

GIRLÂNIO HOLANDA DA SILVA

**RESTABELECIMENTO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO DE SEMENTES
GERMINADAS DE *Solanum lycocarpum* A. ST.-HIL.**

Botucatu

2019

GIRLÂNIO HOLANDA DA SILVA

**RESTABELECIMENTO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO DE SEMENTES
GERMINADAS DE *Solanum lycocarpum* A. ST.-HIL.**

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp Campus
de Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Ciência Florestal.

Orientador: Dr. Edvaldo Aparecido Amaral
da Silva

Botucatu

2019

S586r	Silva, Gírlânio Holanda Restabelecimento da Tolerância à Dessecação de Sementes Germinadas de <i>Solanum lycocarpum</i> A. St.-Hil. / Gírlânio Holanda Silva. -- Botucatu, 2019 63 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu Orientador: Edvaldo Silva 1. Sementes florestais. 2. Transcriptoma. 3. Solanaceae. 4. Cerrado. 5. Bioinformática. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados
fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

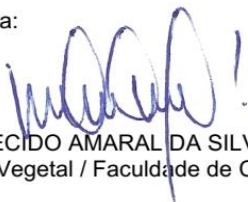
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

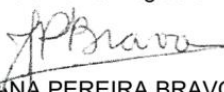
TÍTULO DA TESE: RESTABELECIMENTO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO DE SEMENTES
GERMINADAS DE *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil.

AUTOR: GIRLÂNIO HOLANDA DA SILVA

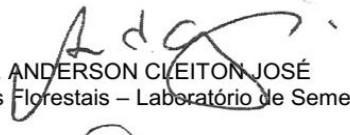
ORIENTADOR: EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA FLORESTAL
pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA
Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu – UNESP


Profª. Drª. JULIANA PEREIRA BRAVO
Agronomia / Faculdade La Salle


Voluntário Livre docente JOÃO NAKAGAWA
Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu


Prof. Dr. ANDERSON CLEITON JOSÉ
Ciências Florestais – Laboratório de Sementes Florestais / Universidade Federal de Lavras


Profª. Drª. HELOISA OLIVEIRA DOS SANTOS
Agricultura / Universidade Federal de Lavras

Botucatu, 30 de maio de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em quem sempre busquei força pra continuar lutando e insistindo pelo meu trabalho.

A meu pai, Givaldo, sempre presente em minhas lutas, e a Minha mãe, Lucineide, com seus cuidados comigo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, obrigado pela orientação concedida e paciência durante esses anos.

Aos meus colegas de departamento pela amizade que tivemos: Pedro Bento, Felipe, Breno, Denise, Valéria, Karina, Tiago Batista, Tiago Alexandre, Larissa, Louise, Daiani, Samara, Carol, Amada, Rute, Maria Rita, Vitor, Melissa, Gilberto, Fabíola, Maurício, Andréia, Leonel, Denis, Yago.

Ao professor Dr. João Nakagawa pela amizade, contribuição na minha formação, excelente exemplo de profissional e valiosos conselhos que levarei sempre comigo.

A banca examinadora: Profa. Dra. Juliana Bravo, Prof. Dr. Anderson Cleiton José, Prof. Dr. Pedro Bento da Silva e Prof. Dr. João Nakagawa pela participação na banca.

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

À FAPESP pela bolsa concedida e financiamento do projeto (n° 2016/05790-8).

RESUMO

A tolerância à dessecação (TD) em sementes ortodoxas é adquirida na fase de maturação e perdida com a germinação (protrusão radicular). Todavia, a utilização de polietileno glicol (PEG) pode restabelecer a TD em sementes germinadas. Objetivou-se neste trabalho restabelecer a tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Solanum lycocarpum* e estudar o transcriptoma e os mecanismos associados a este processo. Quatro repetições de 50 sementes germinadas com comprimento de raiz primária de 1, 2, 3, 4 e 5 mm foram tratadas com PEG 8000 à -1,7 MPa e mantidas à 10 °C por 72 horas e, após esse período, as sementes germinadas foram secadas em ambiente com solução de cloreto de lítio (65% de UR e 20 °C) até atingirem a umidade de 8,7%, como a do tratamento controle, as sementes germinadas não tratadas. Em seguida, as sementes germinadas foram pré-umidificadas em atmosfera saturada com vapor d'água por 24 horas à 20 °C e, então, submetidas às condições de germinação. O RNA foi extraído e sequenciado de raízes primárias de 2 mm de comprimento tratadas com PEG e não tratadas. Foram utilizadas três repetições biológicas de 100 raízes primárias para cada biblioteca de RNA, para o sequenciamento (Paired-End 2 x 200 bp HiScan2500). Foram identificados aproximadamente 116.000 transcritos, dos quais 2896 genes tiveram expressão diferencial, 1.184 genes tiveram a expressão aumentada e 1.712 tiveram a expressão diminuída. Foram identificados genes relacionados ao restabelecimento da TD em *S. lycocarpum*, destacando-se as oleosinas, LEA14, GOLS1 e EMP1. A tolerância à dessecação em *S. lycocarpum* é governada por um complexo de interações e mecanismos moleculares, dos quais os principais são os processos biológicos e vias relacionadas ao metabolismo de lipídeos e respostas hormonais.

Palavras-chave: Sementes florestais. Transcriptoma. Solanaceae. Cerrado.

ABSTRACT

The desiccation tolerance (TD) in orthodox seeds is acquired during the maturation phase and lost with germination (root protrusion). However, the use of polyethylene glycol (PEG) can reestablish TD in germinated seeds. The aim of this research was to restore tolerance to desiccation in germinated seeds of *Solanum lycocarpum* and to study the transcriptome and mechanisms associated with this process. Four replicates of 50 germinated seeds with primary root length of 1, 2, 3, 4 and 5 mm were treated with PEG 8000 at -1.7 MPa and maintained at 10 °C for 72 hours and after that period the seeds germinated seeds were dried in a solution of lithium chloride solution (65% RH and 20 °C) until reaching the humidity of 8.7%, as the control treatment, the untreated germinated seeds. Then the germinated seeds were pre-humidified in an atmosphere saturated with water vapor for 24 hours at 20 °C and then submitted to the germination conditions. RNA was extracted and sequenced from 2 mm long primary roots treated with PEG and untreated. Three biological replicates of 100 primary roots were used for each RNA library for sequencing (Paired-End 2 x 200 bp HiScan2500). Approximately 116,000 transcripts were identified, of which 2896 genes had differential expression, 1,184 genes had increased expression and 1,712 had decreased expression. Genes related to the reestablishment of TD in *S. lycocarpum* were identified, with emphasis on oleosins, LEA14, GOLS1 and EMP1. The desiccation tolerance in *S. lycocarpum* is governed by a complex of interactions and molecular mechanisms, the main ones being the biological processes and pathways related to lipid metabolism and hormonal responses.

Keywords: Forest seeds. Transcriptome. Solanaceae. Cerrado.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Espécie.....	15
2.2	Tolerância a dessecação.....	15
2.3	Restabelecimento da tolerância a dessecação	16
2.4	Mecanismos fisiológicos e moleculares da tolerância a dessecação.....	17
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1	Coleta de sementes, germinação e curva de embebição.....	20
3.2	Caracterização da perda da tolerância à dessecação.....	20
3.3	Restabelecimento da tolerância à dessecação.....	21
3.4	Extração de RNA total.....	22
3.5	Sequenciamento e Análise de bioinformática.....	22
3.6	Estudo da RT-PCR em tempo real.....	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5	CONCLUSÕES.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	APÊNDICE A – Dados suplementares.....	58

1 INTRODUÇÃO

A tolerância à dessecação é uma característica presente em vários organismos, como grãos de pólen, plantas, tardígrados, sementes e propágulos vegetativos (BEWLEY et al., 2013); esta capacidade permite aos organismos tolerar a secagem abaixo de $0,09 \text{ g.H}_2\text{O.g}^{-1}$ de massa seca, e após reidratação dar continuidade ao seu ciclo de vida (ALPERT, 2000; OLIVER et al., 2000; HOEKSTRA et al., 2001).

Espécies que possuem sementes ortodoxas são capazes de tolerar a secagem e ao armazenamento por longos períodos, estas sementes adquirem a tolerância à dessecação na fase de maturação (ROBERTS, 1973), mas com o início do processo germinativo estas se tornam sensíveis à dessecação, comportando-se como sementes recalcitrantes (LEPRINCE et al., 1993; BRADFORD, 1994; BUITINK et al., 2003).

Para que as sementes ortodoxas readquiram a capacidade de tolerar à dessecação são aplicados estímulos externos nas sementes germinadas para que possam reativar os mecanismos de tolerância à dessecação, o que pode ser feito por meio de estresse osmótico moderado com o uso polietileno glicol(PEG) ou aplicação de ácido abscísico(ABA) (BUITINK et al., 2003; FARIA et al., 2005; MAIA et al., 2011).

Sob condições de estresse osmótico, como a altas temperaturas, vários genes respondem a este estímulo para reinduzir a tolerância a dessecação, sendo o acúmulo de ABA um dos fatores principais que governam as mudanças fisiológicas que geram a tolerância a dessecação (MAIA et al., 2011; YOSHIDA et al., 2014).

Análises de transcriptoma mostram que genes envolvidos com a tolerância a estresses codificam proteínas LEA, enzimas de desintoxicação, chaperonas, fatores de transcrição (MARUYAMA et al., 2014; NAKASHIMA et al., 2014); plantas em condições de estresse aumentam os níveis de glicose, frutose, oligossacarídeos da família rafinose, aminoácidos de cadeia ramificada maiores em comparação às não estressadas (VERSLUES; JUENGER, 2011; MARUYAMA et al., 2014). Além disto, genes associados à fotossíntese tem expressão diminuída (MARUYAMA et al., 2012; SHARMA et al., 2013; HU; XIONG, 2014; TODAKA et al., 2015).

A identificação dos genes e a compreensão dos mecanismos responsáveis por conferir tolerância a dessecação em sementes podem auxiliar programas de

melhoramento genético de espécies cultivadas e avançar no conhecimento sobre sementes sensíveis à dessecação (KASUGA et al., 1999; ITO et al., 2006; SAKUMA et al., 2006; TODAKA et al., 2015). Assim, utilizar espécies nativas como modelo que apresentem genes relacionados a tolerância a dessecação e selecionar suas características pode ser uma estratégia para a conservação de sementes e auxiliar o processo de melhoramento de espécies agrícolas.

A espécie utilizada neste trabalho, *Solanum lycocarpum* A. ST.-HIL, é uma solanácea de porte arbustivo ou arbóreo conhecida como lobeira, cuja família apresenta grande importância comercial devido à utilização de suas espécies para fins agrícolas. A espécie apresenta distribuição por todo Cerrado brasileiro (LORENZI, 2002). Alguns trabalhos indicam que esta espécie possui tolerância a estresse hídrico, como relatado por Vidal et al. (1999) e Chaves Filho; Stacciarini-Seraphin (2001). Todavia, nenhum trabalho sobre a caracterização dos mecanismos moleculares que governam o reestabelecimento da tolerância à dessecação para esta espécie foi realizado.

Objetivou-se neste trabalho restabelecer a tolerância à dessecação em sementes germinadas de *S. lycocarpum* e estudar o transcriptoma e os mecanismos moleculares associados a este processo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espécie

A espécie *Solanum lycocarpum*, é conhecida popularmente como lobeira, pertencente à família Solanácea e apresenta distribuição por todo o Cerrado brasileiro (LORENZI, 2002), além disto, a família desta espécie possui importância econômica, devido a utilização de diversas espécies desta família para fins agrícolas. Alguns trabalhos apontam que *S. lycocarpum* possui características adaptativas de resistência a condições de estresse hídrico, como relatado por Vidal et al. (1999) e Chaves Filho; Stacciarini-Seraphin (2001). Além disto, a espécie *S. lycocarpum* apresenta grande uso farmacêutico, visto que seus frutos são fontes de diversos compostos anticancerígenos, antibacterianos, anti-inflamatórios, dentre outros (XIANG et al., 2016; PEREIRA et al., 2018).

A *S. lycocarpum* pode chegar a quatro metros de altura, possui folhas alternadas e pecioladas com coloração roxa (ALMEIDA et al., 1998), sua floração ocorre o ano todo e pode apresentar até 100 frutos por árvore (SILVA et al., 1994). As sementes de *S. lycocarpum* possuem tegumento achatado, rígido e com coloração marrom-escuro; seu embrião tem forma espiralada dentro do endosperma, os cotilédones encontram-se internamente entre o hipocótilo e a radícula (LORENZI, 1998; PINTO et al., 2007). As sementes germinam e as plântulas se estabelecem em solos arenosos e de baixa fertilidade química, formações secundárias abertas e terrenos elevados (LORENZI, 1998). Além disto, *S. lycocarpum* é uma espécie adaptada ao clima do Cerrado, em condições de déficit hídrico (ELIAS et al., 2003).

2.2 Tolerância à dessecação

A tolerância à dessecação é a habilidade de tolerar a quase total perda de água no protoplasma, e após a reidratação retomar as atividades metabólicas normais (OLIVER et al., 2000; HOEKSTRA et al., 2001), sendo uma característica apresentada por diversos organismos, incluindo plantas e propágulos vegetativos (BEWLEY, 1979; ALPERT, 2005). Esta capacidade permite que sementes possam tolerar condições ambientais desfavoráveis, como altas temperaturas e dar continuidade ao seu ciclo de vida (ALPERT, 2000; OLIVER et al., 2000).

A propagação de plantas pode acontecer predominantemente via sementes, porém sua utilização envolve problemas relacionados às respostas quanto à secagem e ao armazenamento (BRADFORD, 1994). As sementes podem ser classificadas em três categorias, (HONG; ELLIS, 1996): sementes ortodoxas, que toleram a secagem até cerca de 7% de conteúdo de água e ao armazenamento prolongado em baixas temperaturas (sub-zero); recalcitrantes, que não suportam redução do teor de água e ao armazenamento por longos períodos a baixas temperaturas; entretanto, sementes classificadas como intermediárias, suportam a redução do conteúdo de água a níveis próximos aos de sementes ortodoxas, mas não toleram o armazenamento a temperaturas abaixo de zero por longos períodos (ELLIS et al., 1990).

As sementes ortodoxas são tolerantes à dessecação ao final do estágio de maturação e durante o início do processo germinativo. Com o prosseguimento da germinação, elas tornam-se sensíveis à dessecação, comportando-se como sementes recalcitrantes (LEPRINCE et al., 1993; BRADFORD, 1994; BUITINK et al., 2003). Assim, sementes ortodoxas germinadas podem ser utilizadas como modelo para se ajudar a compreender sensibilidade à dessecação das sementes recalcitrantes (BUITINK et al., 2003).

2.3 Restabelecimento da tolerância a dessecação

Na literatura é possível observar vários exemplos quanto a capacidade de tolerância à dessecação em diversas espécies que possuem os requisitos para que ocorra, o que depende de alguns fatores, como o tipo de estímulo aplicado (PEG e/ou ABA), comprimento da radícula que recebe o estímulo e variações de sua concentração e/ou tempo de incubação do tratamento nas espécies. O que se nota é que o restabelecimento da tolerância a dessecação em sementes germinadas tem maior sucesso com aplicação de estresse moderado (-1,7 MPa) e com aplicação em raízes primárias menores de 4 mm de comprimento (FARIA et al., 2005; MAIA et al., 2011; COSTA et al., 2015).

Incubação de sementes germinadas de *Medicago truncatula* em polietileno glicol (PEG -1,7 MPa), sob estresse osmótico moderado, possibilitou o restabelecimento da tolerância à dessecação, ou seja, as sementes voltaram a apresentar os mecanismos que conferiam a capacidade de tolerar a dessecação, pois

anteriormente eram sensíveis à dessecação. A condição para que sementes se tornem tolerantes à dessecação, portanto, é sua passagem por um período de estresse moderado (BUIKINK et al., 2003, FARIA et al., 2005).

2.4 Mecanismos fisiológicos e moleculares da tolerância a dessecação

Sementes recalcitrantes são dispersas com umidade elevada, não tolerando a dessecação. Assim, com a perda de água, alterações no volume do vacúolo podem ocasionar a sua desestruturação e rompimento (PAMMENTER et al., 1994; BERJAK; PAMMENTER, 2008). Outro desafio para a conservação de sementes recalcitrantes é a baixa concentração de ácido abscísico (ABA) endógeno, que poderia atuar na redução da sensibilidade aos danos pelo armazenamento, como observado em sementes sensíveis a dessecação de *Avicennia marina* (FARRANT et al., 1993).

Vários estudos têm sido realizados para compreender o que faz as sementes se comportarem diferentemente quanto à dessecação. A conclusão é que não é apenas um componente fisiológico/molecular que modula e confere a capacidade de tolerar à dessecação nas sementes, mas sim um conjunto de fatores, havendo uma dependência entre eles, podendo ser morfológicos, fisiológicos e moleculares, com respostas que podem ser lenta ou imediata (LEPRINCE et al., 1993; HOEKSTRA et al., 2001; PAMMENTER; BERJAK, 1999).

