



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E TOLERÂNCIA À  
RESTRIÇÃO HÍDRICA DE SEMENTES DE *Erythrina velutina*  
Willd.**

**JULIANA LOPES SOUZA**

**2020**





**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**JULIANA LOPES SOUZA**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E TOLERÂNCIA À RESTRIÇÃO HÍDRICA DE  
SEMENTES DE *Erythrina velutina* Willd.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Doutor em Ciências”.

Orientadora  
Profa. Dra. Renata Silva-Mann

SÃO CRISTÓVÃO  
SERGIPE – BRASIL  
2020

**JULIANA LOPES SOUZA**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E TOLERÂNCIA À  
RESTRICÇÃO HÍDRICA DE SEMENTES DE *Erythrina velutina*  
Willd.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Doutor em Ciências”.

APROVADA em 17 de fevereiro de 2020.

Profa. Dra. Luzimar Gonzaga Fernandez  
UFBA

Profa. Dra. Sheila Valéria Álvares Carvalho  
UFAL

Profa. Dra. Heloisa Oliveira dos Santos  
UFLA

Dra. Itamara Bomfim Gois  
UFS

Profa. Dra. Renata Silva-Mann  
UFS  
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO  
SERGIPE – BRASIL

*À Isolina 'Zuzu' Gomes de Souza, minha avó e  
grande incentivadora (In Memoriam)*  
**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Nos meus 12 anos como estudante na Universidade Federal de Sergipe, eu tive a oportunidade de ter muitas pessoas contribuindo para o meu crescimento pessoal e acadêmico. Eu espero poder continuar fazendo pesquisa e colaborar não somente para o avanço da ciência, mas também para que as pessoas possam fazer ciência sem deixarem de ser felizes. É a minha forma de retribuir e agradecer por todo o apoio.

Primeiramente, e sempre, agradeço a Deus por todos os momentos de calma e luz, pela proteção e acalanto.

Agradeço aos meus pais, José Gomes e Lucia Maria, por me incentivarem a seguir em frente e por valorizarem tanto a educação e a ciência. Obrigada pelo apoio e paciência nos dias que estive muito ocupada ou até mesmo ausente. Em todos os momentos que precisei, pude contar com vocês e como diz o nosso lema, “é pela família”.

Agradeço imensamente ao meu irmão, Igor, por não somente me incentivar, mas também contribuir ativamente em meus trabalhos. Obrigada por gastar os seus dedos escarificando centenas de sementes, obrigada por ficar até altas horas da noite no laboratório comigo, obrigada por levar almoço pra mim quando eu não podia sair do laboratório, obrigada por ser meu representante legal quando eu estava no doutorado sanduíche e ir ao banco resolver os problemas, obrigada por ser o melhor amigo que eu poderia ter.

Agradeço a minha orientadora, Renata “Prof.” Silva-Mann, pelos seis anos de orientação e companheirismo. Eu não sinto como se tanto tempo tivesse se passado e ter sua companhia nessa trajetória acadêmica pareceu sempre certo e garantido. Obrigada por me acolher e ter me escolhido para desbravar novos campos na atuação do GENAPLANT. Foram seis anos trabalhando para chegar nos resultados de hoje e me sinto muito feliz de termos conseguido. Afinal, sabemos o quão difícil foi persistir, mas valeu à pena. Todos os planos A, B, C e D me deram vontade de fazer também planos E, F, G, ..., Z! Muito obrigada pela inspiração.

Agradeço a todos os participantes do GENAPLANT, dos estagiários que nos ajudam aos colegas com quem colaboramos, dos pós-doutorandos aos membros honorários. Especialmente, agradeço às colegas Val e Fernanda pela amizade e companheirismo. Continuem firmes, fortes e fitness, se possível. À querida Allana, por todos os dias em que me emprestou o seu ombro amigo. Às nossas pós-doutorandas Michelle e Itamara pelos ensinamentos e pela grande amizade. À nossa ex-pós-doutoranda Sheila, muito obrigada, de coração. E agradeço a Laurinha por ter tido tanto prazer em aprender e ensinar.

A minha vida acadêmica, como pode ser evidenciado aqui, é repleta de mulheres incríveis. Dentre os seis orientadores que tive, cinco foram mulheres e todas sempre grandes fontes de inspiração. Agradeço a todas por trilharem o caminho e em especial a minha orientadora do doutorado sanduíche, Prof. Dra. Julia Kehr. Muito obrigada pela oportunidade de renovar o meu ânimo com a ciência, por ser um grande exemplo e por todos os mais surreais ‘sim’ que eu já recebi em minha vida. Agradeço também a todos do MPG da Universität Hamburg, grupo onde realizei meu doutorado sanduíche na Alemanha. Obrigada por me acolher e me ensinar, por me convidar a participar das reuniões, palestras, eventos, festas, passeios no jardim botânico e tudo mais. Obrigada Sandra, Oliver, Hanna, Malte e em especial, Linn, Lena e Tina.

Agradeço também aos amigos que fiz durante o doutorado sanduíche, à amiga Theresa por me receber em seu lar, Déborah por me mostrar a cidade e me apresentar aos seus amigos, e os meus parceiros brasileiros espalhados pela Alemanha, Júnia, Mayara, Gabi, Joyce, Lummy, Ruan e Laszlon.

Agradeço aos membros do PPGAGRI, docentes, discentes e técnicos. Obrigada pela contribuição e agradeço em especial ao Prof. Dr. Robério Ferreira, por ter sido meu orientador durante a graduação, ter participado de várias bancas minhas e por ser sempre um incentivador.

Algumas das melhores palavras que já ouvi durante esses anos acadêmicos vieram de você, obrigada professor.

Agradeço aos meus colegas, Thiago e Annie, pelos anos lado a lado. Começamos na UFS juntos, na graduação, nos formamos juntos, fizemos mestrado e doutorado juntos e agora terminamos juntos. Nós conseguimos! Agradeço também ao meu parceiro, Bruno, com quem fiz a graduação e mestrado junto, e embora estando em Viçosa agora, nunca deixou de estar sempre comigo. E agradeço a Monique e Larissa por todos esses anos de amizade. Vocês são uma eterna fonte de alegria, muito obrigada.

Agradeço aos meus colegas da Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Aracaju, onde sou analista ambiental. Não poderia ter escolhido melhores pessoas para dividir meus dias de Licenciamento Ambiental. Obrigada por serem tão compreensivos durante a minha ausência para os estudos e por esperarem com muito carinho o meu retorno. Agradeço em especial a Carol Boschese, que esteve comigo também na graduação na UFS. Fico feliz pela vida ter nos aproximado e tê-la com amiga. Agradeço também aos meus queridos colegas Áurea, Andreza, Andrezza, Isadora, Eglícia, Rafael, Helena e Gal pelas risadas e momentos de descontração. Queria poder estar sempre com vocês.

Agradeço aos meus demais amigos, que em algum momento disseram uma palavra de apoio, vocês não sabem como isso é importante. Obrigada Mari, Lu e Helaina por, de alguma forma, estarem sempre comigo. O carinho é recíproco, sempre! E a David, por todas as horas me ouvindo desabafar, me aconselhando ou simplesmente me fazendo rir. A minha gratidão será eterna.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e bolsa de doutorado sanduíche no exterior. Continuaremos lutando!

No final, é impossível listar todos que contribuíram para esse momento, mas não há limites para a gratidão que sinto por todos. Espero já ter contribuído para suas vidas da mesma forma, nada me deixa mais feliz do que retribuir toda a cooperação e ajuda recebida. E que possamos continuar nos apoiando e crescendo, cuidando daquilo que temos de mais importante, uns aos outros. Muito obrigada e vamos em frente!

## **BIOGRAFIA**

Juliana Lopes Souza é Engenheira Florestal formada pela Universidade Federal de Sergipe em 2013. No ano seguinte, iniciou sua carreira como Analista Ambiental na Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Aracaju, onde trabalha com Licenciamento Ambiental, e concomitantemente realizou o Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, também na Universidade Federal de Sergipe. Em 2016, mesmo ano de conclusão do Mestrado, iniciou o Doutorado pelo mesmo programa. Durante o curso, realizou entre 2018 e 2019 o doutorado sanduíche na Universität Hamburg, Alemanha. No presente ano de 2020, conclui seu Doutorado em Agricultura e Biodiversidade.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	v
RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Tolerância aos estresses abióticos em plantas .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Mecanismos de tolerância aos estresses em <i>Erythrina velutina</i> Willd. ....</b>	<b>6</b>
<b>2.3. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes ortodoxas .....</b>	<b>8</b>
<b>2.4. Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR .....</b>	<b>10</b>
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>15</b>
<b>4. ARTIGO 1: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA PLANTA MEDICINAL</b> <b><i>Erythrina velutina</i> Willd. ....</b>	<b>20</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>20</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. Introdução .....</b>	<b>21</b>
<b>4.2. Material e Métodos .....</b>	<b>23</b>
<b>4.3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>23</b>
<b>4.3.1. Artigos científicos .....</b>	<b>23</b>
<b>4.3.2. Patentes .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3.3. Genes, Genoma e Proteínas .....</b>	<b>32</b>
<b>4.4. Conclusões .....</b>	<b>34</b>
<b>4.5. Referências bibliográficas .....</b>	<b>34</b>
<b>5. ARTIGO 2: QUALIDADE DE SEMENTES DE <i>Erythrina velutina</i> Willd. POR</b> <b>ANÁLISES FISIOLÓGICAS E DE IMAGENS DE RAIOS-X .....</b>	<b>40</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>40</b>
<b>5.1. Introdução .....</b>	<b>41</b>
<b>5.2. Material e Métodos .....</b>	<b>43</b>
<b>5.3. Resultados e discussão .....</b>	<b>44</b>
<b>5.4. Conclusão .....</b>	<b>52</b>
<b>5.5. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>52</b>
<b>6. ARTIGO 3: VIABILIDADE E INTEGRIDADE DE RNA DE SEMENTES DE</b> <b><i>Erythrina velutina</i> WILLD. SOB RESTRIÇÃO HÍDRICA .....</b>	<b>55</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>55</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>56</b>

