

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

**EXPRESSÃO DE GENES NO EMBRIÃO E ENDOSPERMA DURANTE A
GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE LOBEIRA (*Solanum lycocarpum* St. Hill)**

LILIAN ELENA DUARTE SILVEIRA

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre em Agronomia
(Agricultura).

BOTUCATU - SP
Novembro - 2014

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

**EXPRESSÃO DE GENES NO EMBRIÃO E ENDOSPERMA DURANTE A
GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE LOBEIRA (*Solanum lycocarpum* St. Hill)**

LILIAN ELENA DUARTE SILVEIRA

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre em Agronomia
(Agricultura).

BOTUCATU – SP

Novembro – 2014

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

S587e Silveira, Lilian Elena Duarte, 1988-
Expressão de genes no embrião e endosperma durante a germinação de sementes de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hill) / Lilian Elena Duarte Silveira. - Botucatu : [s.n.], 2014
ix, 56 f. : ils. color., grafs., tabs.

Dissertação(mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2014
Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva
Inclui bibliografia

1. Solanacea. 2. Sementes - Germinação. 2. Expressão gênica. I. Silva, Edvaldo Aparecido Amaral da. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu. III. Título.

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "EXPRESSÃO DE GENES NO EMBRIÃO E ENDOSPERMA DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE LOBEIRA (*Solanum lycocarpum* St. Hill)"

ALUNA: LILIAN ELENA DUARTE SILVEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA:



PROF. DR. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA



PROF.ª DR.ª JULIANA PEREIRA BRAVO



PROF. DR. MARCELO DE ALMEIDA SILVA

Data da Realização: 12 de dezembro de 2014.

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer.” Amyr Klink

DEDICO

*Aos meus pais Valter e Eliana, à avó Maria Odete,
à irmã Vivian, ao cunhado Binho e à sobrinha Letícia.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por se fazer presente durante toda minha caminhada me dando forças para conquistar meus objetivos.

Aos meus pais, Valter e Eliana, o meu mais sincero obrigado, por terem sido meu alicerce durante essa etapa, por todas as palavras de incentivo, pela preocupação, carinho, cuidado, pelo amor incondicional e por não medirem esforços para me ver feliz. AMO MUITO VOCÊS!

À irmã Vivian, ao cunhado Binho e a sobrinha e afilhada Letícia. Obrigada por estarem sempre do meu lado.

À avó Odete, pela preocupação, por me amar e me mimar tanto.

Ao Prof. Dr. Maurício Dutra Zanotto, pela oportunidade e por estar sempre de acordo com as minhas decisões.

Ao Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, pela orientação e pela “adoção”, por muitas e muitas vezes me acalmar, indicando-me sempre o caminho certo.

À Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista-UNESP, pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os professores e funcionários.

À amiga Ju, pela infinita paciência, pela quantidade de risadas que demos juntas, por ouvir minhas reclamações e pela ajuda do início ao fim deste trabalho. Palavras não são suficientes para demonstrar minha gratidão por você.

As amigas Daiani, Rubiana, Camila e Renake. Obrigada por me darem o privilégio de fazer parte da vida e da rotina de vocês! Obrigada por cada palavra de apoio, pelas contribuições com o meu trabalho, pela companhia, pela preocupação. Posso dizer, com toda certeza, que vocês são parte das melhores lembranças que vou levar de Botucatu.

A todos os colegas do Laboratório de Sementes, em especial à técnica Valéria Cristina Retameiro Giandoni por ser sempre muito prestativa, pelos conselhos profissionais e pessoais também.

Aos amigos Milena, Flávia, Taína, Amábile, Marianna, Gustavo, Pandero, Valéria, Isis, Giselle e Tato, por compartilharem comigo os momentos de aflição e por comemorarem comigo minhas realizações, por torcerem sempre por mim estando perto ou longe. Amo vocês!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
1. RESUMO.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUÇÃO.....	4
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
4.1. <i>Solanum lycocarpum</i> St Hill.....	6
4.2. Germinação.....	8
4.3. Genes de estudo.....	11
4.4. Análise de expressão gênica.....	15
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
5.1. Obtenção das sementes.....	17
5.2. Teor de água.....	17
5.3. Teste para avaliar a qualidade fisiológica das sementes.....	18
5.4. Curva de imbebição.....	18
5.5. Estudos moleculares dos embriões de sementes de <i>Solanum lycocarpum</i> durante a germinação.....	19
5.5.1. Extração de RNA.....	19
5.5.2. Determinação da quantidade e qualidade do RNA extraído.....	20
5.5.3. Confeção de cDNA.....	20
5.5.4. Desenho de <i>primers</i>	21
5.5.5. Quantificação da expressão relativa por PCR em tempo real.....	24
5.6. Análise estatística.....	25
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
8. CONCLUSÃO.....	50
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> específicos da região do embrião de sementes de lobeira utilizados para análises de PCR em tempo real.....	22
Tabela 2. Genes (mRNAs) estudados no embrião de sementes de lobeira durante a germinação.....	23
Tabela 3. Reações padronizadas para PCR em tempo real para cada gene.....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotos de sementes de <i>Solanum lycocarpum</i> . A) Semente inteira mostrando: el - endosperma lateral; e – embrião; t – tegumento; em – endosperma micropilar. B) Embrião mostrando: h – hipocótilo; c – cotilédone; r - radícula. Barras representam 1,0 mm.....	10
Figura 2. Dados médios (●) do peso fresco das sementes de <i>Solanum lycocarpum</i> durante a embebição.....	27
Figura 3. Germinação de sementes de lobeira embebidas em água (●). Os pontos de dados representam a média de quatro repetições de 25 sementes.....	28
Figura 4. Frequência de germinação de sementes de <i>Solanum lycocarpum</i>	29
Figura 5. Desenvolvimento da raiz primária após a protrusão de sementes de lobeira embebidas em água. A – protrusão após a embebição durante nove dias; B – semente de lobeira germinada após 10 dias de embebição; C – semente de lobeira após 12 dias de embebição; D – semente de lobeira após 15 dias de embebição. Barras representam 1,0 mm.....	30
Figura 6. Gel de agarose a 1%, mostrando a corrida de eletroforética do RNA total extraído da região embrionária de sementes de <i>Solanum lycocarpum</i> . M - marcador 1kb DNA Ladder; 1, 2, 3 e 4 – embrião aos 1, 5, 10 e 15 dias de embebição, respectivamente.....	31
Figura 7. Ct do gene 18S em embriões de sementes de lobeira durante a embebição. As barras representam as médias de duas repetições biológicas.....	32
Figura 8. Ct do gene MTP em embriões de sementes de lobeira durante a embebição. As barras representam as médias de duas repetições biológicas.....	33
Figura 9. Expressão relativa do gene álcool desidrogenase no embrião de sementes de <i>Solanum lycocarpum</i> durante o processo de germinação. Valores significativos estão indicados com um asterisco (*)......	34
Figura 10. Expressão relativa do gene malato desidrogenase no embrião de sementes de <i>Solanum lycocarpum</i> durante o processo de germinação. Valores significativos estão indicados com um asterisco (*)......	36
Figura 11. Expressão relativa do gene actina no embrião de sementes de <i>Solanum lycocarpum</i> durante o processo de germinação. Valores significativos estão indicados com um asterisco (*)......	39

Figura 12. Expressão relativa do gene ciclina no embrião de sementes de <i>Solanum lycocarpum</i> durante o processo de germinação.....	41
Figura 13. Expressão relativa do gene <i>heat shock protein 17.6</i> no embrião de sementes de <i>Solanum lycocarpum</i> durante o processo de germinação. Valores significativos estão indicados com um asterisco (*)......	44
Figura 14. Expressão relativa do gene glutathiona-S-transferase no embrião de sementes de <i>Solanum lycocarpum</i> durante o processo de germinação. Valores significativos estão indicados com um asterisco (*)......	47

1. RESUMO

Durante o processo de germinação da semente várias enzimas estão presentes em reações metabólicas importantes durante a respiração, como por exemplo, malato desidrogenase e álcool desidrogenase. Além disso, para que a germinação aconteça, são necessárias a expansão e a posterior divisão das células do embrião, nesses processos estão envolvidos os genes actina e ciclina, respectivamente. São importantes ainda, os mecanismos de proteção das sementes contra estresses abióticos durante a germinação, dentre eles podem ser citadas a presença de proteínas de choque térmico, relacionadas com a tolerância à dessecação e de enzimas como a glutathiona-S-transferase, consideradas antioxidantes. Objetivou-se com este estudo avaliar o perfil de expressão de genes associados com a respiração, citoesqueleto, ciclo celular e estresse no embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* durante a germinação. As sementes de lobeira foram avaliadas com relação a sua qualidade fisiológica, determinando-se: porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, tempo médio de germinação, frequência de germinação. Além disso, determinou-se uma curva de embebição. O RNA do embrião das sementes foi extraído aos 1, 5, 10 e 15 dias de embebição em água seguido da síntese de cDNA. A expressão gênica foi realizada usando-se a técnica de PCR em tempo real. Os genes estudados no embrião foram malato desidrogenase (*MDH*), álcool desidrogenase (*ADH2*), actina (*ACT7*), ciclina (*CDC2*), proteína de choque térmico (*HSPS17.6*), glutathiona-S-transferase (*GST*). A partir dos resultados obtidos conclui-se que, durante o processo de germinação de sementes de lobeira, existe variação no perfil de expressão de

genes associados com o metabolismo respiratório, proteção a estresse, expansão e divisão celular.

PALAVRAS-CHAVE: embebição, embrião, PCR em tempo real, expansão celular.

Expression of genes in embryo and endosperm during germination of lobeira seeds (*Solanum lycocarpum* St. Hill). Botucatu, 2014. 56 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: LILIAN ELENA DUARTE SILVEIRA

Adviser: EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

2. ABSTRACT

During the process of seed germination various enzymes are present in important metabolic reactions during respiration, such as malate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase. In addition, for germination to take place, is necessary expansion and subsequent division of the cells of the embryo, which requires the involved of the genes cyclin and actin, respectively. Mechanisms associated with seed protection against abiotic stresses during germination, among which may be mentioned is the presence of *heat shock proteins* related to desiccation tolerance and enzymes such as glutathione-S-transferase, considered as antioxidant. The aim of this study was to evaluate the expression profile of genes associated with respiration, cytoskeleton, cell cycle and stress in the embryo of seeds of *Solanum lycocarpum* during germination. Lobeira seeds were evaluated with respect to their physiological quality, determining: germination percentage, speed of germination, means germination time, frequency of germination and was also given a curve of soaking. The RNA from the embryo of the seeds was extracted at 1, 5, 10 and 15 days of imbibitions in water, followed by cDNAS synthesis. The gene expression was carried out using the technique of real time PCR. The genes studied in the embryo were malate dehydrogenase (*MDH*), alcohol dehydrogenase (*ADH2*) and actin (*ACT7*), cyclin (*CDK2*), heat shock protein (*HSPS17.6*), glutathione-S-transferase (*GST*). From the results obtained we concluded that, during the process of germination of lobeira, there is variation in the expression of genes associated with respiratory, stress protection and expansion and cell division.

Keywords: imbibition, embryo, Real time PCR, cell expansion.

3. INTRODUÇÃO

Solanum lycocarpum St. Hill, popularmente conhecida como lobeira, pertence à família Solanaceae e é uma espécie adaptada ao cerrado, ambiente de condições estressantes, principalmente em relação à falta de água. Utilizada na preparação de geleias e doces, tem ainda uso medicinal, no tratamento de diabetes, obesidade, inflamações, hipertensão e na redução do nível de colesterol. Além disso, seus frutos são fonte de alimento para diversos animais como lobo guará, anta, raposa do campo e tiú.

Durante o processo de germinação das sementes várias enzimas estão envolvidas em reações metabólicas relacionadas à síntese e a degradação de moléculas. Assim essas enzimas podem ser utilizadas como marcadores moleculares para a elucidação dos eventos que ocorrem durante o processo de germinação, como por exemplo, as enzimas malato desidrogenase e álcool desidrogenase que permitem a avaliação da atividade respiratória (ALBUQUERQUE et al., 2009).

Além da respiração, para que a germinação aconteça, são necessárias a expansão e a posterior divisão das células do embrião. Nesse processo estão envolvidas a actina e a ciclina, respectivamente (CARVALHO e RECCO-PIMENTEL, 2007). São importantes ainda, os mecanismos de proteção das sementes contra estresses abióticos durante a germinação, dentre eles podem ser citados a presença de proteínas de choque térmico, relacionadas com a tolerância à dessecação em sementes de várias espécies, atuando na proteção de membranas e outras proteínas (WATERS et al., 1996) e de enzimas como a glutathione-S-transferase, consideradas antioxidantes (ROXAS et al., 2000).

Segundo Hilhorst et al. (1998), o tomate, espécie pertencente à família Solanaceae, é considerado um modelo para estudos de desenvolvimento e germinação de sementes. *Solanum lycocarpum*, além de pertencer à mesma família, possui características germinativas bastante semelhantes. Há ainda o fato de que é uma espécie nativa e relativamente pouco estudada. Dessa forma, estudos relacionados ao mecanismo molecular envolvido em sua germinação contribuem para a compreensão do assunto em outras espécies da família Solanaceae, no melhoramento de plantas, na produção e tecnologia de sementes.

As informações disponíveis sobre o processo de germinação, embora relativamente volumosas, são insuficientes para caracterizá-lo perfeitamente, representando apenas a reunião de conhecimentos obtidos para diferentes espécies, isso ocorre devido ao dinamismo dos avanços da pesquisa, o qual não permite limitar essa questão (MARCOS FILHO, 2005). Nesse contexto, existe a necessidade de se obter um melhor entendimento da germinação, vinculado à compreensão da expressão de alguns genes. Na ciência básica, a técnica de PCR em tempo real tem sido amplamente empregada na quantificação de transcritos específicos, podendo ser utilizada no estudo da expressão de genes associados à qualidade das sementes, a exemplo dos envolvidos no processo de germinação (SANTOS, 2013).

Contudo, ainda são escassos os trabalhos voltados para a expressão de genes durante o processo germinativo nas espécies vegetais do bioma cerrado. Assim, esse trabalho teve como objetivo estudar o perfil de expressão de genes relacionados à respiração, ciclo celular, citoesqueleto e estresse durante a germinação de sementes de lobeira.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Caracterização da espécie *Solanum lycocarpum* St. Hill

Solanum lycocarpum St. Hill é popularmente conhecida como fruta-do-lobo, lobeira, berinjela ou jurubebão, podendo ser encontrada em regiões de Cerrado, Cerradão e Campo Sujo e está distribuída no Amazonas, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo e Tocantins (ALMEIDA et al., 1998). A espécie pertence à família Solanaceae, a qual também pertencem várias espécies conhecidas, algumas delas de interesse econômico como o tomate, batata, as pimentas, berinjela, jiló e tabaco, além de ornamentais como o manacá-de-cheiro e petúnia e várias espécies nativas do Brasil (SOUZA e LORENZI, 2012).

Caracteriza-se por ser uma árvore ou arbusto grande, de até 4 metros de altura, com folhas simples, alternas e pecioladas, flores hermafroditas ou masculinas de coloração lilás ou roxa (ALMEIDA et.al., 1998). As plantas podem apresentar de 40 a 100 frutos, cuja massa por fruto pode variar de 400 a 900 g (SILVA et al., 1994). A floração ocorre o ano todo, com predominância durante o inverno e seus frutos amadurecem na primavera (LORENZI, 1998).