Entre os fatores que auxiliam a capacidade de tolerar a dessecação, observa-se a influência do acúmulo de ABA, açúcares da família rafinose, lipídios, proteínas e de sistemas antioxidantes, atuando em cooperação na manutenção da integridade de membranas e macro moléculas, bem como no reparo dos danos celulares causados pela dessecação (LEPRINCE et al., 1990a, 1990b, 1993; BLACKMAN et al., 1991; MEURS et al., 1992; PAMMENTER; BERJAK, 1999; HOEKSTRA et al., 2001).

As primeiras respostas observadas ao estresse é governada por ABA (HARB et al., 2010), que pode atuar no metabolismo celular mantendo-o predominantemente anabólico nas sementes, aumentando seu nível durante a secagem da semente levando ao acúmulo dos mecanismos que conferem a capacidade de tolerar à dessecação (MEURS et al., 1992; BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998).

As alterações ambientais estimulam as plantas a mudanças metabólicas que permitem tolerar estresses, como por exemplo, o hídrico (INGRAM; BARTELS, 1996; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997), que por sua vez promove a secagem, e condicionando mudanças fisiológicas e moleculares em partes vegetativas e reprodutivas, como em sementes. Estas alterações são reguladas por genes específicos envolvidos na tolerância à dessecação (INGRAM; BARTELS, 1996).

O *galactinol synthase* (GolS) catalisa as primeiras reações de biossíntese de açúcares da família rafinose, regulando os níveis de açúcares em sementes (SARAVITZ et al., 1987). Uma das funções desta família de açúcares é a osmoproteção, como observado em *arabidopsis* e *Ajuga reptans* L, que após o aumento de expressão de GolS estas espécies apresentaram maior tolerância ao frio (LIU, et al., 1998; SPRENGER; KELLER, 2000).

Oleosinas são proteínas estruturais que previnem a coalescência da membrana durante a dessecação de sementes (SILOTO et al., 2006), e tolerância ao frio ao manter a integridade da membrana (SHIMADA et al., 2008). Além disto, estas se apresentam na forma de organelas lipídicas que armazenam triacilgliceróis, importantes fontes de reserva para o processo germinativo e crescimento inicial de plantas (SILOTO et al., 2006).

A dificuldade no estudo de genes é relacionar a sua expressão com os eventos aos quais estão envolvidos, pois em sementes eventos metabólicos podem estar relacionados a estádios do desenvolvimento ou também em resposta a estresses. Diversos genes já foram identificados mostrando relação com a tolerância à dessecação, codificando moléculas importantes neste processo, como proteínas LEA e enzimas que atuam na degradação de açúcares ou antioxidantes (INGRAM; BARTELS, 1996). Entre os genes já estudados mostrando relação com a tolerância à dessecação, alguns deles são os: *LEC1*, *LEC2*, *FUS3* e *ABI3* (BÄUMLEIN et al., 1994; HARADA, 2001; KEITH et al., 1994; PARCY et al., 1994).

A identificação dos genes e compreensão dos mecanismos responsáveis por conferir a tolerância a estresses em plantas, como a tolerância à dessecação em sementes, possibilitará o aprimoramento de programas de melhoramento genético de espécies cultivadas e avançar no conhecimento de sementes sensíveis à dessecação. Portanto, utilizar espécies nativas que apresentem estas características, pode ser uma estratégia importante para o desenvolvimento de

técnicas aplicáveis na conservação de sementes e no melhoramento de espécies que não possuem características voltadas para condições tropicais, cujos genes que conferem tolerância à dessecação ainda não foram relatados.

A estratégia mais empregada atualmente para estudar os mecanismos associados com a indução e caracterização da tolerância à dessecação em sementes germinadas é o uso de estresse osmótico moderado de soluções de polietileno glicol (PEG), conforme já realizado em outras espécies (LEPRINCE et al., 1990a, 1990b, 1993; BLACKMAN et al., 1991; MEURS et al., 1992. PAMMENTER; BERJAK, 1999). Aliado aos experimentos de indução de tolerância à dessecação, tem sido de grande importância o uso da nova geração de sequenciamento genético, que permite a identificação de genes diferencialmente expressos, além de se conhecer a expressão de genes associados ou não com a tolerância à dessecação em sementes germinadas.

A nova geração de sequenciamento de RNA, chamada de RNA-Seq, é uma tecnologia eficiente para estudos de transcriptoma que permite investigar os genes presentes em determinado organismo, nos diferentes tecidos e nas diferentes condições. Comparado com a técnica de microarranjos, a tecnologia de RNA-Seq pode detectar a quase totalidade dos transcritos num dado momento nas células, enquanto a de microarranjos depende de informação prévia do genoma e, desta forma, não permite detectar novos transcritos. Além disso, a tecnologia de RNA-Seq apresenta elevada sensibilidade, exige pouca quantidade de RNA e está se tornando cada vez mais acessível devido ao rápido desenvolvimento e popularização da tecnologia.

Portanto, o conhecimento sobre sementes de *S. lycocarpum* quanto a tolerância à dessecação e o restabelecimento da tolerância permitirá compreender os genes e mecanismos envolvidos na tolerância à dessecação em sementes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de sementes, germinação e curva de embebição

Para iniciar os estudos, frutos de 20 matrizes de *S. lycocarpum* fisiologicamente maduros (coloração verde) foram coletados após a dispersão natural (coletados do solo) (PINTO et al., 2007), em um fragmento contínuo de Cerrado no estado de Minas Gerais na Universidade Federal de Lavras (UFLA), entre os meses de junho e novembro de 2016, esses frutos foram beneficiados com auxílio de peneira e água corrente para a remoção da polpa, sobrando apenas as sementes, que logo depois foram secadas a temperatura ambiente. Em seguida, as sementes foram submetidas a teste de germinação, caracterização da curva de embebição e determinação do grau de umidade, em estufa à 105 °C por 24 horas (BRASIL, 2009). Durante as realizações dos testes fisiológicos as sementes foram armazenadas à temperatura de -5 °C e umidade relativa de 30%.

Antes de cada teste de germinação, as sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% durante oito minutos e logo a pós lavadas em água corrente por um minuto, em seguida, 4 repetições de 25 sementes, foram semeadas entre papel mata borrão em caixas plásticas tipo Gerbox. Logo após as sementes foram incubadas em câmara de germinação do tipo B.O.D., com temperatura alternada (20-30 °C) e fotoperíodo de 8 horas de luz. Como critério de germinação foi utilizado o comprimento da raiz primária ≥ 1 mm (protrusão da radícula) e as avaliações ocorreram diariamente até o 30° dia.

Para caracterização da curva de embebição, 50 sementes foram avaliadas individualmente e mantidas sob as mesmas condições de germinação e pesadas em balança de precisão de 0,0001 g em intervalos regulares de uma hora durante 24 horas e diariamente até a protrusão radicular. As pesagens foram realizadas até que a raiz primária atingisse 3 mm de comprimento. Antes de cada pesagem a água superficial foi removida das sementes com auxílio de papel toalha, retornando-as para a embebição após a pesagem.

3.2 Caracterização da perda da tolerância à dessecação

As sementes foram mantidas nas mesmas condições de germinação do experimento anterior e submetidas à secagem em sílica gel após diferentes tempos de embebição (0, 1, 3, 5, 8, 10, 15 e 20 dias). Para a secagem, as sementes foram mantidas a 20 °C em caixas tipo Gerbox sobre telado, com uma camada de sílica gel abaixo para manter a umidade relativa próxima a 8,5%, sendo vedadas com filme plástico. Durante a secagem foi realizada a determinação do grau de umidade das sementes (BRASIL, 2009), e após retornar ao conteúdo de água inicial, anterior à embebição, as sementes foram mantidas por mais três dias com o mesmo conteúdo de água que foi atingido anteriormente.

Após este período, as sementes foram pré-umidificadas em atmosfera saturada (99-100% de umidade relativa e temperatura de 20 °C) durante 24 horas em caixas Gerbox sobre telado, para cada Gerbox foi adicionado 30 ml de água destilada; decorrido esse período as sementes foram submetidas à germinação. A formação de plântulas normais, com todas as estruturas essenciais com raiz e hipocótilo sem defeitos, foi o critério usado para avaliação da tolerância à dessecação.

3.3 Restabelecimento da tolerância à dessecação

Para cada tratamento quatro repetições de 50 sementes germinadas com comprimento de raiz primária de 1, 2, 3, 4 e 5 mm foram incubadas em placas de Petri contendo polietileno glicol (PEG 8000) à -1,7 MPa conforme Maia et al. (2011). As sementes germinadas de cada comprimento foram mantidas à 10 °C, durante 72 horas, e após esse período foram lavadas em água corrente para remoção de resíduos de PEG, e secadas em papel toalha para remoção da água superficial. Como tratamento controle foram utilizadas 4 repetições de 50 sementes germinadas de cada comprimento de raiz primária de 1, 2, 3, 4 e 5 mm não tratadas com PEG.

Após a incubação, as sementes germinadas foram secadas em ambiente com solução de cloreto de lítio (65% RH) por aproximadamente 30 horas à 20 °C, de forma que alcançassem $\leq 0,09 \text{ g.H}_2\text{O g}^{-1}$ (8,5% de massa fresca na base úmida) (CROMARTY et al., 1985). Após este período, as sementes foram pré-embebidas em atmosfera saturada com vapor d'água em caixas Gerbox durante 24 horas à 20 °C, e então submetidas às condições de germinação de modo a verificar a retomada de crescimento das raízes primárias.

A retomada do crescimento das raízes primárias e posterior formação de plântulas normais foram utilizadas como critério para avaliação do restabelecimento da tolerância à dessecação. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 50 sementes germinadas para os comprimentos de 1, 2, 3, 4 e 5 mm; para efeito de comparação entre cada comprimento de raízes primárias tratadas e não tratadas com PEG.

Os dados foram inicialmente analisados estatisticamente com testes de normalidade (Shapiro-Wilk), análise de variância (Anova) e teste de média (teste de t pareado, à 5% de probabilidade), utilizando o *software* SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 2010) para comparar as médias da sobrevivência de radículas de sementes germinadas tratadas e não tratadas com PEG -1,7 MPa em todos os comprimentos.

3.4 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído de raízes primárias (todo eixo embrionário) tratadas com PEG (8000) e não tratadas, com comprimento de 2 mm. Foram utilizadas três repetições biológicas formadas por 100 raízes primárias de 2 mm para cada tratamento. As raízes primárias tratadas e não tratadas foram isoladas e congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em *Deep freezer* à -80 °C até o momento da extração do RNA total.

Para extração de RNA total, foi utilizado o Kit NucleoSpin RNA Plant® da Macherey-Nagel, conforme instruções descritas no protocolo do fabricante. Os RNAs extraídos foram quantificados em espectrofotômetro Nanodrop-2000 (Thermo Scientific®) e seus resultados expressos em ng/μL e a avaliação da sua integridade foi determinada usando o equipamento Bioanalyzer 2100 Agilent®.

3.5 Sequenciamento e análise de bioinformática

O sequenciamento de RNAs foi realizado em raízes primárias de 2 mm tratadas e não tratadas com PEG à -1,7 MPa. Foram utilizadas três repetições biológicas formadas por 100 raízes primárias para cada tratamento. Desta forma, foram necessárias três bibliotecas (1 comprimento de raiz primária X 3 repetições biológicas) para raízes primárias tratadas com PEG e três bibliotecas controle (1

comprimento de raiz primária X 3 repetições biológicas) para raízes primárias não tratadas. Assim, foram seis (3+3) bibliotecas com 50 milhões de *reads* por amostra.

O sequenciamento e montagem do transcriptoma foi realizado no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) na Universidade de Campinas (UNICAMP), através da plataforma da empresa illumina (HISEQ2500, módulo Paired-End 2x100 *bp*). A estratégia utilizada para a montagem foi a *de novo* para identificação de novos transcritos associados a tolerância à dessecação. A reconstrução independente do transcriptoma foi obtida por meio de montagem de transcritos consenso diretamente a partir dos *reads* obtidos.

O controle de qualidade foi feito através da filtragem e trimagem dos *reads* das bibliotecas de acordo com a qualidade das bases, usando o software FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) e Trimmomatic (BOLGER et al., 2014).

Para a montagem *de novo* do transcriptoma foi feita normalização digital dos *reads* usando DigiNorm (BROWN et al., 2012) e a montagem dos *reads* foi realizado usando o software Trinity (GRABHERR et al., 2011).

Para o cálculo da expressão diferencial dos transcritos foi utilizado o software DESeq2 (LOVE et al., 2014) e para calcular a abundância dos transcritos o RSEM (LI; DEWEY, 2011). Os valores da expressão dos transcritos foram expressos em FPKM (Reads per Kilobase per Million of Mapped Reads) e log2FoldChange. Para a anotação funcional dos transcritos foi utilizado o software Trinotate e blast contra o banco de dados SwissProt, em seguida todos os genes diferencialmente expressos de *S. lycocarpum* foram classificados em termos GO (Gene Ontology) em: processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares. As vias metabólicas, termos GO e co-expressão de genes relacionados a tolerância a dessecação foram enriquecidos com *p*values < 0,05 utilizando como background a espécie *Arabidopsis thaliana*.

3.6 Estudo da RT-PCR em tempo real

Para validação e confirmação da acurácia dos dados de RNA-Seq, os genes candidatos com expressão diferencial nas raízes primárias de 2 mm tratadas e não tratadas com PEG à -1,7 MPa, foi realizado estudo da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR). O RNA extraído das raízes primárias foi

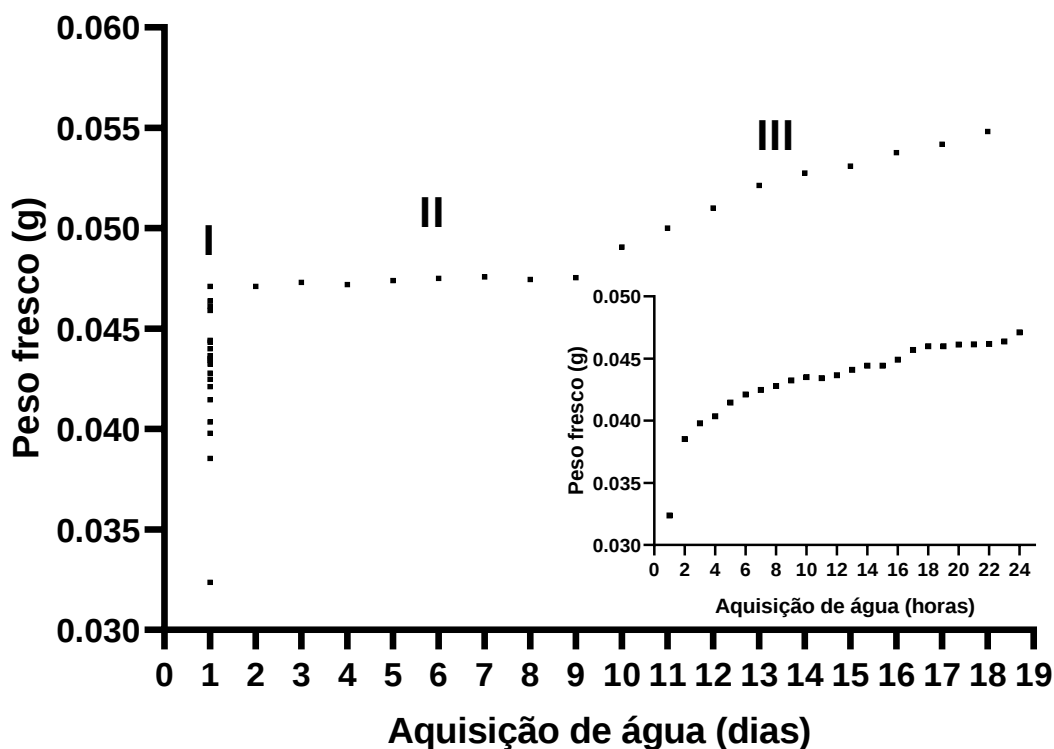
utilizado para confecção de cDNA, por transcrição reversa. A transcrição reversa foi feita a partir de mistura de 10 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 400 mM dNTPs, 5 mM DTT, 2% de (p/v) sacarose, 0,1 mM de cresol red, 0,1 ml de Transcriptase Reversa e 2,5 µg mRNA, com ciclos divididos em três etapas: 25 °C à dez minutos, 37 °C à 120 minutos e 85 °C à cinco minutos no equipamento Applied Biosystems™. Em seguida, uma nova reação foi realizada utilizando-se o cDNA obtido. A técnica de RT-PCR foi realizada com um mix de cDNA, primer *forward* e primer *reverse* desenhados para os genes de interesse e iQ SYBR *green supermix* (produto fluorescente). Para cada reação foi utilizado 10 µl de mix feito na etapa anterior. O desenho dos primers dos genes candidatos foi feito a partir do transcriptoma montado.