6.1. Introdução.....	56
6.2. Material e Métodos .....	58
6.3. Resultados e Discussão.....	60
6.4. Conclusões.....	64
6.5. Referências Bibliográficas .....	64
<b>7. ARTIGO 4: EXPRESSÃO GÊNICA DE LEA E sHSP EM SEMENTES DE <i>Erythrina velutina</i> SOB CONDICIONAMENTO OSMÓTICO .....</b>	<b>68</b>
RESUMO .....	68
ABSTRACT .....	69
7.1. Introdução.....	69
7.2. Material e Métodos .....	71
7.3. Resultados e discussão .....	74
7.4. Conclusões.....	83
7.5. Referências Bibliográficas .....	83
<b>8. CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>87</b>

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

Figura		Página
1	Compostos químicos da PCR real-time: a) Detecção por SYBR Green. SYBR Green se liga a todo DNA de fita dupla e emite um sinal fluorescente. No seu estado livre, o SYBR não produz fluorescência. Portanto, a amplificação é medida a cada ciclo pelo aumento correspondente em fluorescência. b) Ensaio TaqMan (5' nuclease) usando sonda TaqMan. Durante o anelamento, a sonda TaqMan e os primers se ligam a fita. Quando a sonda está intacta, a energia é transferida entre o supressor e o reportador; como resultado, o sinal fluorescente não é detectado. Com a síntese de uma nova fita pela Taq polimerase, a atividade da enzima 5' exonuclease corta o nucleotídeo 5' marcado da sonda, liberando o reportador. Uma vez distante, o sinal fluorescente da sonda é detectado e a amplificação identificada com o aumento correspondente em fluorescência.....	11
2	Curva de amplificação ilustrando o aumento de fluorescência (eixo y em logaritmo - $\Delta R_n$ representa valores normalizados em relação a uma referência) a cada ciclo de PCR (eixo x). As curvas com NTC ( <i>no-template control</i> ) são amostras sem ácidos nucleicos, mostram que apenas os primers não geram sinal e que os reagentes usados não possuem contaminantes com DNA.....	12
3	Passos para o processo de quantificação de expressão gênica por PCR real-time.....	13

### ARTIGO 1

Figura		Página
1	Número de artigos científicos publicados por termo nas bases de dados Scopus, <i>Web of Science</i> e SciELO.....	24
2	Estrutura de composição principal de compostos eritrina.....	26
3	Número de depósitos de patentes por termo nas bases World Intellectual Property Organization (WIPO), United States Patent and Trademark Office (USPTO), European Patent Office (EPO), Espacenet-Latipat e Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). .....	29
4	Principais empresas depositárias de patentes do gênero <i>Erythrina</i> . .....	30
5	Agrupamentos conceituais para os termos mais citados em patentes relacionadas com plantas do gênero <i>Erythrina</i> . .....	32

## ARTIGO 2

Figura		Página
1	Gráfico box-plot para a comprimento, largura (cm) e área (cm <sup>2</sup> ) de 100 sementes dos lotes 1 e 2 de <i>Erythrina velutina</i> Willd.....	47
2	Imagens de raios-x e projeção 3D das sementes de <i>Erythrina velutina</i> Willd. lote 1. A) Semente cheia originando plântula normal, B) semente cheia com emissão de radícula, C) semente cheia deteriorada, D) semente com danos deteriorada durante o teste de germinação do lote 1.....	48
3	Imagens de raios-x e projeção 3D das sementes de <i>Erythrina velutina</i> Willd. lote 2. A) Semente cheia originando plântula normal, B) semente cheia com emissão de radícula, C) semente cheia deteriorada durante o teste de germinação do lote 2.....	49
4	Densidade das sementes dos lotes 1 e 2 de <i>Erythrina velutina</i> Willd. estabelecida pelo parâmetro IntDen, por meio da densidade de pixels em imagens de raios-x avaliadas no programa ImageJ. ....	51
5	Gráfico box-plot para o tamanho da parte aérea (PA), radícula (R) e relação parte aérea/radícula (PA/R) para as plântulas dos lotes 1 e 2 de <i>Erythrina velutina</i> Willd. ....	51

## ARTIGO 3

Figura		Página
1	Porcentagem de germinação (G%) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes dos lotes 1 e 2 de <i>Erythrina velutina</i> Willd. germinadas em papel e areia.....	60
2	Porcentagem de germinação (G%) e Índice de Velocidade de Germinação de sementes dos lotes 1 e 2 de <i>Erythrina velutina</i> Willd. após embebição em solução de PEG (6000) a -0,8 MPa por 0, 24, 48 e 72 horas. ....	61
3	Quantificação de RNA de embriões de <i>Erythrina velutina</i> Willd. após embebição em solução de PEG (6000) a -0,8 MPa por 0, 24, 48 e 72 horas. ....	63
4	Qualidade de RNA de embriões de <i>Erythrina velutina</i> Willd. após embebição em solução de PEG (6000) a -0,8 MPa por 0, 24, 48 e 72 horas. ....	63

## ARTIGO 4

Figura		Página
1	Curva de embebição em água por incremento de massa fresca de três lotes de sementes de <i>Erythrina velutina</i> Willd. ....	75
2	Curva de restrição hídrica em solução PEG por incremento de massa fresca do lote 1 de sementes de <i>Erythrina velutina</i> Willd., sob os potenciais osmóticos -0,4 MPa, -0,8 MPa e -1,2 MPa. ....	77
3	Curva de restrição hídrica em solução PEG por incremento de massa fresca do lote 2 de sementes de <i>Erythrina velutina</i> Willd., sob os potenciais osmóticos -0,4 MPa, -0,8 MPa e -1,2 MPa.....	77
4	Curva de restrição hídrica em solução PEG por incremento de massa fresca do lote 3 de sementes de <i>Erythrina velutina</i> Willd., sob os potenciais osmóticos -0,4 MPa, -0,8 MPa e -1,2 MPa. ....	78
5	Porcentagem de germinação (%G), emissão de radícula (%ER), emissão de radícula após restrição hídrica (%ER (RH)) e sementes deterioradas (%De) de três lotes de sementes de <i>Erythrina velutina</i> Willd., sob os potenciais osmóticos -0,4 MPa, -0,8 MPa e -1,2 MPa. ....	79

6	Expressão relativa dos genes <i>Em6</i> e <i>sHSP</i> em embriões de três lotes de sementes osmocondicionadas de <i>Erythrina velutina</i> Willd., em solução de polietilenoglicol -0,8 MPa.....	82
---	--	----

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 2

Tabela	Página
1    Peso de 1.000 sementes, condutividade elétrica (CE), teor de água (TA), comprimento, largura e área de sementes, germinação (%), primeira contagem de germinação (PCG%), tamanho da parte aérea (PA), radícula (R), relação parte aérea/radícula (PA/R) e massa seca de plântulas dos lotes 1 e 2 de sementes de <i>Erythrina velutina</i> Willd. ....	52

### ARTIGO 4

Tabela	Página
1    Lista de sequências gênicas para a determinação da expressão gênica em embriões de <i>Erythrina velutina</i> Willd. (FARIA, 2006).....	74
2    Quantificação (ng/μL) e qualidade de RNA extraído de embriões de sementes de três lotes de <i>Erythrina velutina</i> Willd .....	80
3    Quantificação (ng/μL) e qualidade de cDNA sintetizado de embriões de sementes de três lotes de <i>Erythrina velutina</i> Willd .....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$^1\text{O}_2^-$	Oxigênio singleto
ABA	Ácido Abscísico
ACT	Actina
APX	Ascorbato Peroxidase
ATP	Adenosina Trifosfato
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i> (Demanda Bioquímica de Oxigênio)
BOLD	<i>Barcode of Life Data System</i>
CAPES	Coordenação em Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (DNA Complementar)
Ct	<i>Cycle Threshold</i> (Limiar do Ciclo)
CTS	<i>Comatose</i>
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
Em6	<i>Early methionine 6</i>
EPO	<i>European Patent Office</i>
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
GABA	Ácido $\gamma$ -4-Aminobutírico
GSH	Glutathiona reduzida
GST	Glutathiona-S-Transferase
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de Hidrogênio
$\text{HO}^-$	Hidroxila
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
IntDen	<i>Integrated Density</i> (Densidade Integrada)
IVG	Índice de Velocidade de Germinação
LEA	<i>Late Embryogenesis</i>
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i> (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology</i>
NTC	<i>No-Template Control</i>
$\text{O}_2^-$	Superóxido
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia Polimerase)
PEG	Polietilenoglicol
PER1	1- Cis- Peroxirredoxina

POD	Peroxidase
RBOH	<i>Respiratory Burst Oxidase Homolog</i>
RH	Restrição Hídrica
RIN	<i>RNA Integrity Number</i> (Número de Integridade do RNA)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
RT-qPCR	<i>Real Time quantitative PCR</i> (PCR quantitativa em Tempo Real)
Rubisco	Ribulose-1,5-Bifosfato Carboxilase Oxigenase
SciELO	<i>Scientific Eletronic Library Online</i>
sHSP	<i>small Heat Shock Protein</i>
SOD	Superóxido Dismutase
SUMO	<i>Small Ubiquitin-related Modifier</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i> (Fator de Necrose de Tumor Relacionado a Apoptose)
USPTO	<i>United States Patent and Trademark Office</i>
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i>