As sementes de *Solanum lycocarpum*, quando secas a 8% de umidade, apresentam tegumento rígido, coloração marrom-escuro, forma achatada, com comprimento, largura, e espessura médios de 7 mm, 5,17 mm, 1,78 mm, respectivamente. Um quilo de sementes de lobeira possui, em média, 35.000 unidades. O embrião apresenta

forma espiral encaixado no endosperma, os cotilédones localizam-se na parte interna e o hipocótilo e a radícula, de forma curvilínea, na parte externa (PINTO et al., 2007).

As plantas ocorrem preferencialmente em formações secundárias abertas de terrenos elevados, tanto de solos argilosos como arenosos, porém bem drenados e de baixa fertilidade. São plantas rústicas e de crescimento vigoroso, podendo ser considerada até como planta daninha por pecuaristas, porém essas características são desejáveis no sentido de ser considerada como planta pioneira para reflorestamentos (LORENZI, 1998). Segundo Elias et al. (2003), *Solanum lycocarpum* é uma espécie adaptada ao cerrado, ambiente onde condições estressantes, principalmente em relação à falta de água, são observadas em determinadas épocas do ano. Além disso, a lobeira apresenta-se como excelente material de estudo dado às suas características de crescimento e desenvolvimento (VIDAL et al., 1999) e, por ser planta de fácil obtenção em qualquer época do ano, coloca-se em vantagem para estudo em relação às outras espécies de cerrado, que apenas frutificam em determinada época, geralmente na estação chuvosa, como *Eugenia dysenterica* De. (cagaita), *E. lutescens* Camb. (perinha), *Caryocar brasiliense* Camb. (pequi) e *Hancomia speciosa* Gomez. (mangaba) (SILVA et al., 1994).

A fruta-de-lobo é uma espécie comestível e aromática, utilizada na preparação de geleias e doces (ALMEIDA et. al, 1998), possui ainda outros usos como o medicinal, já que a qualidade de sua farinha é considerada uma alternativa viável no tratamento de diabetes (CLERICI et al., 2011), seus subprodutos também são indicados para o tratamento de obesidade, inflamações, hipertensão e para reduzir o nível de colesterol (DALL'-AGNOL e VON-POSER, 2000; VIEIRA JÚNIOR et al., 2003).

Os teores encontrados na fruta-de-lobo de vitamina C, AST, sacarose, fósforo e ferro, comparados aos de outros frutos, como abacaxi, banana, laranja, manga entre outros, são equivalentes ou superiores aos dos frutos em questão, podendo-se concluir que o fruto da lobeira representa mais uma alternativa como fonte desses nutrientes (JÚNIOR et al., 2003).

O fruto de *S. lycocarpum* é caracterizado como importante fonte alimentar durante o ano para diversas espécies de animais, dentre elas *Chrysocyon brachyurus* (lobo guará), *Tapirus terrestris* (anta), *Lycalopex vetulus* (raposa do campo), *Tupinambis merianae* (tiú, teiú ou teju), especialmente durante a estação de seca, quando outras fontes de alimento tornam-se escassas (PINTO, 1998; DALPONTE e LIMA, 1999; RODRIGUES, 2002; CASTRO e GALLETI, 2004).

4.2. Germinação

A germinação começa com a tomada de água pela semente (embebição) e termina com a emergência do eixo embrionário, usualmente a radícula, através das estruturas que a cercam (BEWLEY et al., 2013), incluindo inúmeros processos, como por exemplo mudanças estruturais sub-celulares, respiração, síntese de macromoléculas e alongamento celular (BEWLEY e BLACK, 1994).

Segundo Bewley et al. (2013), o processo de absorção de água pelas sementes ocorre em três fases. A primeira fase ou fase I é caracterizada pela rápida transferência de água do substrato para a semente, graças à diferença de potencial hídrico. Nesse período surgem os primeiros sinais de reativação do metabolismo, com aumento acentuado da atividade respiratória e liberação de energia para a germinação, ativação de enzimas e síntese de proteínas a partir do RNAm armazenado ao final do processo de maturação (MARCOS FILHO, 2005).

Durante a fase II, o teor de água das sementes é relativamente constante e as atividades metabólicas aumentam substancialmente com a transcrição de novos genes (BEWLEY et al., 2013). Essa fase, quando ocorrem atividades constituintes do processo bioquímico preparatório, pode ser necessária para a síntese de enzimas, DNA e RNAm exauridos durante a fase I (MARCOS FILHO, 2005). Segundo Bewley (1997), há ainda o transporte de substâncias desdobradas na fase anterior, do tecido de reserva para o tecido meristemático onde serão ressintetizadas em substâncias utilizadas no crescimento do embrião e, embora o eixo embrionário já esteja recebendo algum nutriente, ainda não consegue crescer.

O final da fase II culmina com a conclusão de germinação, para então dar início à fase III, onde as substâncias transportadas na fase II são reorganizadas em substâncias complexas para formar o protoplasma e as paredes celulares, promovendo o crescimento do eixo embrionário (CARVALHO e NAKAGAWA, 2012). Essa fase é marcada por um aumento no conteúdo de água da semente, que acontece devido à absorção associada ao início do crescimento do embrião (expansão concomitantemente com a divisão celular e consequente alongamento embrionário) (DE CASTRO et al., 2004).

Segundo Bewley (1997), a expansão da radícula se refere ao processo de turgor dirigido que faz com que as paredes das células do eixo embrionário

cedam. Existem três possíveis razões para que isso aconteça. A primeira possibilidade consiste no fato de que, durante a germinação, o potencial osmótico (ψ_s) das células da radícula torna-se mais negativo por causa do acúmulo de solutos, possivelmente como resultado da hidrólise de reservas presentes dentro dessas próprias células. O decréscimo no ψ_s poderia levar ao aumento da embebição, resultando no aumento do turgor, desencadeando a extensão das células. Uma segunda possibilidade é que a extensibilidade das paredes das células da radícula permitam seu alongamento, isso foi verificado em sementes de tomate por Chen e Bradford (2000), a partir da detecção da expressão de genes de expansinas atuando especificamente na ponta da radícula.

Ainda segundo Bewley (1997), existe uma terceira possibilidade, que consiste no enfraquecimento dos tecidos que circundam o embrião, permitindo a protrusão da radícula, pela redução da resistência mecânica imposta ao mesmo. Esse enfraquecimento é controlado pela ação de hidrolases (endo- β -mananase, α -galactosidase, β -manosidase), com ação descrita em diversas espécies, dentre elas o tomate (TOOROP et al., 2000) e lobeira (PINTO et al., 2007), as quais possuem semelhanças nas estruturas de suas sementes (Figura 1), assim como nos mecanismos que controlam o processo germinativo de ambas.

Como exemplos, podem ser citados os trabalhos desenvolvidos com sementes de tomate (TOOROP et al., 2000) e lobeira (PINTO et al., 2007), que descrevem o número e a espessura das camadas de células do endosperma, verificando que ambos são maiores em sementes de lobeira, o que possivelmente faz com que a germinação da espécie seja mais lenta e a força requerida pelo embrião, para que haja a protrusão da radícula, seja maior se comparada às sementes de tomate. Porém, em ambos os casos, há redução da força de ruptura do endosperma micropilar durante a embebição, que está relacionado com o aumento da atividade da enzima endo- β -mananase e crescimento do embrião.

As sementes de tomate são consideradas como modelo para o estudo da fisiologia e bioquímica do desenvolvimento, dormência e germinação de sementes, pois possuem estrutura relativamente simples, e são facilmente manipuláveis (HILHORST et al., 1998). Tendo em vista as características descritas, para estudar a germinação de sementes de tomate deve-se levar em conta que o processo consiste no resultado final de duas forças: potencial de crescimento do embrião e enfraquecimento do endosperma micropilar (TOOROP et al., 2000). O mesmo foi descrito em sementes de

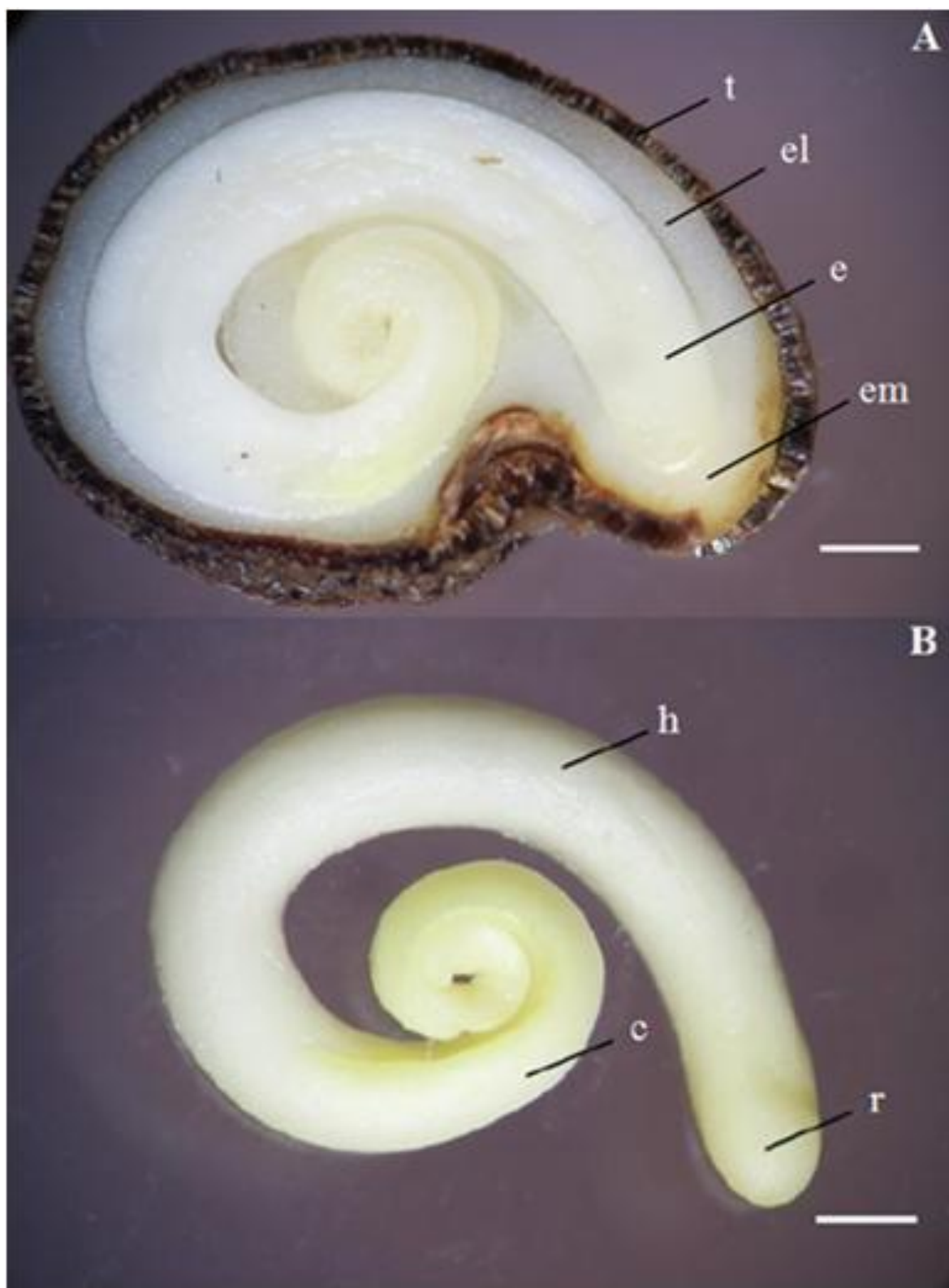


Figura 1. Fotos da semente de *Solanum lycocarpum*. A) Semente inteira mostrando: el - endosperma lateral; e - embrião; t - tegumento; em - endosperma micropilar. B) Embrião mostrando: h - hipocótilo; c - cotilédone; r - radícula. Barras representam 1,0 mm.

Solanum lycocarpum por Pinto et al. (2007) e Anese et al. (2011) que enfatizam a importância de aliar o enfraquecimento do endosperma micropilar ao crescimento do embrião para a ocorrência da germinação.

4.3. Estudo da expressão gênica

De acordo com Carvalho e Nakagawa (2012), à medida que a semente absorve água e os tecidos reidratam, a respiração e todas as outras atividades metabólicas são intensificadas, fornecendo de energia e nutrientes necessários para a retomada do crescimento embrionário.

A respiração envolve o ciclo da glicólise, de Krebs e a fosforilação oxidativa, com a contribuição de enzimas na regulação de cada rota (TAIZ e ZEIGER, 2013), dessa forma, a ativação dos sistemas enzimáticos em decorrência da hidratação é extremamente importante para o desenvolvimento e germinação das sementes, pois as enzimas estão envolvidas diretamente no processo respiratório e na digestão de reservas, produzindo energia para a biossíntese de novos tecidos (BEWLEY e BLACK, 1994).

Malato desidrogenase e álcool desidrogenase são enzimas que atuam no processo respiratório e, portanto, permitem a avaliação da atividade respiratória. A malato desidrogenase (MDH) é uma enzima importante na respiração, desempenhando relevante papel no ciclo de Krebs, catalisando a conversão de malato à oxalacetato, produzindo NADH, produto necessário para posterior produção de ATP (TAIZ e ZEIGER, 2013).

A enzima álcool desidrogenase (ADH) é uma das principais enzimas fermentativas, que converte o acetaldeído em etanol (CASTRO et al., 2005), considerado menos tóxico à planta além de poder se difundir para fora da células (TAIZ e ZEIGER, 2013). Muitas sementes ficam sob condições temporárias de baixa disponibilidade de O₂ (hipoxia), durante a embebição, nesse o etanol, produto da respiração anaeróbica, é acumulado interior da semente, podendo ocorrer em proporções diferentes em diferentes espécies (BEWLEY et al., 2013). O processo de acumulação de etanol envolve a oxidação de NADH e resulta na produção de pequenas quantidades de ATP, fundamental para a sobrevivência de varias espécies sob condições de anoxia ou hipoxia (CASTRO et al., 2005).

Malone et al. (2007), estudando sementes de arroz durante o processo de germinação verificaram variações no padrão de expressão das enzimas álcool desidrogenase a malato desidrogenase. Albuquerque et al. (2009), trabalhando com dois lotes de sementes de sucupira-preta durante a germinação, observaram comportamento constante para a enzima malato desidrogenase, enquanto que, para a enzima álcool desidrogenase a atividade variou em função dos lotes utilizados. Lin e Sung (2001) verificaram que a maior germinação e emergência em sementes submetidas ao *priming* foram associadas com o aumento de enzimas como isocitrato liase, malato sintase e malato desidrogenase. Segundo Silveira (2014), há escassez de trabalhos na literatura, sobre a influência do ambiente, no período de germinação, em sementes do cerrado correlacionado com atividade enzimática.

O citosol das células está organizado em uma rede tridimensional de proteínas filamentosas, o citoesqueleto, que além de outras funções, apresenta papel fundamental nos processos de mitose, meiose, citocinese, depósito de parede, manutenção da forma celular e diferenciação celular. O citoesqueleto é formado por microtúbulos e microfilamentos, e este último composto por actina (TAIZ e ZEIGER, 2013).