O protocolo de amplificação dos *primers* foi de 2 min à 95 °C e 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C e 40 min à 60 °C, seguido por 15 segundos à 95 °C e 15 segundos à 55 °C, seguido de 15 segundos à 95 °C. O método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi utilizado para o cálculo do nível de expressão gênica (cDNA) dos genes selecionados (LIVACK; SCHMITTGEN, 2001). Os *primers* para os genes OLEO1, OLEO2, OLEO6, EMP1, GOLS1, LEA14 foram avaliados quanto a sua eficiência e expressão constitutiva dentro de cada tratamento através do software LinRegPCR e o desenho dos mesmos pelo PerlPrimer v1.1 (MARSHALL, 2004) e amplificações pelo equipamento Eco™ Real-Time PCR System da illumina. Foram utilizadas três repetições biológicas por tratamento e três repetições técnicas por repetição biológica, para cada par de *primer* e mais dois genes normalizadores (DN30933 e 4CPL1). As sequências dos primers e suas eficiências encontram-se no Apêndice I.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva de embebição, caracterizada no período de 18 dias apresentou o padrão trifásico proposto por Bewley et al. (2013). O teor de água inicial das sementes foi de 10,3 %, após 1 hora do início da embebição observou-se aumento na massa inicial da semente, tendo estabilizado nas primeiras 24 horas após o início da embebição, o que marca o final da fase I e início da fase II da curva de embebição, com teor de água estável de 38% até o final da fase II. Durante essa fase várias atividades metabólicas ocorrem de modo a garantir o sucesso germinativo (BEWLEY et al., 2013). Ficou evidente que o início da fase III ocorreu a partir do 10º dia. A rápida embebição inicial das sementes indica que esta espécie *S. lycocarpum* não possui dormência tegumentar (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

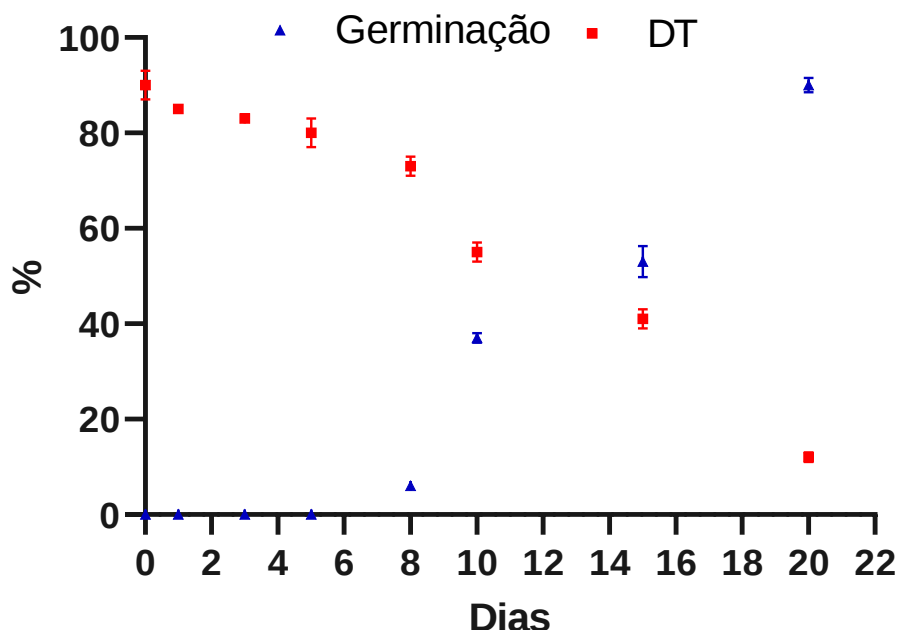
Figura 1 – Massa de matéria fresca das sementes de *S. lycocarpum* no decorrer da hidratação. Legenda: I, II e III representam as fases da germinação



As curvas de germinação e sobrevivência de sementes após a secagem em sílica gel foram aproximadamente opostas; ao décimo quinto dia após o início do teste, quando as sementes apresentaram 53% de germinação, a porcentagem de tolerância à dessecação foi de 41%, após esse período a tolerância à dessecação caiu para 12% (Figura 2). Observou-se ligeira perda da tolerância à dessecação até aproximadamente o início da germinação das sementes, que ocorreu a partir do sexto dia do início experimento. Além disto, os resultados confirmam que sementes de *S. lycocarpum* toleram à dessecação antes da protrusão radicular, contudo após o início da protrusão da radícula a tolerância a dessecação é acentuadamente perdida.

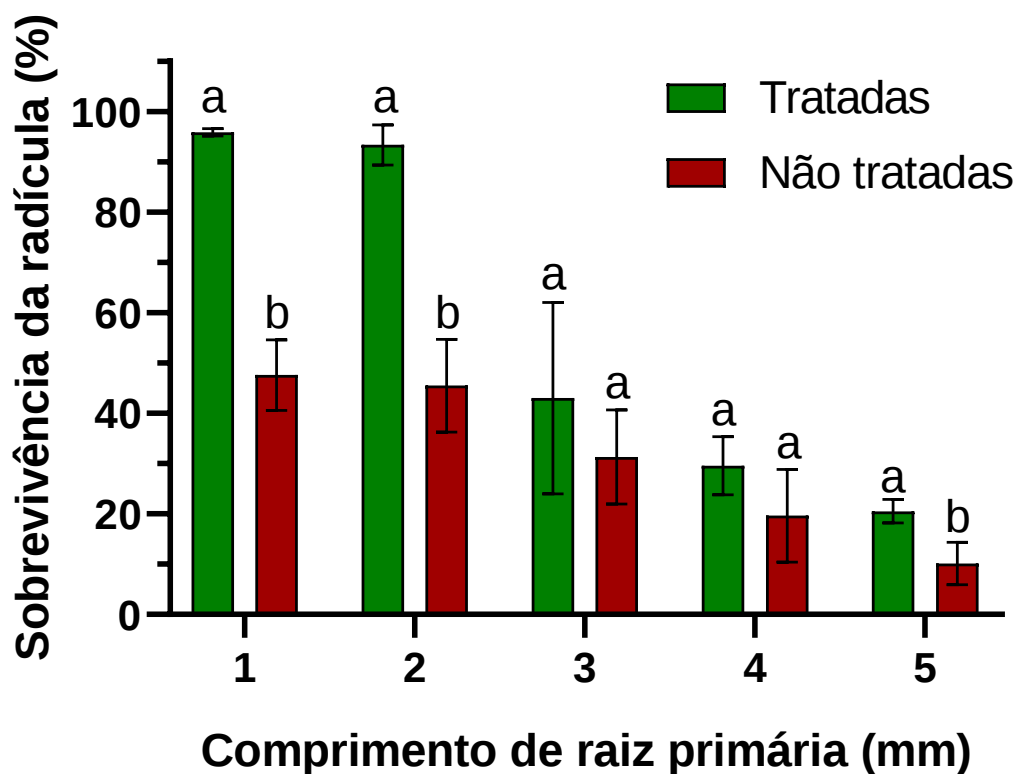
A tolerância à dessecação é a capacidade que sementes possuem de tolerar a secagem a teores de água próximos à $0,09 \text{ g.H}_2\text{O.g}^{-1}$ fresco, e pós a reidratação continuar a suas atividades metabólicas (LEPRINCE et al., 1993). O início da perda da tolerância a dessecação para cada espécie varia em função do tempo de embebição e comprimento de radícula, contudo, existem ainda diversos mecanismos que são influenciados durante a secagem das sementes, como desnaturação de proteínas, açúcares, síntese de DNA, entre outros, fazendo com que as células entrem em colapso metabólico (NEDEVA; NIKOLOVA, 1997), o que pode ter gerado o leve decréscimo da perda da tolerância a dessecação em sementes de *S. lycocarpum* mesmo antes do início da germinação das mesmas (LEPRINCE et al., 1990a, 1993, 2000; BUITINK et al., 2003; MAIA et al., 2011).

Figura 2 - Curva de germinação e de perda da tolerância à dessecação (DT) em sementes de *S. lycocarpum*. *Barras representam desvio padrão da média



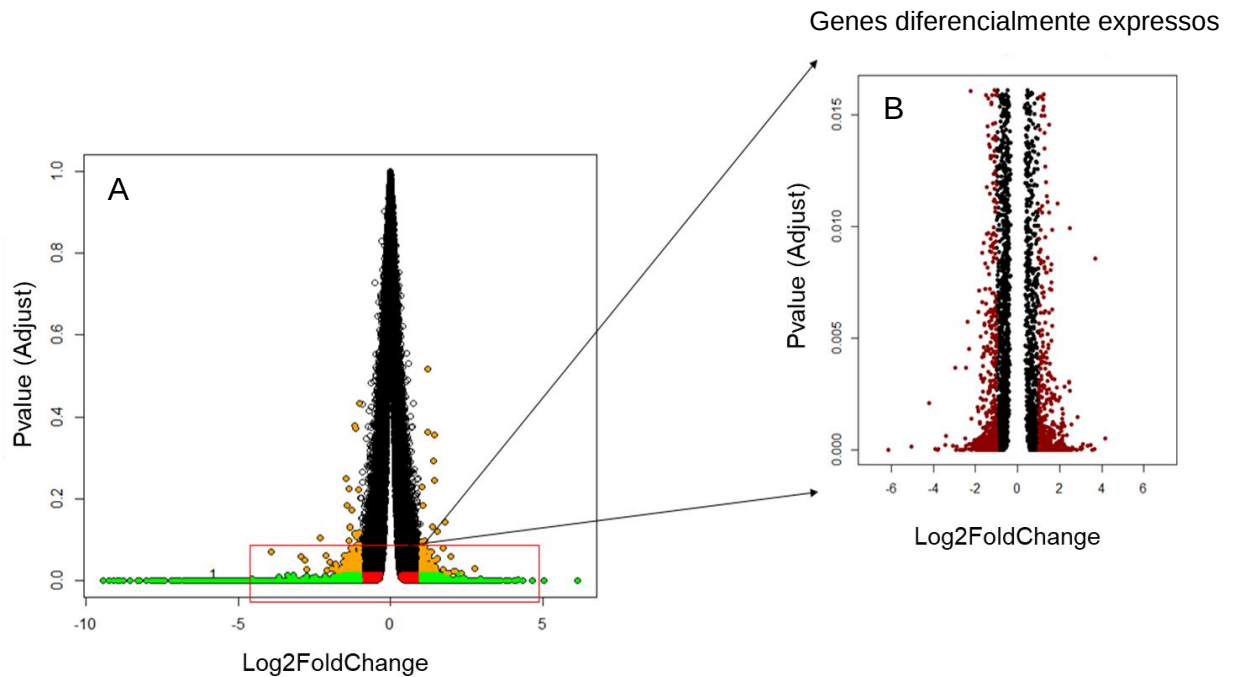
Observou-se que para todos os comprimentos de raízes primárias estudadas ocorreu o restabelecimento da tolerância à dessecação. Os comprimentos de 1 e 2 mm de raízes primárias tiveram maior taxa de sobrevivência após a secagem do que os comprimentos 3, 4 e 5 mm (Figura 3). Para os comprimentos de 1 e 2 mm de raiz primária a tolerância a dessecação foi quase que totalmente restabelecida. Houve, portanto, diferenças estatísticas entre sementes tratadas e não tratadas com PEG (-1,7 MPa) para esses comprimentos (Figura 3). Em decorrência do fato da quase totalidade do restabelecimento da tolerância a dessecação ocorrerem um estágio de desenvolvimento mais tardio, como em 2 mm de comprimento de radícula em sementes germinadas tratadas com PEG -1,7 MPa, este comprimento foi escolhido para o sequenciamento. Pode ser observado que o limite de comprimento de raiz primária que retomou o crescimento, foi superior aos encontrados em outros trabalhos (MAIA et al., 2011; BUITINK et al., 2003). Vários autores relatam que para que ocorra o restabelecimento da tolerância à dessecação existe uma série de estratégias que devem acontecer, como formação de microtúbulos, reparo de DNA, síntese de açúcares, etc. (BUITINK et al., 2003; FARIA, et al., 2005).

Figura 3 - Restabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas de *S. lycocarpum*. Letras iguais em cada comprimento não diferem estatisticamente pelo teste t à 5% de probabilidade. *Barras de erro representam desvio padrão da média



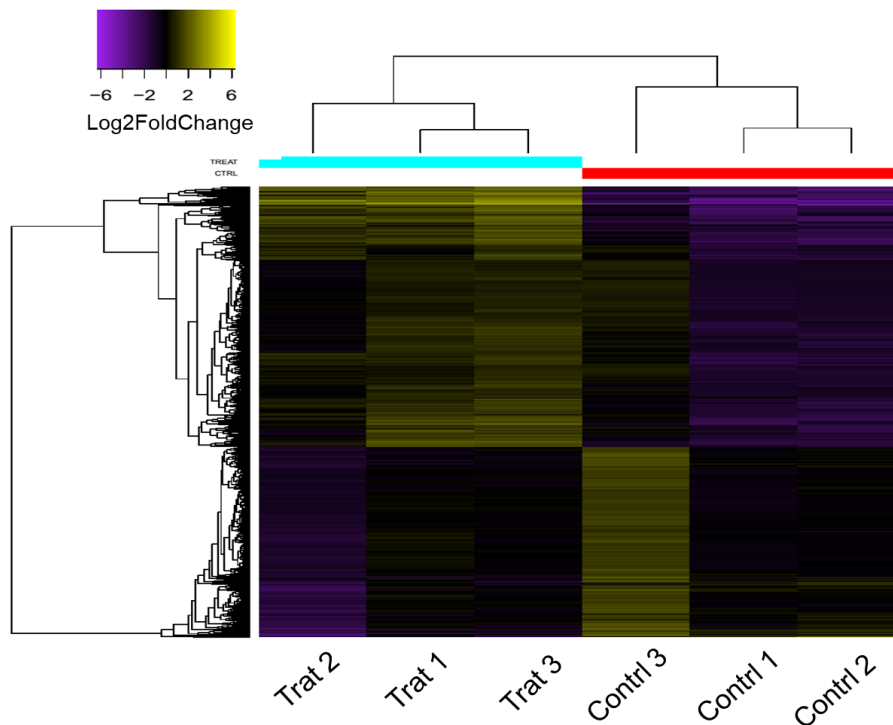
Após a reconstrução independente do genoma obtida por meio de montagem de transcritos consenso diretamente a partir dos *reads*, foram identificados aproximadamente 116.000 transcritos, dos quais 5.740 apresentaram expressão diferencial. Deste total, 2.896 transcritos apresentam notação funcional, sendo que 1.184 transcritos tiveram expressão aumentada e 1.712 diminuída (Figura 4). O fato de haver menor número de transcritos com aumento de expressão nas sementes germinadas tratadas em relação as sementes germinadas não tratadas evidencia o que se chama de “desligamento metabólico”, o que limita o número de processos celulares que contribuiriam com a sensibilidade a dessecação, como a geração de radicais livres (ROS) que pudessem causar danos a estruturas essenciais para a manutenção da tolerância dessecação (BERJAK; PAMMENTER, 2013, MAIA et al., 2011; RATAJCZAK et al., 2018).

Figura 4 - Representação de transcritos totais (A) e transcritos diferencialmente expressos (B) em sementes germinadas de *S. lycocarpum*



Pelos dados obtidos pela análise do transcriptoma verifica-se que houve resposta do tratamento aplicado as sementes (PEG -1,7 MPa), de forma que pode ser observada pela intensidade de sinal dos 500 genes mais diferencialmente expressos das amostras tratadas e não tratadas através da análise de cluster (Figura 5). Os resultados são apresentados em *heatmap* e confirmam a presença de maior número de genes com expressão diminuída.

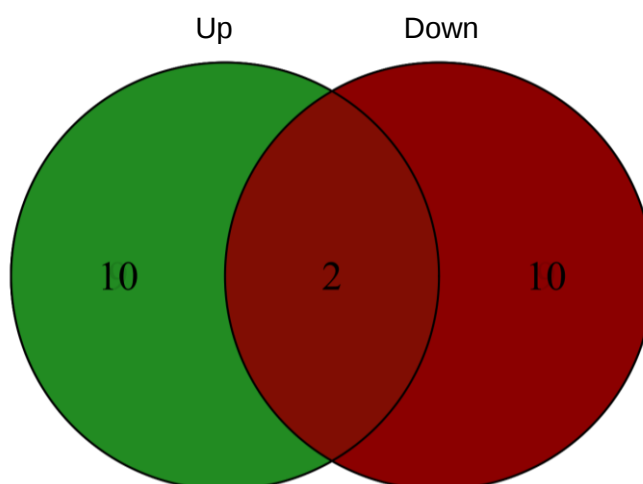
Figura 5 - Agrupamento hierárquico dos transcritos diferencialmente expressos de raízes primárias submetidas ao tratamento de restabelecimento da TD vs amostras controle em *S. lycocarpum*



A identificação de transcritos em sementes germinadas de *S. lycocarpum* que restabeleceram a tolerância à dessecação foram anotadas de acordo com o banco de dados SwissProt, o que permitiu a classificação da ontologia genética (GO) em processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares.

