (Tabela 4). Esta enzima apresenta função celular e atua principalmente em atividades desenvolvidas no citossol. A enzima *Malate glyoxisomal-like* desempenha papel semelhante às enzimas Isocitrato liase (ICL) e Malato sintetase (MLS). Estas enzimas são ativas em tecidos de reserva (cotilédones) e de crescimento (eixo embrionário) em sementes de oleaginosas, como tremoço amarelo (*Lupinus luteus* L.) (BOREK; NUC, 2011).

As enzimas Isocitrato liase (ICL) e Malato sintetase (MLS) estão localizadas no glioxissomos e auxiliam a síntese e o transporte do succinato para as mitocôndrias e do malato, para a síntese de açúcares (PRACHAROENWATTANA et al., 2007; SMEEKENS et al., 2010).

A enzima *Citrate glyoxysomal-like* apresentou expressão de aproximadamente de quatro vezes superior nas sementes condicionadas, quando comparadas com as sementes não tratadas (Tabela 4). Esta enzima tem função celular e atua no metabolismo dos ácidos graxos no glioxissomos. Os glioxissomos são peroxissomos especializados que são encontrados principalmente no endosperma e cotilédones de sementes oleaginosas, onde são envolvidos em converter lipídios de armazenamento em compostos de carbono e energia, para que ocorra a germinação e o crescimento subsequente da plântula (BEEVERS, 1961; SCHIEDEL et al., 2004).

Os peroxissomos são organelas indispensáveis para a detoxificação devido ao número de enzimas catalizadoras envolvidas no controle das EROs em células de plantas sobre condições adversas, pois, tais condições estressantes tendem a aumentar o número de peroxissomos nas células (MITTLER, 2002).

Em sementes de oleaginosas, como as de girassol (*Helianthus annuus* L.) e as de soja (*Glycine max*), a conversão dos lipídios de armazenamento em energia e composto de carbono ocorre nos cotilédones e distingue-se pela existência de duas isoformas diferentes de thiolase, thiolase I e II. (STEPHENS et al., 1998; OELJEKLAUS et al 2002; SCHIEDEL et al., 2004).

A *Chalcone-flavonone isomerase* (CHI; EC 5.5.1.6) apresentou valor de expressão nove vezes superior nas sementes condicionadas, em relação às não condicionadas (Tabela 4). Presente em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) e trigo (*Triticum aestivum*), esta enzima participa da etapa inicial da biossíntese dos flavonoides e na proteção das plantas adaptadas a estresse ambiental. Codificada pelo

gene *Chi*, a *Chalcone-flavonone isomerase* catalisa a conversão de chalconas a flavanonas, incluindo nove dos doze principais subgrupos compostos de flavonoides (WINKEL-SHIRLEY, 2001).

A intensificação da transcrição da enzima *CHI*; EC 5.5.1.6 acumula diferentes classes de flavonoides, que possuem atividade biológica auxiliam das plantas a superarem estresses ambientes severos (LIU et al., 2013). Em plantas de trigo a biossíntese de flavonoides foi regulada em condições de estresses bióticos (CHENG et al., 2011; ZAMORA et al., 2013).

Os resultados da avaliação da enzima *Poly [ADP-ribose] polimerase 3-like* apresentou expressão diferencial de oito vezes superior nas sementes condicionadas em relação ao controle (Tabela 4). A enzima *Poly (ADP-ribose) polimerase* (PARP; CE 2.4.2.30) (PARPs), tem a função de catalisar a transferência de partes de ADP-ribose do substrato nicotinamida adenina dinucleotido (NAD^+) para proteínas alvo em formas de *poly (ADP-ribose)* (BONICALZI et al., 2005).

Atividades das enzimas PARP foram demonstradas por Jagtap e Szabo, (2005) em células cultivadas de tabaco, trigo e ervilha (JAGTAP; SZABO, 2005). Em plantas as enzimas PARP são geralmente associadas às cromatinas (Gagne et al., 2006) e podem ter função semelhante no reparo do DNA, como em células de mamíferos (ZEIGLER, 2000; HEERES; HERGENROTHER, 2007).

Doucet-Chabeaud et al. (2001) observaram a expressão dos genes PARP1 e PARP2 em *Arabidopsis thaliana*, em condição de estresse oxidativo, mesmo levando em consideração que o PARP2 é induzido em situação de restrição hídrica. A expressão dos genes (PARP1 e PARP2) é fundamental à prevenção de danos em nível de DNA em plantas sob condições de estresse abiótico (déficit hídrico, estresse salino e oxidativo) severo (LI et al. 2011).

Entre os transcritos mais expressos as enzimas *Galactinol synthase* apresentaram expressão sete vezes superior nas sementes condicionadas em relação ao controle (Tabela 4). A *Galactinol sintase* (GOLS, CE 2.4.1.123) é uma enzima importante na síntese de oligossacarídeos da família da rafinose (RFOs) (PETERBAUER et al., 2000). Oligossacarídeos de família rafinose (RFOs) têm diversas funções nas plantas, são utilizados para o transporte e o armazenamento de carboidratos e como solutos compatíveis para proteção contra estresses bióticos e abióticos (PHILIPPE et al., 2010, PETERS; KELLER, 2009).

Downie et al. (2003) relataram aumento na expressão de genes GOLS em sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*) sob condições de frio e quando comparado ao controle. Sprenger e Keller (2000) relatam expressão de dois genes GOLS em folhas de Ajuga (*Ajuga reptans*) ambos induzidos sob condição de frio. Em *Arabidopsis thaliana*, sob condições de estresses térmico, hídrico e salino foram observados aumentos da expressão dos genes GOLS quando comparados ao tratamento controle (TAJI et al., 2010; PANIKULANGARA et al., 2004).