## RESUMO

SOUZA, Juliana Lopes. **Potencial biotecnológico e tolerância à restrição hídrica de sementes de *Erythrina velutina* Willd.** São Cristóvão: UFS, 2020. 88 p. (Tese – Doutorado em Agricultura e Biodiversidade).\*

*Erythrina velutina* Willd. é espécie arbórea nativa do Brasil com ampla ocorrência em regiões áridas e úmidas, sendo encontrada na Caatinga, Mata Atlântica e Cerrado. Por ser uma espécie pioneira, é altamente recomendada para o reflorestamento de áreas degradadas e suas sementes ortodoxas possuem tolerância à dessecação e ao déficit hídrico. As sementes são armazenadas como principal fonte de conservação *ex situ*, além de serem bastante utilizadas pela medicina popular. Esses aspectos enfatizam a alta relevância da conservação e estudo desse recurso natural, principalmente frente aos impactos causados ao ambiente pelas mudanças climáticas. Portanto, objetivou-se com esse trabalho avaliar as características fisiológicas de sementes de *E. velutina* sob restrição hídrica, visando identificar níveis de deterioração, mecanismos de tolerância e o potencial biotecnológico. Para a avaliação do potencial biotecnológico da espécie, realizou-se prospecção de dados científicos entre artigos, patentes e sequências nucleotídicas. Apesar do baixo número de patentes e nucleotídeos sequenciados para a espécie, os dados científicos a estabelecem como relevante e com alto potencial biotecnológico nos campos farmacêutico, por seus compostos bioativos, e como fonte de polinucleotídeos e polipeptídios para a inserção de tolerância a estresses abióticos. Mesmo sendo ortodoxas e longevas, as sementes de *E. velutina* são susceptíveis ao deterioramento durante o armazenamento. Ao se avaliar a viabilidade e o vigor de lotes da espécie, foi identificado que o método de avaliação de imagens de raios-x, associado a análise da densidade interna das sementes diferencia aquelas com maior capacidade germinativa em lotes de moderada deterioração. Assim, é possível selecionar e otimizar a propagação da espécie usando-se um método de análise não-destrutiva. Além do deterioramento por armazenamento, as sementes podem ser afetadas por estresses ambientais. Analisando-se a viabilidade e o vigor das sementes desta vez sob restrição hídrica, observou-se capacidade de tolerância ao estresse pela germinação sob diferentes potenciais osmóticos. Para a recuperação dos danos causados às sementes e criar condição de tolerância cruzada, estimula-se a síntese de proteína protetoras como LEA e sHSP por meio do condicionamento osmótico. Em sementes de *E. velutina* osmocondicionadas, identificou-se por meio de RT-qPCR o incremento em expressão dos genes *Em6* (LEA grupo 1) e *sHSP*, caracterizando uma condição de resistência a restrição hídrica. *Erythrina velutina* é espécie com várias propriedades biotecnológicas, capacidade de recuperação germinativa após a deterioração e tolerância a restrição hídrica, sendo um importante recurso genético vegetal com potencial adaptabilidade a mudanças climáticas.

**Palavras-chave:** mulungu; RT-qPCR; estresse abiótico; armazenamento; potencial biotecnológico.

---

\* Comitê Orientador: Renata Silva-Mann – UFS (Orientadora).

**ABSTRACT**

SOUZA, Juliana Lopes. **Biotechnological potential and drought stress tolerance of *Erythrina velutina* Willd. seeds.** São Cristóvão: UFS, 2020. 88 p. (Thesis - Doctor of Science in Agriculture and Biodiversity)\*

*Erythrina velutina* is a native Brazilian tree species with wide occurrence in arid and humid regions, observed in Caatinga, Atlantic Forest and Cerrado. As pioneer species, it is highly recommended for the reforestation of degraded areas and its orthodox seeds have tolerance to desiccation and water deficit. *E. velutina*'s seeds are stored as the main *ex situ* conservation resource and are widely used by traditional medicine. These aspects emphasize the high relevance of conservation and study of this natural resource, especially in face of the impacts caused to the environment by climate change. Therefore, the objective of this study was to evaluate the physiological characteristics of *E. velutina*'s seeds under water stress, identifying deterioration levels, tolerance mechanisms and biotechnological potential. To evaluate the biotechnological potential of this species, scientific data were prospected from articles, patents and nucleotide sequences related to *E. velutina*. Despite the low number of patents and nucleotides sequenced for the species, scientific data establishes it as prominent and with high biotechnological potential in the fields of pharmacy, bioactive compounds and source of polynucleotides and polypeptides for the insertion of abiotic stress tolerance. Although orthodox and longevous, *E. velutina*'s seeds are susceptible to deterioration during storage. When evaluating the viability and vigor of lots from this species, it was identified that x-ray images analysis, associated to the evaluation of the internal density of seeds, differentiates seeds with higher germination capacity in lots of moderate deterioration. Consequently, it is possible to select and optimize the propagation of the species using a non-destructive method of analysis. In addition to storage deterioration, *E. velutina*'s seeds can be affected by environmental stresses. Analyzing the viability and vigor of the seeds, this time under water deficit, it was observed the ability to tolerate water stress, demonstrated by germination under osmotic potentials. To recover from seed damage and create a cross-tolerant condition, the synthesis of protective proteins such as LEA and sHSP is stimulated through osmotic conditioning. In osmoconditioned *E. velutina*'s seeds, through RT-qPCR it was identified the increase in expression of *Em6* (LEA group 1) and *sHSP* genes, characterizing a condition of resistance to drought stress. *Erythrina velutina* is a species with several biotechnological properties, germinative recovery capacity deterioration and water stress tolerance, being an important plant genetic resource with potential adaptability to climate change.

**Keywords:** mulungu; RT-qPCR; abiotic stress; storage; biotechnological potential.

---

\* Supervising Committee: Renata Silva-Mann – UFS (Supervisor).

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As previsões para os cenários de mudanças climáticas preveem o aumento da temperatura global e, conseqüentemente, expansão de áreas secas no mundo. O aquecimento global possui maior impacto nessas áreas. No último século, o aquecimento da superfície terrestre em zonas áridas foi de 20 a 40% maior do que em áreas úmidas, caracterizando um possível aumento de 3 a 4°C nessas zonas, caso a temperatura média global suba 2°C (HUANG et al., 2017).

O aumento de áreas com clima extremo altera as condições do ambiente, podendo ocasionar a redução da biodiversidade e produtividade de ecossistemas florestais (MORIN et al., 2018). A seca é considerada o principal componente para os efeitos negativos nos cenários climáticos futuros, ocorrendo períodos mais longos e intensos de estresse hídrico (CHOAT et al., 2012). Esse fenômeno é resultado da combinação das variáveis precipitação, temperatura, umidade, evaporação e transpiração, ocasionado baixa disponibilidade hídrica.

As previsões das alterações climáticas criam uma crescente necessidade de se estudar espécies tolerantes as condições de estresses abióticos. Isso é intensificado em países em desenvolvimento de regiões tropicas, devido a necessidade de manter a produção para atender a demanda, conservar a biodiversidade remanescente e evitar a expansão do uso alternativo do solo.

Sementes ortodoxas podem ser usadas como modelos para o entendimento de vários fatores relacionados a tolerância ao déficit hídrico, fato em regiões semiáridas. Considerando-se que essas sementes são tolerantes à dessecação; e, possuem a mesma capacidade de tolerar o estresse hídrico, os genes que conferem essas características podem ser identificados e obtidos a partir de organismos adaptados a condições variáveis e extremas. Portanto, a conservação de plantas com sementes ortodoxas é importante para manutenção de recursos vegetais com potencial para adaptação às mudanças climáticas futuras.

O principal método de conservação de sementes ortodoxas é por meio da conservação *ex situ* por armazenamento em câmaras frias (WALTERS, 2015). Para a eficácia do método é necessário o conhecimento sobre características intrínsecas às sementes - como morfologia, fisiologia e genética - relacionadas ao vigor e viabilidade do lote sob armazenamento.

Como estratégia para recuperar os danos causados devido ao armazenamento, a técnica de condicionamento osmótico é utilizada para ativar sob condições de laboratório os mecanismos de reparo das sementes. Ao simular uma situação de estresse controlado, a técnica possibilita a ação de mecanismos para a manutenção da qualidade fisiológica e a expressão de genes relacionados a tolerância aos estresses abióticos. Durante o condicionamento osmótico ocorre embebição controlada das sementes sem a protrusão radicular. Assim, propicia-se a mobilização de reservas, síntese de proteínas e DNA, reparos aos danos na membrana plasmática, entre outros mecanismos que permitem uma germinação mais rápida, uniforme e com melhor resistência aos estresses abióticos (NAWAZ et al., 2013; VENTURA et al., 2012).

*Erythrina velutina* Willd. é uma espécie arbórea nativa da família Fabaceae que apresenta sementes ortodoxas. Essa espécie possui ampla plasticidade de ocorrência, sendo encontrada na Caatinga, Mata Atlântica e Cerrado, adaptando-se aos climas secos e úmidos (SILVA JUNIOR et al., 2012a). É uma espécie pioneira, bastante recomendada para a recuperação de áreas degradadas e um bioindicador de mudanças climáticas (BUTZ et al., 2016). Além disso, a espécie possui alto potencial bioquímico, sendo estudadas suas propriedades medicinais (OZAWA et al., 2008, 2009; OZAWA; KISHIDA; OHSAKI, 2011; SILVA et al., 2016).