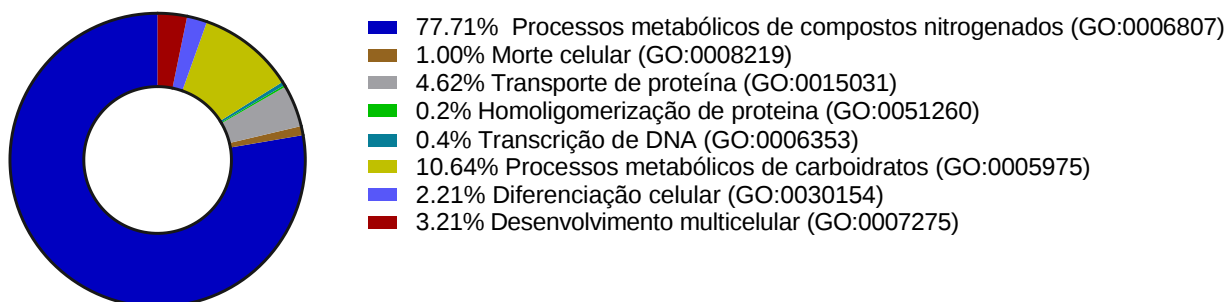
Foram identificados 22 processos biológicos dentre os transcritos diferencialmente expressos, em que dez processos ocorreram exclusivamente em transcritos com expressão aumentada e outros dez em transcritos com expressão diminuída, mais dois processos que ocorreram em ambas as situações de expressão (Figura 6).

Figura 6 - Representação dos processos biológicos de transcritos com aumento (Up) e com diminuição (Down) da expressão em sementes germinadas de *S. lycocarpum*



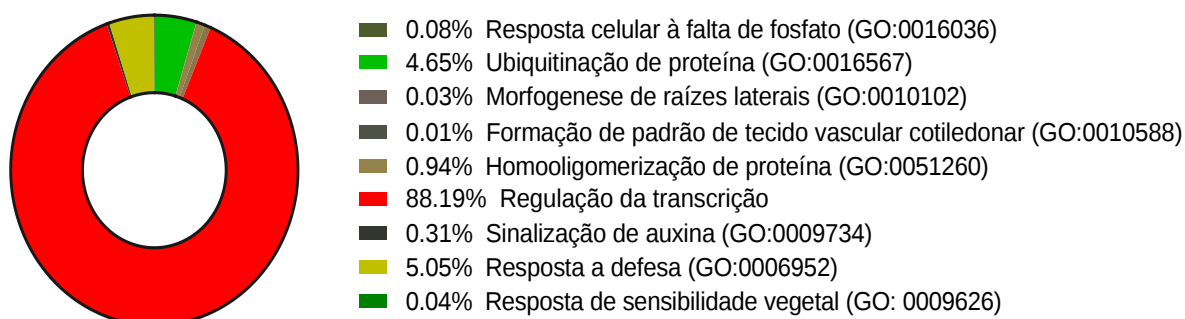
O componente biológico de maior proporção durante o aumento de expressão dos transcritos com expressão aumentada foram os processos metabólicos de compostos nitrogenados com aproximadamente 78% (GO: 0006807), seguido pelos processos metabólicos de carboidratos com 10,6% (GO: 0005975) e transporte de proteínas com 4,62% (GO: 0015031) (Figura 7). O que sugere que esses produtos irão atuar nos processos pós traducionais em biomoléculas para posterior gasto energético e estrutural necessários que tornem as raízes primárias tolerantes a dessecação (BUITINK et al., 2006; TIAN et al., 2016).

Figura 7 - Representação dos processos biológicos de transcritos com aumento de expressão em sementes germinadas de *S. lycocarpum*



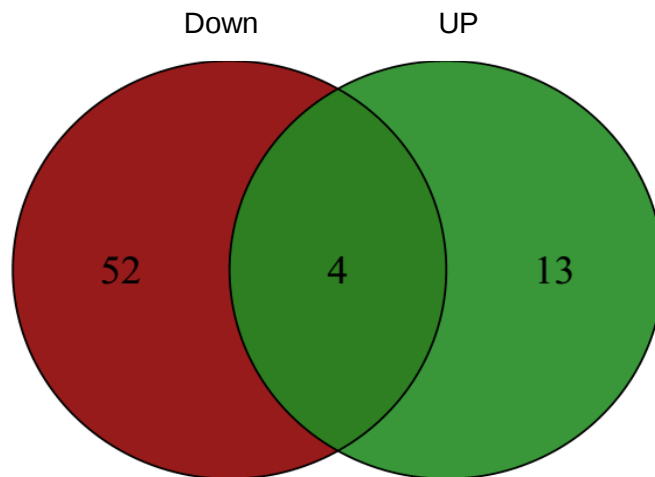
Por outro lado, o componente biológico de maior proporção durante a diminuição de expressão dos transcritos foram os processos ligados a regulação de transcrição com 88% (GO: 0006355), seguido pelos processos relacionados a defesa com 5,05% (GO: 0006952) e ubiquitinação protéica com 4,65% (GO: 0015031) (Figura 8).

Figura 8 - Representação dos processos biológicos de transcritos com diminuição de expressão em sementes germinadas de *S. lycocarpum*



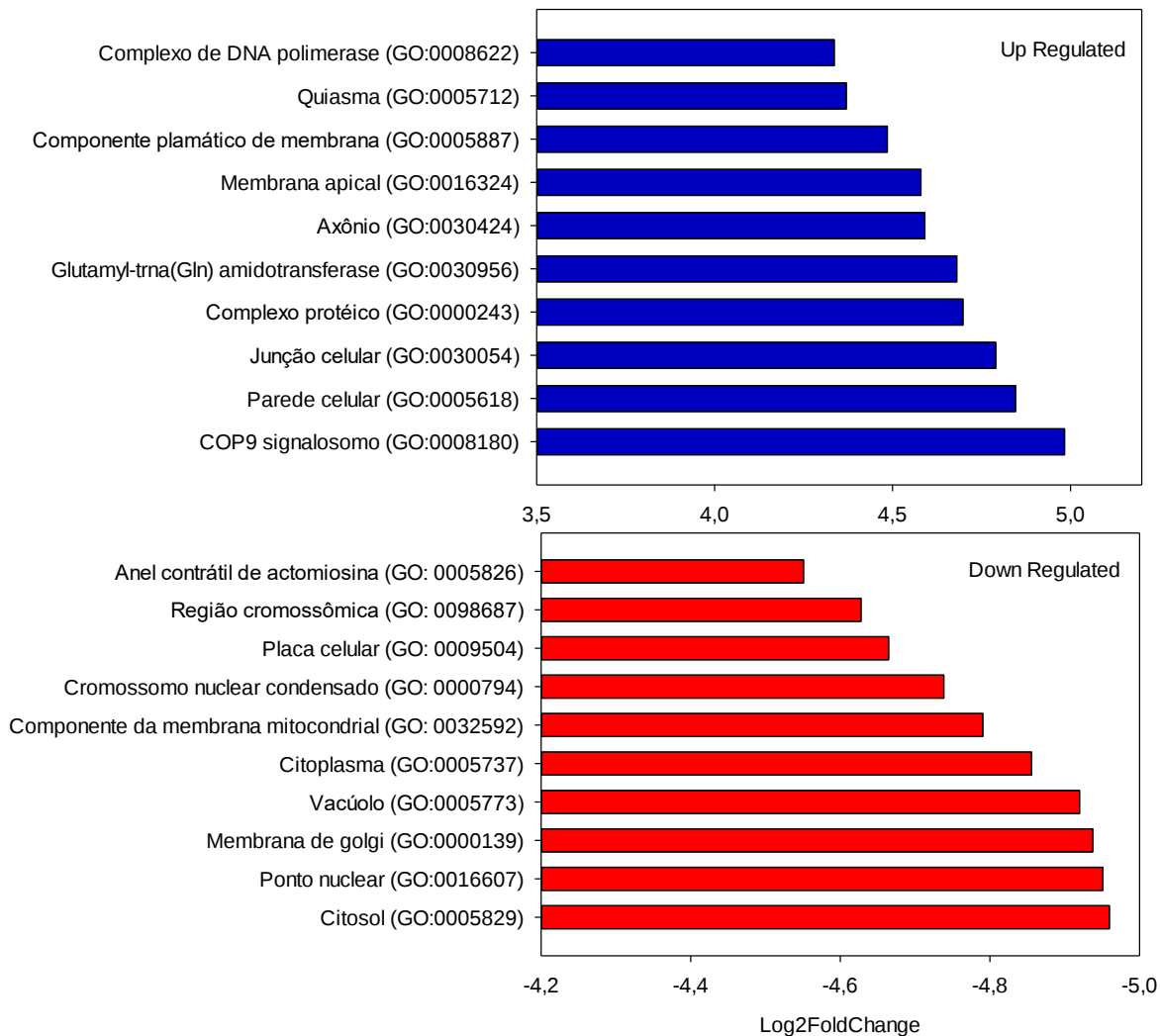
Foram identificados 69 componentes celulares dentre os transcritos diferencialmente expressos, em que 13 processos ocorreram exclusivamente em transcritos com expressão aumentada e outros 52 em transcritos com expressão diminuída, mais quatro processos que ocorreram em ambas situações de expressão (Figura 9).

Figura 9 - Representação dos componentes celulares de transcritos com aumento (Up) e diminuição (Down) expressão em sementes germinadas de *S. lycocarpum*



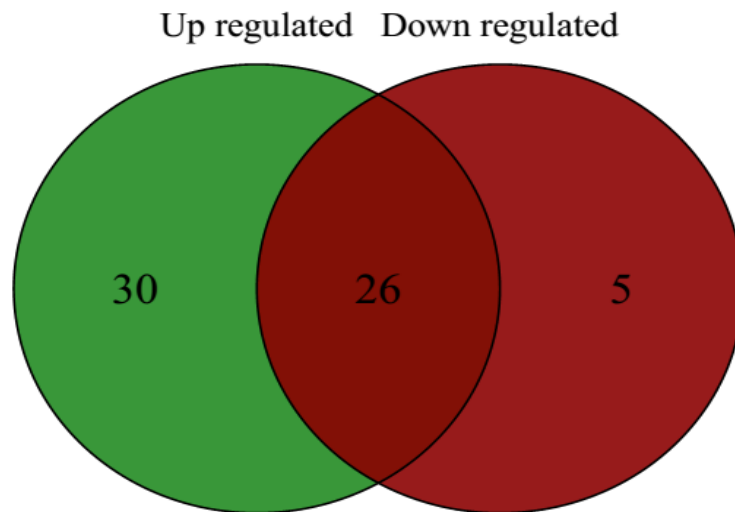
Dentre os componentes celulares de maior nível de expressão em transcritos com aumento de expressão, as regiões cromossômicas e centrossômicas (Figura 10) que tiveram maior destaque, por outro lado, os componentes celulares de transcritos com expressão diminuída que foram menos expressos são aqueles ligados as regiões de denedilação de proteínas, do nucleosomo e peroxisomos.

Figura 10 - Representação dos componentes celulares com aumento e diminuição de expressão em sementes germinadas de *S. lycocarpum*



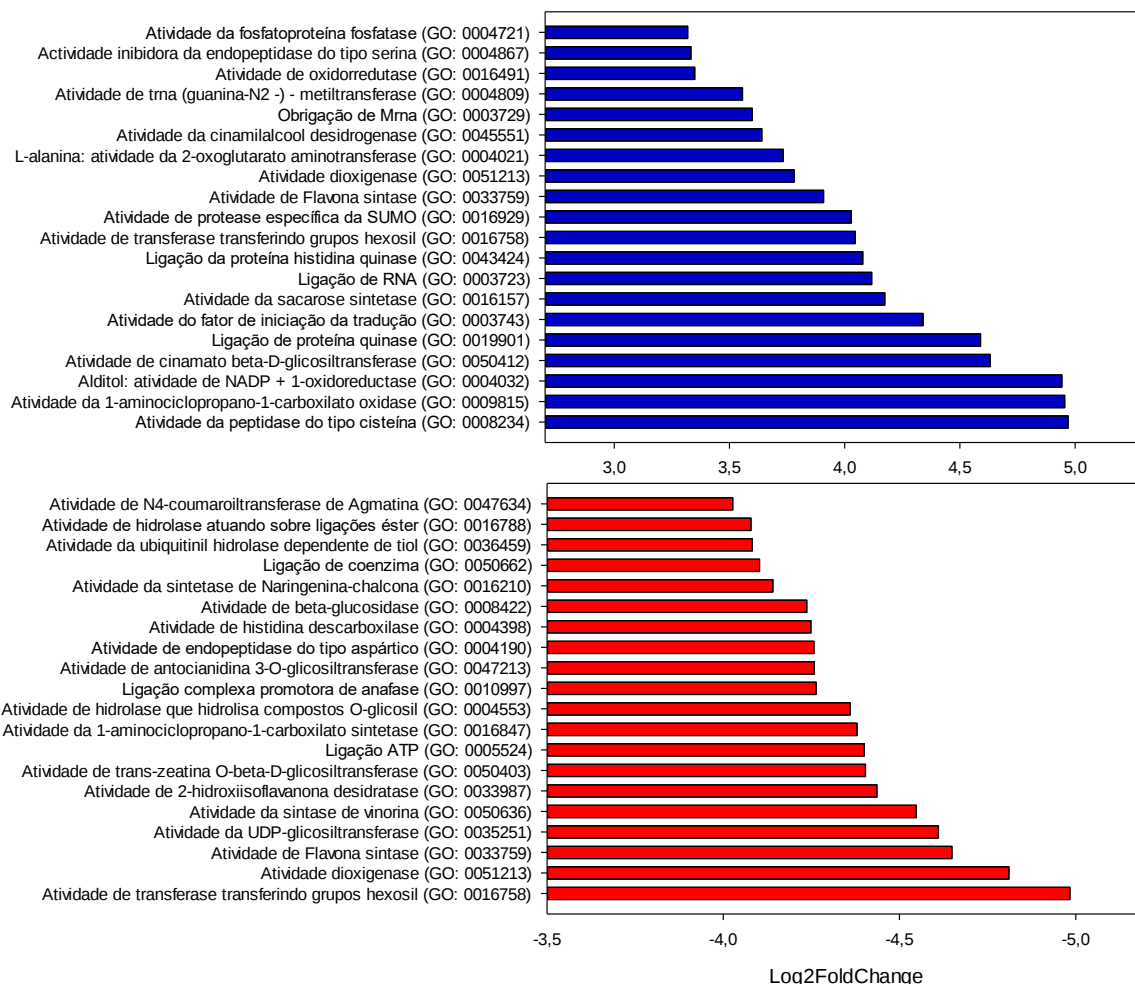
Foram identificadas 61 funções moleculares dentre os transcritos diferencialmente expressos, em que 30 processos ocorreram exclusivamente em transcritos com expressão aumentada e outros 5 em transcritos com expressão diminuída, mais 26 processos que ocorreram em ambos níveis de expressão (Figura 11).

Figura 11 - Representação das funções moleculares de transcritos com aumento (Up regulated) e diminuição (Down regulated) da expressão em sementes germinadas de *S. lycocarpum*



Dentre as funções moleculares de maior aumento de expressão, inibidores de atividades enzimáticas, atividade de oxido redutase, carregadores de elétrons podem ser destacadas (Figura 12). Por outro lado, as funções moleculares de transcritos com expressão diminuída foram aqueles ligados a denedilação de proteínas, atividades do nucleosomo, peroxissomos e microtúbulos.