A actina (ACT) desempenha papel importante na morfogênese das células das plantas, podendo estar envolvida na expansão celular, no deslocamento de células sobre substratos sólidos, na manutenção da forma celular, no transporte intracelular, no posicionamento de macromoléculas e nas respostas a estímulos do meio externo (CARVALHO e RECCO-PIMENTEL, 2007).

O alongamento da radícula embrionária dentro da semente ocorre, em geral, por alongamento ou expansão das células, seguido pela diferenciação e pelo crescimento da plântula, como resultado tanto de expansão como de divisão celular. Entretanto, geralmente a preparação para a divisão celular ocorre bem antes que a protrusão da radícula, visto que requer a iniciação do ciclo celular (BINO et al., 1992; DE CASTRO et al., 1995 apud DE CASTRO et al., 2004).

O ciclo celular é o processo pelo qual ocorre a reprodução da célula e de seu material genético, o DNA nuclear. E consiste em quatro fases: G₁, S, G₂ e M (TAIZ e ZEIGER, 2013). Durante a fase G₁, ocorre a síntese de proteínas e de ácido ribonucléico (RNA). Nessa fase, há um ponto crítico, denominado ponto de restrição (Ponto R), quando a célula pode seguir o ciclo para a divisão ou sair e entrar em repouso. Na fase S, ocorre duplicação do DNA e a célula torna-se tetraplóide (4n). Em G₂, a célula

prepara-se para a mitose. Na fase M, ocorre a divisão celular em duas células filhas diplóides (2n). Após a mitose, a célula pode entrar na fase G0, na qual fica em repouso, ou reiniciar outro ciclo (SOUZA et al., 2001).

As enzimas-chave que controlam as transições entre os diferentes estados do ciclo celular e a entrada das células no ciclo de divisão são as proteínas cinases dependentes de ciclina ou CDks (*cyclin-dependent protein kinases*). As proteínas cinases são enzimas que fosforilam outras proteínas utilizando ATP, e todas dependem de subunidades reguladoras, as ciclinas, para desempenhar suas atividades (TAIZ e ZEIGER, 2013). Segundo Pines (1995), a ativação e inativação de complexos ciclina-CDK específicos devem ser sensíveis a uma variedade de estímulos externos e internos para garantir a regulação adequada do ciclo celular.

As plantas podem ser atingidas por estresses abióticos, sendo a germinação e o estágio inicial de plântula bastante sensíveis e vulneráveis. A tolerância a alguns tipos de estresse podem ser explicados por adaptações desenvolvidas pelas plantas como, por exemplo, mudanças na expressão gênica (XIONG e ZHU, 2002).

Um dos mecanismos mais estudados na adaptação dos organismos à condição de estresse é a indução de *heat shock proteins* (HSP) ou proteínas de choque térmico, o qual inclui várias famílias de proteínas conservadas. HSPs são divididas em proteínas com baixo peso molecular, de aproximadamente 15–28 kDa (sHSPs) e proteínas com alto peso molecular, com mais de 30 kDa (HMM HSPs) (JOSÉ et al., 2009).

A tolerância à dessecação está correlacionada com a presença de quantidades consideráveis de proteínas de choque térmico (HSPs) (HOEKSTRA et al., 2001). Segundo Vertucci e Farrant (1995), a função das HSPs é conhecida por estabilizar a conformação de proteínas e por preservar e reparar as estruturas macromoleculares durante a desidratação ou reidratação, respectivamente. WATERS et al. (1996) sugerem que essas proteínas se ligam parcialmente à proteínas desnaturadas ou agregadas, evitando a agregação irreversível ou promovendo o enovelamento correto das mesmas. Essa ligação também pode manter a conformação de outras proteínas, a fim de facilitar a translocação das mesmas através de membranas. Porém, embora todos os organismos sintetizem HSP em resposta ao calor, o balanço de proteínas sintetizadas e a relativa importância das famílias individuais de HSP na tolerância ao estresse variam enormemente entre organismos (QUEITSCH et al., 2000).

Diferentes tipos de estresse podem acarretar o aumento da concentração das espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs causam peroxidação de lipídios, modificações protéicas, rompimento das cadeias de DNA, entre outros, eventos que podem culminar com a morte das células. Para minimizar os efeitos causados pela presença dos EROs nos tecidos vegetais, as células possuem mecanismos de proteção, que estão atrelados à ação das enzimas antioxidantes (MOLLER et al., 2007; MUNNS e TESTER, 2008).

A glutathiona-S-transferase é uma das enzimas importantes envolvidas na proteção de plantas. Ela é expressa durante o desenvolvimento normal, bem como em resposta a diferentes condições de estresse. Além do estresse oxidativo, a expressão dessa enzima é também induzida por estresses xenobióticos tais como herbicidas, além do frio, estresse hipóxico, desidratação, ataque patogénico, bem como o estresse salino (MARRS, 1996).

Estudos em plantas transgênicas de tabaco mostram que é evidente que o gene de glutathiona-S-transferase desempenha um papel vital na tolerância ao estresse abiótico, por esse motivo, os autores especulam que ele é um gene candidato potencial ser usado na engenharia genética no sentido de aumentar a tolerância a esse tipo de estresse (JHA et al., 2011). Roxas et al. (2000) também verificaram a relação positiva entre a expressão de glutathiona-S-transferase e aumento do crescimento das plântulas sob uma variedade de condições de estresse em *Nicotiana tabacum* L.

4.4. Análise de expressão gênica

Atualmente, avançadas técnicas vêm sendo utilizadas na biologia molecular, com aplicação em plantas, e especificamente em sementes. Essas técnicas são desenvolvidas a partir da pesquisa básica em diferentes campos da atividade científica e são de grande importância para auxiliar no entendimento de processos biológicos importantes como a identificação de vias bioquímicas, de sinalização e níveis de transcrição integrados no funcionamento da célula (CLEMENTE, 2012).

Nesse sentido, a invenção da reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) por Kary Mullis em 1984 foi considerada como uma revolução na ciência (DEEPAK et al., 2007). A PCR é um método rápido e fácil para a geração de cópias ilimitadas de qualquer fragmento de DNA, usando oligonucleotídeos

iniciadores ou *primers* de sequência conhecida e complementares às extremidades do segmento a ser amplificado, direcionando a síntese de DNA alvo, em ciclos repetidos. A técnica permite o uso de pequenas quantidades de material ou até mesmo fragmentos danificados, auxiliando em práticas diárias como diagnósticos médicos por exemplo (MULLIS, 1991; JOSHI e DESHPANDE, 2010).

Segundo Clemente (2012), com a ampliação de novas tecnologias, a PCR foi aprimorada, visando proporcionar resultados mais rápidos, através de uma nova técnica, denominada PCR em tempo real (*real-time* PCR ou RT-PCR). A PCR em tempo real é usada para medir com precisão as diferentes quantidades de um produto do gene alvo presente em amostras independentes. Cada amostra passa por uma amplificação por PCR juntamente com um corante fluorescente presente na mistura de reação, que fluoresce apenas quando o produto específico é reconhecido ou sintetizado (GACHON et al., 2004). Sendo assim, pode-se dizer que a RT-PCR baseia-se na utilização de corantes fluorescentes para quantificar a transcrição do gene de interesse, com o número de ciclos de amplificação em que estes corantes/transcritos são detectados, indicando a abundância relativa das moléculas alvo (WALKER et al., 2009).

A sensibilidade da RT-PCR torna-se uma ferramenta poderosa para a medição da expressão do gene, especialmente quando as quantidades de amostra são limitadas ou um transcrito é expresso a um nível muito baixo (WALKER et al., 2009). Há ainda o fato de que, além de ser uma alternativa para algumas técnicas de laboratório bem estabelecidas, a PCR em tempo real tem uma série de características que a torna a escolha para vários tipos de estudo, pois permite a detecção de um determinado ácido nucleico alvo de forma rápida e específica (GACHON et al., 2004).

Após a obtenção dos dados de expressão gênica das amostras em estudo, uma etapa bastante importante quando se considera o uso de RT-PCR em análises experimentais é a normalização dos dados obtidos, utilizando os resultados da amplificação de produtos de um gene de referência ou normalizador. A normalização dos resultados de RT-PCR é necessária para controlar as diferenças entre as amostras que possam surgir como resultado dos passos de processamento das mesmas (BUSTIN et al., 2005). O método mais comum para normalizar os dados de RT-PCR envolve a utilização de um ou mais genes endógenos controle. A escolha do gene controle endógeno para normalizar os dados de expressão gênica é uma das etapas cruciais no projeto experimental (WALKER et al., 2009).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. 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.

Os frutos com aparência de maduros foram colhidos após a dispersão natural (frutos coletados no solo) em fevereiro de 2010, na região de Lavras - MG, com altitude de 919 metros, latitude de 21°14' S e longitude de 45°00' W de Greenwich (BRASIL, 1992). Os frutos que se encontravam amolecidos foram beneficiados por meio da retirada da polpa. As polpas foram passadas em peneiras na presença de água corrente, para a separação das sementes. Após o beneficiamento, as sementes foram submetidas à secagem e posteriormente acondicionadas em saco plástico fechado mantido a 4°C (geladeira).

5.2. Teor de água

O teor inicial de água das sementes foi determinado pelo método da estufa a 105°C °C por 17 horas, utilizando quatro repetições de 10 sementes. Os resultados foram expressos em porcentagem conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

5.3. Testes para avaliar a qualidade fisiológica das sementes

Para a execução do teste de germinação, as sementes tiveram a superfície externa esterilizada com hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos, e em seguida, foram dispostas entre folhas de papel de germinação (duas folhas embaixo das sementes e uma em cima, umedecidas com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel), em caixas tipo gerbox. As caixas foram acondicionadas em câmara de germinação do tipo BOD, regulada em temperatura alternada de 20-30°C com fotoperíodo de 12/12 horas, durante 15 dias. Utilizaram-se quatro repetições de 25 sementes e as contagens de germinação foram realizadas diariamente, considerando como germinadas sementes que apresentavam raiz primária de tamanho superior ou igual a 1 mm.

As avaliações foram feitas por meio da porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962), frequência de germinação (LABOURIAU e AGUDO, 1987) e tempo médio de germinação (LABOURIAU, 1983). As sementes foram fotografadas com o auxílio de uma câmera digital da marca Canon modelo Power Shot SX50HS.

5.4. Curva de embebição

A determinação da curva de embebição foi realizada utilizando-se 20 sementes esterilizadas com hipoclorito de sódio 1% durante 10 minutos. As sementes foram colocadas para embeber entre folhas de papel de germinação (duas embaixo e uma em cima das sementes, umedecidas com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel) acondicionadas em caixas do tipo gerbox. As caixas foram incubadas em câmara de germinação do tipo BOD regulada em temperatura alternada de 20-30°C e fotoperíodo de 12/12 horas. As sementes tiveram o peso fresco quantificado com o auxílio de uma balança digital (com precisão de 0,001g) em intervalos de três horas até completar 12 horas de embebição, seis horas até completar 36 horas de embebição e 48 horas até completar 324 horas (aproximadamente 14 dias) de embebição.

5.5. Estudos moleculares dos embriões de sementes de *Solanum lycocarpum* durante a germinação

Após serem submetidas ao processo de germinação (nas mesmas condições descritas acima), as sementes não germinadas aos 1, 5, 10 e 15 dias de embebição foram seccionadas com o auxílio de uma lâmina para expor o embrião e permitir que o mesmo pudesse ser removido. Foram coletadas duas repetições de 50 embriões para cada um dos tempos descritos acima. Após a coleta, as amostras biológicas foram acondicionadas em tubos plásticos de 1,5 mL, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em *deep freezer* à temperatura de -80 °C.

5.5.1. Extração de RNA

Para a extração do RNA, foi efetuada a maceração do material coletado, com o auxílio de um conjunto de almofariz e pistilo. A extração foi realizada utilizando o “kit” – NucleoSpin RNA Plant[®] (Macherey-Nagel). Conforme descrito no protocolo, em capela, foram transferidos aproximadamente 100 mg do material vegetal macerado, 350 µL de tampão de extração (RA1) e 3,5 µL de β-mercaptoethanol (β-ME) para um tubo plástico de 1,5 mL. Logo em seguida, as amostras foram homogeneizadas com auxílio de um agitador, transferidas para filtros NucleoSpin Filter[®] acoplados à tubos coletores de 2 mL e centrifugadas por um minuto a 11.000 rpm, para redução da viscosidade.

Os filtros foram descartados e, então, adicionaram-se 350 µL de etanol 70% nos filtrados de cada amostra, que foram transferidas para colunas de NucleoSpin RNA Plant[®] acopladas à tubos coletores de 2 mL e centrifugadas por 30 segundos a 11.000 rpm. As colunas de filtração foram acondicionadas a novos tubos coletores, nas quais se adicionaram 350 µL de Membrane Desalting Buffer[®], e centrifugadas por um minuto a 11.000 rpm até que a membrana da coluna de filtração estivesse seca. Em seguida, foi adicionado 95 µL de DNase *reaction mix*, constituído por 10 µL de rDNase reconstituída e 90 µL de *reaction mix* ao centro da membrana de sílica da coluna de filtração e os tubos deixados em repouso, incubados à temperatura ambiente, por 15 minutos.

As colunas de filtração foram submetidas à lavagem com 200 µL de tampão e centrifugadas por 30 segundos a 11.000 rpm. Depois, foram acondicionadas em novos tubos coletores e 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, foi adicionado 250 µL de tampão RA3 nas colunas, que foram centrifugadas por dois minutos a 11.000 rpm até secar completamente a membrana. Transferidas as colunas de NucleoSpin RNA Plant[®] para microtubos de 1,5 mL, foram adicionados 40 µL de água RNase-free nas colunas de NucleoSpin RNA Plant[®] e centrifugadas por 1 minuto a 11.000 rpm para obtenção do RNA extraído.

5.5.2. Determinação de quantidade e qualidade do RNA extraído

Após a extração, a concentração e a pureza do RNA extraído foi avaliada em espectrofotômetro Nanodrop-2000 (*Thermo Scientific*) utilizando uma alíquota de 1 µL da solução de RNA total. A pureza do RNA foi estimada a partir da relação absorvância A260/280 nm que é uma estimativa de contaminação, principalmente por proteínas e fenóis. A verificação da qualidade das amostras foi realizada por meio da avaliação de gel de agarose a 1,0% (0,4 g de agarose e 40 µL de TAE 1X) corado com *gel red*. Soluções contendo 500 ng de RNA extraído e azul de bromofenol foram submetidas à corrida de eletroforese, a 90 volts durante uma hora.

O marcador utilizado foi o 1kbp DNA Ladder (*Jena Bioscience*) na quantidade de 4 µL. Para visualização das bandas no gel utilizou-se um fotodocumentador (*Mini Bis 24mm da DNR Bio-Imaging Systems*).

5.5.3. Confecção de cDNA

Para a confecção do cDNA foi utilizado o “kit” *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems*). Conforme descrito no protocolo, para uma reação de 20 µL, utilizaram-se 1000 ng (o volume exato foi dependente da quantificação fornecida no espectrofotômetro) de RNA completando o volume com água MiliQ até atingir 10 µL. O mix de cDNA consistiu de 2 µL de 10X RT *Random Primers*, 2

μL de 10x RT *Buffer*, 0,8 μL 25X dNTP Mix (100mM), 1 μL MultiScribe™ Reverse Transcriptase e 4,2 μL *Nuclease-free H₂O*.