Neste contexto, objetivou-se por meio deste trabalho, caracterizar lotes de sementes de *Erythrina velutina* Willd. fisiológica e molecularmente quanto a resposta a restrição hídrica de sementes armazenadas e, ainda, avaliar a resposta da expressão gênica ao condicionamento osmótico, como estratégias para a conservação e identificação do potencial biotecnológico da espécie.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Tolerância aos estresses abióticos em plantas

As plantas desenvolveram evolutivamente mecanismos para identificação, tradução e resposta aos vários estresses ambientais com a finalidade de manter a homeostase metabólica vital. Os estresses são caracterizados como condições climáticas adversas ao desenvolvimento normal das plantas, como a indisponibilidade de água, causando estresse hídrico; temperaturas extremas, o estresse térmico; a alta concentração de sais, o estresse salino.

Essas respostas constituem ajustes para lidar com os estresses, em diferentes níveis organizacionais - moleculares, celulares, em tecidos, órgãos, sistemas, na anatomia e morfologia – nas plantas que desenvolvem diversos mecanismos de tolerância.

Mecanismos de sinalização e regulação (fatores de transcrição, fosfatases, cinases) são ativados sob estresse (KRASENSKY; JONAK, 2012). Vários processos de sinalização envolvendo cálcio, espécies reativas de oxigênio (ERO) e quinases são induzidos para tradução de sinais (XIONG; ZHU, 2001). Em nível molecular, além da expressão de genes relacionados aos estresses, ocorre também a ativação de proteínas ligadas a atividades de transporte, detoxificação, proteases e chaperonas, e a produção de metabólitos osmoprotetores (também denominados de osmólitos ou solutos compatíveis) (WANG et al., 2004). Essas mudanças levam a respostas específicas aos estresses, resultando em adaptações e tolerância aos mesmos.

É necessário que as plantas otimizem o uso de recursos energéticos celulares para sobreviver sob estresse. Portanto, processos que consomem muita energia, como tradução, reprodução e algumas vias biossintéticas (fotossíntese, síntese de aminoácidos) são reduzidas parcialmente e os recursos realocados para os mecanismos de defesa (QU et al., 2011).

Um dos mecanismos mais comuns iniciados em resposta a estresse é a produção de biomoléculas solúveis que protegem as plantas de estresses abióticos ao proteger células e membranas. Estes incluem metabólitos quimicamente diversos, como prolina, asparagina, poliaminas, glicina betaína, ácido  $\gamma$ -4-aminobutírico (GABA), rafinose, trealose, sacarose e

polióis, a exemplo do sorbitol e mioinositol (KRASENSKY; JONAK, 2012). O acúmulo de prolina foi relatado em diversos tipos de estresses, como salino, hídrico, temperaturas extremas, metais pesados etc. (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008). Além de osmoprotetora, a prolina também age como crioprotetora, eliminadora de ERO e molécula de sinalização. Os genes ligados ao metabolismo de prolina estão sujeitos à regulação da transcrição sob estresse (VERSLUES; SHARMA, 2010).

A tolerância ao estresse hídrico é definida como a capacidade da planta em lidar com o potencial hídrico reduzido nos tecidos. Os mecanismos de tolerância ao estresse hídrico permitem que a planta mantenha suas funções, ou que pelo menos sobreviva, em potencial hídrico interno reduzido (ASHRAF; HARRIS, 2013; MOORE et al., 2008).

Ao passar por estresses abióticos, incluindo o estresse hídrico, as plantas produzem vários tipos de ERO em compartimentos intracelulares, podendo levar a danos oxidativos ou a sinalização de estresse. ERO são espécies reativas de oxigênio molecular, que incluem o radical hidroxila ( $\text{HO}^\cdot$ ), superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ) e oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), com destaque para o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). ERO são acumuladas nas células por mecanismos como o transporte de elétrons para o cloroplasto e mitocôndria ou por vias enzimáticas, como peroxidase da parede celular e oxidase de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato – NADPH (conhecidos em plantas como oxidases homólogas da explosão respiratória RBOH) em espaços extracelulares e peroxissomos (WRZACZEK; BROSCHE; KANGASJÄRVI, 2013). As RBOH em plantas estão envolvidas em várias rotas de sinalização, incluindo crescimento de pelos radiculares, fechamento de estômatos, interação pólen estigma e defesa e aclimação aos estresses abióticos (TORRES; DANGL, 2005).

Além dos mecanismos mencionados, modificações pós-tradução influenciam na tolerância ao estresse hídrico. A conjugação de proteína com ubiquitina ou SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) são modificações comuns. A ubiquitina age na regulação de ABA

(ácido abscísico) e SUMO na estabilidade, localização e alterações em conformação e atividade de proteínas (YU; WU; XIE, 2016; ZHIGUO et al., 2015).

A expressão de proteínas relacionadas aos estresses é um importante mecanismo adaptativo para tolerância. A maioria das proteínas relacionadas ao estresse são solúveis em água e, portanto, contribuem para a tolerância provavelmente ao hidratar estruturas celulares. O estresse por altas temperaturas induz a síntese de outras proteínas, como ubiquitina, peroxidase (Mn-POD) e ascorbato peroxidase (APX) citosólicos e de cloroplastos, e as proteínas superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD), entre outras enzimas antioxidantes (ALMESELMANI et al., 2006; STONE, 2014; TANG et al., 2006). A principal função dessas proteínas é proteger estruturas celulares e subcelulares contra o dano oxidativo e forças desidratantes.

As proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*) são encontradas em diversos organismos, como bactérias, insetos e plantas. Como principal função, essas proteínas previnem danos celulares causados pelos estresses abióticos, sobretudo o estresse hídrico (WANG et al., 2014). A biossíntese de proteínas HSP (*heat shock*) é induzida para evitar a desnaturação de macropartículas. Essas proteínas se mantêm estáveis por um período e são, provavelmente, o principal mecanismo de sobrevivência de plantas ao aumento de temperatura. As HSP são encontradas no citoplasma e em organelas como o núcleo, mitocôndrias, cloroplastos e retículo endoplasmático. A tolerância conferida por HSP resulta no melhor funcionamento de fenômenos fisiológicos como a fotossíntese, eficiência de uso de água e nutrientes e estabilidade de membranas (AL-WHAIBI, 2011; KOTAK et al., 2007; WAHID et al., 2007; WANG et al., 2004).

As HPS juntamente com chaperonas podem estar relacionadas a sinalização de estresse, ativação de genes e regulação do estado redox celular (AL-WHAIBI, 2011; WAHID et al., 2007). Essas proteínas também interagem com outros mecanismos de resposta aos estresses como a produção de osmólitos e antioxidantes. Em temperaturas excessivamente altas, HSP

minimizam os danos às células ao protegê-las da desnaturação e criando ligações quelantes com íons vazando do vacúolo para o citosol (AL-WHAIBI, 2011; KOTAK et al., 2007).

A ação de hormônios vegetais pode também estar associada a tolerância ao estresse térmico. Alguns estudos sugerem que a indução de várias proteínas HSP é regulada por ABA (SNYMAN; CRONJÉ, 2008). O aumento da liberação de etileno em altas temperaturas leva a abscisão de órgãos reprodutivos (WAHID et al., 2007) como estratégia vegetal para tolerância ao estresse térmico. O ácido salicílico também é importante componente da sinalização para resposta por resistência sistêmica adquirida; e resposta hipersensível durante o estresse térmico (KAWANO et al., 1998; WANG; LI, 2006).

Existe correlação entre estresse hídrico e térmico, assim pode ser difícil de distinguir os efeitos de cada estresse em plantas em campo e, adaptações aos ambientes áridos apenas são efetivas quando levam à tolerância a ambos os estresses (FITTER; HAY, 2002).

## **2.2. Mecanismos de tolerância aos estresses em *Erythrina velutina* Willd.**

As condições climáticas apresentadas na Caatinga e Mata Atlântica, caracteriza os estresses abióticos como os principais fatores limitantes para o desenvolvimento de espécies vegetais.

Em estudo sobre os efeitos desses tipos de estresse em sementes de *E. velutina* (REIS, 2012) procedente de região de Caatinga, o estresse térmico ocasionou redução na porcentagem de germinação. A temperatura ótima de 25°C apresentou germinação de 99%, mas com o aumento da temperatura de 35°C para 40°C houve queda de 76%. À 40°C, ocorreu o bloqueio de mobilização de reservas e degradação de açúcares solúveis totais e redutores, proteínas totais e aminoácidos constituindo uma temperatura crítica para germinação. Nas sementes submetidas ao estresse hídrico, a partir do potencial de -0,6 MPa houve drástica queda na germinação, sendo completamente inibida a partir em -0,8 MP. Entretanto, quando as sementes submetidas a este potencial foram retiradas desta condição e colocadas em condições ideais de

disponibilidade de água, houve 100% de germinação. Esse resultado indica a capacidade osmocondicionante deste potencial. E, com o aumento do estresse hídrico, houve redução da concentração de açúcares livres, provavelmente relacionado ao metabolismo inicial e mobilização de reservas. Houve também redução de proteínas totais e aminoácidos, sendo atribuída a inibição da atividade de proteases nos cotilédones e da translocação de aminoácidos para o eixo embrionário (REIS, 2012).