SUN et al. (2013) observaram um incremento da expressão dos genes GOLS em sementes transgênicas de *A. thaliana* em condições de estresse salino e osmótico. A enzima *Galactinol sintase* (GOLS, CE 2.4.1.123) é responsável pela síntese do osmólito rafinose, que tem a função de proteger as células e realizar ajustamento osmótico nas plantas sobre condições adversas severas (KEREPESI; GALIBA, 2000; TAJI et al., 2010).

A proteína *DnaJ-like protein 2 homolog*, após condicionamento, apresentou expressão diferencial de duas vezes nas sementes condicionadas em relação às não sementes condicionadas (Tabela 4). A proteína *DnaJ-like* atua de forma semelhante às proteínas de choque térmico e estão presentes em plantas tolerantes à salinidade. As proteínas *DnaJ-like* são codificadas por uma família de múltiplos genes, estas proteínas multifuncionais estão envolvidas no tráfego de proteína, na mitocôndria, no citossol e no retículo endoplasmático (SUNG; GUY, 2003).

De acordo com Frydman (2001) essas proteínas por fazerem parte do grupo das chaperonas (Hsp70) têm funções essenciais para prevenir danos às outras proteínas na presença de estresse abiótico. CHEN et al. (2012) observaram dois grupos de proteínas HSPsDnaJ e HSP70B em plantas halófitas (*Nitraria sphaerocarpa*); onde estas HSP70 interagem com as chaperonas CPN 60-1 na montagem e envolvidas no enovelamento de proteínas (GUPTA; TUTEJA, 2011).

Os resultados das proteínas *Heat shock cognate 70 kDa protein like* e *Heat shock factor-like protein hsf30*, apresentaram expressão de duas vezes e superior a seis vezes, respectivamente, nas sementes tratadas em relação ao controle (tabela 4). Denominadas de proteínas de choque térmico de 70 kDa, é uma família altamente conservada e constitutivamente expressa (Hsc70s) em vários organismos, assim como, em diferentes compartimentos celulares dentro do mesmo organismo. Estas proteínas multifuncionais estão envolvidas no tráfego de proteína, dobrando a

montagem de proteínas, cuja família Hsc70/Hsp70 consiste de membros situados em plastídios, mitocôndria, citossol e no retículo endoplasmático. (SUNG; GUY, 2003).

As proteínas Hsc70s são uma família multigenes com funções importantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como em resposta das plantas ao estresse ambiental (condição de seca e alta temperatura), envolvidos, também, em uma variedade de processos celulares, incluindo, o transporte de proteínas através da membrana, a modulação da atividade da proteína, a regulação da degradação de proteína, e a prevenção da agregação de proteínas irreversíveis (SU; LI, 2010).

A superexpressão de Hsp70 do retículo endoplasmático (ER), em tabaco (*Nicotiana tabacum*), aliviou o estresse no ER sobre condições de seca (Leborgne-Castel et al., 1999), mas não conferiu tolerância a estresse térmico (ALVIM et al., 2001). No entanto, vale salientar que a compreensão das estratégias de termo tolerância das plantas é limitada ao conhecimento insuficiente do grupo *Haps* (LIU et al 2006; SU; LI, 2010).

As proteínas *9-divinyl ether synthase-like* foram diferencialmente expressas 21,7 vezes em comparação ao tratamento controle (Tabela 4). Essa proteína funciona em conjunto com hidroperóxido liase (HPL) e com síntese de éter divinil (DES), que são enzimas importantes da via lipoxigenase em planta.

Estas enzimas produzem *oxilipins* como jasmonatos e seus congêneres, bem como éster divinil e aldeídos, que estão envolvidos em sinalizações de defesa a herbívoros e patógenos nas plantas (TIJET et al., 2002; NELSON, 2011). Em plantas como batata (*Solanum tuberosum* L) e alho (*Allium sativum* L) o éter divinil é predominantemente encontrado em raízes e bulbos, respectivamente (STUMPE et al., 2006).

A enzima *Phenylalanine ammonia-lyase 1-like* apresentou expressão sete vezes superior nas sementes condicionadas em relação às não tratadas (Tabela 4). A enzima, *Phenylalanine ammonia-lyase* (PAL; EC 4.3.1.5), apresenta função metabólica em estudos realizados em plântulas de tomate (*S lycopersicum* L) após serem submetidas a condições de estresse oxidativo. Sreelakshmi e Sharma (2008) observaram ação dessa enzima (PAL) nas vias metabólicas dos flavonoides localizados nos tecidos cotiledonares e hipocótilo de plântulas de tomate.

A via fenilpropanoide constitui uma importante via metabólica secundária nas plantas, conduzindo à síntese de uma variedade de compostos, tais como flavonoides, fitoalexinas e ligninas. (WADA et al., 2010).

De acordo com Tong et al. (1978), a indução da enzima PAL é mediada pelo fitocromo dos cotilédones das sementes de mostarda que demonstraram ser resultados da síntese de proteína. A atividade da enzima PAL parece ser extremamente sensível ao estado fisiológico das plantas, podendo ocorrer mudança durante o crescimento ou podem acompanhar eventos traumáticos, patológicos, ou estresse por saturação de luz. . SARMA et al. (1997), observaram estímulos de atividades de três isoformas da PAL em folhas de tomate à medida que as plantas foram expostas à alta intensidade luminosa. Estes autores afirmaram ainda, que as três isoformas (PAL I, PAL II e PAL II), provavelmente, foram estimuladas como estratégia de defesa das plantas contra os possíveis danos causados pelo estresse oxidativo.

As enzimas *Peroxidase 12-like* apresentaram expressão de duas vezes nas sementes condicionadas quando comparadas às não condicionadas (Tabela 4). A Peroxidase (POD: EC 1.11.1.7) está envolvida no grupo de enzimas que atua no complexo de defesa oxidativa das plantas (ASADA, 2006).