As reações foram incubadas em termociclador *PTC-100 – Programmable Thermal Controller, Peltier – Effect Cycling (MJ Research, INC.)*, a 25 °C por 10 minutos, para a ativação inicial da enzima, a 37°C por 120 minutos para a síntese de cDNA, seguido por inativação da enzima a 85°C por cinco minutos e finalizando a ciclagem sob 4°C constante. A quantificação do cDNA foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop-2000 (*Thermo Scientific*) e diluídas a uma concentração padrão de 60 ng^(-μL). Após a padronização, as amostras foram armazenadas em *deep freezer* a -80°C.

5.5.4. Desenhos de *primers*

Os genes estudados foram identificados por meio de buscas na literatura, associados ao ciclo celular, citoesqueleto, estresse e respiração. Para quantificar a expressão dos mesmos se fez necessária a confecção de *primers* específicos para os genes de interesse. Devido à ausência de sequências nucleotídicas em *Solanum lycocarpum*, foram realizadas buscas de sequências de tomate (*Solanum lycopersicum*, outra solanácea e conforme já mencionado, bastante semelhante à lobeira), depositadas em bancos de dados públicos.

Para o desenho utilizou-se 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 no desenho dos *primers* foram: *amplicon* de 100 a 200 pares de bases, temperatura de anelamento de 60°C $\pm$ 1 e tamanho do *primer* de 20 a 24 pares de bases.

5.5.5. Quantificação da expressão relativa por PCR em tempo real

Para a quantificação da expressão relativa dos genes em estudo e dos normalizadores, foi utilizado *Lumino Ct Sybr Green qPCR Ready Mix (Sigma Life Science)*, sendo padronizado o volume das reações, totalizando uma solução de 10,0 μL (Tabela 3).

Tabela 1. *Primers* específicos da região do embrião de sementes de lobeira utilizados para análises de PCR em tempo real.

Nome	<i>Forward</i> (5'-3')	<i>Reverse</i> (5'-3')
Ciclina	ATCACGCCATTACTCTACTCC	GGGAAGGCAGATTTGTAATCAG
Actina	ATCCACGAGACTACCTACAAC	TCCACATCTTAATCTTCATGCTG
<i>Heat Shock Protein</i>	GACGTGTTTGATCCATTCAG	CCTCTTCGATCTCCACTTTC
Glutathiona S-transferase	AGTCCTCTGCTTTTGCAGATG	AAGGATCAGAAGGGAGCAAAGG
Malato Desidrogenase	CTTGAAAGGTGTAAATGTGGTGG	CTGGATTGCTAATGATGTGGATAA
Álcool Desidrogenase	ACTACAAACCTCGTTCGGATAT	GCCTTCTCCCTTCAGCATTA
Metalotioneina	TCGTGCTGTGGAGGAAACTGTGG	AGCTTGTCTTCTCAGGTCCCACCC
18S ribossomal	TGACGGAGAATTAGGGTTCG	CCTCCAATGATCCTCGTTA

Tabela 2. Genes (mRNAs) estudados no embrião de sementes de lobeira durante a germinação.

Gene alvo	Nº Acesso	Sigla	Relacionado à/ao
Ciclina	NM-001247447.1	CDC2	Citoesqueleto
Actina	XM-004249818.1	ACT7	Ciclo celular
<i>Heat Shock Protein</i>	SGN-U578134	HSP17.6	Estresse
Glutathiona S-transferase	NM-001247228.2	GST	Estresse
Malato Desidrogenase	XM-004235934.1	MDH	Respiração
Álcool Desidrogenase	NM-001247170.1	ADH2	Respiração
Metalotioneina	SGN-U143485	MTP	Gene de Referência

Tabela 3. Reações padronizadas para PCR em tempo real para cada gene.

<i>Sybr</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	cDNA	Água
5 µl (1 X)	0,25 µL (10 mM)	0,25 µl (10 mM)	3 µl (60 ng/µL)	1,5 µl

A amplificação dos fragmentos alvo foi realizada em termociclador óptico *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 duas repetições biológicas e duas repetições técnicas para cada amostra. Para mensurar a expressão gênica foi utilizado o cálculo do $\Delta\Delta Ct$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), que se baseia na reação exponencial da PCR. Para tal a expressão $QR = 2^{-\Delta Ct}$, onde QR 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; $\Delta\Delta Ct$ representa a diferença entre o ΔCt da amostra de interesse em determinado tempo e o ΔCt da amostra de referência.

5.6. Análise estatística

Os dados de expressão gênica obtidos foram analisados utilizando o programa REST®, que realiza a quantificação comparativa pelo método de “*Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test*” (PFAFFL et al., 2002).

O programa REST realiza a quantificação relativa ao comparar um grupo de amostras com o grupo controle, a comparação sempre é realizada a partir de um gene normalizador (gene expresso na mesma quantidade nas condições experimentais avaliadas) (NACHTIGALL, 2012).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O valor médio do teor de água das sementes de lobeira foi 6,7%. Quando submetidas à embebição, verificou-se aumento de 67,48% em seu peso fresco até as primeiras 24 horas (Fase I), que se manteve constante até os sete dias (Fase II), para então, tornar-se novamente crescente (Fase III), caracterizando o crescimento acentuado do eixo embrionário, culminando com a protrusão da radícula (Figura 2).

Observou-se que a curva de embebição obedeceu ao padrão trifásico proposto por Bewley e Black (1994) e que o tegumento da semente de *Solanum lycopersicum* não oferece impedimento físico à entrada de água. Muito provavelmente, a embebição ocorreu devido a um processo físico, em decorrência da diferença de potencial hídrico entre a semente e o meio. Pinto et al. (2007), estudando o mecanismo e controle da germinação de sementes de lobeira verificaram um padrão trifásico de embebição, com a fase II bastante longa, permanecendo as sementes sem aumento significativo de peso fresco por pelo menos seis dias e ausência de restrição à entrada de água na semente.

A germinação de sementes de lobeira teve início aos oito dias de embebição (Figura 3), atingindo aproximadamente 50% e 75% aos 14 e 15 dias respectivamente. Souza (2014) obteve valores próximos a 55% de germinação ao final dos 15 dias avaliados para sementes de lobeira embebidas em água. Anese et al. (2011) trabalhando com condicionamento fisiológico em sementes da mesma espécie, verificaram que no tratamento controle, o tempo para ocorrência de 50% de germinação (T50) foi 17,3 dias.

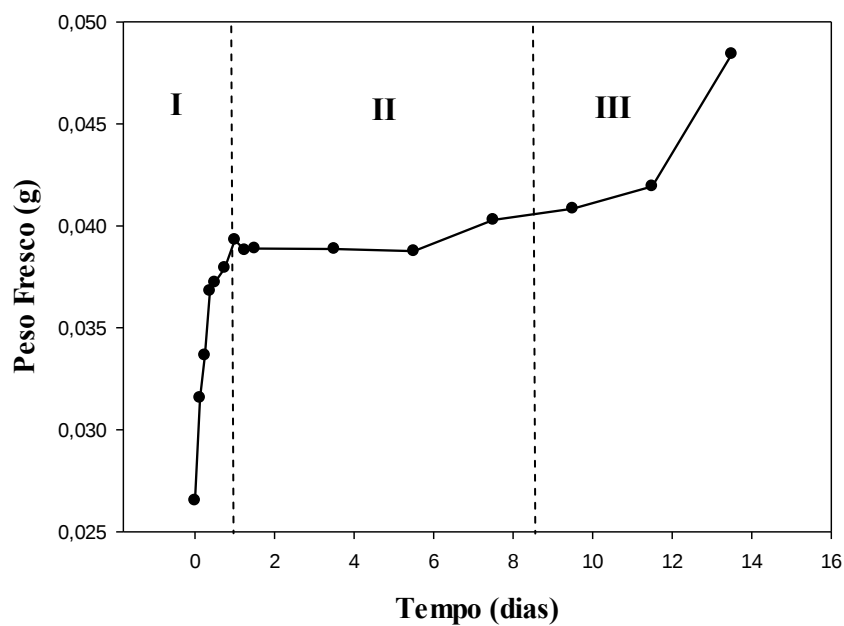


Figura 2. Dados médios (●) do peso fresco das sementes de *Solanum lycocarpum* durante a embebição.

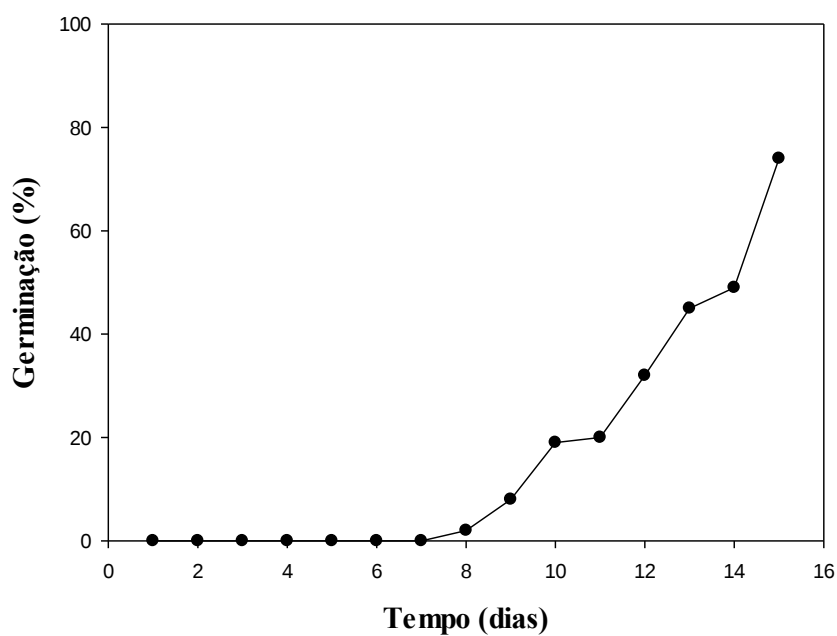


Figura 3. Germinação (%) de sementes de lobeira embebidas em água (●). Os pontos de dados representam a média de quatro repetições de 25 sementes.

A velocidade de germinação apresentada por Maguire (1962) é uma das medidas mais utilizadas por pesquisadores da área de ciências agrárias. Em geral, os pesquisadores a expressam como um índice ($IVG = \text{índice de velocidade de germinação}$) e a utilizam como uma medida adimensional (sem unidade), para predizer o vigor relativo de amostras de sementes. Apesar de não assumirem uma unidade para o número obtido, a expressão comunica o número de plântulas emergidas em laboratório, por dia (SANTANA e RANAL, 2000).

A velocidade de germinação calculada foi de 1,44, corroborando com resultados encontrados por Anese et al. (2011), que obtiveram índice de velocidade de germinação de 1,54 em sementes de lobeira não tratadas e embebidas em água e um índice maior (4,64) em sementes condicionadas em água, já Souza (2014) encontrou resultados próximos a 2 em sementes da mesma espécie não tratadas e embebidas em água e 2,9 em sementes hidrocondicionadas.

O tempo médio de germinação representa uma média ponderada, onde o número de sementes germinadas é o peso de ponderação do tempo (SANTANA e RANAL, 2000). O tempo médio de germinação para sementes de *Solanum lycocarpum* foi de 9,28 dias. Souza (2014) relatou que o tempo médio de germinação em sementes de lobeira no tratamento controle (embebidas em água e não condicionadas) foi de 10,52 dias e 8,41 e 9,18 dias para os tratamentos de hidrocondicionamento e condicionamento com PEG, respectivamente.

Os polígonos de frequência de germinação das sementes de lobeira resultaram em um gráfico polimodal (Figura 4), caracterizando uma germinação bastante heterogênea. Foi possível observar que, enquanto algumas sementes protrundiram e deram início ao desenvolvimento (Figura 5) em torno de oito dias de embebição, outras sementes só protrundiram aos 15 dias. Resultados semelhantes foram encontrados por Souza (2014), que também obteve um gráfico polimodal para a frequência de germinação de sementes de *Solanum lycocarpum* e concluiu que a germinação de sementes da espécie apresenta um padrão heterogêneo.

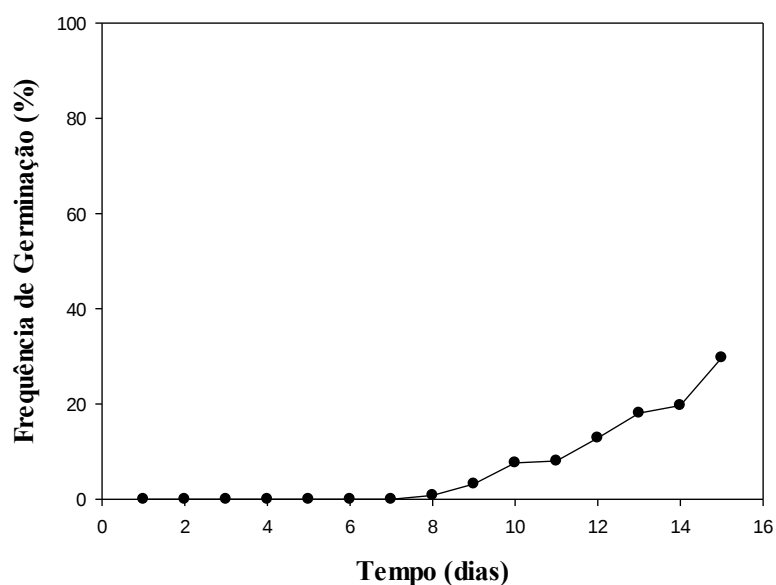


Figura 4. Frequência de germinação (%) de sementes de *Solanum lycocarpum*.

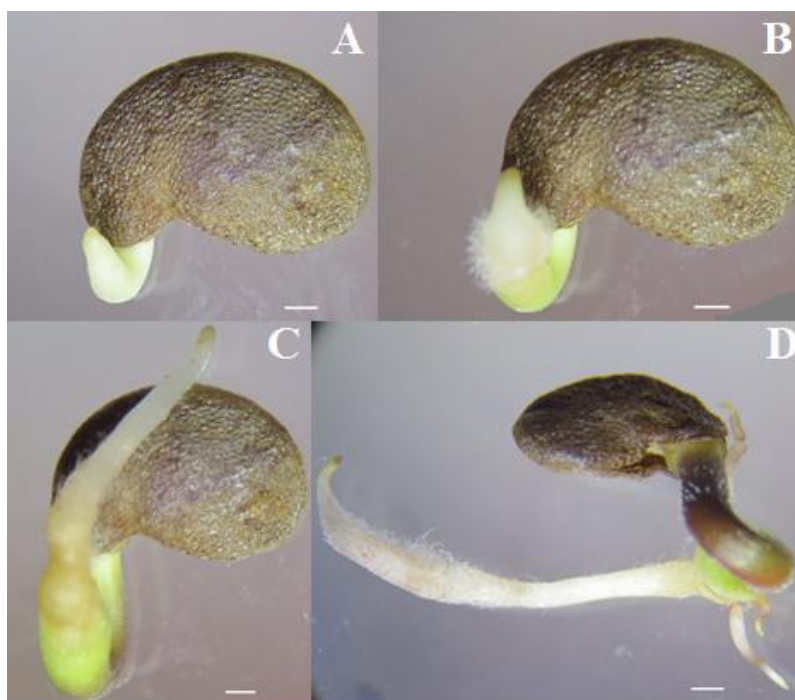


Figura 5. Desenvolvimento da raiz primária após a protrusão de sementes de lobeira embebidas em água. A – protrusão após a embebição durante nove dias; B – semente de lobeira germinada após 10 dias de embebição; C – semente de lobeira após 12 dias de embebição; D – semente de lobeira após 15 dias de embebição. Barras representam 1,0 mm.