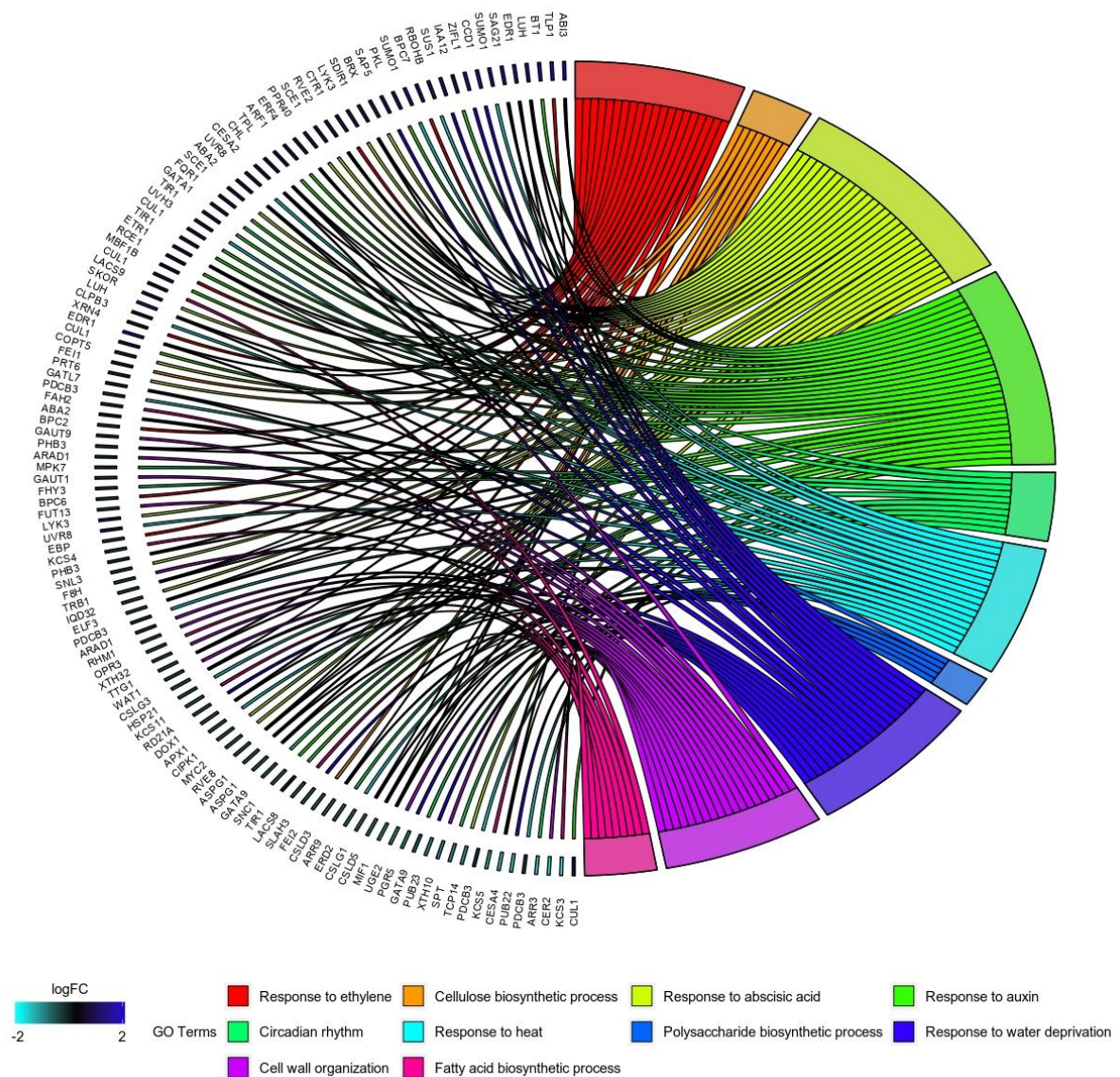
Figura 12 - Representação das funções moleculares de transcritos com aumento e diminuição de expressão em sementes germinadas de *S. lycocarpum*



Por meio da análise de enriquecimento de similaridade da ontologia dos genes, utilizando como base a espécie *arabidopsis*, foi possível anotar o número de genes que regulam os processos biológicos relacionados ao restabelecimento da tolerância à dessecação em *S. lycocarpum* (Figura 13). Pode ser observado alta atividade hormonal, de forma que houve maior número de genes com respostas a auxina (RVE8, TIR1, ELF3, MIF1, RVE2, FQR1, ABI3, RCE1, BT1, IAA12, TTG1, PKL, ARF1, ETR1, SNC1, PHB3, TPL, CUL1, LUH, TRB1), ABA (ELF3, ASPG1, SCE1, ABI3, SNL3, SDIR1, ETR1, CHL, PRT6, TCP14, IQD32, SAG21, MYC2, TRB1, RVE8, COPT5, ERF4, MIF1, RVE2, SKOR, CIPK1, LYK3, DOX1, PPR40, BRX) e etileno (RVE8, ERF4, EBP, XRN4, TLP1, MIF1, RVE2, CTR1, BPC2, TTG1, ETR1, BPC7, BPC6, PHB3, EDR1, SAG21, TRB1, MBF1B), o que reforça a

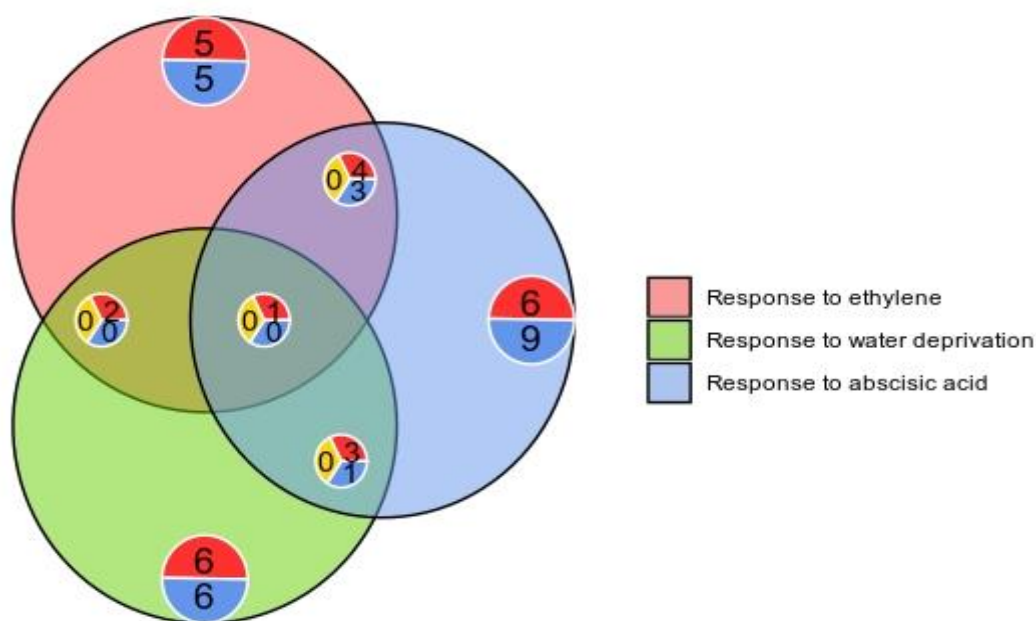
importância do estímulo hormonal ao restabelecimento da tolerância a dessecação (Maia et al., 2011); seguidos por resposta a privação de água (SAP5, ASPG1, PUB23, SDIR1, ABA2, PGR5, PUB22, CSLD5, CHL, ZIFL1, RD21A, CCD1, SUS1, EDR1, SLAH3, SAG21, LUH) e organização da parede celular (RHM1, UGE2, F8H, GATL7, CER2, GAUT9, FUT13, XTH10, XTH32, CSLG1, CSLD3, CESA2, CESA4, CSLD5, ARAD1, CSLG3, WAT1, GAUT1).

Figura 13 - Representação dos processos biológicos de transcritos diferencialmente expressos (Up/Down regulados) em sementes germinadas de *S. lycocarpum*



Com o objetivo de observar possíveis interações de genes entre os diferentes processos biológicos, foram selecionados três processos biológicos da análise de enriquecimento de maior relevância biológica com maior poder explicativo sobre tolerância a dessecação, os quais foram: resposta ao etileno, resposta ao ABA e deprivação de água. Foi possível observar que estes processos possuem vários genes que participam simultaneamente nestes processos, o que sugere interdependência dos processos biológicos que regulam a tolerância a dessecação em *S. lycocarpum* (Figura 14).

Figura 14 - Sobreposição de genes participantes em diferentes processos biológicos de transcritos diferencialmente expressos (com aumento de expressão em círculo azul e com diminuição de expressão em círculo vermelho) em sementes germinadas de *S. lycocarpum*

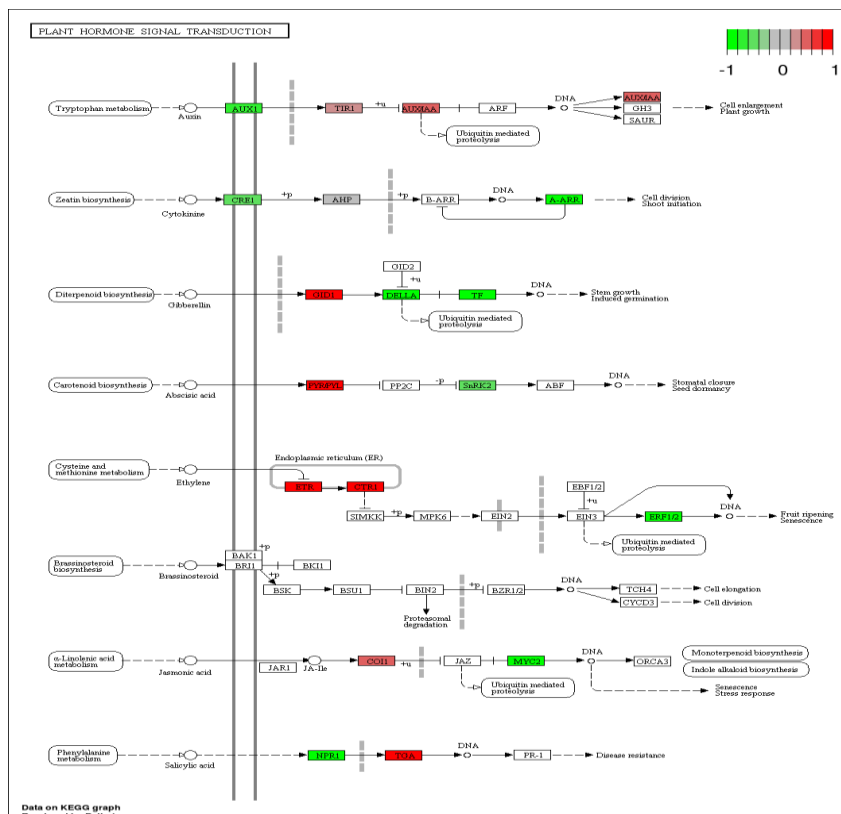


Apesar do fato de haver maior quantidade de genes com expressão diminuída em todas as análises deste estudo, quando se observa a sobreposição de genes que participam de processos biológicos é que genes responsivos ao ABA são os únicos processos biológicos que possui maior número genes com expressão aumentada (Figura 14), o que reforça a importância do papel do ABA ao restabelecimento da tolerância a dessecação. Além disto, a alta atividade hormonal observada pode explicar a diminuição da expressão dos transcritos relacionados a

tolerância a dessecação, visto que a produção de diversos metabólitos está ligada a atividade hormonal (WENG et al., 2016).

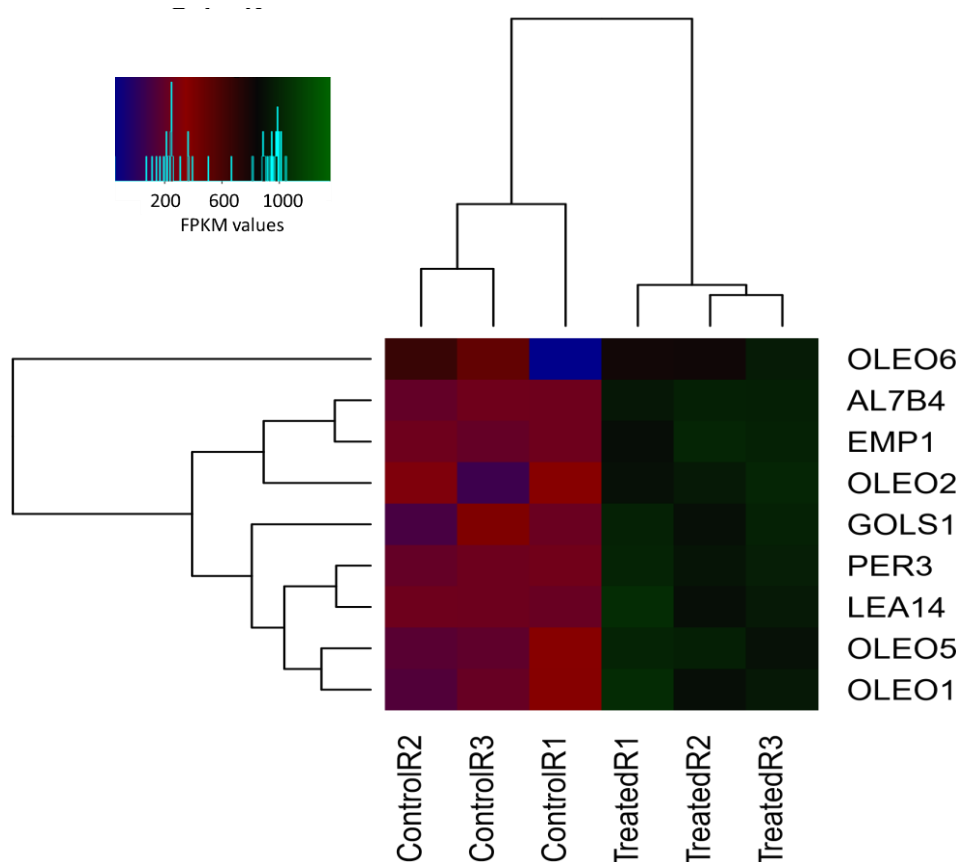
Além do que já foi descrito na literatura sobre o restabelecimento da tolerância a dessecação ser modulado pelo acúmulo de ABA (MAIA et al., 2014), no presente estudo, pela análise de vias metabólicas enriquecidas identificáveis, observa-se que a transdução de sinal nas membranas ocorre devido à alta atividade hormonal. Assim, pode ser visualizado alteração da expressão em vários dos precursores ligados ao aumento ou diminuição da expressão da transdução de sinal do metabolismo hormonal, de modo que a maioria dos genes tiveram sua expressão alterada, com aumento seguido de diminuição da expressão genica quanto a transdução de sinal hormonal, exceto para os brasinosteróides, em que não foi observado nenhuma atividade (Figura 15). Estes aumentos seguidos de diminuição da expressão de genes ligados às vias metabólicas sugerem possíveis interações entre os hormônios (KANNO et al., 2010), o que pode ser elucidado através da quantificação dos mesmos em estudos futuros.

Figura 15 - Transdução de sinais hormonais em sementes germinadas de *S. lycocarpum*



Foi feito um cluster hierárquico do perfil transcriptômico de genes relacionados a tolerância a dessecação através de termos “secagem”, “tolerância a dessecação” e “tolerância a seca” entre as bibliotecas tratadas e não tratadas utilizando correlação de Pearson. Observou-se algumas correlações entre os genes relacionados a tolerância a dessecação pela expressão bruta da contagem normalizada através da variação de Fragments Per Kilobase Million (FPKM) (Figura 16).

Figura 16 - Representação dos genes que conferem tolerância a dessecação em sementes germinadas de *S. lycocarpum*



Nos transcritos relacionados a tolerância a dessecação, constatou-se a presença de oleosinas, proteínas LEA, enzimas e açúcares, que são compostos amplamente conhecidos pela regulação da tolerância a dessecação (VERSLUES; JUENGER, 2011; MARUYAMA et al., 2014) (Figura 16).

Pode-se observar a presença de várias oleosinas (OLEO1, OLEO2, OLEO5 e OLEO6), as quais foram agrupadas em uma mesma classe, exceto a OLEO5, com menor expressão em relação as demais. Vale destacar a presença do gene EMP1 (Endomembrane protein 1), que foi o transcrito de maior expressão dentre os

relacionados a tolerância a dessecação, e cuja função pode atuar na proteção citoplasmática durante a dessecação. Quanto ao GOL51, este possui atuação na biossíntese de carboidratos e peróxido de hidrogênio, o que pode favorecer o restabelecimento da tolerância a dessecação (ELSAYED et al., 2014; EGERT et al., 2015; GOJŁO et al., 2015; SENGUPTA et al., 2015).

Após a análise de co-expressão dos genes envolvidos com a tolerância à dessecação, pode-se observar independência de genes envolvidos (Figura 17). Com relação aos transcritos de proteínas LEA14, observa-se que esta é precursora direta da formação de LTI30 que é uma proteína membro da família das deidrin, e que o aumento de sua expressão modula a produção de ácido abscísico (ERIKSSON et al., 2016). Outro aspecto observado na análise é que as oleosinas e PER1 atuam com maior interação na rede co-expressão de proteínas relacionadas a tolerância a dessecação, regulando maior número de proteínas (Figura 17 e Tabela 1).