Em condições normais, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de enzimas de defesa antioxidante das plantas está em um equilíbrio dinâmico. No entanto, sob condições de estresse, o equilíbrio pode ser quebrado, causando o excesso de produção de ROS e a indução de danos oxidativos em nível de membranas celulares. Para minimizar estes efeitos, as plantas desenvolveram o sistema de defesa antioxidante contra ROS, incluindo um grupo de enzimas antioxidantes, da qual, a peroxidase (POD: EC 1.11.1.7) está incluída (GONG et al., 2008).

Estes grupos de enzimas, em conjunto, convertem O_2 em H_2O_2 e que então é catalisado em água (H_2O) e oxigênio (O_2) (WANG et al., 2009). Sob condições de déficit hídrico, a alta capacidade de defesa antioxidante é essencial para plantas combaterem ROS e, portanto, evitar o dano oxidativo (MASOUMI et al., 2011).

Devido à ocorrência de estresses abióticos, como salinidade e a falta de água pode haver atraso ou impedimento da germinação (GONG et al., 2008; HAGHIGHI et al., 2012). De acordo com Hubbard et al. (2012), nas regiões áridas e semiáridas, déficit hídricos são fatores que limitam a germinação das sementes e a produção vegetal.

Shi et al. (2014) observaram, aumentos significativos da enzima POD em cultivares de tomate em diferentes níveis de déficit hídrico. Meloni et al. (2003) observaram o aumento da atividade da POD em duas cultivares de algodão (Porá e Guazuncho), sob condições de estresse salino. Na cultivar Guazuncho, a

atividade da enzima POD permaneceu essencialmente constante em todos os níveis de NaCl. Na cultivar Porá, os autores observaram incremento na atividade da POD com relação às plantas controle. O aumento na atividade de enzimas antioxidantes sob condições de estresse salino e déficit hídrico pode ser indicativo de maior produção de ROS e mecanismo de proteção para reduzir danos oxidativos nas plantas.

O estresse salino pode induzir estresse oxidativo severo nas folhas e o acúmulo de H_2O_2 é relatado como um sinal intercelular (Levine et al., 1994), e estimula um número de genes tais como a peroxidase e oxidase alternativas e proteínas envolvidas com as respostas a estresse, (PRASAD et al., 1994).

A *Ribulose biphosphate carboxylase small Chloroplastic-like* apresentou expressão 17,7 vezes nas sementes condicionadas superior quando comparada às sementes não condicionadas (Tabela 4). Em plantas e algas verdes, a Rubisco é montada no cloroplasto, são codificadas em oito genes nucleares (*rbcS*), sintetizadas em pequenas subunidades do citossol (*SS*) e codificadas por oito genes plastídial (*rbcL*) e sintetizadas em subunidades grandes (*LS*). (KNIGHT et al., 1990; YING et al., 1999; ZHANG et al., 2011).

A atividade da 1,5-ribulose-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco, EC 4.1.1.39), converte CO_2 em 3-fosfoglicerato, precursor de açúcar orgânico. É essencial considerar a importância desta enzima na produção de biomassa e sequestro de CO_2 da atmosfera (KNIGHT et al., 1990; ZHANG et al., 2011).

ZHANG et al. (2011) observaram eficiência da Rubisco em plântulas de tomate do tipo selvagem (LLS2) que apresentaram um nível de assimilação de CO_2 líquida (Fotossíntese) satisfatória em diferentes ambientes. Em contrapartida, indivíduos transgênicos (LLS4) apresentaram taxas fotossintéticas inferiores quando comparadas às selvagens. Estes autores enfatizaram ainda, que a baixa eficiência da fotossíntese em LLS4 foi prejudicada por se tratar de plântulas que geralmente podem apresentar concentrações rudimentares da enzima Rubisco em seus cloroplastos.

A enzima *Aspartic proteinase* (APs) (CE 3.4.23) apresentou expressão duas vezes superior nas sementes condicionadas em comparação com as sementes não tratadas (Tabela 4). Enzimas proteolíticas são envolvidas em processos de fisiologia e desenvolvimento vegetal. As Proteinases aspárticas (APs) (CE 3.4.23) são uma das principais classes catalíticas e são distribuídas, não somente em plantas, mas também entre vertebrados, nematoides, parasitas, leveduras, fungos e vírus

(MILISAVLJEVIC et al., 2008). Embora, não exista registro dessa enzima relacionada a estresse abiótico (déficit hídrico, estresse salino e oxidativo) em plantas na literatura.

As proteínas *GDSL-like esterase Lipase at5g03820-like* apresentaram nível de expressão 15 vezes superior nas sementes condicionadas em relação às não condicionadas (Tabela 4). As enzimas GDSL Lipases, foram encontradas em diversas espécies de plantas, incluindo *Arabidopsis thaliana*, arroz (*Oryza sativa L*) e milho (*Zea mays*), e elas atuam na morfogênese, no desenvolvimento e nas respostas de defesa das plantas (BRICK et al., 1995). Em *Brassica napus*, o gene (BnLIP2) codifica uma lipase GDSL; que teve a expressão induzida durante a germinação e mantida nas plântulas, sugerindo funções na germinação e na morfogênese (LING et al., 2006).

A *Thiamine thiazole synthase chloroplast-like* apresentou expressão superior a quatro vezes nas sementes condicionadas em comparação com o controle (Tabela 4). Estudada em *Arabidopsis* e milho é denominada como Difosfato de Thiamina (vitamina B1), desempenha função como um cofator enzimático nas vias metabólicas, incluindo a glicólise, a via das pentoses fosfato, e o ciclo de ácido tricarboxílico. Além disso, difosfato de thiamina também pode ser importante como um cofator em resposta a estresses abióticos e bióticos em plantas (GOYER, et al., 2012).

A Thiamina e os seus ésteres de fosfato de TMP (Thiamine monophosphate) e TDP (Thiamine diphosphate) são encontrados em plântulas em condições adversas do meio ambiente. Na verdade, há um aumento no conteúdo total de thiamina em *Arabidopsis* quando as plântulas são submetidas a condições de estresse salino e oxidativo (RAPALA-KOZIK et al., 2008, TUNC-OZDEMIR et al., 2009). Conforme, Tunc-Ozdemir et al (2009), plântulas de *arabidopsis* submetidas ao frio, ao calor e a luz alta apresentaram um aumento no conteúdo total de thiamina três vezes superior ao conteúdo de peróxido de hidrogênio.