Bewley et al. (2013), afirmaram que populações de sementes de espécies não cultivadas são bastante desuniformes, com algumas sementes que completam a germinação relativamente cedo e outras requerem tempo mais longo, estendendo o tempo requerido para determinar a percentagem total de sementes viáveis dessa população, e que este é também o perfil de germinação que ocorre quando há menor disponibilidade de água, isto é, a conclusão da germinação é atrasada e a uniformidade é reduzida.

Sementes de *S. lycocarpum* possuem dormência imposta pela resistência do endosperma micropilar ao crescimento da radícula (PINTO et al., 2007). De acordo com os mesmos autores, para que ocorra a germinação em sementes de *S. lycocarpum* é necessário o enfraquecimento do endosperma micropilar, assim como o crescimento do embrião. Essa é uma possível explicação para o baixo índice de velocidade de germinação, alto valor de tempo médio de germinação e para a heterogeneidade de germinação nos resultados obtidos.

A extração do RNA da região embrionária de sementes de lobeira utilizando o "kit"– NucleoSpin RNA Plant[®] da Macherey-Nagel gerou RNAs totais com alta qualidade, íntegros e livres de impurezas (Figura 6).

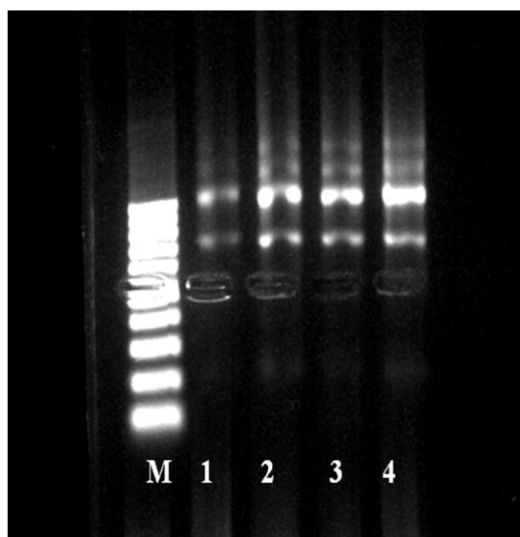


Figura 6. Gel de agarose a 1%, mostrando a corrida eletroforética do RNA total extraído da região embrionária de sementes de *Solanum lycocarpum*. M - marcador 1kb DNA Ladder; 1, 2, 3 e 4 – embrião aos 1, 5, 10 e 15 dias de embebição, respectivamente.

Para os genes de referência testados nas amostras utilizadas foi possível observar que os resultados de Ct para o gene 18S (Figura 7) apresentaram variação expressiva entre as amostras avaliadas, com médias variando de 7,08 a 8,6.

Esses resultados indicam que, apesar de ser amplamente utilizado em análises moleculares (FIELD et al., 1988), como por exemplo para o estudo de expressão de genes em sementes de café (FARIAS et al., 2014) e *Magnolia ovata* (JOSÉ et al., 2008), não foi considerado como opção para normalizar os dados obtidos durante a germinação de sementes de *Solanum lycocarpum*.

No caso do gene metalotioneína (MTP), escolhido para a normalização dos dados de expressão gênica obtidos de embriões de sementes de lobeira, a variação obtida foi menor que 1 Ct durante os tempos de germinação avaliados, com médias variando de 19,10 a 19,48 (Figura 8). Isso indica estabilidade de expressão em todos os tecidos independente do tempo de embebição.

Marques (2012), trabalhando com *Physalis angulata* L., também pertencente à família das Solanáceas, avaliou diferentes genes de referência e concluiu que o gene MTP foi considerado o mais estável para ser usado como normalizador. Segundo Walker et al. (2009), um gene endógeno controle ideal é aquele que é expresso de forma estável dentro de amostras a serem comparadas, independentemente das diferenças de tecido, das condições experimentais ou tratamentos.

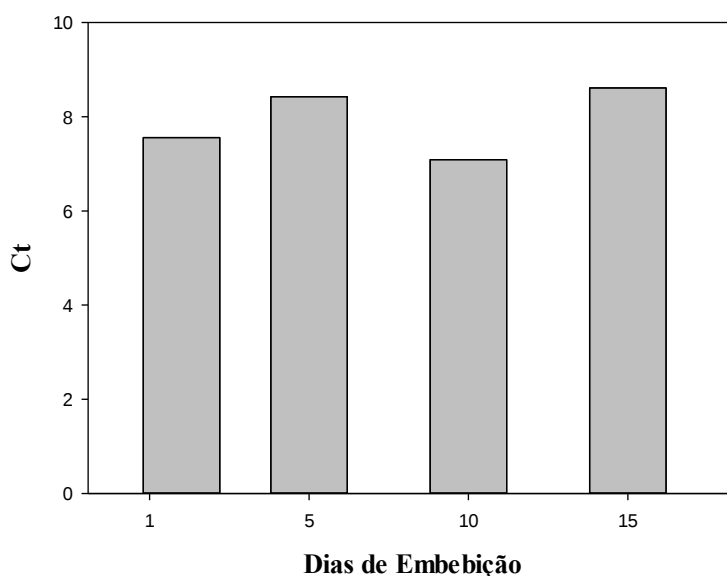


Figura 7. Ct do gene 18S em embriões de sementes de lobeira durante a embebição. As barras representam as médias de duas repetições biológicas.

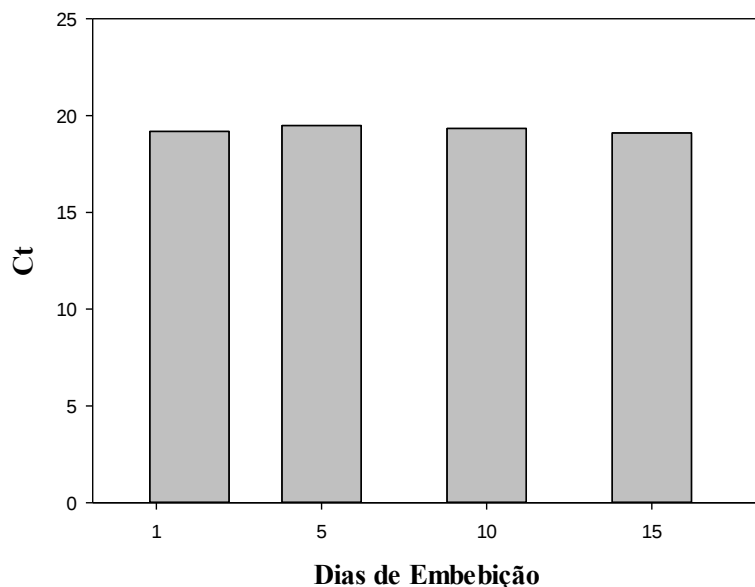


Figura 8. Ct do gene MTP em embriões de sementes de lobeira durante a embebição. As barras representam as médias de duas repetições biológicas.

Para a expressão da enzima álcool desidrogenase foi verificado que, até os cinco dias de embebição ela se manteve constante, não diferindo do tratamento controle (semente embebida por 24 horas) (Figura 9). Após a germinação, houve uma queda brusca na expressão da enzima, com valores de expressão 27 e 71 vezes menor que o tratamento controle aos 10 e 15 dias de embebição respectivamente, diferindo estatisticamente do mesmo em ambas as situações. Esses resultados, aliados aos resultados de germinação, mostram que o padrão de expressão da enzima álcool desidrogenase se mantém constante no início da embebição e diminui a partir do momento em que há protrusão da radícula, que ocorreu aos oito dias de embebição. Além disso, o fato de que a expressão desse gene se mantém até os cinco dias de embebição, mesmo em condições ideais de germinação, dão a ideia de que esse pode ser um mecanismo que auxilie as sementes de lobeira em situações de estresse durante o início da germinação.

A álcool desidrogenase é uma das principais enzimas atuantes na respiração em condições anaeróbicas (SACHS et al., 1980). Ela atua na metabolização do piruvato gerado na glicólise produzindo etanol e oxidando NADH no processo (TAIZ e ZEIGER, 2013).

No início, a energia para a germinação das sementes é fornecida principalmente pela respiração anaeróbica, em seguida, a atividade respiratória aumenta à medida que o consumo de oxigênio e liberação de dióxido de carbono aceleram durante a embebição (YU et al., 2014). Segundo Bewley et al. (2013), a enzima ADH tende a estar presente em sementes durante a germinação, e frequentemente está presente na semente seca. Em sementes de algumas espécies a atividade da ADH aumenta consideravelmente (dez vezes ou mais) durante a germinação. Quando a germinação é concluída, e quando as condições são mais aeróbicas, a atividade da enzima se torna insignificante.

Tunes et al. (2009) estudaram o padrão isoenzimático de sementes e plântulas de cevada e relataram que há alta atividade da enzima álcool desidrogenase nas sementes, o que não foi observado nas plântulas, já que a expressão diminuiu praticamente a zero com o processo de emergência. Os autores afirmaram ainda, que à medida que o processo de germinação avança e o processo aeróbico de geração de energia começa a ser predominante, a enzima ADH não é mais necessária. O mesmo foi observado por Malone et al. (2007), estudando o padrão da expressão da enzima álcool desidrogenase durante a germinação de sementes de arroz, que verificaram a expressão em sementes secas, diminuindo para zero com o avanço do processo de emergência de plântulas.

Albuquerque et al. (2009) avaliaram o perfil isoenzimático de álcool desidrogenase durante a embebição de sementes de sucupira-preta e verificaram intensa atividade da enzima no início da embebição em um dos lotes avaliados, com tendência de diminuição nas fases finais do processo. Os autores sugerem que a maior atividade observada no início da embebição pode ser atribuída à entrada restrita de oxigênio na semente, favorecendo a rota de respiração anaeróbica, evitando que as sementes ficassem expostas à ação deletéria do acetaldeído. À medida que a embebição progrediu, houve aumento da permeabilidade do tegumento e, portanto, o suprimento de oxigênio, justificando a diminuição da atividade da enzima.

Conley et al. (1999) também verificaram decréscimo acentuado na atividade da enzima ADH em sementes de uma linhagem selvagem de *Arabidopsis* durante a germinação, principalmente a partir dos cinco dias de embebição. Os autores observaram que a expressão desse gene (analisados através da técnica de PCR em tempo real), nas células de plantas sob condições normais de crescimento são extremamente baixos, mas sua expressão pode ser induzida em situações de hipoxia e anoxia. Chung e Ferl (1999)

também explanaram que é amplamente aceito que o nível de expressão do gene ADH em *Arabidopsis* é induzido por condições de ausência ou falta de oxigênio.

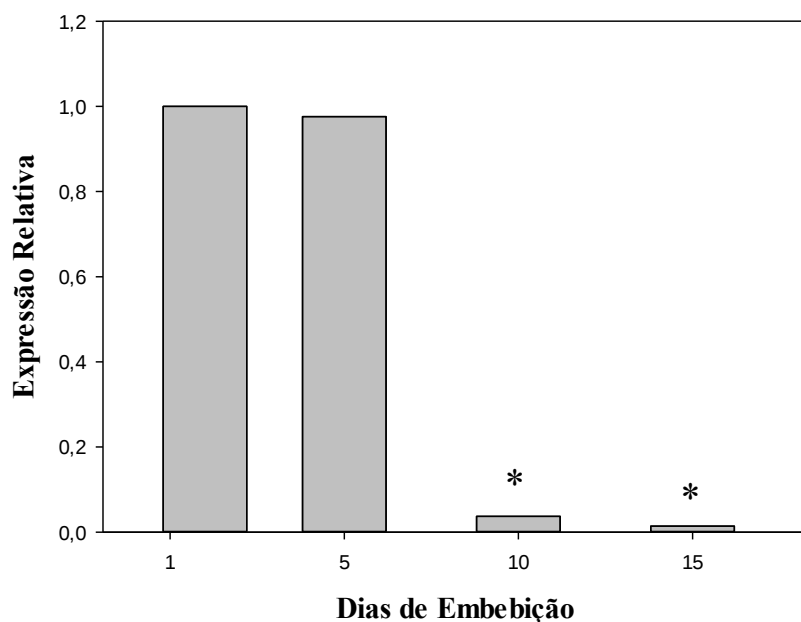


Figura 9. Expressão relativa do gene álcool desidrogenase no embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* durante o processo de germinação. Valores significativos estão indicados com um asterisco (*).

Ismail et al. (2009), estudando os mecanismos associados à tolerância ao alagamento durante a germinação de sementes de arroz, verificaram que as plantas se ajustam a condições de baixo nível de oxigênio através da fermentação alcoólica, que reflete no aumento da atividade de ADH. Os mesmos autores observaram o aumento da atividade de ADH em diferentes pontos durante a germinação das sementes com diferenças entre genótipos tolerantes e intolerantes, sendo que houve um aumento progressivo da atividade após 24 horas em condições de baixo oxigênio, sugerindo o papel significativo de ADH na tolerância a condições de anaerobiose durante a germinação.

Em análise de transcriptoma em sementes de trigo durante a embebição, Yu et al. (2014) observaram que há expressão de ADH durante a germinação. A enzima é altamente expressa após 12 horas de embebição e decresce bruscamente a partir das 24 horas, momento em que há a protrusão da radícula. Silveira (2014) analisou o transcriptoma de sementes de *Annona crassiflora* durante a quebra natural de dormência e encontrou grande quantidade de transcritos da enzima ADH, concluindo que em ambiente

de cerrado, a limitação de água no período da germinação das sementes pode ter ativado a rota fermentativa de produção de energia para continuação do crescimento e desenvolvimento do embrião.

A expressão da enzima malato desidrogenase no embrião de sementes de lobeira foi aproximadamente 250 e 28 vezes menor quando comparada ao tratamento controle aos cinco e 10 dias de embebição, respectivamente. Aos 15 dias foi verificado aumento da atividade da enzima, com valor de expressão bastante próximo ao tratamento controle, motivo pelo qual não diferiu estatisticamente do mesmo (Figura 10). Dessa forma, é possível inferir que para as sementes de lobeira embebidas em água o padrão de expressão de malato desidrogenase encontrado é de diminuição significativa após o início da embebição seguido de aumento progressivo até os 15 dias, ou seja, conforme o processo germinativo acontece.

A enzima malato desidrogenase catalisa a conversão de malato a oxaloacetato tendo importante função de produção de NADH para o ciclo de Krebs e geração de oxaloacetato, para biossíntese de aminoácidos (TUNES et al., 2011) e, durante o desenvolvimento, as sementes necessitam de maior suprimento energético, com isso a atividade respiratória nesses tecidos é mais intensa (TAIZ e ZEIGER, 2013). Essa é uma possível explicação para a atividade da enzima no primeiro dia de embebição, dando a ideia de que nessa fase os transcritos são remanescentes do processo de desenvolvimento. Segundo Bewley et al. (2013), a respiração é intensa nos estádios iniciais da germinação e é possível que, pelo menos durante esse período, a germinação aconteça utilizando apenas mRNA residual.