Figura 17 - Co-expressão de genes relacionados a tolerância a dessecação em sementes germinadas de *S. lycocarpum*

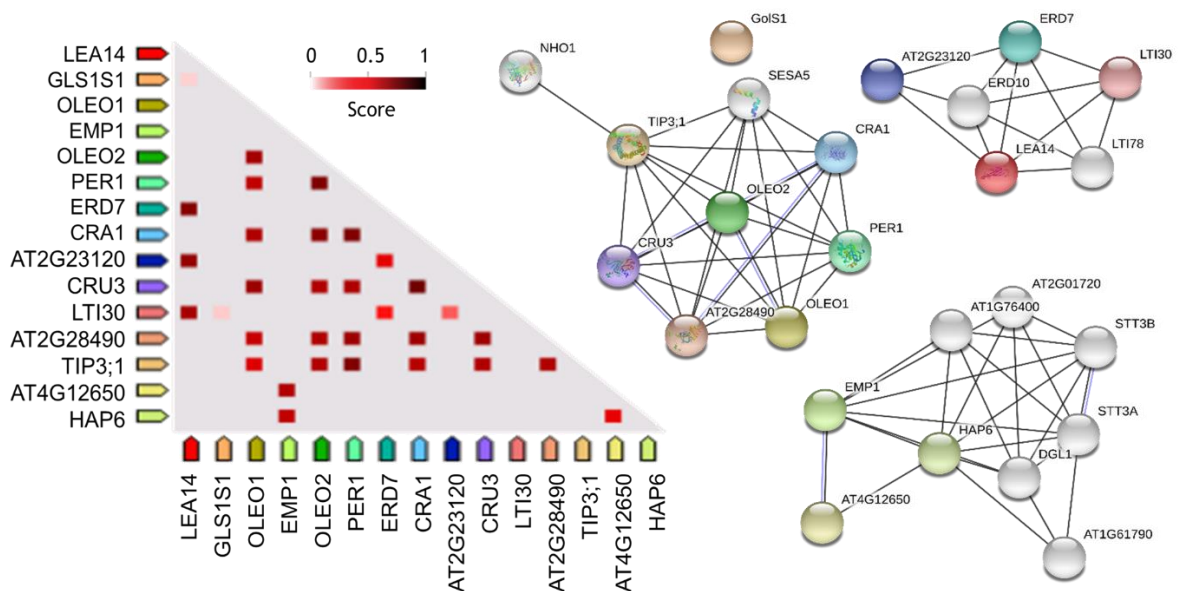
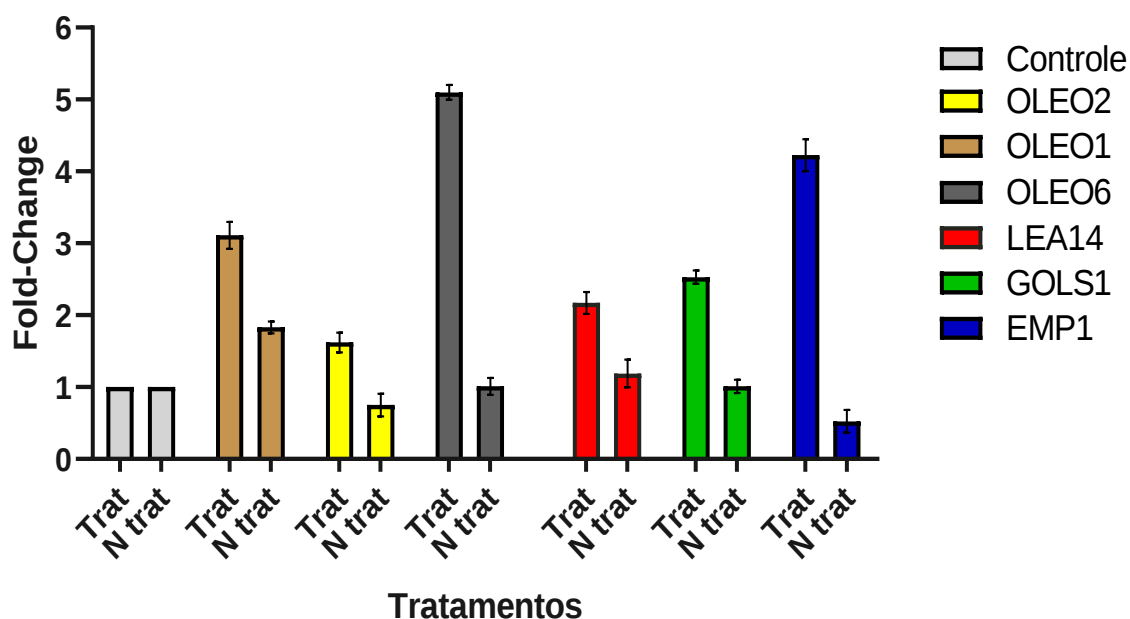


Tabela 1 - Co-expressão de genes relacionados à tolerância a dessecação em sementes germinadas de *S. lycocarpum*. Score mais próximos de 1 possuem maior co-expressão. (aa = amino ácidos)

Preditores	Descrição funcional	Score
ERD7	Responsivo precoce à desidratação 7 (452 aa)	0.806
CRA1	Cruciferina; Proteína de armazenamento de sementes (472 aa)	0.796
AT2G23120	Proteína abundante na embriogênese tardia, grupo 6 (83 aa)	0.775
CRU3	Cruciferina 3; Proteína de armazenamento de sementes (524 aa)	0.756
LTI30	Deidrina 2 (193 aa)	0.739
AT2G28490	Proteína contendo domínio cupina; Proteína de armazenamento de sementes (511 aa)	0.718
TIP3;1	Aquaporina TIP3-1; Canal de água (268 aa)	0.716
AT4G12650	Proteína da família endomembrana 70 (652 aa)	0.715
HAP6	HAPLESS 6; Subunidade do complexo N-oligossacarídeo transferase (691 aa)	0.698

Para confirmar os resultados do sequenciamento transcriptômico, foi analisado o nível de expressão através de RT-PCR de seis genes identificados que possuíam participação no restabelecimento da tolerância a dessecação em sementes germinadas de *S. lycocarpum* (OLEO1, OLEO2, OLEO6, EMP1, LEA14 e GOLS1). Foi observado que o nível de expressão para todos os genes testados foi significativamente aumentado (Figura 18), o que é consistente com os resultados da análise do transcriptoma.

Figura 18 - Análise de RT-PCR de genes envolvidos no restabelecimento da tolerância a dessecação em sementes germinadas de *S. lycocarpum* em amostras tratadas com PEG -1,7 MPa (Trat) e não tratadas (N trat). *As barras de desvio no gráfico representam o erro padrão da média



Oleosinas são proteínas as quais armazenam corpos lipídicos constituídos de triacilgliceróis que suprem energia para o processo de germinação e crescimento inicial de plantas em embriões durante a maturação de sementes (SILOTO et al., 2006; ANGELOVICI et al., 2010; KELLY et al., 2011; SEOK et al., 2016). As oleosinas também estão associadas com a tolerância ao frio em sementes, e a proteção de membranas (SHIMADA et al., 2008; VAN BUREN et al., 2017). No presente estudo observa-se que também estão associadas ao restabelecimento da tolerância a dessecação, visto que todas as oleosinas testadas (OLEO1, OLEO2 e OLEO6) quanto a expressão relativa destas foram significativamente maiores (Figura 18).

De forma geral, através das vias metabólicas enriquecidas de compostos lipídicos como os glicerol fosfolípídeo e eter lipídeo (Figuras 19 e 20), observou-se a presença de vários precursores regulados diferencialmente quanto a sua expressão, e em sua maioria com o aumento da expressão.

O aumento da atividade dos compostos lipídicos pode aumentar a estabilização da membrana, o que pode indicar ser essencial para a manutenção da tolerância a

A membrana é uma das primeiras estruturas que são acometidas pela degradação durante a dessecação, e a proteção e reparo para manutenção de sua integridade é essencial para à manutenção da tolerância a dessecação (SAHSAH et al., 1998). Os lipídeos e as proteínas são os constituintes predominantes das membranas os quais possuem papel na sinalização celular em resposta a dessecação, de forma a manter a estrutura estável das membranas e ajudar a evitar o rompimento das membranas durante a dessecação (WEBB; GREEN, 1991; TORRES-FRANKLIN et al., 2007).

lycocarpum

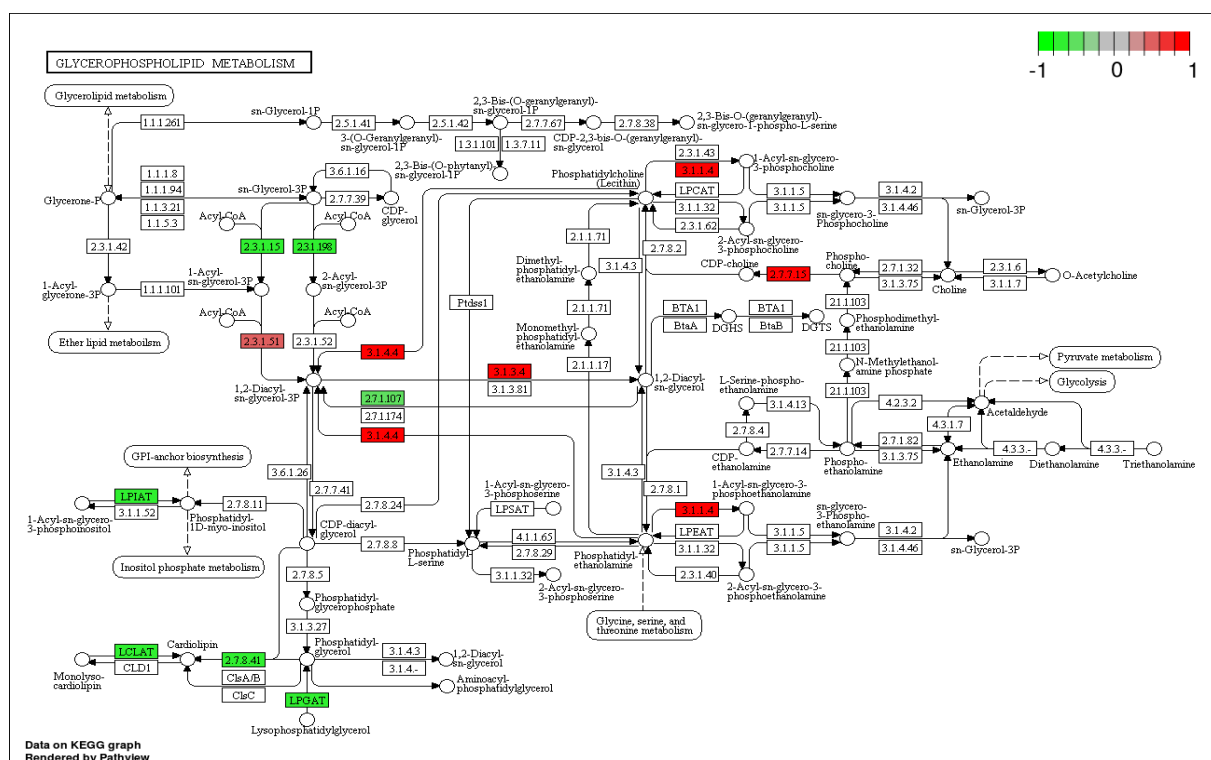
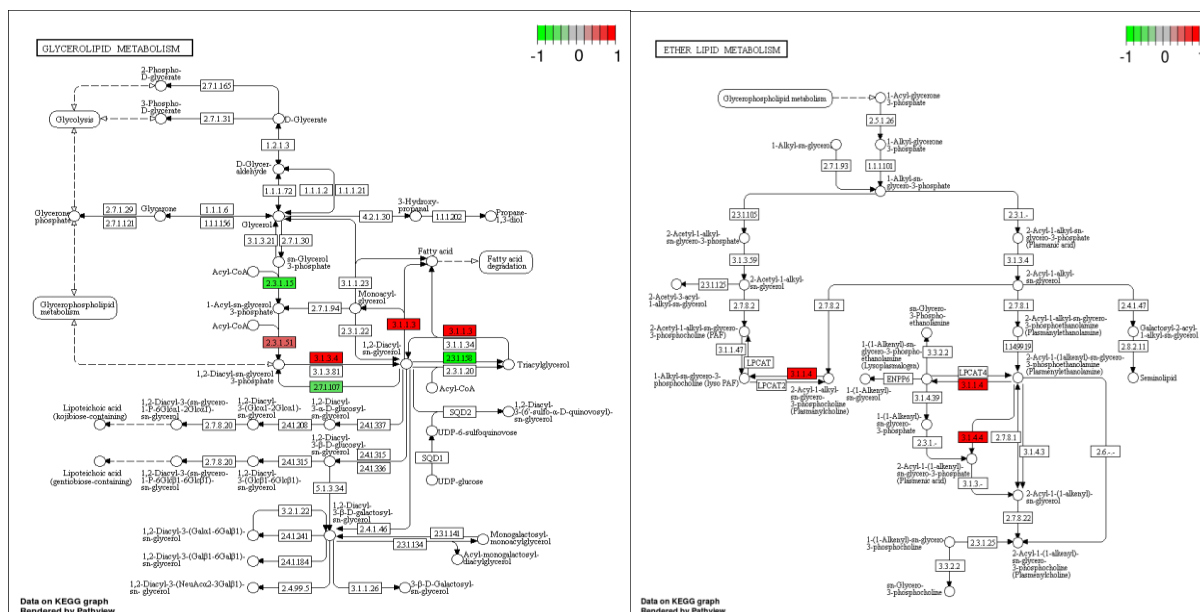


Figura 20 - Biossíntese de glicerol lipídio e éter lipídio em sementes germinadas de *S. lycocarpum*



A galactinol sintase (GOLS1) é o primeiro metabólito precursor da síntese de oligossacarídeos relacionados da família rafinose. Além disso, o GOLS1 possui função de osmoproteção celular e promover tolerância a estresses em plantas em condições de: salinidade, dessecação, elevadas e baixas temperaturas (DOWNIE et al., 2003; NISHIZAWA et al., 2008; PANIKULANGARA et al., 2004) deste componente, portanto, possui papel chave na regulação da produção de açúcares que influenciam o restabelecimento da tolerância a dessecação, de forma que foi observado no presente estudo que a expressão desta foi significativamente superior em sementes germinadas *S. lycocarpum* tratadas com PEG (-1,7 MPa) em relação às não tratadas.

Os açúcares da família rafinose possuem vários papéis no processo celular dos quais se destacam: proteção da integridade celular durante a dessecação, o que favorece estabilidade da membrana pelo estado vítreo formado, substituição de moléculas de água, fornece substrato para a geração de energia para o processo germinativo e faz parte do processo de eliminação de radicais livres (HINCHA et al.,

2003; NISHIZAWA et al., 2008; WOLKERS et al., 1998; DIERKING; BILYEU, 2009, VERTUCCI; FARRANT, 1995; HOEKSTRA et al., 2001; LEPRINCE et al., 2004).

Com relação ao EMP1 (Proteína de endomembrana), baseado no sequenciamento feito por Litts et al. (1992), é um gene que possui muitas regiões conservadas similares ao gene ABRE, que por sua vez está relacionado a indução de ABA. O genoma da espécie *arabidopsis* contém 12 tipos deste gene, mas pouco se conhece a respeito da sua localização e função. No presente trabalho indica estar associado ao restabelecimento da tolerância a dessecação, pois através da análise de RT-PCR, o gene EMP1 em sementes germinadas tratadas com PEG, o aumento de sua expressão foi de aproximadamente 4 vezes maior do que na condição de não tratada.

As proteínas LEA (*Late embryogenesis abundant*) são pertencentes a um grupo de proteínas que são responsivas a estresses abióticos como a dessecação. As proteínas LEA estão divididas em diferentes grupos baseados nas sequências de aminoácidos e tipo de estrutura dimensional da proteína; a LEA14 encontrada em *S. lycocarpum* neste trabalho está dentro do mesmo grupo 7 de proteínas LEA, que estão associadas com a proteção contra estresses abióticos (CANDAT et al., 2014; HE et al., 2011). No presente estudo foi observado a presença deste tipo de proteína, e que, tanto na análise do transcriptoma quanto na validação por RT-PCR em tempo real, apresentou uma tendência a ter maior expressão em sementes germinadas tratadas com PEG (-1,7 MPa), confirmando o que outros estudos também apresentam sobre o papel desta proteína (DUNAEVA; ADAMSKA, 2001; JIA et al., 2014).

Sementes de *S. lycocarpum* são tolerantes à dessecação, contudo é perdida logo após a protrusão da radícula na maioria das raízes primárias. No entanto, sementes germinadas de *S. lycocarpum* foram capazes de restabelecer a tolerância à dessecação após serem tratadas com PEG à -1,7 MPa. A capacidade de restabelecer a tolerância à dessecação varia com os comprimentos das raízes primárias. Assim, nem todos os comprimentos de raízes primárias foram capazes de restabelecer a tolerância à dessecação, como mostrado anteriormente por Buitink et al. (2003) e Maia et al. (2011) em *Medicago truncatula* e *Arabidopsis thaliana*, respectivamente. *S. lycocarpum* é encontrada em condições desfavoráveis do solo (OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2003), áreas sujeitas ao estresse hídrico (CAMPOS, 1994; VIDAL et al., 1999; CHAVES-FILHO; STACCIARINI-SERAPHIN, 2001) e

onde há presença constante de fogo (CAMPOS, 1994), como no bioma Cerrado brasileiro. Além disso, o *S. lycocarpum* é caracterizada como uma planta de que facilita o estabelecimento e a ocorrência de muitas outras espécies em ambientes sazonais sob seu dossel (PASSOS et al., 2014). Portanto, a capacidade de restabelecer a tolerância à dessecação em sementes germinadas em *S. lycocarpum* pode ser uma estratégia importante para favorecer a sobrevivência e o estabelecimento de plântulas em bioma sazonalmente seco.

A aquisição da tolerância a dessecação em sementes ortodoxas é associada a um conjunto de processos celulares, dentre os quais se destacam o acúmulo de oligossacarídeos, síntese e reserva de proteínas (VERDIER et al., 2008; TUNNACLIFFE et al., 2007; FARRANT et al., 2004) e mudanças na estrutura da membrana celular (LEPRINCE et al., 1993; BAILLY et al., 2001; WOLKERS et al., 1999; SUN et al., 1994; MAIA et al., 2014); notadamente no presente estudo foi observado a presença de diversos genes que controlam esses processos, com destaque para a atividade de vias metabólicas de transdução de sinal hormonal em sementes germinadas tolerantes a dessecação em *S. lycocarpum*.

5 CONCLUSÕES

A tolerância a dessecação em sementes germinadas em *S. lycocarpum* pode ser restabelecida com aplicação de PEG à -1,7 MPa.

Foram identificados e validados genes relacionados ao restabelecimento da tolerância a dessecação em *S. lycocarpum*, dos quais se destacam as oleosinas, LEA14, GOLS1 e EMP1.