5.4 Validação dos transcritos relacionados a déficit hídrico via RT-qPCR

Nas análises de RT-qPCR, para validação dos dados de RNA-Seq, foram desenhados *primers* específicos para os genes alvo e de referência (Tabelas 1 e 2). A eficiência dos *primers* foi próxima de 1,8 e apresentaram R^2 de aproximadamente 1,0. Para as análises de validação dos dados de RNA-seq via RT-

qPCR, foram usados 13 do total de 15 genes identificados como os mais expressos e relacionados ao estresse abiótico em sementes de *Solanum paniculatum* L após condicionamento e não condicionadas (NC). Estes transcritos foram relacionados a três classes funcionais como componente celular, função molecular e processos biológicos, dentre as quais, a última classe apresentou maior número de transcritos mais expresso (Tabela 4).

Do total de 15 transcritos diferencialmente expressos, os (*Contig3485 Peroxidase 12-like* e o *Contig14743 Ribulose bisphosphate carboxilase smoll-like*) apresentaram sequências pequenas que impossibilitaram o desenho de *primers*, devido a isso, estes genes não foram validados. Conforme a Figura 9, após a validação, os níveis de expressão dos genes alvo foram coerentes com os resultados obtidos pelas análises de RNA-Seq na Tabela 4.

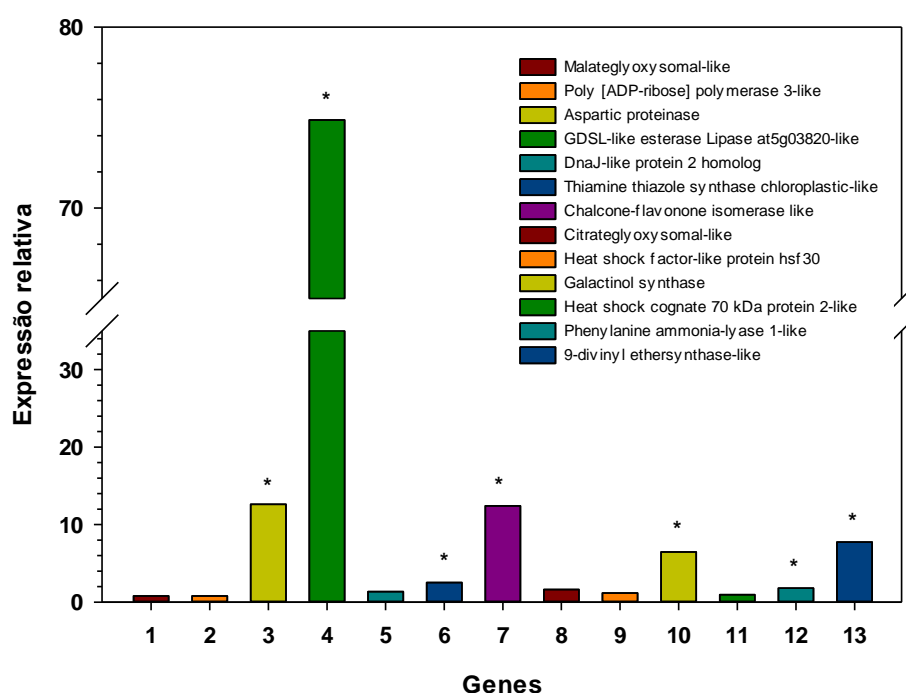


Figura 9. Níveis de expressão relativa dos genes mais expressos em sementes de *Solanum paniculatum* L. não condicionadas e condicionadas a -1,0MPa, validados por RT-qPCR.. *genes que se diferem estatisticamente do controle endógeno.

Ou seja, os genes identificados tiveram a expressão confirmada quando as sementes foram submetidas a estresse e tiveram o RNA extraído. Os genes, *Chalcone-flavonone isomerase like*, *Galactinol synthase*, *9-divinyl ethersynthase-like*, *Phenylalanine ammonia-lyase 1-like*, *Aspartic proteinase*, *GDSL-like esterase Lipase at5g03820-like*, *Thiamine thiazole synthase chloroplastic-like*.

A condição de déficit hídrico simulada pelo potencial osmótico de solução de PEG 8000 induziu melhorias no índice de velocidade, na germinação e, por conseguinte a expressão de genes tolerantes a estresse abiótico em sementes de *Solanum paniculatum* L. Resultados semelhantes foram observados por Bowman et. al. (2013), na cultura do algodão (*Gossypium hirsutum* L.) sobre condições de estresse onde observaram um incremento na expressão de genes relacionados a estresse abiótico com a intensidade de déficit hídrico.

Cheong et. al. (2002), observaram uma superexpressão de genes relacionados a proteínas de choque térmicos, tolerâncias a estresse salino e déficit hídrico em sementes de arábida (*Arabidopsis thaliana*) sobre condições de déficit hídrico. O déficit hídrico influencia amplamente nos processos de crescimento e desenvolvimento, regulações moleculares que são essenciais às vias de transcrpcionais, processos fisiológicos e na produção das plantas (BRUCE et al. 2007, DEEBA et. al., 2012).

Com o crescimento da população mundial, o aumento da demanda por alimentos e as crescentes mudanças climáticas globais, é essencial à compreensão de como as espécies vegetais, nativas e cultivadas, respondem ao déficit hídrico.

6. CONCLUSÕES

O condicionamento fisiológico a -1,0 MPa de solução de PEG-8000 induziu tolerância a déficit hídrico em sementes de *Solanum paniculatum* L durante a germinação;

O condicionamento osmótico induziu a expressão de 101 genes ligados à tolerância a estresse abiótico (déficit hídrico, estresse térmico, estresse oxidativo e térmico) em sementes de *Solanum paniculatum* L.