Para as sementes sob estresse salino, não houve diferença significativa na germinação comparada ao controle, e a espécie foi considerada glicófita (com moderada tolerância ao cloreto de sódio - NaCl), resultados corroborados pelo estudo de Bessa et al. (2017). Observou-se uma menor mobilização de açúcares solúveis, podendo indicar uma tentativa de proteção e tolerância à salinidade.

Com o aumento da temperatura de 15°C a 35°C observou-se o aumento de atividade da catalase, provavelmente relacionada à eliminação de ERO. Isso foi observado nos tecidos embrionários sob estresse térmico. Um aumento da atividade de catalase ainda mais acentuado foi verificado em sementes sob estresse hídrico e salino, com o aumento em restrição hídrica e concentração de íons. O aumento em temperatura também induziu uma maior síntese da enzima glutathione-S-transferase (GST) no eixo embrionário da espécie. Essas enzimas podem funcionar como glutathione peroxidases, além de promover a conjugação de GSH (glutathione reduzida) com produtos endógenos causadores de danos oxidativos, como radicais hidroxila, peróxidos de lipídios de membrana e produtos da degradação oxidativa do DNA, visando sua desintoxicação. Para a prolina, o aumento de temperatura resultou em incremento deste osmoprotetor em embriões de *E. velutina*. No entanto, sob estresse salino, manteve-se constante e sob estresse hídrico houve redução (REIS, 2012).

Em outro estudo, Oliveira et al. (2016) observaram maior desenvolvimento radicular e abscisão foliar em plântulas de *E. velutina* submetidas ao déficit hídrico, sugerindo um potencial de desenvolvimento de características xeromórficas para a espécie.

Em estudo sobre a influência do ambiente da região de brejo de altitude e Caatinga nas sementes de *E. velutina*, observou-se que as plantas da Caatinga produziram sementes menores e em menor quantidade por fruto (SILVA JUNIOR et al., 2012a). Os resultados foram atribuídos às condições edafoclimáticas e a menor disponibilidade de nutrientes na região de Caatinga. Ressaltou-se que sementes menores são mais eficientes na captura de água devido à maior razão superfície/ área, característica vantajosa para regiões de Caatinga, cuja estação seca dura a maior parte do ano. No entanto, características intrínsecas, como diversidade genética entre as plantas das duas regiões devem ser consideradas.

Em relação germinação dessas sementes, as provenientes de região de Caatinga apresentaram velocidade de germinação superior, indicando uma maior eficiência de absorção de água. Apesar de possuir tegumento impermeável, sendo necessária escarificação física para germinação das sementes, a influência da região hiliar no balanço hídrico entre a semente e o seu exterior também foi considerada em estudo sobre a germinação de sementes dessa espécie (MATHEUS et al., 2010).

Apesar de *E. velutina* apresentar vários mecanismos morfológicos e bioquímicos de tolerância aos estresses ambientais, ainda são necessários estudos sobre a expressão gênica dessa espécie sob estresse. O conhecimento sobre os mecanismos moleculares de tolerância aos estresses poderá auxiliar no entendimento da plasticidade da espécie aos diferentes biomas e futuras mudanças climáticas.

### **2.3. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes ortodoxas**

Sementes da maioria das espécies de angiospermas toleram a desidratação a baixos teores de água, caracterizando-se em sementes ortodoxas. Essas sementes possuem a habilidade de tolerar a dessecação ao suspender o desenvolvimento até que seja provida a disponibilidade de água (WALTERS, 2015) para germinação. A sobrevivência nesse estágio permite a formação de bancos de sementes no solo, bem como a expansão da ocorrência natural.

A tolerância à dessecação aliada a longevidade das sementes sob armazenamento permite a transmissão de informação genética entre gerações como eficaz forma de propagação, garantindo – juntamente com a dormência – a germinação somente em ambientes apropriados e ao longo do tempo. Além disso, esses mecanismos podem ser usados como em estratégia de conservação *ex situ* de sementes ortodoxas ao realizar o armazenamento (WATERWORTH; BRAY; WEST, 2015).

Durante a maturação, as sementes ortodoxas atingem de 5% a 10% de teor de água, tornando-se propágulos que podem ser armazenados e resistir a condições ambientais adversas como a seca e baixas temperaturas (WALTERS, 2015). Essas condições também são utilizadas para o armazenamento dessas sementes, ao serem conservadas em câmaras com controle de umidade e temperatura, sendo temperaturas baixas benéficas para a conservação em longo prazo.

Alta umidade e temperatura aceleram o processo de deterioração das sementes, reduzindo a longevidade. Sementes armazenadas em condições de alta umidade podem apresentar maior taxa respiratória, temperatura, susceptibilidade ao ataque de fungos de armazenamento e redução na viabilidade e vigor. Com a absorção de água pelas sementes devido ao ambiente com alta umidade, o início do processo metabólico ocasiona o consumo de reservas pelas sementes, e há a proliferação de fungos associados ao tegumento. E a temperatura elevada ocasiona a deterioração ao influenciar nos processos metabólicos e degradação de enzimas (ZHOU et al., 2019).

Essa capacidade das sementes ortodoxas em tolerar tais condições indicam, ainda, a existência de mecanismos genéticos para se adaptar aos fatores ambientais apropriados ou não para germinação, mas também para reparar os danos causados pela dessecação e durante o período de armazenamento. Entre os danos celulares causados durante o armazenamento e, conseqüente, deterioração das sementes, estão os danos causados a integridade das membranas pela peroxidação e mudanças de lipídeos – causando a exsudação de solutos e danos genéticos

– como aberrações cromossômicas, danos ao DNA causados por estresse oxidativo e expressão gênica anormal (CASTRO; GUIMARÃES; FARIA, 2017; EBONE; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019; FLEMING; HILL; WALTERS, 2019).

As sementes ortodoxas adquirem tolerância à dessecação por meio da síntese de proteínas LEA, HSP e açúcares (WATERWORTH; BRAY; WEST, 2015) e mantendo baixa atividade metabólica, permitindo uma maior longevidade sob armazenamento. Ainda, essas proteínas agem para o reparo de danos causados por estresses abióticos.

No entanto, a ação de genes individuais pode não causar efeito substancial no melhoramento para tolerância ao estresse em todas espécies, sendo necessária a ação em conjunto com outros genes. A identificação de outros agentes que possam influenciar a rota biossintética de elementos cruciais para a tolerância adquirida é essencial. O ácido abscísico (ABA) é um dos principais fitohormônios vegetais responsáveis por regular o desenvolvimento das plantas e a tolerância a perda de água, participando da regulação do desenvolvimento de embriões, sementes, dormência, tolerância à dessecação, germinação, sobrevivência de plântulas, desenvolvimento vegetativo e acúmulo de solutos compatíveis e síntese de proteínas LEA durante estresse hídrico. O ácido abscísico é responsável por mudanças no processamento e estabilidade durante a expressão gênica (SANO et al., 2016).

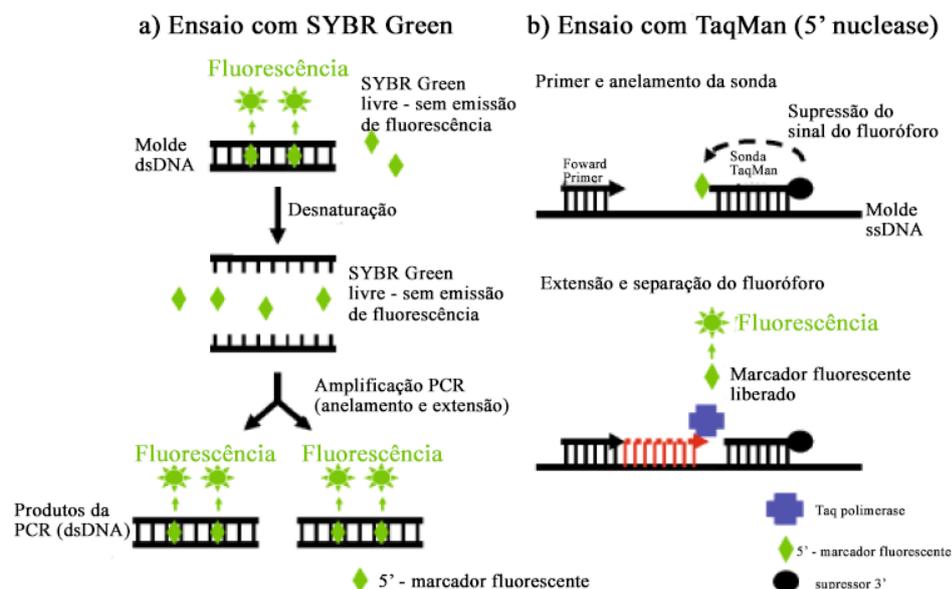
O estudo da tolerância à dessecação tem sido um recurso importante para o desenvolvimento de novas cultivares resistentes ao estresse hídrico através do melhoramento genético. Além disso, o avanço no melhoramento de plantas para tolerância ao estresse hídrico pode ser identificado pela caracterização de genes de tolerância à dessecação.

#### **2.4. Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR**

Expressão gênica é o processo no qual a informação genética é convertida em um produto. Esse processo usa uma molécula intermediária, o RNA, que é transcrita do DNA e usada com molde para tradução em proteína. Para a quantificação dessa expressão gênica foi desenvolvida a técnica de PCR real-time. Essa técnica consiste na coleta de dados durante o

processo de PCR. Tem-se então, a combinação da amplificação de ácidos nucleicos, que se consiste na PCR (Reação em Cadeia Polimerase), com a detecção de sua quantidade em um único processo (HUGGETT; BUSTIN, 2011).