A tolerância a dessecação em *S. lycocarpum* é governada por um complexo de interações e mecanismos moleculares envolvidos, dos quais os principais são os processos biológicos e vias metabólicas lipídicas e respostas hormonais. A maioria dos transcritos possui expressão diminuída.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado**: Espécies Vegetais Úteis. Planaltina: EMBRAPA - CPAC, 1998. 464 p.
- ALPERT, P. The discovery, scope, and puzzle of desiccation tolerance in plants. **Plant Ecology**, v. 151, n. 1, p. 5-17, 2000.
- ALPERT, P. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, n. 5, p. 685-695, 2005.
- ANGELOVICI, R. et al. A. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 4, p. 211-218, 2010.
- BAILLY, C. et al. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 357, p. 701-708, 2001.
- BARBEDO, C. J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botanica Brasilica**, v. 12, n. 2, p.145-164, 1998.
- BÄUMLEIN, H. et al. The FUS3 gene of *Arabidopsis thaliana* is a regulator of gene expression during late embryogenesis. **The Plant Journal**, v. 6, n. 3, p. 379-387, 1994.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, v. 101, n. 2, p. 213-228, 2008.
- BERJAK, Patricia; PAMMENTER, Norman. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 478, 2013.
- BEWLEY, J. D. et al. **Seeds**: Physiology of development, germination and dormancy (3rd edition). New York, Springer, 2013.
- BEWLEY, J. D. Physiological aspects of desiccation tolerance. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 30, n. 1, p. 195-238, 1979.
- BLACKMAN, S. A. et al. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, v. 96, n. 3, p. 868-874, 1991.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for illumina sequence data, **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.
- BRADFORD, K. J. Water stress and the water relations of seed development: a critical review. **Crop Science**, v. 34, n. 1, p. 1-11, 1994.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.

BROWN, C. T. et al. A Reference-Free Algorithm for Computational Normalization of Shotgun Sequencing Data. **arXiv**, v. 1203, n. 2, p. 1-18, 2012.

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

BUITINK, J., et al. Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. **The Plant Journal**, v. 47, n. 5, p. 735-750, 2006.

CAMPOS J. M. O eterno plantio: um reencontro com a natureza. Pensamento, Sao Paulo, 1994.

CANDAT, A. et al. The ubiquitous distribution of late embryogenesis abundant proteins across cell compartments in *Arabidopsis* offers tailored protection against abiotic stress. **The Plant Cell**, v. 26, n. 1, p. 3148-3166, 2014.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção**. 5 ed. Jaboticabal: Funep, 2012, 590p.

CHAVES-FILHO, J. T.; STACCIARINI-SERAPHIN, E. Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas jovens de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.-Hil.) em resposta ao estresse hídrico. **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 199-204, 2001.

COSTA, M. C. D., et al. A gene co-expression network predicts functional genes controlling the re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds. **Planta**, v. 242, n. 2, p. 435-449, 2015.

CROMARTY, A. S.; ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. **Design of seed storage facilities for genetic conservation**. Rome, IPGRI, 100 p, 1985.

DIERKING, E. C; BILYEU, K. D. Raffinose and stachyose metabolism are not required for efficient soybean seed germination. **Journal of Plant Physiology**. v. 166, n. 12, p. 1329-1335, 2009.

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 Physiology**, v. 131, n. 3, p. 1347-1359, 2013.

DUNAEVA, M.; ADAMSKA, I. Identification of genes expressed in response to light stress in leaves of *Arabidopsis thaliana* using RNA differential display. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 21, p. 5521-5529, 2001.

EGERT, A. et al. Evidence for water deficit-induced mass increases of raffinose family oligosaccharides (RFOs) in the leaves of three *Cratogeomys* resurrection plant species. **Frontiers in physiology**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2015.

ELIAS, S. R. M. et al. Anatomia foliar em plantas jovens de *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil. (Solanaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 2, p 169-174, 2003.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? **Journal of Experimental Botany**, v. 41, n. 9, p. 1167-1174, 1990.

ELSAYED, A. I.; RAFUDEEN, M. S.; GOLLDACK, D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress. **Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2014.

ERIKSSON, S. et al. Membrane-induced folding of the plant-stress protein Lti30. **Plant physiology**, v. 171, n. 1, p. 932- 943, 2016.

FARIA, J. M. R. et al. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 418, p. 2119-2130, 2005.

FARRANT, J. M. et al. The role of plant growth regulators in the development and germination of the desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina*. **Seed Science Research**, v. 3, n. 1, p. 55-63, 1993.

FARRANT, J. M. et al. Wheat seedlings as a model to understand desiccation tolerance and sensitivity. **Physiology Plant**. v. 120, n.4, p. 563-574, 2004.

FERREIRA, D. F. SISVAR - Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA, 2010.

GASULLA, F. et al. The role of lipid metabolism in the acquisition of desiccation tolerance in *Craterostigma plantagineum*: a comparative approach. **Plant Journal**. v. 75, n. 5, p. 726-741, 2013. Doi: 10.1111/tpj.12241

GOJŁO, E. et al. The acquisition of desiccation tolerance in developing *Vicia hirsuta* seeds coincides with an increase in galactinol synthase expression and soluble α -d-galactosides accumulation. **Journal of plant physiology**, v. 184, n.1, p. 37-48, 2015.

GRABHERR, M. G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644-652, 2011.

HARADA, J. J. Role of Arabidopsis LEAFY COTYLEDON genes in seed development. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, n. 4, p. 405-409, 2001.

HARB, A. et al. Molecular and physiological analysis of drought stress in Arabidopsis reveals early responses leading to acclimation in plant growth. **Plant physiology**. v.154, n. 1, p. 1254-1271, 2010.

HE, D.; HAN, C.; YANG, P. Gene expression profile changes in germinating rice. **Journal of integrative plant biology**, v. 53, n. 10, p. 835-844, 2011.

- HINCHA, D. K. et al. The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. **BBA-Biomembranes**, v. 1612, n. 2, p. 172-177, 2003.
- HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 9, p. 431-438, 2001.
- HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behavior**. IPGRI Technical Bulletin No. 1 (J.M.M. Engels & J. Tool, vol.eds.) International Plant Genetic Resources Institute, Roma, Itália, 1996.
- HU, H.; XIONG, L. Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, n. 1, p. 715-741, 2014.
- INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 377-403, 1996.
- ITO, Y. et al. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. **Plant Cell Physiology**, v. 47, p. 141-153, 2006.
- JIA, F. et al. Overexpression of Late Embryogenesis Abundant 14 enhances Arabidopsis salt stress tolerance. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 454, n. 4, p. 505-511, 2014.
- KANNO, Y. et al. Comprehensive hormone profiling in developing Arabidopsis seeds: examination of the site of ABA biosynthesis, ABA transport and hormone interactions. **Plant and Cell Physiology**, v. 51, n. 12, p. 1988-2001, 2010.
- KASUGA, M. et al. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature biotechnology**, v. 17, p. 287-291, 1999.
- KEITH, K. et al. fusca3: A heterochronic mutation affecting late embryo development in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 6, p. 589-600, 1994.
- KELLY, A. A. et al. Seed storage oil mobilization is important but not essential for germination or seedling establishment in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 157, p. 866-875, 2011.
- LEPRINCE, O. et al. Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles. **Plant Physiology**, v. 122, p. 597-608, 2000.
- LEPRINCE, O. et al. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, v. 3, p. 231-246, 1993.

LEPRINCE, O. et al. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, v. 116, p. 573-580, 1990b.

LEPRINCE, O. et al. The role of sugars and hexose phosphorylation in regulating the re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Cucumis sativa* and *Medicago truncatula*. **Physiologia Plantarum**, v. 122, n. 2, p. 200-209, 2004.

LEPRINCE, O.; BRONCHART, R.; DELTOUR, R. Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seed. **Plant, Cell and Environment**, v. 13, p. 539-546, 1990a.

LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC Bioinformatics**, v. 12, p. 323, 2011.

LIU, J. J. J., et al., Galactinol synthase (GS): increased enzyme activity and levels of mRNA due to cold and desiccation. **Plant Science** v. 134, n. 1, p. 11-20, 1998.

LITTS, J. C. et al. Nucleotide sequence of the rice (*Oryza sativa*) Em protein gene (Emp1). **Plant molecular biology**, v. 19, n. 2, p. 335-337, 1992.

LIVACK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 1, p. 402-408, 2001.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. v.2, 2 ed. Nova Odessa, São Paulo, Instituto Plantarum, 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2 ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998. v. 2, 352 p.

LOVE, M. I.; HUBER, W., ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, Doi: 10.1186/s13059-014-0550-8, 2014.

MAIA, J. et al. Absciscic acid (ABA) sensitivity regulates desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis* seeds. **New Phytologist**, v. 203, n. 1, p. 81-93, 2014.

MAIA, J. et al. The Re-Establishment of Desiccation Tolerance in Germinated *Arabidopsis thaliana* Seeds and Its Associated Transcriptome. **PlosOne**, v. 6, n. 12, 2011.

MARSHALL, O. J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics**, v. 20, n. 15, p. 2471-2472, 2004.

MARUYAMA, K. et al. Integrated analysis of the effects of cold and dehydration on rice metabolites, phytohormones, and gene transcripts. **Plant Physiology**. v. 164, p. 1759-1771, 2014.

MARUYAMA, K.; TODAKA, D.; MIZOI, J. et al. Identification of cis-acting promoter elements in cold- and dehydration-induced transcriptional pathways in Arabidopsis, rice, and soybean. **DNA Research**. v. 19, p. 37-49, 2012.

MEURS, C. et al. Role of abscisic acid in the induction of desiccation tolerance in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 98, p. 1484-1493, 1992.

NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. The transcriptional regulatory network in the drought response and its cross talking abiotic stress responses including drought, cold, and heat. **Frontiers in Plant Science**. v. 5, 170, 2014.

NEDEVA, D; NIKOLOVA. A desiccation tolerance in developing seeds. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, v. 23, p. 100-113, 1997.

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

OLIVER, M. J.; TUBA, Z.; MISHLER, B. D. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. **Plant Ecology**, v. 151, n. 1, p. 85-100, 2000.

PAMMENTER, N. W. et al. Why do stored hydrated recalcitrant seeds die? **Seed Science Research**, v. 4, p. 187-191, 1994.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, v. 9, p. 13-37, 1999.

PANIKULANGARA, T. J. et al. Galactinol synthase1. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in Arabidopsis. **Plant Physiology**. v. 136, p. 3148-3158, 2004.

PARCY, F. et al. Regulation of gene expression programs during Arabidopsis seed development: roles of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. **The Plant Cell**, v. 6, p. 1567-1582, 1994.

PASSOS, F. B. et al. Nurse plant effect of *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. in area of Brazilian Savanna undergoing a process of restoration. **Brazilian Journal of Botany**, v. 37, n. 3, p. 251-259, 2014.

PEREIRA, A. P. A., et al. A comprehensive characterization of *Solanum lycocarpum* St. Hill and *Solanum oocarpum* Sendtn: Chemical composition and antioxidant properties. **Food Research International**. 2018.

PINTO, L. V. et al. Mechanism and control of *Solanum lycocarpum* seed germination. **Annals of Botany**, v. 100, n. 6, p. 1175-1187. 2007.

RATAJCZAK, E.; DIETZ, K. J.; KALEMBA, E. M. The Occurrence of Peroxiredoxins and changes in redox State in *Acer platanoides* and *Acer pseudoplatanus* during seed development. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 166, n. 1, p. 1-17, 2018.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v.1, p. 499-514, 1973.

SAHSAH, Y. et al. Enzymatic degradation of polar lipids in *Vigna unguiculata* leaves and influence of drought stress. **Physiology Plant**. v. 104, p. 577–586, 1998.

SAKUMA, Y. et al. Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. **Plant Cell**, v. 18, p. 1292-1309, 2006.

SARAVITZ, D. M.; PHARR, D. M.; CARTER, T. E. Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. **Plant Physiology**, 83(1), 185-189, 1987.

SENGUPTA, S. et al. Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. **Frontiers in plant science**, v. 6, 656, 2015.

SEOK, H. Y. et al. AtC3H17, a non-tandem CCCH zinc finger protein, functions as a nuclear transcriptional activator and has pleiotropic effects on vegetative development, flowering and seed development in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, n. 3, p. 603-615, 2016.

SHARMA, R., et al. Recent advances in dissecting stress-regulatory crosstalk in rice. **Molecular Plant**, v. 6, p. 250-260, 2013.

SHIMADA T. L. et al. A novel role for oleosins in freezing tolerance of oilseeds in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 55, p. 798-809, 2008.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology**, v. 115, p. 327-334, 1997.

SILOTO R. M. et al. The accumulation of oleosins determines the size of seed oil bodies in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 18, p. 1961-1974, 2006.

SILVA, J. A. et al. **Frutas nativas dos cerrados**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 166 p.
SPRENGER, N.; KELLER, F. Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: the roles of two distinct galactinol synthases. **The Plant Journal**. v. 21, p. 249-258, 2000.

SUN, W. Q. et al. The role of sugar, vitrification and membrane phase-transition in seed desiccation tolerance. **Physiology Plant**. v. 90, p. 621-628, 1994.

TIAN, X. et al. Transcriptomic profiling reveals metabolic and regulatory pathways in the desiccation tolerance of Mungbean (*Vigna radiata* [L.] R. Wilczek). **Frontiers in plant science**, v. 7, 1921, 2016.

TODAKA, D.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Recent advances in the dissection of drought-stress regulatory networks and strategies for development of drought-tolerant transgenic rice plants. **Frontiers in Plant Science**. v. 6, 2015.

TORRES-FRANKLIN, M. L. et al. Drought stress and rehydration affect the balance between MGDG and DGDG synthesis in cowpea leaves. **Physiology Plant**. v. 131, p. 201-210, 2007.

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

VAN BUREN, R. et al. Seed desiccation mechanisms co-opted for vegetative desiccation in the resurrection grass *Oropetium thomaeum*. **Plant, cell & environment**, v. 40, n. 10, p. 2292-2306, 2017.

VERDIER, J.; THOMPSON, R. D. Transcriptional regulation of storage protein synthesis during dicotyledon seed filling. **Plant and Cell Physiology**, v. 49, n. 9, p. 1263-1271, 2008.

VERSLUES, P. E; JUENGER, T. E. Drought, metabolites, and Arabidopsis natural variation: a promising combination for understanding adaptation to water-limited environments. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, p. 240-245, 2011.

VERTUCCI C. W; FARRANT J. M. **Acquisition and loss of desiccation tolerance**. In: Kigel J, Galili G (eds) Seed Development and Germination. Marcel Dekker Inc, New York, p. 237–271, 1995.

VIDAL, M. C.; STACCIARINI-SERAPHIN, E.; CÂMARA, H. H. L. L. Crescimento de plântulas de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (lobeira) em casa de vegetação. **Acta Botanica Brasilica**. v. 13, n. 3, p. 271-274, 1999.

XIANG, S.; ZHANG, Q.; TANG, Q.; ZHENG, F.; WU, J.; YANG, L.; HANN, S. S. Activation of AMPK α mediates additive effects of solamargine and metformin on suppressing MUC1 expression in castration-resistant prostate cancer cells. **Scientific reports**, v. 6, n. 36721, p. 1-14, 2016.

WEBB, M. S.; GREEN, B. R. Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1060, p. 133–158, 1991.

WENG, J. K.; YE, M.; LI, B.; NOEL, J. P. Co-evolution of hormone metabolism and signaling networks expands plant adaptive plasticity. **Cell**, v. 166, n. 4, p. 881-893, 2016.

WOLKERS, W. F. et al. Changed properties of the cytoplasmic matrix associated with desiccation tolerance of dried carrot somatic embryos. An in situ fourier transform infrared spectroscopic study. **Plant Physiology**, v. 120, p. 153-163, 1999.

WOLKERS, W. F. et al. Properties of proteins and the glassy matrix in maturation-defective mutant seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 16, p. 133-143, 1998.

YOSHIDA, T.; MOGAMI, J.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 21, p. 133-139, 2014.

APÊNDICE A – Dados suplementares

De modo a identificar novos transcritos associados a tolerância à dessecação, a reconstrução independente do genoma foi obtida por meio de montagem de transcritos consenso diretamente a partir dos *reads* obtidos, para isso, foi necessário extrair previamente os RNAs de sementes germinadas tratadas e não tratadas para posterior sequenciamento.

Os RNAs extraídos de sementes germinadas de 2 mm de comprimento foram quantificados em espectrofotômetro Nanodrop-2000 (Thermo Scientific®) e seus resultados expressos em ng/μL e a avaliação da sua integridade foi determinada usando o equipamento Bioanalyzer (Agilent 2500®).

Tanto a quantificação quanto o perfil eletroforético das amostras enviadas para o sequenciamento evidenciaram que os RNAs possuíam alto número de integridade (NIR), e que poderiam ser sequenciados (Figuras 1, 2 e 3).