7. REFERÊNCIAS

ALLEY, R., BERNTSEN, T.; BINDOFF, N. L. Climate change the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Annual Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. **Cambridge University Press**. 2007.

ALVIM, F. C. et al. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. **Plant Physiol.** v.126, p.1042–1054. 2001.

ANESE, S. et al. Seed priming improves endosperm weakening, germination, and subsequent seedling development of *Solanum lycocarpum* St.Hil. **Seed Sci. & Technol.**, v. 39, p. 125-139, 2011.

ARAÚJO, M. M. et al. Densidade e composição florística do banco de sementes do solo de florestas sucessionais na região do baixo Rio Guama, Amazônia Oriental. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.59, p. 115-130, 2001.

ASADA, K. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. **Plant Physiology, Rockville**, v. 141, p. 391-396, 2006.

ASHRAF, M. Inducing drought tolerance in plants: recent advances, **Biotechnol. Adv.** v. 28, p.169-183, 2010.

BEEVERS, H. Metabolic production of sucrose from fat, **Nature**. v.191, p. 433-436, 1961.

BEWLEY, J. D., BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**, 2nd ed. Plenum Press, New York. 1994.

BONICALZI, M. E. et al. Regulation of poly (ADP-ribose) metabolism by poly (ADP-ribose) glycohydrolase: where and when? **Cell Mol. Life Sci.**, v. 62, p. 739-750, 2005.

BOREK, S.; NUC, K. Sucrose controls storage lipid breakdown on gene expression level in germinating yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) seeds **Journal of Plant Physiology**. v. 168, p. 1795-1803, 2011.

BOTION, L. M. et al. Effects of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina® on lipid metabolism and intestinal tonus. **Journal of Ethnopharmacology** 102, p. 137–142. 2005.

BOWMAN, M. J. et al. Campbell, B. T.; RNA-Seq Transcriptome Profiling of Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Root Tissue under Water-Deficit Stress. **PLoS ONE** v. 8, ed. 12, e82634. 2013.

BOWLER, C.; FLUHR, R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 241-246, 2000.

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

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. **Manual de hortaliças não-convencionais**. Brasília, 92p, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Vegetal. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 2009, 399p.

BRICK, D. J. et al. Upton, A new family of lipolytic plant enzymes with members in rice, arabidopsis and maize, **FEBS Lett**; v. 377, p. 475-480, 1995.

BRUCE, T. J. A. et al. Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, v. 173, p. 603-608, 2007.

CADMAN, C. S. et al. Gene expression profiles of *Arabidopsis cvi* seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. **Plant Journal**, v.46, p. 805-822, 2006.

CAPIATI, D.A.; PAÍS, S.M.; TÉLLEZ-INON, M. T. Wounding increases salt tolerance in tomato plants: evidence on the participation of calmodulin-like activities in cross-tolerance signaling. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 2391-2400, 2006.

CHEN, J. H. et al. Cold-induced changes of protein and phosphoprotein expression patterns from rice roots as revealed by multiplex proteomic analysis. **Plant Omics**; v.5 194-9, 2012.

- CHEN, K.; ARORA, R. Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in spinach (*Spinacia oleracea*). **Plant Sci**, v. 180, p. 212-220, 2011
- CHENG, H. et al. Molecular cloning and function assay of a chalcone isomerase gene (GbCHI) from *Ginkgo biloba*. **Plant Cell Rep.** v. 30, p. 49-62, 2011.
- CHEONG, Y. H. et al. Transcriptional Profiling Reveals Novel Interactions between Wounding, Pathogen, Abiotic Stress, and Hormonal Responses in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.129, p. 661-677, 2002.
- CHINNUSAMY, V.; ZHU, J. K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr. Opin. Plant Biol*, v. 12, p.1-7, 2009.
- CONRATH U. et al. Priming: getting ready for battle. **Mol. Plant Microbe Interact**, v. 19, p. 1062-1071, 2006.
- DAMIRKAYA, M. et al. O Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Eur. J. Agron**, v.24, p. 291-295, 2006.
- DEKKERS, B. J. W. et al. Identification of reference genes for RT-qPCR expression analysis in Arabidopsis and Tomato seeds. **Plant Cell Physiology**, v 53, n.1, p. 28-37, 2012.
- DOUCET-CHABEAUD, G. et al. Radiation induces the expression of PARP-1 and PARP-2 genes in Arabidopsis, **Mol. Genet. Genomics**. v.265, p.954-963, 2001.
- DOWNIE, B. et al. Expression of a GALACTINOL SYNTHASE gene in tomato seeds is up-regulated before maturation desiccation and again after imbibition whenever radicle protrusion is prevented, **Plant Physiol**. v.131, p. 1347-1359, 2003.
- FAROOQ, M. et al. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* 29: 185-212.2009.
- FERREIRA, F. et al. Steroid saponins from *Solanum laxum*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1409-1416, 1996.
- FERREIRA, D.F. SISVAR - Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA, 2010.
- PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, 2002.
- FRAIZ, A. C. R. **Indução de tolerância ao déficit hídrico e estresse térmico durante a germinação de sementes e produção de mudas de *Eucalyptus grandis*** Hill Ex. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