Ao quinto dia de embebição a baixa atividade da enzima pode estar atrelada aos resultados de expressão obtidos para a enzima álcool desidrogenase, que está presente nessa fase da germinação, e é responsável pela respiração anaeróbica, indicando que a atividade da malato desidrogenase (responsável pela respiração aeróbica) nesse momento não é necessária. Conforme já mencionado, YU et al. (2014) afirmaram que a energia fornecida no início do processo de germinação se dá principalmente pela respiração anaeróbica. Botha et al. (1992) citaram que a atividade da enzima malato desidrogenase é caracterizada por aumentar após a embebição seguida de declínio várias horas depois, indicando um possível papel dessa enzima durante a germinação.

A partir dos 10 dias de embebição há aumento da atividade de malato desidrogenase que continua até os 15 dias, onde se observa novamente alta

expressão da enzima, provavelmente pela intensa respiração, já que a fase culmina com o pico da germinação (74%), e o processo de respiração e transcrição de RNA continuam ocorrendo após a germinação (Fase III), segundo Bewley et al. (2013).

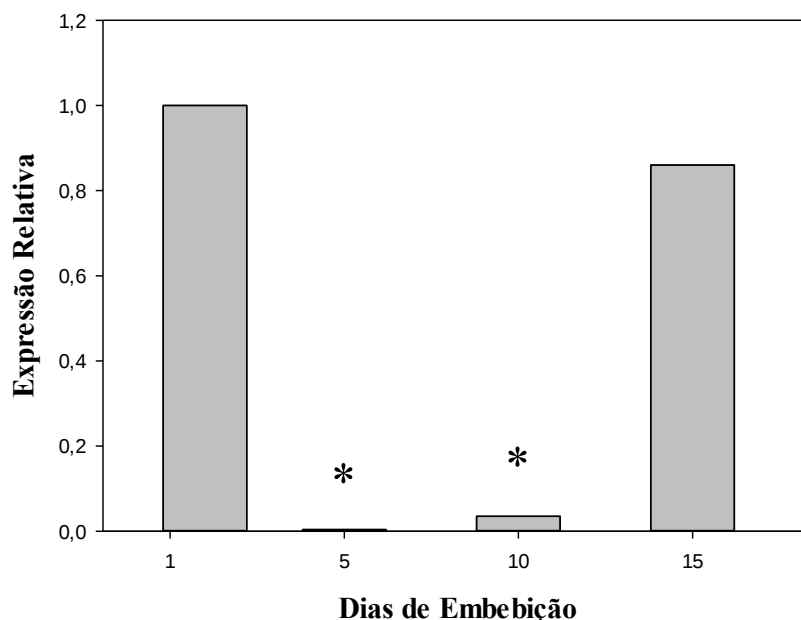


Figura 10. Expressão relativa do gene malato desidrogenase no embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* durante o processo de germinação. Valores significativos estão indicados com um asterisco (*).

Resultados semelhantes foram encontrados por Yu et al. (2014), que durante a germinação de sementes de trigo, observaram aumento progressivo da expressão da enzima malato desidrogenase. Segundo os autores, esse gene, que está relacionado com o metabolismo energético, foi expresso no início do processo, germinativo indicando a ativação das atividades respiratórias nas mitocôndrias e liberação de ATP.

Kim e Smith (1994) explanaram que a expressão do gene MDH aumentaram nos cotilédones de pepino imediatamente após embebição das sementes, seguido de um declínio no nível de mRNAs, que posteriormente, aumentaram novamente. Os autores explicaram que o primeiro pico corresponde ao tempo em que a atividade do ciclo glicoxilato é alta, e as reservas lipídicas de sementes estão sendo mobilizadas. O

segundo pico corresponde ao período em que a fotossíntese e fotorrespiração estão ocorrendo.

Albuquerque et al. (2009) verificaram aumento na atividade da enzima malato desidrogenase durante a germinação de um dos lotes de sementes de sucupira-preta. Segundo os autores, esse comportamento pode estar atrelado à recuperação de mitocôndrias com a indução dos reparos durante a germinação.

Em análise dos padrões enzimáticos de sementes e plântulas de cevada, Tunes et al. (2011) observaram maior expressão da enzima malato desidrogenase, nas sementes. Sua atividade foi mais intensa nos primeiros estádios do processo de germinação, em que a síntese de novos tecidos da semente requer mais energia para o crescimento. Nas plântulas, a enzima MDH apresentou-se com menor número e intensidade de bandas, indicando menor atividade respiratória nessa condição.

Malone et al. (2007), estudando o sistema isoenzimático da enzima malato desidrogenase em sementes de arroz durante a germinação, observaram 4 alelos, sendo que *MDH 1*, *MDH 2* e *MDH 4* foram apenas expressos em sementes secas em todos os ecótipos analisados. O alelo que apresentou maior diferencial de expressão foi o alelo *MDH 3*, sendo expresso aos 0, 3, 6 e 15 dias. Os autores citam que esses resultados concordam com a hipótese de que a maior expressão da enzima MDH está associada com a síntese de novos tecidos nos estádios iniciais do desenvolvimento.

A expressão de actina no embrião de sementes de lobeira foi 1,6 e 1,2 vezes menor que no tratamento controle aos 5 e 10 dias de embebição, respectivamente, não diferindo estatisticamente do mesmo. Aos 15 dias de embebição a expressão foi 2,6 vezes menor, diferindo do tratamento controle (Figura 11). É possível inferir que a expressão deste gene segue um perfil constante até os 10 dias de embebição, e diminui aos 15 dias, conforme a protrusão acontece.

McDowell et al. (1996), estudando a expressão do gene *ACT7* em *Arabidopsis*, explicaram que houve relação entre a expressão deste gene e a expansão celular, assim como Seagull et al. (1987), os quais sugeriram que mudanças dinâmicas na actina foram responsáveis pela expansão das células em plantas.

Segundo Brunner et al. (2004), pesquisas na literatura revelam que genes como actina, tubulina, entre outros, são bastante utilizados como genes de referência em estudos de expressão gênica em plantas utilizando ensaios de PCR em tempo real, fato este que pode estar relacionado a expressão constante nos tecidos avaliados. Além disso,

durante o processo germinativo, o início das fases II e III da germinação não implica na paralisação das anteriores, de modo que a semente pode apresentar simultaneamente as três fases (MARCOS FILHO, 2005). Os resultados obtidos neste trabalho indicam que há expansão das células durante todos os tempos avaliados, precedendo a divisão celular para que haja a protrusão da radícula, justificando a expressão constante de actina durante a embebição.

Li et al. (2005) verificaram a expressão de actina em tecidos vegetais de algodão, com os genes *GhACT1*, *GhACT2*, *GhACT4*, *GhACT5* e *GhACT11*, sendo predominantes nas células das fibras, sendo que o gene *GhACT1* foi expresso especialmente na fase de alongamento dessas células. COSTA (2009), utilizando a técnica de PCR identificou a expressão do gene *ACT2*, que está envolvido no processo de germinação das sementes de pinhão manso, em todas as sementes embebidas em água durante 24, 48, 72 e 96 horas. McDowell et al. (1996) não verificaram a expressão do gene *ACT7* durante o desenvolvimento de embriões de *Arabidopsis*, porém, foi detectada alta expressão após a secagem no final da maturação, que persistiu durante a embebição.

Entretanto, José et al. (2009) observaram aumento da expressão do gene *ACT2* em sementes de *Magnolia ovata* durante a embebição. Farias et al. (2014) analisaram a expressão de actina no embrião das sementes de café e verificaram que a expressão não aumentou significativamente nos três primeiros dias quando embebidas em água, o que, todavia, ocorreu aos seis dias, seguido de uma redução da quantificação relativa aos nove dias de embebição. An et al. (1996), ao avaliarem a expressão conservada de actina em plantas de *Arabidopsis*, verificaram variações na expressão dos genes *ACT1-GUS* e *ACT3-GUS*, sendo que a expressão foi observada preferencialmente no pólen, tubos polínicos e em todos primórdios de órgãos, incluindo raízes, brotos, e inflorescência.

Segundo Gilliland et al. (2003), o gene *ACT7* participa da divisão e expansão celular, afetando a protusão da radícula e o crescimento de plântulas. Por esse motivo, uma deficiência em actina pode dificultar o afrouxamento dos tecidos de cobertura da semente e impedir expansão adequada da radícula, prejudicando a protrusão. Os mesmos autores sugeriram ainda que, provavelmente, *ACT7* é o principal gene de actina envolvido no controle do crescimento da ponta da radícula e divisão celular.

É provável que a queda na expressão aos 15 dias de germinação tenha ocorrido, pois, conforme descrito na metodologia, foram isolados embriões de sementes não germinadas. Dessa forma, presume-se que as sementes não germinadas nesse

período fossem aquelas com metabolismo lento, justificando a lenta expansão celular. Além disso, vale enfatizar que as sementes de *Solanum lycocarpum* possuem dormência (PINTO et al., 2007), acentuando ainda mais essa questão.

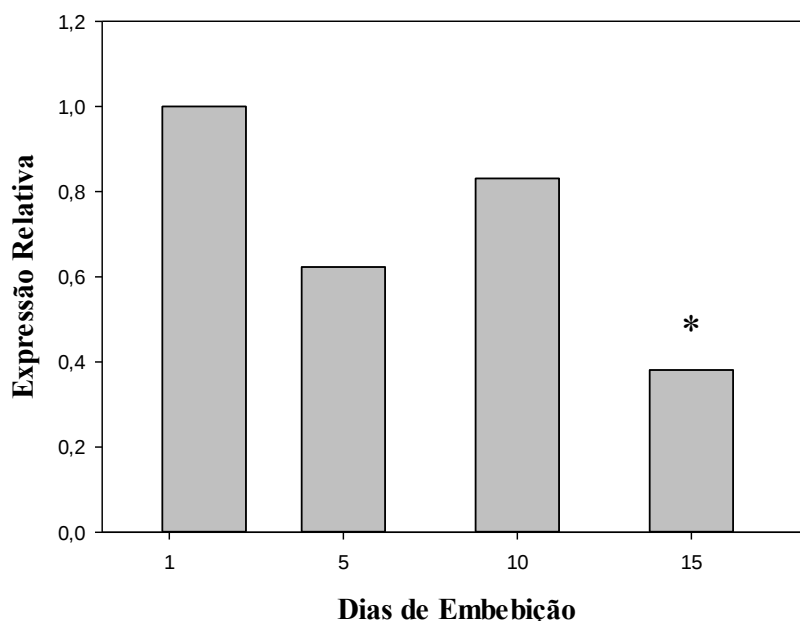


Figura 11. Expressão relativa do gene actina no embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* durante o processo de germinação. Valores significativos estão indicados com um asterisco (*).

A expressão da enzima ciclina foi 0,43 vezes maior que o tratamento controle aos cinco dias de embebição, 1,17 vezes aos 10 dias e 0,16 aos 15 dias de embebição e não diferiram do tratamento controle em nenhum dos tempos avaliados (Figura 12). Embora não significativo, pode-se dizer que o perfil de expressão da ciclina para sementes de lobeira apresenta um pico de expressão aos 10 dias de embebição, que coincide com o momento da protrusão da radícula.

As Cdks (quinases dependentes de ciclinas) são ativadas e inativadas ao longo do ciclo celular, promovendo, em consequência, padrões cíclicos de fosforilação de proteínas que desencadeiam ou regulam os principais eventos do ciclo. A atividade das Cdks oscila em resposta à associação com proteínas regulatórias denominadas ciclinas, que apresentam padrão cíclico de acúmulo e degradação durante o ciclo, sendo periodicamente sintetizadas ao longo de todo o período interfásico e

degradadas rapidamente no final da mitose (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013). De um modo geral, a síntese de ciclinas e a consequente ativação de Cdk sempre resultam na fosforilação de proteínas específicas que promovem a progressão do ciclo celular (CARVALHO e RECCO-PIMENTEL, 2007).

A expressão não significativa aos cinco dias de embebição pode ser explicada, pois, nesse momento, que precede a protrusão, não há intensa divisão celular, conforme indicam os resultados da expressão de actina, o crescimento nesse momento é marcado pela expansão celular. Segundo Bewley et al. (2013), há ampla evidência de que em muitas espécies a conclusão da germinação ocorre na ausência da mitose, a qual ocorre mais tarde, durante o subsequente crescimento da radícula.

Os resultados de expressão aos 10 dias aliados aos resultados de germinação dão a ideia de que, a tendência de aumento observada está ligada ao momento da protrusão da radícula, onde há intensa divisão celular. De acordo com Bewley et al. (2013), a protrusão da radícula se dá pelo alongamento celular e é seguida quase que imediatamente por seu crescimento, devido à divisão celular e alongamento das células recém-formadas. Assim, a divisão celular é um fenômeno pós-germinação, contribuindo para o crescimento do eixo e estabelecimento das plântulas.

Nurse e Bisset (1981), trabalhando com mutantes da levedura *Schizosaccharomyces pombe*, verificaram que o gene *CDC2* participa do controle do ciclo celular, e atua em dois pontos independentes: é necessário na fase G1 para a divisão celular e em G2, para o controle da mitose. Em arroz transgênico com a superexpressão de uma proteína que inibe a atividade da Cdk, foi verificada inibição do enchimento de grãos e, portanto, da produção de sementes, indicando que a inibição de Cdk diminui a produção de células, por inibir a progressão do ciclo celular (BARRÔCO et al., 2006).

Fukuhara et al. (1999) analisaram a expressão de transcritos relacionados ao gene *CDC2* durante a germinação precoce e tardia de sementes de *Mesembryanthemum crystallinum* e observaram aumento de transcritos após a absorção de água em sementes germinando precocemente e ausência em sementes de germinação tardia. Gendreau et al. (2008) estudaram a expressão de quinases dependentes de ciclina e ciclinas durante a germinação no embrião de sementes de cevada e concluíram que a hidratação dos embriões resultou na indução do ciclo celular. Além disso, foi verificado aumento progressivo de *CDKB1* e *CDKD1* durante a embebição. O aumento na expressão das ciclinas *CYCA3* e *CYCB1* foi observado após seis e 12 horas de embebição

respectivamente, sendo que a protrusão da radícula ocorreu após 12 horas de embebição. Os mesmos autores concluíram que a progressão do ciclo celular é regulada pela associação de quinases e ciclinas.

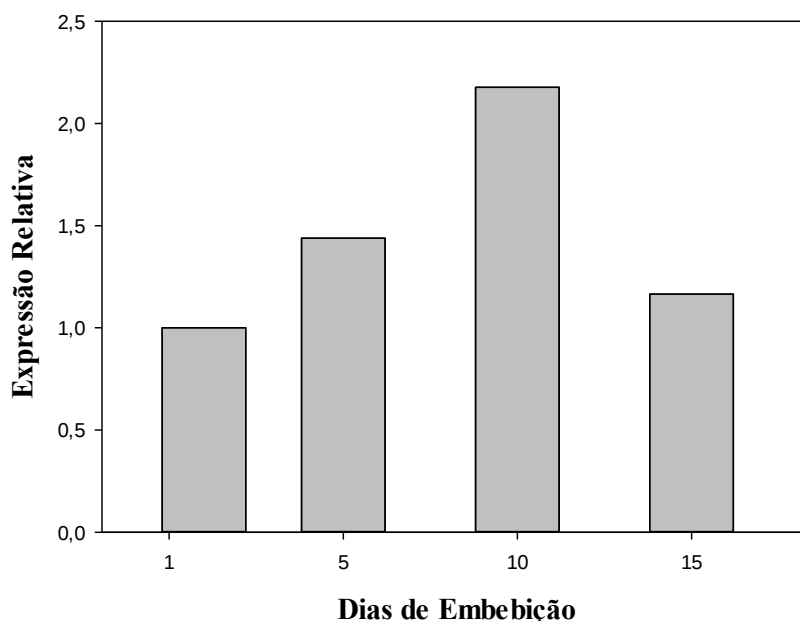


Figura 12. Expressão relativa do gene ciclina no embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* durante o processo de germinação.