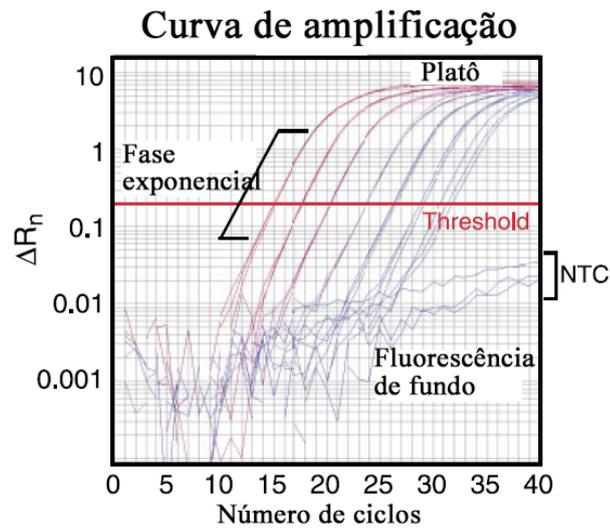
Isso é possível devido ao uso de substâncias fluorescentes que se relacionam com o produto da PCR indicando a concentração através da intensidade da fluorescência (Figura 1). As reações são caracterizadas por ciclos de PCR onde o alvo da amplificação é detectado (NAVARRO et al., 2015).



**Figura 1.** Compostos químicos da PCR real-time: a) Detecção por SYBR Green. SYBR Green se liga a todo DNA de fita dupla e emite um sinal fluorescente. No seu estado livre, o SYBR não produz fluorescência. Portanto, a amplificação é medida a cada ciclo pelo aumento correspondente em fluorescência. b) Ensaio TaqMan (5' nuclease) usando sonda TaqMan. Durante o anelamento, a sonda TaqMan e os primers se ligam a fita. Quando a sonda está intacta, a energia é transferida entre o supressor e o reportador; como resultado, o sinal fluorescente não é detectado. Com a síntese de uma nova fita pela Taq polimerase, a atividade da enzima 5' exonuclease corta o nucleotídeo 5' marcado da sonda, liberando o reportador. Uma vez distante, o sinal fluorescente da sonda é detectado e a amplificação identificada com o aumento correspondente em fluorescência. Fonte: Smith e Osborn (2009).

A partir do resultado das reações tem-se o  $C_t$  (*Cycle threshold*, Limiar do ciclo), valor definido como o ciclo de PCR no qual a fluorescência ultrapassa um limiar determinado. O valor de  $C_t$  garante que a PCR atingiu a fase exponencial e a intensidade de fluorescência do corante associado ao gene é maior do que a fluorescência de fundo (Figura 2).

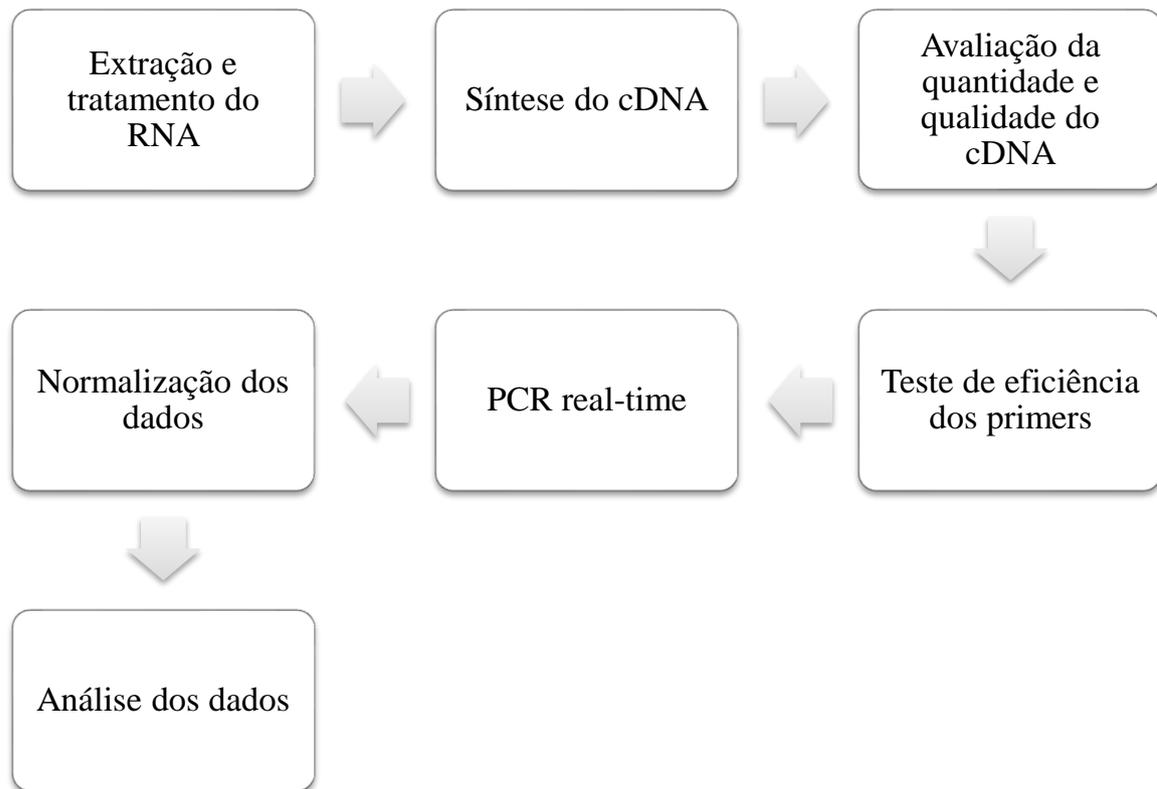
Conseqüentemente, quanto maior a quantidade de ácidos nucleicos no material inicial, mais rápido o aumento em fluorescência, resultando em um baixo valor de  $C_t$  (GINZINGER, 2002).



**Figura 2.** Curva de amplificação ilustrando o aumento de fluorescência (eixo y em logaritmo -  $\Delta R_n$  representa valores normalizados em relação a uma referência) a cada ciclo de PCR (eixo x). As curvas com NTC (*no-template control*) são amostras sem ácidos nucleicos, mostram que apenas os primers não geram sinal e que os reagentes usados não possuem contaminantes com DNA. Fonte: Valasek e Repa (2005).

Esta técnica é considerada uma das mais precisas e confiáveis, sendo usada também para validar dados obtidos por outros métodos (CHEN et al., 2014). A PCR real-time produz dados quantitativos e sem a necessidade de manipulação do material após a amplificação. Além disso, as vantagens da técnica são a sensibilidade, a detecção em tempo real do progresso da reação e a rapidez de análise (DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010).

As etapas gerais de PCR real-time estão descritas na Figura 3:



**Figura 3.** Passos para o processo de quantificação de expressão gênica por PCR real-time.

Fonte: Autor.

A quantificação da expressão gênica pode ser determinada de forma absoluta ou relativa. A quantificação absoluta é o método de quantificação usado para a determinação do número exato de cópias do gene sob investigação. Por meio do uso de uma curva padrão com concentrações de ácidos nucleicos conhecida, gera-se uma relação linear entre o  $C_t$  e quantidade inicial de RNA ou cDNA total, permitindo a determinação de concentrações desconhecidas das amostras. A quantificação absoluta é considerada mais difícil e trabalhosa do que a relativa devido à necessidade de criar padrões confiáveis para a quantificação e inclusão desses padrões em todas as reações de PCR (SIVAGANESAN et al., 2010).

Para a quantificação relativa, a expressão dos genes nas amostras é medida com base em uma amostra referência, também conhecida como calibrador. Ao usar um calibrador, os resultados são expressos pela razão entre a expressão do gene alvo/referência (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Existem vários modelos matemáticos para calcular a expressão gênica

média normalizada por meio de quantificação relativa. Cada método gera resultados e desvios padrões diferentes.

Entre os modelos matemáticos mais utilizados para a quantificação relativa da expressão gênica, tem-se o método do  $C_t$  comparativo. Com este método se faz uso de um modelo matemático que calcula as mudanças em expressão gênica em uma diferença relativa (*fold* = *n* vezes) entre uma amostra experimental e um calibrador (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Apesar do método possuir uma correção para eficiências de amplificação não ideais, como por exemplo, 1 ou 100%, a cinética do gene alvo e do gene de referência devem ser aproximadamente iguais para evitar erros. Consequentemente, um ensaio de validação deve ser realizado com uma série de diluições para o gene alvo e o de referência.

Para uso desse método, o produto da PCR deve ser pequeno, com menos de 150 pares de bases, e a reação rigorosamente otimizada. Por não usar uma curva padrão, esse método é vantajoso para experimentos com grande número de amostras, pois todos os poços de reação de PCR estão ocupados com amostras experimentais e não amostras padrão.

A quantificação relativa é utilizada na maioria das análises em experimentos científicos, sendo mais prática por comparar as amostras experimentais diretamente com os controles, os genes de referência. No entanto, ao se realizar essa técnica de quantificação, os dados ( $C_t$ ) usados para comparação são valores de abundância relativa e não o número exato de cópias. Além disso, para comparar amostras de duas corridas de PCR diferentes, é necessário incluir um controle como referência em cada placa ou corrida. Assim, a quantificação relativa é o método mais usado para experimentos de expressão gênica (BOULTER et al., 2016).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-WHAIBI, M. H. Plant heat-shock proteins: A mini review. **Journal of King Saud University - Science**, v. 23, n. 2, p. 139–150, 2011.

ALMESELMANI, M. et al. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. **Plant Science**, v. 171, n. 3, p. 382–388, 2006.