- FRYDMAN, J. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. **Annu. Rev. Biochem.** v. 70, p. 603-647, 2001.
- GAGNE, J. P. et al. The expanding role of poly (ADP- ribose) metabolism: current challenges and new perspectives, **Curr. Opin. Cell. Biol.** 18, p.145-151, 2006.
- GAO, Y.; XU, H.; SHEN, Y.; WANG, J. Transcriptomic analysis of rice (*Oryza sativa*) endosperm using the RNA-Seq technique. **Plant Mol Biol.**, v. 81, p 363-378, 2013.
- GARCIA, J. et al. R. F. Effectiveness of methods to increase the germination ratio of Jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) seeds. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 38, p. 223-226, 2008.
- GONG, H. J. et al. Effects of silicon on defense of wheat against oxidative stress under drought at different developmental stages. **Biol. Plant.**, v. 52, 592-596, 2008.
- GOYER, A. Thiamine in plants: Aspects of its metabolism and functions **Phytochemistry**, v.71, p. 1615-1624, 2010.
- GUPTA D.; TUTEJA N. Chaperones and foldases in endoplasmic reticulum stress signaling in plants. **Plant Signal Behav**, v. 6, p. 232, 2011.
- HAGHIGHI, M.; AFIFIPOUR, Z.; MOZAFARIAN, M. The alleviation effect of silicon on seed germination and seedling growth of tomato under salinity stress. **Veg. Crops Res. Bull**, v. 76, p. 119-126, 2012.
- HARDEGREE, S. P., EMMERICH, W. E. Seed germination response to polyethylene glycol solution depth. *Seed Sci. Technol*, v. 22, p. 1-7, 1994.
- HARRIS, D. The effects of manure, genotype, seed priming, depth and date of sowing on the emergence and early growth of Sorghum bicolor (L.) Moench in semi-arid Botswana. **Soil Till. Res**, v. 40, p. 73-88, 1996.
- HEERES, J. T.; HERGENROTHER, P. J. Poly (ADP-ribose) makes a date with death, **Curr. Opin. Chem. Biol.**, 11, p. 644-653, 2007.
- HEYDECKERT, W.; HIGGINS, B. M. The priming of seeds. **Acta horticultural.** v. 83, p. 213-223. 1978.
- HUBBARD, M.; GERMIDA, J.; VUJANOVIC, V. Fungal endophytes improve wheat seed germination under heat and drought stress. **Botany.**, 90, p. 137-149, 2012.
- IQBAL, M.; ASHRAF, M. Seed preconditioning modulates growth, ionic relations, and photosynthetic capacity in adult plants of hexaploid wheat under salt stress. **J. Plant Nutri**, v. 30, p. 381-396, 2007.
- JAGTAP, P.; SZABO, C. Poly (ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors, **Nat. Rev. Drug Discov.**, 4, p. 421-440, 2005.

- JISHA, K.C.; VIJAYAKUMARI, K.; PUTHUR, J. T. Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. **Acta Physiol. Plant.** v. 35, p. 1381–1396. 2013.
- KAUSAR, M. et al. Invigoration of Low Vigor Sunflower Hybrids by Seed priming. **International Journal Of Agriculture & Biology.**, v. 11 p. 521-528, 2009.
- KAWAHARA, Y. et al. Simultaneous RNA-Seq Analysis of a Mixed Transcriptome of Rice and Blast Fungus Interaction. **Plos one.**, v. 7, p. 11, 49423, 2012.
- KEREPESE, I.; GALIBA, G. Osmotic and salt stress induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings, **Crop Science** v. 40,p. 482- 487. 2000.
- KNIGHT, S.; ANDERSSON, I.; BRANDEN, C.I. Crystallographic analysis of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from spinach at 2.4 °A resolution. Subunit interactions and active site, **J. Mol. Biol.**, v.215, p.113-160, 1990.
- KORKMAZ, A.; KORKMAZ, Y. Promotion by 5-aminolevulinic acid of pepper seed germination and seedling emergence under low-temperature stress. **Sci. Hortic**, v. 119, p. 98-102, 2009.
- KUBALA, S. et al. Deciphering priming-induced improvement of rapeseed (*Brassic napus* L.) germination through an integrated transcriptomic and proteomic approach. **Plant Science**, v. 231, 94-113, 2015.
- LEBORGNE-CASTEL, N. et al. Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. **Plant Cell.**, v. 11, p.459-470, 1999.
- LEPRINCE, O. et al. Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles. **Plant Physiol**, v. 122, p. 597-608, 2000.
- LEVINE, A. et al. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v.79, p.583-593, 1994.
- LIU et al. Isolation and characterization of tomato Hsa32 encoding a novel heat-shock protein, **Plant Science**, v. 170, p. 976-985, 2006.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCt Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOPES, J.C.; MARCEDO, C. M. P. Germinação de sementes de couve chinesa sob influência do teor de água, substrato e estresse salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, p. 079-085, 2008.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 2002.
- MAERE S.; HEYMANS, K.; KUIPER, M. **BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks**. **Bioinformatics**, v. 21, p. 3448-3449, 2005.

- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, p.176-177,1962.
- MARTINS, F. C. Solanáceas (*Solanaceae Juss.*) do Estado do Maranhão. **Monografia de conclusão de curso**. Universidade Federal do Maranhão, São Luís,1998. 86p.
- MASIA-VELA, S. et al. Solanum paniculatum L. (Jurubeba): Potent inhibitor of gastric acid secretion in mice. **Phytomedicine**, v.9, p.508-14, 2002
- MASOUMI, H. et al. Effects of water deficit stress on seed yield and antioxidants content in soybean (*Glycine max L.*) cultivars. **Afr. J. Agr. Res.** v. 6, p. 1209-1218, 2011.
- MCDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Sci. Technol**, v. 27, p. 177-237, 1999.
- MEI, Y.Q.; SONG, S. Q. Cross-tolerance is associated with temperature and salinity stress during germination of barley seeds. **Seed Sci. Technol**, v. 36, p. 689-698, 2008.
- MELONI, D. A. et al. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**. v. 49, p. 69-76. 2003.
- MENTZ, L. A.; OLIVEIRA, P.L. *Solanum* (Solanaceae) na Região Sul do Brasil. **Pesquisas (Botânica)**, v. 54, p. 5-327, 2004.
- MILISAVLJEVIC, M. D. J. et al. Two types of aspartic proteinases from buckwheat seed-Gene structure and expression analysis. **Journal of Plant Physiology**. v.165, p.983-990, 2008.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **TRENDS in Plant Science**, v.7, n.9 p.405-410, 2002.
- MOHAMMADI G.R.; AMIRI; F.The Effect of Priming on Seed Performance of Canola (*Brassica napus L.*) Under Drought Stress **J. Agric. & Environ. Sci.**, v. 9, p. 202-207, 2010.
- MOOSAVI, A. et al. Seed priming to increase salt and drought stress tolerance during germination in cultivated species of Amaranth. **Seed Sci. Technol**, v. 37, p. 781-785, 2009.
- MYINT, T., CHANPRASERT, W., SRIKUL, S. Effect of seed weight on germination potential of different oil palm (*Elaeis guineensis Jacq.*) crosses. **Seed Sci. Technol**, v. 58, p. 125-135, 2010.
- NELSON, D. Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450, **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1814, 14-18, 2011.
- NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination—still a mystery. **Plant Physiol**, v. 179, p. 574-581, 2010.