Farias et al. (2014) analisaram a expressão do gene de quinase dependente de ciclina durante a germinação de sementes de café e verificaram uma estabilidade de expressão até o sexto dia de embebição, seguido de um aumento expressivo aos nove dias, momento da protrusão da radícula. Os autores explicaram que durante a embebição, a fase II é alcançada pelas sementes de café quando a atividade das ciclinas é inibida por quase toda fase G1, devido a mecanismos celulares que inibem sua reativação. Superada esta inibição, a enzima em estudo reativa seus mecanismos celulares, ocorrendo divisões e diferenciação celular (fase III).

Outros autores comprovam ainda, a relação das ciclinas com o controle da divisão celular através de induções de estresse, com o intuito de verificar se há a paralisação da atividade mitótica e, portanto, menor expressão de ciclinas. Schuppler et al. (1998) propuseram que o estresse hídrico sinaliza a ação do gene *CDC2* pelo aumento

da fosforilação de tirosina, mudando para a forma inibida e retardando a produção de células, relacionando a atividade mitótica à regulação do gene *CDC2*.

Em sementes de *Magnolia ovata* houve redução nos níveis de mRNAs de *CDC2* quando as sementes foram submetidas à secagem a baixa quantidade de água. Entretanto, quando as mesmas foram embebidas, os níveis de transcritos aumentaram, mesmo em sementes que foram secadas, as quais tinham baixa viabilidade (JOSÉ et al., 2009). Reichheld et al. (1999), analisando o efeito do estresse oxidativo em plântulas de tabaco, sugeriram que esse tipo de estresse inibe a divisão celular no meristema radicular via paralisação específica nas fases G1 e G2, fazendo com que as células permaneçam nessas duas fases, sem avançar. Os autores verificaram ainda que concomitantemente com essa paralisação houve inibição de genes relacionados ao ciclo celular, como as ciclinas.

A queda na expressão de ciclina aos 15 dias, assim como ocorrido para a expressão do gene de actina, pode estar relacionada às questões da metodologia do trabalho, onde foram isoladas apenas as sementes não germinadas as quais, presume-se que possuíam metabolismo lento, acentuada pela dormência conforme já mencionado, daí a menor expressão de ciclina.

A expressão do gene *sHSPs 17.6* teve um decréscimo não significativo de 1,47 vezes aos cinco dias de embebição seguido de um decréscimo significativo a partir dos 10 dias de embebição, permanecendo baixa até os 15 dias, com valores de expressão 4,25 e 5,71 vezes menor que o tratamento controle aos 10 e 15 dias, respectivamente (Figura 13). Dessa forma, o perfil encontrado para o gene *sHSP 17.6* foi de expressão constante até os cinco dias de embebição e queda na expressão a partir dos 10 dias, coincidindo com o momento da protrusão da radícula.

A tolerância à dessecação em sementes ortodoxas é adquirida durante o desenvolvimento e perdida durante a embebição/germinação (FARIA et al., 2005). As proteínas sHSPs desempenham sua função durante o estresse térmico por manter ou restaurar a estrutura de proteínas e prevenir sua irreversível desnaturação, podendo exercer função similar no momento da aquisição de tolerância a dessecação. O papel específico que elas desempenham durante a tolerância à dessecação ainda não é totalmente conhecido, porém sugere-se que elas façam parte de um grupo de grandes e pequenas moléculas que interagem com as células no sentido de assegurar que não haja danos no momento em que a água é retirada da semente (BEWLEY et al., 2013).

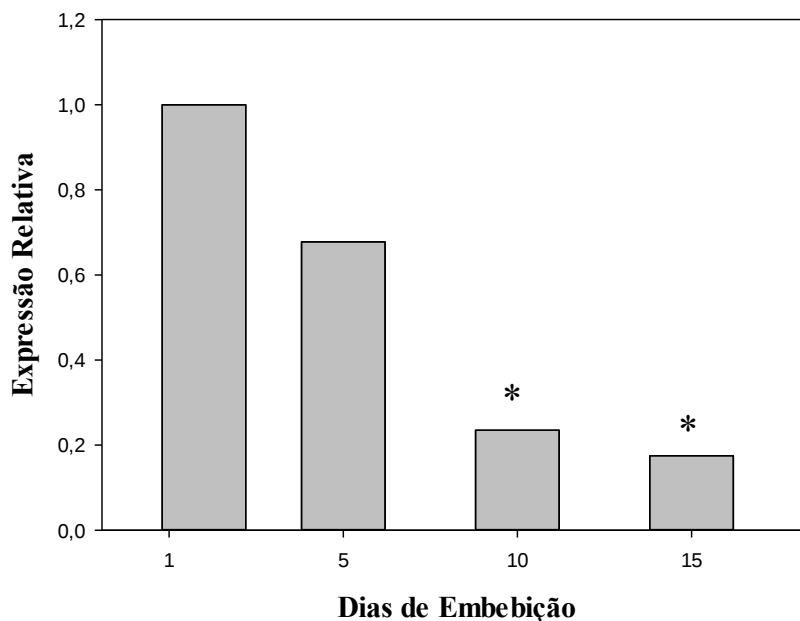


Figura 13. Expressão relativa do gene *heat shock protein 17.6* no embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* durante o processo de germinação. Valores significativos estão indicados com um asterisco (*).

Quando as sementes são colocadas em ambiente propício para a germinação, tem início a hidratação; as células embrionárias mantêm a capacidade de tolerância à desidratação durante a primeira etapa da embebição, mas a redução do suprimento de água ou a sua paralisação provocam prejuízos crescentes e proporcionais à evolução da atividade metabólica das sementes (MARCOS FILHO, 2005). Segundo Bewley et al. (2013), dentre os genes que aumentam a sua expressão durante a maturação e a secagem, podem ser citadas as proteínas de choque térmico, as quais têm sua síntese aumentada antes da perda de água no final da maturação. O aumento dos transcritos no momento da perda de água provavelmente acontece para que seus produtos sejam traduzidos no início da germinação.

Levando em conta as informações descritas sobre o processo de germinação e a tolerância à dessecação aliadas ao fato de que, sementes de *Solanum lycocarpum* são dispersas em ambiente de cerrado, onde condições estressantes, principalmente em relação à falta de água, são observadas em determinadas épocas do ano (ELIAS et al., 2003), a expressão do gene *sHSP 17.6* aos um e cinco dias de embebição, indica que ele pode estar envolvido em uma das estratégias que, atuando em conjunto com

outros fatores, permitem que as sementes germinem sob situações de estresse encontradas em seu ambiente de dispersão durante o início da germinação.

Resultados semelhantes foram encontrados por José et al. (2009), que estudando a expressão de genes durante a secagem e embebição, concluíram que o padrão de expressão do gene *sHSP 17.5* sugere a participação deste gene em mecanismos de proteção durante a embebição de sementes de *Magnolia ovata*. Assim como Hoekstra et al. (2001), que relatam que *sHSPs* podem atuar como chaperonas moleculares durante a desidratação de sementes e nos primeiros dias de reidratação. Além disso, Marques (2012), trabalhando com *Physalis angulata* L., espécie quem também pertence à família das Solanáceas, obteve valores de expressão próximo a 1,0 para os genes de *sHSP 17.6* e *18.7* em sementes embebidas em água por 24 horas. O mesmo autor verificou que ambas as proteínas tiveram a expressão induzida quando germinadas em situação de estresse osmótico.

Os resultados de expressão de *sHSP 17.6* obtidos neste trabalho, se comparados aos de germinação, permitem inferir que a queda na expressão a partir do momento da protrusão da radícula reforça a ideia já mencionada de que as proteínas de choque térmico estão ligadas à proteção das sementes sob condições adversas durante a embebição, e que a menor atuação dessas proteínas coincide com o momento em que as sementes perdem mecanismos de tolerância à dessecação. Além disso, verificou-se aumento de divisões celulares, mostrada pelo aumento nos valores de expressão de ciclina, ao mesmo tempo em que a expressão de *sHSP 17.6* diminui e, segundo Marcos Filho (2005), a fase intolerante se acentua com o aumento das divisões celulares que caracterizam a retomada do crescimento embrionário.

Wehmeyer et al. (1996) verificaram que *sHSP 17.6* são expressas durante o desenvolvimento da semente de *Arabidopsis* em um padrão semelhante ao observado em outras espécies: são detectadas pela primeira vez em meados de maturação, se tornando mais abundantes em sementes secas e declinam durante a germinação. Wehmeyer e Vierling (2000) sugerem que as *sHSPs* tem papel geral de proteção para as sementes e que há redução nas *sHSPs* conforme as sementes perdem a tolerância à dessecação, indicando ainda que a expressão do gene *sHSP 17.4* pode prevenir a agregação irreversível de proteínas durante a dessecação e/ou auxiliar no reenrolamento de proteínas desnaturadas durante a embebição. Resultados semelhantes foram encontrados por Soeda et al. (2005), os quais observaram queda na expressão do gene *sHSP 17.6* durante a

germinação em sementes de *Brassica oleraceae*. Kotak et al. (2007) analisaram a expressão dos genes *HSP 17.4* e *HSP 17.7* durante o desenvolvimento e a embebição de sementes de *Arabidopsis* e concluíram que os níveis de transcritos de *HSP* foram bastante afetados pela embebição. O padrão de expressão encontrado pelos autores foi de aumento durante o desenvolvimento, com pico de expressão em sementes secas e queda com o avanço do processo de embebição.

A expressão do gene glutationa-S-transferase foi 4,7, 8,6, e 20,4 vezes menor que o tratamento controle aos cinco, 10 e 15 dias respectivamente, diferindo significativamente do mesmo em todos os tempos avaliados (Figura 14). Sendo assim, é possível inferir que a expressão desse gene é baixa durante a germinação de sementes de lobeira e decresce conforme ela progride.

Segundo Marrs (1996), dentre as funções exercidas pela enzima glutationa-S-transferase, pode ser citada sua ação em resposta ao estresse, incluindo o oxidativo. Como essa enzima está envolvida com o estresse, é provável que a maior expressão no início da embebição tenha sido remanescente de transcritos acumulados durante o desenvolvimento para auxiliar na proteção de algum estresse causado pela secagem no final do desenvolvimento da semente.

Conforme descrito por Weitbrecht et al. (2011), muitos transcritos abundantes em sementes secas refletem a transcrição durante a maturação da semente. Durante as fases de absorção de água I e II grandes alterações metabólicas ocorrem em sementes, o metabolismo é reativado com enzimas que foram armazenadas na semente durante a maturação. De acordo com Barbedo e Marcos Filho (1998), enzimas associadas exclusivamente a processos pós-germinativos têm sua produção induzida pela secagem da semente durante seu processo de desenvolvimento/maturação. Marcos Filho (2005), explica que a retomada do crescimento é controlada via porções ativas do genoma, de modo que o RNAm sintetizado no fim da maturação é responsável pelo fluxo inicial de informações genéticas, em seguida novos RNAm são sintetizados. Bewley et al. (2000) também explicaram que a retomada metabólica se utiliza da estrutura e dos componentes enzimáticos pré-existent nas sementes, que foram conservados durante o período de quiescência.

Em muitos casos os transcritos mais abundantes em sementes secas são rapidamente degradados após a embebição (WEITBRECHT et al., 2011). Além disso, as enzimas e metabólitos exibem suas funções somente após a hidratação do meio em que

estão (VOET e VOET, 2004 apud GUIMARÃES et al., 2008). Sendo assim, é provável que a queda na expressão após a embebição tenha ocorrido por esse motivo, já que as sementes germinaram em condições em que não há estresse, assim, as enzimas não precisaram atuar. Yildirim et al. (2011) avaliaram a tolerância ao estresse salino na germinação e emergência de *Physalis peruviana* e concluíram que a espécie, que também pertence à família das Solanáceas é tolerante ao estresse salino durante a germinação, mas torna-se sensível na emergência e estádios iniciais das plântulas.

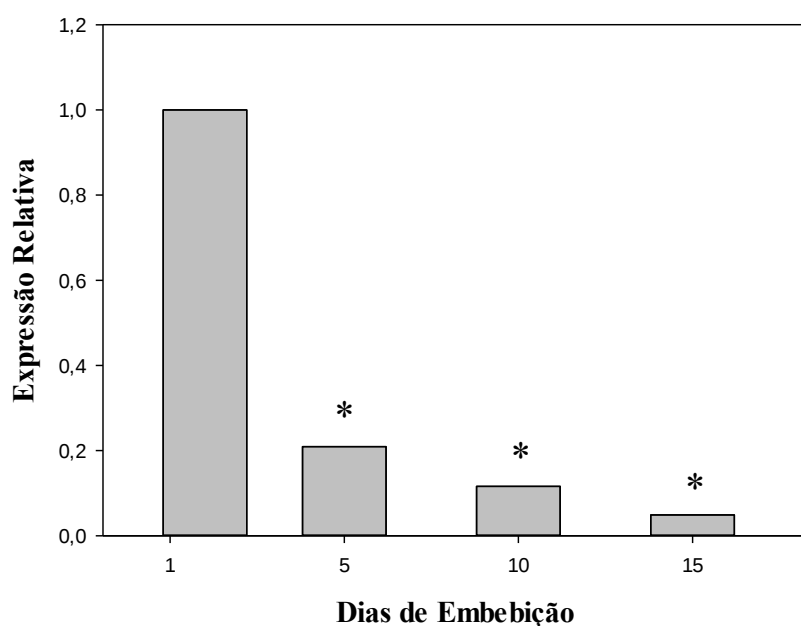


Figura 14. Expressão relativa do gene glutathione-S-transferase no embrião de sementes de *Solanum lycocarpum* durante o processo de germinação. Valores significativos estão indicados com um asterisco (*).

Os resultados disponíveis na literatura reforçam a ideia de que a expressão do gene *GST* está ligada a condições estressantes e, muitas vezes, é induzida nessas situações. Roxas et al. (2000) observaram que tratamentos de estresse térmico e salino aumentaram a peroxidação lipídica e inibiram o crescimento de plântulas selvagens, ao passo que a superexpressão do gene *GST* em plantas de tabaco transgênicas tiveram danos oxidativos reduzidos.

Souza (2009) estudou a expressão do gene *GST* em sementes de *Physalis peruviana* e não verificou influência de tratamentos de condicionamento

fisiológico, sendo que a expressão foi maior em sementes secas. Quando foi avaliada a expressão na parte aérea e raízes de plântulas com 10 dias oriundas de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas, foi verificada a indução da expressão do gene naquelas submetidas às soluções salinas. O autor afirma que é possível que o osmocondicionamento tenha favorecido a expressão do gene *GST* e que o aumento da expressão provavelmente contribuiu para a síntese de enzimas antioxidantes, que protegeram as plântulas do efeito da salinidade e danos oxidativos.