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Photosynthesis under stressful environments: An overview. **Photosynthetica**, v. 51, n. 2, p. 163–190, 2013.

BESSA, M. C. et al. Mechanisms of salt tolerance in seedlings of six woody native species of the Brazilian semi-arid. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 48, n. 1, p. 157–165, 2017.

BOULTER, N. et al. A simple, accurate and universal method for quantification of PCR. **BMC Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1–14, 2016.

BUTZ, P. et al. Tree responses to moisture fluctuations in a neotropical dry forest as potential climate change indicators. **Ecological Indicators**, 2016.

CASTRO, L. E.; GUIMARÃES, C. C.; FARIA, J. M. R. Physiological, cellular and molecular aspects of the desiccation tolerance in *Anadenanthera colubrina* seeds during germination. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 4, p. 774–780, 2017.

CHEN, X. et al. Genome-wide analysis of soybean *hd-zip* gene family and expression profiling under salinity and drought treatments. **PloSOne** v. 9, n. 2, 2014.

CHOAT, B. et al. Global convergence in the vulnerability of forests to drought. **Nature**, v. 491, n. 7426, p. 752–755, 2012.

DERVEAUX, S.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 227–230, 2010.

EBONE, L. A.; CAVERZAN, A.; CHAVARRIA, G. Physiologic alterations in orthodox seeds due to deterioration processes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 145, n. October, p. 34–42, 2019.

FITTER, A.; HAY, R. **Environmental Physiology of Plants**. 3. ed. Academic Press, Inc, 2002. v. 1

FLEMING, M. B.; HILL, L. M.; WALTERS, C. The kinetics of ageing in dry-stored seeds : a

comparison of viability loss and RNA degradation in unique legacy seed collections. **Annals of Botany**, v. 123, p. 1133–1146, 2019.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 503–512, 2002.

HUANG, J. et al. Drylands face potential threat under 2 °C global warming target. **Nature Climate Change**, v. 7, n. 6, p. 417–422, 2017.

HUGGETT, J.; BUSTIN, S. A. Standardisation and reporting for nucleic acid quantification. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 16, n. 8, p. 399–405, 2011.

KAWANO, T. et al. Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction. **Plant Cell Physiol.**, v. 39, n. January, p. 721–730, 1998.

KOTAK, S. et al. Complexity of the heat stress response in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, n. 3, p. 310–316, 2007.

KRASENSKY, J.; JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 4, p. 1593–1608, 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

MATHEUS, M. T. et al. Superação da dormência em sementes de duas espécies de *Erythrina*. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 3, p. 48–53, 2010.

MOORE, J. P. et al. Adaptations of higher plant cell walls to water loss: Drought vs desiccation. **Physiologia Plantarum**, v. 134, n. 2, p. 237–245, 2008.

MORIN, X. et al. Long-term response of forest productivity to climate change is mostly driven by change in tree species composition. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

NAVARRO, E. et al. Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 231–250, 2015.

NAWAZ, J. et al. Seed Priming A Technique. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 6, n. 20, p. 1373–1381, 2013.

OLIVEIRA, M. K. T. et al. Desenvolvimento inicial de *Erythrina velutina* sob restrição hídrica. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 36, n. 88, p. 481–488, 2016.

OZAWA, M. et al. Hypaphorine, an indole alkaloid from *Erythrina velutina*, induced sleep on normal mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 3992–3994, 2008.

OZAWA, M. et al. TRAIL-enhancing activity of Erythrinan alkaloids from *Erythrina velutina*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 1, p. 234–236, 2009.

OZAWA, M.; KISHIDA, A.; OHSAKI, A. Erythrinan alkaloids from seeds of *Erythrina velutina*. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 59, n. 5, p. 564–7, 2011.

QU, C. et al. Inhibition of nitrogen and photosynthetic carbon assimilation of maize seedlings by exposure to a combination of salt stress and potassium-deficient stress. **Biological Trace Element Research**, v. 144, n. 1–3, p. 1159–1174, 2011.

REIS, R. C. R. **Tolerância a estresses abióticos em sementes de *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae - Papilionoideae) nativa da Caatinga**. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2012.

SANO, N. et al. Staying alive: Molecular aspects of seed longevity. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, n. 4, p. 660–674, 2016.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SILVA, A. H. et al. Pharmacognostical analysis and protective effect of standardized extract and rizonic acid from *Erythrina velutina* against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. 48, p. 307–312, 2016.

SILVA JUNIOR, V. T. et al. *Erythrina velutina* WILLD. (LEGUMINOSAE-PAPILIONOIDEAE) ocorrente em Caatinga e Brejo de Altitude de Pernambuco : Biometria, embebição e germinação. **Revista árvore**, Viçosa, v. 36, n. 2, p. 247–257, 2012.

SIVAGANESAN, M. et al. Improved strategies and optimization of calibration models for real-time PCR absolute quantification. **Water Research**, v. 44, n. 16, p. 4726–4735, 2010.

SMITH, C. J.; OSBORN, A. M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, n. 1, p. 6–20, 2009.

SNYMAN, M.; CRONJÉ, M. J. Modulation of heat shock factors accompanies salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 in tomato seedlings. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 8, p. 2125–2132, 2008.

STONE, S. L. The role of ubiquitin and the 26S proteasome in plant abiotic stress signaling. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. April, p. 1–10, 2014.

TANG, L. et al. Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress and high temperature. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 1380–1386, 2006.

TORRES, M. A.; DANGL, J. L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 4, p. 397–403, 2005.

VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, p. 151–159, 2005.

VENTURA, L. et al. Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 60, p. 196–206, 2012.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: A review. **Amino Acids**, v. 35, n. 4, p. 753–759, 2008.

VERSLUES, P. E.; SHARMA, S. Proline Metabolism and Its Implications for Plant-Environment Interaction. **The Arabidopsis Book**, v. 8, p. e0140, 2010.

WAHID, A. et al. Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, n. 3, p. 199–223, 2007.

WALTERS, C. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. **Planta**, v. 242, n. 2, p. 397–406, 2015.

WANG, L.-J.; LI, S.-H. Thermotolerance and related antioxidant enzyme activities induced by heat acclimation and salicylic acid in grape (*Vitis vinifera* L.) leaves. **Plant Growth Regulation**, v. 48, n. 2, p. 137–144, 2006.

WANG, W. et al. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 5, p. 244–252, 2004.

WANG, W. Q. et al. Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 86, n. November, p. 1–15, 2014.

WATERWORTH, W. M.; BRAY, C. M.; WEST, C. E. The importance of safeguarding genome integrity in germination and seed longevity. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 12, p. 3549–3558, 2015.

WRZACZEK, M.; BROSCHE, M.; KANGASJÄRVI, J. ROS signaling loops - production, perception, regulation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 5, p. 575–582, 2013.

XIONG, L.; ZHU, J. K. Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. **Physiologia Plantarum**, v. 112, n. 2, p. 152–166, 2001.

YU, F.; WU, Y.; XIE, Q. Ubiquitin-Proteasome System in ABA Signaling: From Perception to Action. **Molecular Plant**, v. 9, n. 1, p. 21–33, 2016.

ZHIGUO, E. et al. Characterization of the ubiquitin- conjugating enzyme gene family in rice and evaluation of expression profiles under abiotic stresses and hormone treatments. **PloSOne**, p. 1–24, 2015.

ZHOU, W. et al. A matter of life and death: Molecular, physiological, and environmental regulation of seed longevity. **Plant Cell and Environment**, p. 0–3, 2019.

#### 4. ARTIGO 1: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA PLANTA MEDICINAL

*Erythrina velutina* Willd.

Periódico a ser submetido: Natural Products and Bioprospecting | ISSN: 2192-2195 (Impresso); 2192-2209 (Online)

##### RESUMO

As plantas possuem vários usos biotecnológicos, como farmacêuticos, alimentícios, combustível, inseticida e como fonte de sequências gênicas para a engenharia genética. O objetivo nesse estudo foi identificar o potencial biotecnológico de *Erythrina velutina*, uma planta nativa brasileira altamente utilizada na medicina tradicional. A análise foi baseada na prospecção de dados científicos em bases de dados reconhecidas de artigos, patentes, e sequências de nucleotídeos. As propriedades medicinais de fitocompostos extraídos de *E. velutina* são evidentes em vários estudos, apesar da eficiência e segurança do uso desses compostos químicos ainda estarem sendo testadas. É relatado o potencial para outros usos químicos, como antibacteriano e bioinseticida. Na análise de informações moleculares os *barcodes* para estudos filogenéticos são citados; e, em patentes, essa espécie é fonte de polinucleotídeos e polipeptídios. O número de patentes e nucleotídeos sequenciados para *E. velutina* ainda é baixo (21 e 10, respectivamente), porém, os dados científicos estabelecem essa espécie como proeminente e com alto potencial biotecnológico.

**Palavras-chave:** mulungu; dados científicos; patentes; genômica

##### ABSTRACT

**Title: Biotechnological potential of medicinal plant *Erythrina velutina* Willd.**

Plants have several biotechnological uses, such as pharmaceuticals, food, fuel, insecticide and as a source of gene sequences for genetic engineering. The aim of this study was to identify the biotechnological potential of *Erythrina velutina*, a native Brazilian plant highly used in

traditional medicine. The analysis was based on the prospecting of scientific data in recognized databases of articles, patents, and nucleotide sequences. The medicinal properties of phytocomposites extracted from *E. velutina* are evident in several studies, although the efficiency and safety of using these chemical compounds are still being tested. The potential for other chemical uses, such as antibacterial and bioinsecticide, is reported. In the analysis of molecular information, barcodes for phylogenetic studies are mentioned; and, in patents, this species is a source of polynucleotides and polypeptides. The number of patents and nucleotides sequenced for *E. velutina* is still low (21 and 10, respectively), however, scientific data establish this species as prominent and with high biotechnological potential.