OSHLACK, A.; ROBINSON, M. D.; YOUNG, M. D. From RNA-seq reads to differential expression results. **Genome Biology**, v. 11, p. 220, 2010.

PAN, Q. et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. **Nat Genet**, v. 40, p. 1413-1415, 2008.

PASTORI, G. M.; FOYER, C. H. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. **Plant Physiology**. v. 129, p. 460-468, 2002.

PANIZZA, S. **Plantas que curam**. 25. ed. São Paulo: Ibrasa, 1997.

PATANÈA, C.; CAVALLAROA, 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, p.1-8 .2009.

PETERBAUER, T. et al. Analysis of the raffinose family oligosaccharide pathway in pea seeds with contrasting carbohydrate composition, **Plant Physiol**.v.127, p.1764-1772, 2001.

PETERS, S.; KELLER, F. Frost tolerance in excised leaves of the common bugle (*Ajuga reptans* L.) correlates positively with the concentrations of raffinose family oligosaccharides (RFOs), **Plant Cell. Environ**. v.32, p.1099-1107, 2009.

PRACHAROENWATTANA, I.; CORNAH, J. E.; SMITH, S. M. Arabidopsis peroxisomal malate dehydrogenase functions in oxidation but not in the glyoxylate cycle. **Plant Journal**. v.50, p.381-90, 2007.

PRASAD, T. K. et al. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. **Plant Cell**. v. 6, p.65-74, 1994.

RAPALA-KOZIK, M., KOWALSKA, E., OSTROWSKA, K. Modulation of thiamine metabolism in *Zea mays* seedlings under conditions of abiotic stress. **J. Exp. Bot**. v.59, p.4133-4143.2008.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, New Haven, v. 13, p. 62-66, 2003.

RUSSELL, L. et al. The Arabidopsis COMATOSE locus regulates germination potential. **Development**, v. 127, p. 3759-3767, 2000.

SARMA, A. D.; SREELAKSHMI Y.; SHARMA A. Differential expression and properties of Phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. **Phytochemistry** v.49, p. 2233-2243, 1998

SCHIEDEL, A. C. et al. Cloning, expression, and purification of glyoxysomal 3-oxoacyl-CoA thiolase from sunflower cotyledons. **Protein Expression and Purification**. v. 33, p.25-33, 2004.

SCHMOURLO, G. et al. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol. 96, p. 563-568, 2005.

SCHWEMBER, A. R.; BRADFORD, K. J. A genetic locus and gene expression patterns associated with the priming effect on lettuce seed germination at elevated temperatures. **Plant Mol. Biol**, v.73, 105-118, 2010.

SHENDURE, J.; JI, H.; Next-generation DNA sequencing. **Nat Biotechnol**, v. 26, p. 1135-1145, 2008.

SHI, Y. et al. Silicon improves seed germination and alleviates oxidative stress of bud seedlings in tomato under water deficit stress. **Plant Physiology and Biochemistry**.v.78, p. 27-36, 2014.

SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE. **Como utilizar plantas medicinais**. Goiânia: Hospital de Medicina, 1999.

SMEEKENS, S. et al. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. **Curr Opin Plant Biol** v.13, p274-9, 2010.

SOEDA, Y. et al. Gene expression programs during Brassica oleracea seed maturation, osmopriming, and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. **Plant Physiol**, v. 137, p. 354-368, 2005.

SOUZA, C. L. et al. R. Morfologia de semente e desenvolvimento pós-seminal de *Physalis angulata* L. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, p. 1082-1085, 2010.

SPRENGER, N.; KELLER, F. Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: the roles of two distinct galactinol synthases, **Plant J.**, v. 21, p.249-258, 2000.

SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. Differential regulation of phenylalanine ammonia lyase activity and protein level by light in tomato seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 46, p. 444-451. 2008.

SRIVASTAVA, A. K. et al. Comparative evaluation of hydro-, chemo-, and hormonalpriming methods for imparting salt and PEG stress tolerance in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, p. 1135-1144, 2010.

STEPHENS, A. S. et al. Purification and preliminary characterization of the soybean glyoxysomal aspartate aminotransferase isozyme **Plant Science.**, v. 139, p.233-242.1998.

STUMPE, M.; FEUSSNER, I. Formation of oxylipins by CYP74 enzymes, **Phytochem. Rev.** v. 5, p. 347-357, 2006.

SU, P. H.; LI, H-M. Stromal Hsp70 is important for protein translocation into pea and *Arabidopsis* chloroplasts. **Plant Cell.**, v. 22, p.1516-1531, 2010.

SUN, Z. et al. Overexpression of TsGOLS2, a galactinol synthase, in *Arabidopsis thaliana* enhances tolerance to high salinity and osmotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry.**, v. 69 p. 82-89, 2013.

SUNG, D.;Y., GUY, C. L. Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70-1 in *Arabidopsis*. Evidence for pleiotropic consequences. **Plant Physiol.** v. 132, p. 979-987, 2003.

TAJI, T. et al. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*, **Plant J.** v. 29 p. 417-426, 2002.