Figura 1 - Perfil eletroforético das amostras de RNAs analisadas pelo Bioanalyzer em sementes germinadas com 2 mm de comprimento de *S. lycocarpum*

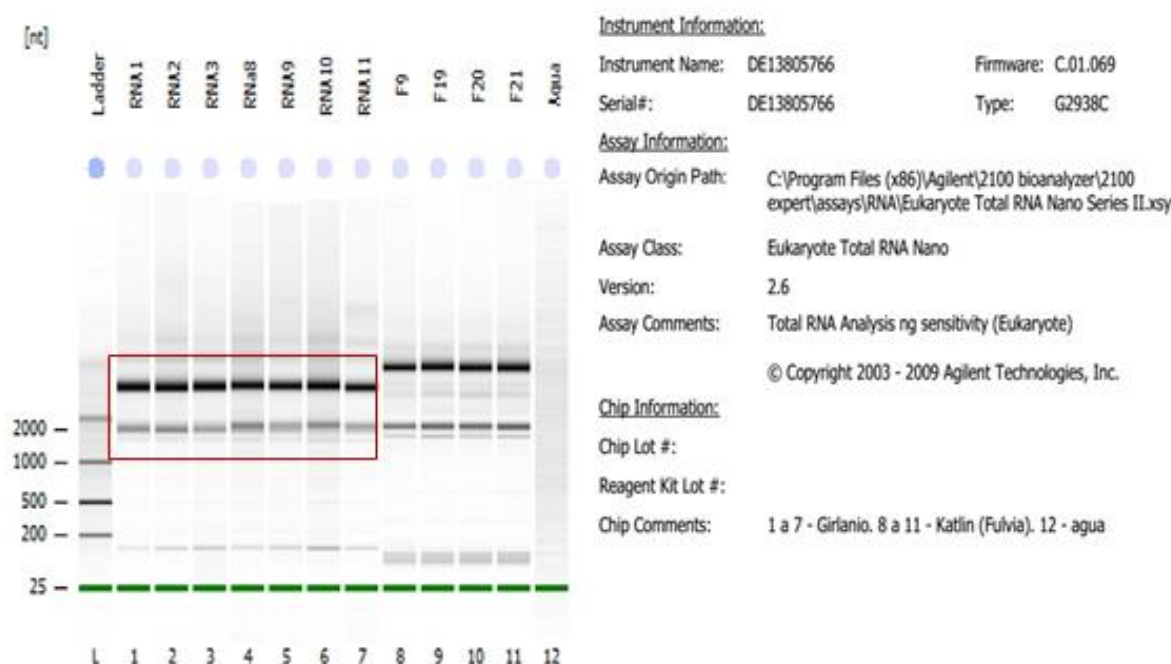


Figura 2 - Eletroferograma de separação das subunidades de RNAs das amostras analisadas pelo Bioanalyzer em sementes germinadas com 2 mm de comprimento de *S. lycocarpum*

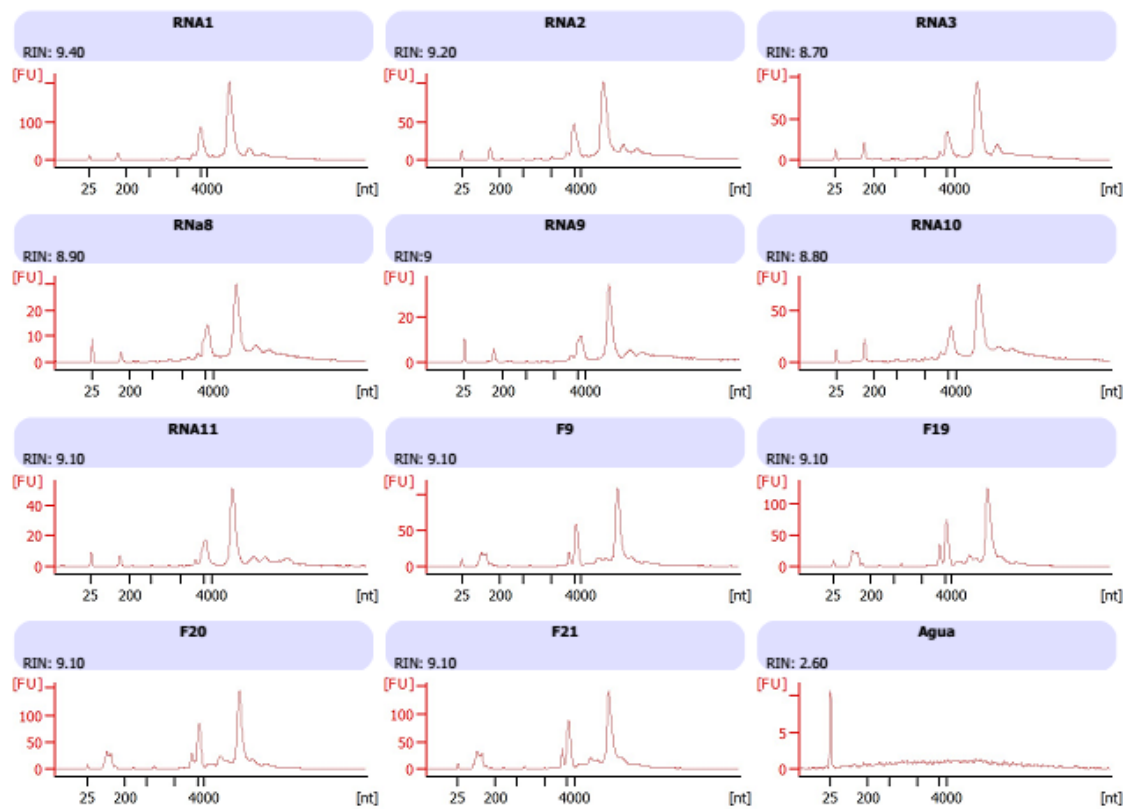


Figura 3 - Número de integridade de RNAs das amostras analisadas pelo Bioanalyzer em sementes germinadas em *S. lycocarpum*

Sample Name	Sample Comment	Stat	Result Label	Result Color
RNA1		✓	RIN: 9.40	
RNA2		✓	RIN: 9.20	
RNA3		✓	RIN: 8.70	
RNA8		✓	RIN: 8.90	
RNA9		✓	RIN: 9	
RNA10		✓	RIN: 8.80	
RNA11		✓	RIN: 9.10	
F9		✓	RIN: 9.10	
F19		✓	RIN: 9.10	
F20		✓	RIN: 9.10	
F21		✓	RIN: 9.10	
Agua		✓	RIN: 2.60	
Ladder		✓	All Other Samples	

No gráfico box-whisker, feito com auxílio do software FastQC, (Figura 4) pode ser observado a qualidade dos pares de bases sequenciados, de forma que no eixo y quanto maior o valor de phred score melhor é a qualidade das bases sequenciadas. De forma geral todas as amostras apresentaram ótima qualidade.

Figura 4 - Análise de qualidade dos reads sequenciados de amostras tratadas e não tratadas após a trimagem dos reads

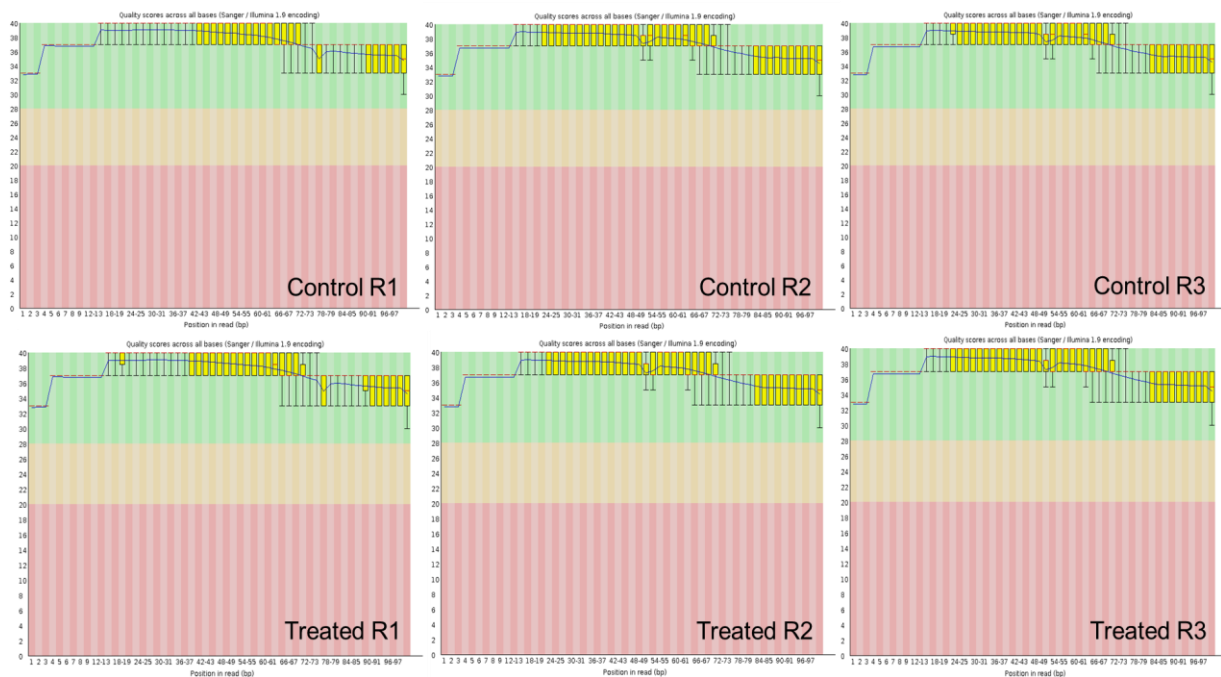
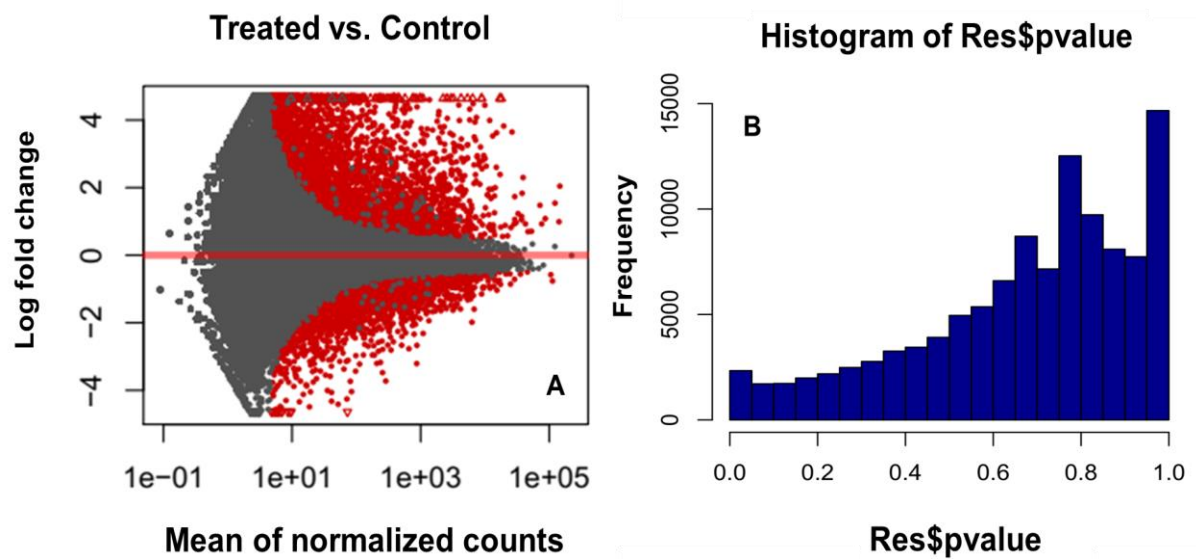


Figura 5 - Distribuição dos reads sequenciados de amostras tratadas vs. não tratadas (A) e histograma de frequência do pvalue dos transcritos (B)



Após verificação da integridade e montagem do transcriptoma, foi feita análise de contrastes das amostras tratadas e não tratadas com PEG -1,7 MPa através de clusterizações hierárquicas e análise de componentes principais de modo a identificar o efeito de tratamento (Figuras 6 e 7).

Figura 6 - Heatmap de distâncias matriciais das dissimilaridade e similaridades entre amostras através de clusterização hierárquica

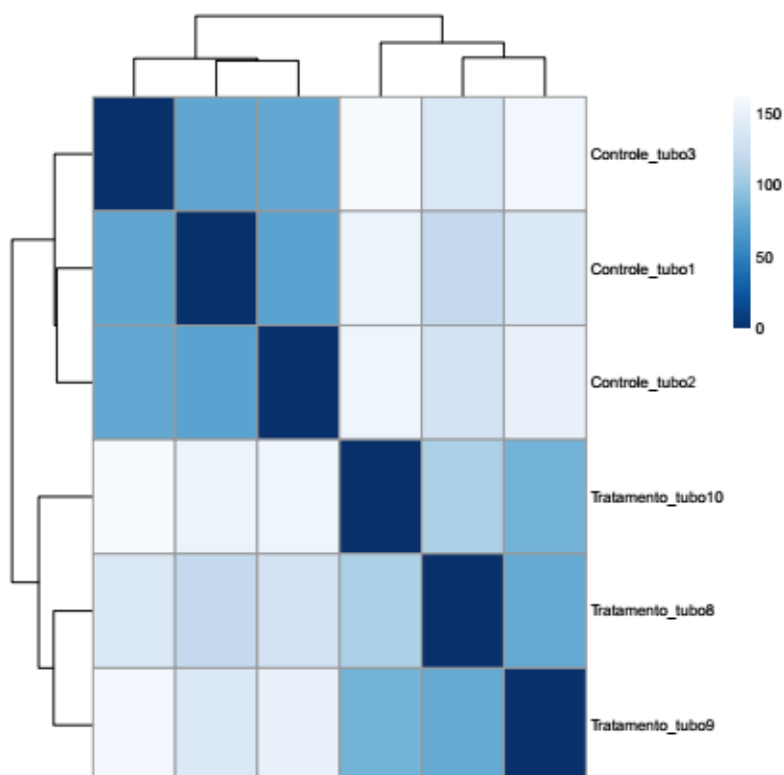
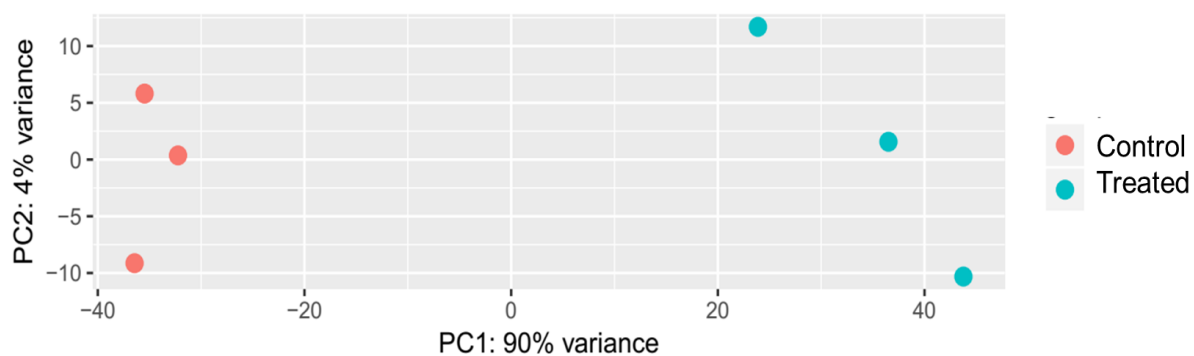


Figura 7 - Análise de componentes principais do efeito experimental sobre as amostras controle e amostras tratadas com PEG -1,7 MPa em sementes germinadas de *S. lycocarpum*



De modo a validar os resultados transcriptômicos foi feito análise de RT-PCR em nos genes selecionados, de forma que antes de iniciar a reação foi realizado a eficiência dos mesmos (Tabelas 1 e 2). Foram utilizados os primers com elevada eficiência.

Tabela 1 - Eficiência dos primers utilizados para a análise RT-PCR

Genes	Mean Efficiency	St Dev	SEM	RSE
OLEO1	2,001	0,005	0,003	0,002
OLEO2	1,945	0,047	0,018	0,009
OLEO6	1,943	0,006	0,005	0,002
EMP1	1,978	0,035	0,018	0,009
GOLS1	1,969	0,009	0,006	0,003
LEA14	1,976	0,034	0,017	0,009
*4CPL1	1,902	0,010	0,006	0,003
*DN30933_2_	1,918	0,031	0,013	0,007

*Genes de referência

Tabela 2 - Primers utilizados para a análise RT-PCR

Identificadores	Sequência de bases	Nº de bases
OLEO1_forward	TGATTGTACCTGCTGTTATTACTC	24
OLEO1_reverse	TCCACGATAACACGCTTACC	20
OLEO2_forward	TCTGGCTATTGTTACTCTTCTACC	24
OLEO2_reverse	AGAGCAAGCCCAATTAAAGTG	21
OLEO6_forward	CTTCTAAATCTCAAATCCTCGCC	23
OLEO6_reverse	GCAAGTCCGATGAGAGTTCC	20
EMP1_forwad	CAATCTTCCTCTTGTTATGCCT	22
EMP1_reverse	CTTCTCCTCCTTGCTTCCAG	20
GOLS1_forward	GCTTAACTACTCCAACTTCGG	22
GOLS1_reverse	TCAGGCAGCTCAAATAGATGG	21
LEA14_forwad	GTATTTGGTAATTTACCATTTCCC	24
LEA14_reverse	TCTTTCTCTTCTTTCTTCTTCC	24
4CPL1_forward	CCAAACTTGTACATCCATAGTGAG	24
4CPL1_reverse	CTCCAACCTTAATCCACATAGCA	24
DN30933_2_Forward	ACCCAATTCTTCTACTTTACAACC	24
DN30933_2_Reverse	AACTTTGATCCTCCCTTCCC	20