Jha et al. (2011) estudaram os perfis de expressão do gene *SbGST* em plantas de tabaco sob diferentes condições abióticas de estresse e verificaram que a superexpressão do gene coincidiu com a alta germinação das sementes transgênicas e sobrevivência maior em relação ao tipo selvagem, indicando que a expressão desse gene foi induzida por diferentes estresses e que o mesmo desempenhou uma função vital na tolerância a esses estresses. Sendo assim, os autores concluíram que a superexpressão de *GST* provavelmente está ligada à melhoria no crescimento de plantas, especialmente quando essas são expostas a condições estressantes.

Segundo Bewley et al. (2013), a elevada taxa respiratória em tecidos intolerantes à dessecação, pode resultar em aumento da geração de espécies reativas de oxigênio e subsequente lesão oxidativa. Embora as sementes estivessem respirando durante o processo de embebição, momento onde os tecidos perdem a tolerância à dessecação, os resultados obtidos excluem a participação da enzima glutathione-S-transferase nesse sentido, indicando a atuação de outro mecanismo de reparo nesse caso.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os perfis de expressão gênica nos embriões de sementes de *Solanum lycocarpum* St. Hill obtidos durante a germinação foi possível verificar que, as sementes de lobeira ativam o metabolismo para a respiração, divisão e expansão celular durante o crescimento do embrião e que, além disso, atuam nas sementes mecanismos de proteção a estresses que podem ocorrer durante o processo de germinação.

8. CONCLUSÃO

Durante a germinação de sementes de lobeira a expressão de genes relacionados à respiração anaeróbica e tolerância à dessecação como o *ADH* e *HSP 17.5* respectivamente, é constante durante a embebição e diminui após a protrusão da radícula. Já a expressão do gene *ACT7*, responsável pela expansão celular, é constante durante todo o processo de embebição.

A expressão de ciclina (*CDC2*) aumenta durante a embebição, com pico que coincide com a protrusão da radícula, momento de intensa divisão celular.

O gene *GST* tem expressão reduzida após o início da embebição, fase em que há perda da tolerância à dessecação, decrescendo conforme o processo germinativo acontece.

O gene *MDH*, envolvido com a respiração aeróbica, apresenta queda após o início da embebição, porém, tem sua expressão aumentada conforme a germinação progride.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado**: Espécies Vegetais Úteis. Planaltina: EMBRAPA - CPAC, 1998. 464 p.

ALBUQUERQUE, K. S. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a embebição de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides kunth.*). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 12-19, 2009.

AN, Y. et al. Conserved expression of the Arabidopsis ACT1 and ACT3 actin subclass in organ primordial and mature pollen. **The Plant Cell**, v. 8, p. 15-30, 1996.

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

BARBEDO, C. J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação de sementes. **Acta Botanica Brasilica**, v. 12, p. 145-164, 1998.

BARRÔCO, R. M. et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor Orysa; KRP1 plays an important role in seed development of rice. **Plant Physiology**, v. 142, p. 1053-1064, 2006.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 455 p.

BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, v. 9, n. 7, p. 1055-1066, 1997.

BEWLEY, J. D. et al. Reproductive Development. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockeville: American Society of Plant Phytologist, 2000, p. 988-1043.

BEWLEY, J. D. et al. **Seeds**: Physiology of development, germination and dormancy, 3. ed. New York: Springer, 2013. 392 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Normas climatológicas**: 1961-1990. Brasília, 1992. 84p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395 p.

BOTHA, F. C.; POTGIETER, G. P.; BOTHA, A.-M. Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. **Plant Growth Regulation**, v. 11, p. 211-224, 1992.

BRUNNER, A. M.; YAKOVLEV, I. A.; STRAUSS, S. H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. **BMC Plant Biology**, v. 4, n. 14, 2004.
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC515301/>>. Acesso em: nov. 2014.

BUSTIN, S. A. et al. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 597-601, 2005.

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula**. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. 380 p.

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

CASTRO, E. R.; GALETTI, M. Frugivoria e dispersão de sementes pelo lagarto teiú *Tupinambis merianae* (Reptilia: Teiidae). **Papeis Avulsos de Zoologia**, v. 44, n. 6, p. 91-91, 2004.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; PERES, L. E. P. **Manual de fisiologia vegetal**: teoria e prática. 1. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 640 p.

CHEN, F.; BRADFORD, K. J. Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. **Plant Physiology**, v. 124, n. 3, p. 1265-1274, 2000.

CHUNG, H-J.; FERL, R. J. *Arabidopsis* alcohol dehydrogenase expression in both shoots and roots is conditioned by root growth environment. **Plant Physiology**, v. 121, n. 2, p. 429-436, 1999.

CLEMENTE, A. C. S. **Expressão de genes associados à rota biossintética do ácido abscísico, giberelina e etileno durante o desenvolvimento e germinação de sementes de alface**. 2012. 97 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

CLERICI, M. T. P. S. et al. Physical, chemical and technological characteristics of *Solanum lycocarpum* A. St. - HILL (Solanaceae) fruit flour and starch. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2143-2150, 2011.

CONLEY, T. T.; PENG, H. P.; SHIH, M. C. Mutations affecting induction of glycolytic and fermentative genes during germination and environmental stresses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 119, n. 2, p. 599-608, 1999.

COSTA, M. J. C. **Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.): aspectos sócio-econômicos e a fisiologia de sementes**. São Cristóvão, 2009. 80 p. Dissertação (Mestrado em Agrossistemas), Núcleo de Pós-Graduação e Estudos em Recursos Naturais, Universidade Federal de Sergipe, 2009.

DALL-AGNOL, R.; VON-POSER, G. L. The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the case of *Solanum lycocarpum* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1/2, p. 337-341, 2000.

DE CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Armed, 2004. p. 149-162.

DEEPAK, S. A. et al. Real-time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes. **Current Genomics**, v. 8, n. 4, p. 234-251, 2007.

DALPONTE, J. C.; LIMA, E. S. Disponibilidade de frutos e a dieta de *Lycalopex vetulus* (Carnivora - Canidae) em um cerrado de Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 325-332, 1999.

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.

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. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10725-014-9960-6#page-1>>. Acesso em: out. 2014.

FARIAS, E. T. et al. Expression studies in the embryo and in the micropylar endosperm of germinating coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seeds. **Plant Growth Regulation**, 2014.

FIELD, K. G. et al. Molecular phylogeny of the animal kingdom. **Science**, v. 239, p. 748-753, 1988.

FUKUHARA, T.; KIRCH, H.-H.; BOHNERT, H. J. Expression of Vp1 and water channel proteins during seed germination. **Plant, Cell and Environment**, v. 22, n. 4, p. 417–424, 1999.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 402, p. 1445-1454, 2004.

GENDREAU, E. et al. Regulation of cell cycle activity in the embryo of barley seeds during germination as related to grain hydration. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 2, p. 203-212, 2008.

GILLILAND, L. U. et al. Arabidopsis actin gene ACT7 plays an essential role in germination and root growth. **The Plant Journal**, v. 33, p. 319-328, 2003.

GUIMARÃES, M. A.; DIAS, D. C. F. S.; LOUREIRO, M. E. Hidratação de sementes. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 2, n. 1, p. 31-39, 2008.

HILHORST, H. W. M. et al. The tomato seed as a model to study seed development and germination. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 47, p. 169–183, 1998.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Plant Science**, v.6, n.9, p. 431-438, 2001.

ISMAIL, A. M. et al. Mechanisms associated with tolerance to flooding during germination and early seedling growth in rice (*Oryza sativa*). **Annals of Botany**, v. 103, n. 2, 197–209, 2009.

JHA, B.; SHARMA, A.; MISHRA, A. Expression of *SbGSTU* (tau class glutathione S-transferase) gene isolated from *Salicornia brachiata* in tobacco for salt tolerance. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 7, p. 4823-4832, 2011.

JOSÉ, A. C. et al. Changes in gene expression during drying and imbibition of desiccation sensitive *Magnolia ovata* (A. St.-Hil.) Spreng. seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 270-280, 2009.

JOSHI, M.; DESHPANDE, J. D. Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. **International Journal of Biomedical Research**, v. 2, n.1, p. 81-97, 2010.

JUNQUEIRA L. C. U.; CARNEIRO J. **Biologia Celular e Molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2013. 364 p.

KIM, D-J.; SMITH, S. M. Expression of a single gene encoding microbody NAD-malate dehydrogenase during glyoxysome and peroxisome development in cucumber. **Plant Molecular Biology**, v. 26, n. 6, p. 1833-1841, 1994.

KOTAK, S. et al. A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 19, n. 1, p. 182–195, 2007.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria Geral da OEA, 1983, 174 p.

LABOURIAU, L. G.; AGUDO, M. On the physiology of seeds germination in *Salvia hispanica* L. I. temperature effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 59, n. 1, p. 37-56, 1987.

LI, X. et al. The cotton ACTIN1 gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation. **The Plant Cell**, v.17, n. 3, p. 859-875, 2005.

LIN, J. M.; SUNG, J. M. Pre-sowing treatments for improving emergence of bittergourd seedlings under optimal and sub-optimal temperatures. **Seed Science and Technology**, v. 29, n. 1, p. 39–50, 2001.

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.

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.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MALONE, G. et al. Expressão diferencial de isoenzimas durante o processo de germinação de sementes de arroz em grandes profundidades de semeadura. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p. 61-67, 2007.

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

MARQUES, A. C. S. S. **Expressão de genes associados à restrição hídrica em sementes de *Physalis angulata* L. (SOLANACEAE)**. 2012. 61 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2012.

MCDOWELL, J. M. et al. The Arabidopsis ACT7 Actin gene is expressed in rapidly developing tissues and responds to several external stimuli. **Plant Physiology**, v. 111, n. 3, p. 699-711, 1996.

MARRS, K. A. The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 127–158, 1996.

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459-81, 2007.

MULLIS, K. B. The polymerase chain reaction in an anemic mode: how to avoid cold oligodeoxyribonuclear fusion. **Genome Research**, v. 1, n. 1, p. 1-4, 1991.

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

NACHTIGALL, P. G. **Perfil de expressão e organização genômica de microRNAs músculo- específicos na tilápia no Nilo *Oreochromis niloticus***. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Genética) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

NURSE, P.; BISSET, Y. Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. **Nature**, v. 292, p. 558–560, 1981.

OLIVEIRA JUNIOR, E. N. et al. Análise nutricional da fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) durante o amadurecimento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 4, p. 846-851, 2003.

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. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/content/30/9/e36.long>>. Acesso em: out. 2014.

PINES, J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. **Biochemical Journal**, v. 308, p. 697–711, 1995.

PINTO, F. S. **Efeitos da dispersão de sementes por animais e dos fatores edáficos sobre a germinação, crescimento e sobrevivência das plântulas de lobeira, *Solanum lycocarpum***. 1998. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 1998.

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

QUEITSCH, C. et al. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 12, n. 4, p. 479-492, 2000.

REICHHELD, J. et al. Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. **Plant Journal**, v.17, n. 6, p. 647-656, 1999.

ROXAS, V.P. et al. Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. **Plant and Cell Physiology**, v. 41, n. 11, p. 1229-1234, 2000.

RODRIGUES, F. H. G. **Biologia e Conservação do lobo-guará na Estação Ecológica de Águas Emendadas**. 2002. 96 f. Tese (Doutorado em Ecologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

SACHS, M.; FREELING, M.; OKIMOTO, R. The anaerobic proteins in maize. **Cell Press**, v. 20, n. 3, p. 761-767, 1980.

SANTOS, H. O. **Qualidade fisiológica e expressão de genes durante o desenvolvimento de sementes de pimenta habanero (*Capsicum chinense* JACQUIM)**. 2013. 70 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. Análise estatística na germinação. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 205-237, 2000.

SEAGULL, R. W.; FALCONER, M.; WEERDENBURG, C. A. Microfilaments: dynamic arrays in higher plant cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 104, p. 995-1004, 1987.

SCHUPPLER, U. et al. Effect of water stress on cell division and Cdc2-like cell cycle kinase activity in wheat leaves. **Plant Physiology**, v. 117, n. 2, p. 667-678, 1998.

SILVA, J. A. et al. **Frutas nativas dos cerrados**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 166 p.

SILVEIRA, P. S. **Estudos fisiológicos e moleculares durante a superação da dormência morfológica de sementes de *Annona crassiflora***. 2014. 131 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2014.

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 Physiology**, v. 137, n. 1, p. 354–368, 2005.

SOUZA, R. F.; MORALES, C. P.; SPECHLER, S. J. Review article: a conceptual approach to understanding the molecular mechanisms of cancer development in Barrett's oesophagus. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 15, n. 8, p. 1087-100, 2001.

SOUZA, M O. **Expressão diferencial de genes em sementes osmocondicionadas e plântulas de *Physalis angulata* L. e prospecção de constituintes seco-esteroidais em plantas submetidas a estresse abiótico.** 2009. 92 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática.** Guia ilustrado para identificação das famílias Fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APG III. 3. ed. Nova Odessa: Plantarum. 2012. 768 p.

SOUZA, B. L. **Expressão de genes em sementes de lobeira (*Solanum lycocarpum* L. ST. Hill) submetidas ao condicionamento fisiológico.** 2014. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TUNES, L. M. et al. Expressão diferencial de isoenzimas em sementes e em plântulas F1 de cevada. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 2, n. 2, p. 31-37, 2009.

TUNES, L. M. et al. Influência dos diferentes períodos de colheita na expressão de isoenzimas em sementes de cevada. **Revista Ceres**, v.58, n. 2, p. 178-184, 2011.

TOOROP, P. E.; VAN AELST, A. C.; HILLHORST, H. W. M. The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon esculentum*) seed germinating is under control of ABA. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 349, p. 1371-1379, 2000.

VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination.** New York: Marcel Dekker, 1995. p. 237-271.

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.

VIEIRA JÚNIOR, G. et al. Anti-inflammatory effect of *Solanum lycocarpum* fruits. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 8, p. 892-896, 2003.

XIONG, L.; ZHU, J. K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic

stress. **Plant Cell & Environment**, v. 25, n. 2, p.131-139. 2002.

WALKER, C. G. et al. Evaluation of real-time PCR endogenous control genes for analysis of gene expression in bovine endometrium. **BMC Molecular Biology**, v. 10, 2009. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2199-10-100.pdf>>. Acesso em: out. 2014.

WATERS, E. R. et al. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 296, p. 325-338, 1996.

WEHMEYER, N. et al. Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. **Plant Physiology**, v. 112, n. 2, p. 747-757, 1996.

WEHMEYER, N.; VIERLING, E. The expression of small heat-shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. **Plant Physiology**, v. 122, n. 4, p. 1099-1108, 2000.

WEITBRECHT, K.; MULLER, K.; LEUBNER-METZGER, G. First off the mark: early seed germination. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 10, p. 3289-3309, 2011.

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

YU, Y. et al.: Transcriptome analysis during seed germination of elite Chinese bread wheat cultivar Jimai 20. **BMC Plant Biology**, v. 14, 2014. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2229-14-20.pdf>>. Acesso em: out. 2014.