TAO, T. et al. Transcriptome Sequencing and Differential Gene Expression Analysis of Delayed Gland Morphogenesis in *Gossypium australe* during Seed Germination. **Plos One**, v. 8, p. 753, p. 75323, 2013

TIJET, N.; BRASH, A. R. Allene oxide synthases and allene oxides, **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 68-69, p.423-431, 2002.

TONG, W. F.; SCHOPFER, P. Absence of Pfr destruction in the modulation of phenylalanine ammonia-lyase synthesis of mustard cotyledons, **Plant Physiol.**, v. 61, p.59-61, 1978.

TUNC-OZDEMIR, M. et al. Thiamin confers enhanced tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.**151, p.421-432, 2009.

VAN VLIET, A. H. M. Next generation sequencing of microbial transcriptome: challenge and opportunities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 302 p. 1-7, 2010.

VASCONCELOS, M. C. et al. Expressão gênica diferencial de sementes de *Schinus terebinthifolius* Raddi. submetidas ao estresse combinado de temperatura e restrição hídrica. **Scientia Plena.** v.6,p. 12. 2010.

VESELOVA, T. V. KOZAR, V. I. Hypoxia and imbibition injuries to aging seeds. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.50, p. 835-842, 2003.

VIDAL, M. C.; STACCIARINI-SERAPHIN, E; CAMARA, H. H. L. L. Crescimento de plântulas de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Lobeira) em casa de vegetação. **Acta Botânica Brasílica.** Rio de Janeiro, v.13, n.3, p.271-274, 1999.

VILLELA, F. A.; BECKERT , O. P. Potencial osmótico de soluções aquosas de polietileno glicol 8000. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, p. 267-275, 2001.

WADA, K. C. et al. Salicylic acid and the flowering gene FLOWERING LOCUS T homolog are involved in poor-nutrition stress-induced flowering of *Pharbitis nil*. **J. Plant Physiol**, v. 167, p. 447-52, 2010.

WAHID, A. et al. Seed pretreatment with hydrogen peroxide improves heat tolerance in maize at germination and seedling growth stages. **Seed Sci. Technol**, v. 36, p. 633-645, 2008.

WANG, W. B. et al. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. **Plant Physiol. Biochem.** v.47, p.570-577, 2009.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet**, v. 10, p. 57-63, 2009.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology, **Plant Physiol.** v.126, p. 485-493, 2001.

YANG, Y. et al. Germination, osmotic adjustment, and antioxidant enzyme activities of gibberellin-pretreated *Picea asperata* seeds under water stress. **New Forests**, v. 39, p. 231-23, 2010.

XU, H.; GAO, Y.; WANG, J. Transcriptomic Analysis of Rice (*Oryza sativa*) Developing Embryos Using the RNA-Seq Technique. **Plos one**, Canadá, v.72, p. 30646. 2012.

YANG, S. et al. RNA-Seq analysis of differentially expressed genes in rice under varied nitrogen supplies, **Gene**, v. 555 305–317, 2015.

YING, Z. et al. Rubisco small and large subunit N-methyltransferases, Bi- and mono-functional methyltransferases that methylate the small and large subunits of Rubisco, **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 36750-36756. 1999

ZAMORA, P. et al . Molecular characterization of the chalcone isomerase gene family in *Deschampsia antarctica*. **Polar Biol**, v. 36, p.1269-1280, 2013.

ZHANG, X.-H. et al. Complementation of the nuclear antisense *rbcS*-induced photosynthesis deficiency by introducing an *rbcS* gene into the tobacco plastid genome, **Plant Cell Physiol.** v. 43, p.1302-1313, 2002.

ZHANG, X-H. et al. Hybrid Rubisco of tomato large subunits and tobacco small subunits is functional in tobacco plants. **Plant Science**, v.180, p.480-488, 2011.

ZIEGLER, M. New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling, **Eur. J. Biochem.** v. 267, p.1550-1564, 2000

8. ANEXOS

Anexo 1. Tabela de comparação de médias para porcentagem final de germinação em déficit hídrico de sementes de *Solanum paniculatum* L. não condicionadas (NC) e condicionadas a -1,0MPa.

Meio germinativo (MPa)	Potencial de condicionamento (MPa)				
	NC	-0,4	-0,8	-1,0	-1,2
0,0	95,0Aa	98,0Aa	100,0Aa	100,0Aa	90,0Aa
-0,2	91,0Aa	90,0Aa	90,0Aa	100,0Aa	85,0Aba
-0,4	30,0Cc	75,0Bc	78,0Bc	95,0 Aab	78,0Ba
-0,6	15,0DCb	35,0Ca	18,0Cb	19,0Bb	17,0Cb
-0,8	0,0Da	0,0Da	0,0Da	0,0Ca	0,0Da
-1,0	0,0Da	0,0Da	0,0Da	0,0Ca	0,0Da
Media Geral	83,94				
CV (%)	11,17				

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x} + 1$.

Anexo 2. Tabela para comparação de médias de índice de velocidade de germinação em déficit hídrico de sementes de *Solanum paniculatum* L. não condicionadas (NC) e condicionadas a -1,0MPa.

Meio germinativo (MPa)	Potencial de condicionamento (MPa)				
	NC	-0,4	-0,8	-1,0	-1,2
0,0	1,80Ac	3,00Ab	2,10Ac	2,20Ac	4,50Aa
-0,2	1,00Ac	1,20Bc	1,00Bc	1,00Bc	3,00Ba
-0,4	0,50Bb	0,50Cb	0,50Cb	0,40Cb	0,60Ca
-0,6	0,0Ca	0,0Da	0,0Da	0,0Da	0,0Da
-0,8	0,0Ca	0,0Da	0,0Da	0,0Da	0,0Da
-1,0	1,80Ac	3,00Ab	2,10Ac	2,20Ac	4,50Aa
Média Geral	2,91				
CV (%)	5,33				

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x} + 1$.