**Keywords:** mulungu; scientific data; patents; genomic

#### 4.1. Introdução

As plantas são historicamente fonte de compostos com propriedades medicinais, ainda sendo a fonte primária de tratamento para diversas enfermidades para a maioria da população global (ROMANELLI et al., 2015). Vários compostos com propriedades farmacológicas foram isolados de plantas, apresentando propriedades no tratamento e cura de várias doenças e levado ao desenvolvimento de medicamentos clinicamente eficientes (WANGCHUK, 2018).

A flora brasileira é rica em biodiversidade e potencial medicinal amplamente explorado por comunidades tradicionais. No entanto, o número de produtos herbais licenciados por agências de saúde, principalmente aqueles compostos de plantas nativas, ainda é pequeno quando comparado a outros países (CECÍLIA et al., 2014).

Além do uso farmacológico, outros potenciais biotecnológicos da flora nacional provêm da fonte de material genético para o desenvolvimento de cultivares. Seja para a produção de alimentos (ANDRADE et al., 2016), biocombustíveis (HOANG et al., 2015) na produção de madeira e celulose (SILVA et al., 2019), o material genético nativo ou naturalizado tem sido

usando em programas de melhoramento e conservado como valiosa fonte de recursos biológicos (ALVES; AZEVEDO, 2018).

As plantas da família Fabaceae estão entre as mais importantes pelas suas propriedades medicinais, 11,2% das plantas dessa família – mais de 2000 espécies, fazem parte da medicina tradicional. Essa família possui alcaloides como seu componente principal (WILLIS, 2017).

O gênero *Erythrina*, da família Fabaceae, é composto por mais de 120 espécies ocorrendo em áreas tropicais e subtropicais. A origem do epíteto *Erythrina* vem da palavra grega “erythros”, que significado vermelho, e está relacionado a ação do pigmento presente em sementes e flores. No Brasil, existem oito espécies dentro desse gênero: *Erythrina crista-galli* L., *E. falcata* Benth., *E. fusca* Lour., *E. mulungu* Mart., *E. speciosa* Andrews, *E. poeppigiana* (Walp.) O.F. Cook, *E. verna* Vell. e *velutina* Willd. A este gênero tem sido relatadas ações atribuídas a alta produção de alcaloides e compostos fenólicos, como flavonoides, flavonas, isoflavonóides e pterocarpanos, produzidos em sementes, folhas, casca e flores (HUSSAIN et al., 2016; SOTO-HERNÁNDEZ et al., 1996).

*Erythrina velutina* Willd. é uma espécie nativa das Antilhas, Brasil, Colômbia, Equador, Galápagos e Venezuela. No Brasil, ocorre de maneira ampla, principalmente na Caatinga e Mata Atlântica. A medicina popular tem atribuído a esta espécie propriedades calmantes, sedativas, anestésicas e analgésicas a casca e sementes, relacionadas a ação do alcaloide eritrina (PALUMBO; GARDIN; NAKAMURA, 2016). Outros compostos também tem sido relatados, como auronas, chalconas, catequinas, esteróis, flavonóis, flavonas, flavononas, flavonoides, fenóis, leucoantocianinas, saponinas, taninos, triterpenóides e xantonas em extratos de folhas e inflorescências (CARVALHO et al., 2009; PALUMBO; GARDIN; NAKAMURA, 2016).

O objetivo desse estudo foi identificar o potencial biotecnológico da *Erythrina velutina* por meio de prospecção de dados científicos em artigos, patentes e sequências de nucleotídeos.

## 4.2. Material e Métodos

Dados científicos foram coletados em revistas científicas indexadas nas bases internacionais: *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), *Web of Science* e Scopus. Os dados também foram prospectados em patentes depositadas nas bases *World Intellectual Property Organization* (WIPO), *United States Patent and Trademark Office* (USPTO), *European Patent Office* (EPO), Espacenet-Latipat e o Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). Para a pesquisa de dados moleculares, as bases de dados *Barcode of Life Data System* (BOLD) e *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) foram usadas para as pesquisas de sequências de genes, genoma e proteínas.

Os termos usados foram “Erythrina”, “*Erythrina velutina*”, “Erythrina medicinal” e “*Erythrina velutina* medicinal” em todas as bases para publicações que apresentaram os termos no título, resumo, descrição ou palavras-chave.

Todos os dados foram coletados em maio de 2018.

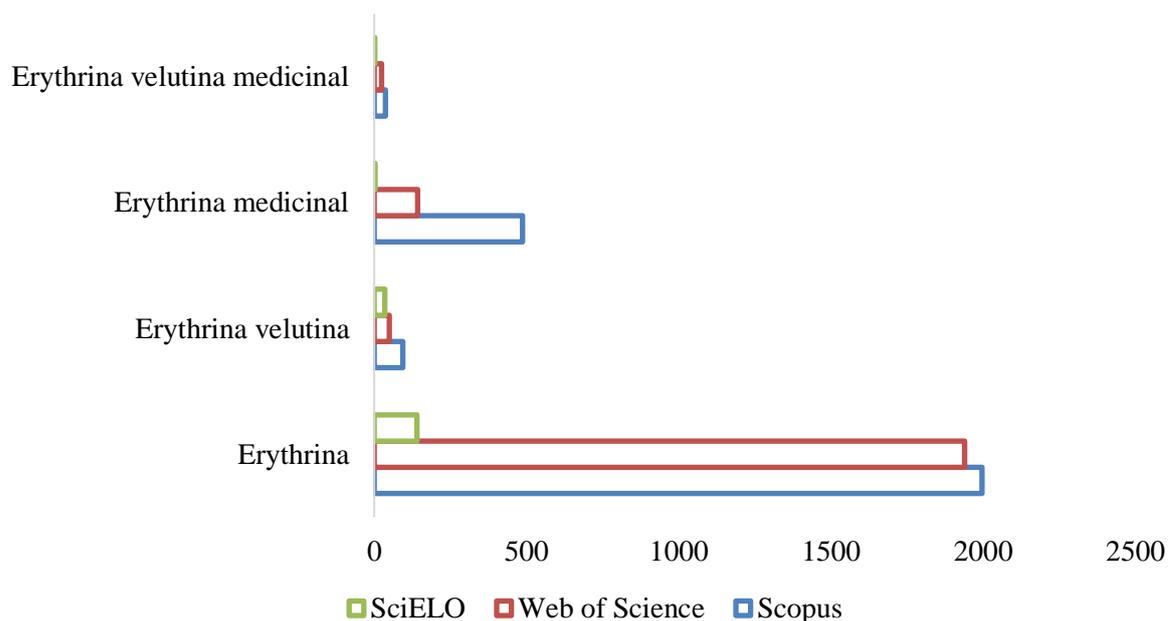
## 4.3. Resultados e Discussão

### 4.3.1. Artigos científicos

Existe grande número de dados científicos para as publicações relacionadas ao gênero *Erythrina* comparado a espécie *Erythrina velutina* (Tabela 1.1). Esse resultado é esperado devido ao número de espécies dentro do gênero, muitas com propriedades medicinais.

As bases de dados Scopus, *Web of Science* e CAPES apresentaram resultados similares, exceto para o termo “Erythrina medicinal” em Scopus, que apresentou um resultado muito maior, enquanto a base SciELO apresentou os menores valores para todos os termos. Isso pode ser explicado pelo fato das bases Scopus e *Web of Science* serem coleções de artigos científicos publicados mundialmente. A base de dados ScieELO, no entanto, é restrita a países em

desenvolvimento, principalmente na América Latina, contribuindo para os menores valores de dados científicos disponíveis.



**Figura 1.1.** Número de artigos científicos publicados por termo nas bases de dados Scopus, *Web of Science* e SciELO.

A maioria das publicações relacionadas a espécie *Erythrina velutina* são do Brasil, sendo uma espécie nativa, porém não endêmica, no país. Entretanto, existem alguns artigos do Japão que buscam elucidar a composição química da espécie, enfatizando o interesse internacional na flora brasileira e seu potencial.

Em relação aos campos de publicação, os artigos com o gênero *Erythrina* estavam bem distribuídos entre agricultura e ciências biológicas; biologia molecular e química; farmácia e farmacologia. Publicações mais recentes estão relacionadas a restauração de florestas, agroecossistemas, produção de foragem e sequestro de carbono, quando não mencionam propriedades químicas medicinais. No gênero, a espécie *E. crista-galli* L. foi usada na avaliação da tolerância e ao potencial de biorremediação em solo contaminado com petróleo. A germinação foi maior e mais evidente em concentrações elevadas de contaminante e os indivíduos apresentaram diferenças na anatomia das raízes. *E. crista-galli* é potencialmente recomendada para solos contaminados com petróleo (FARIAS et al., 2009).

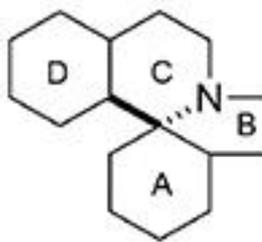
Especificamente para *Erythrina velutina*, a maioria das publicações está associada aos campos de agricultura e ciências biológicas; biologia molecular; farmácia e farmacologia e bioquímica. *E. velutina* é uma espécie pioneira muito recomendada para o reflorestamento devido ao seu crescimento rápido, adaptabilidade e plasticidade a diferentes climas e ambientes (HOLANDA et al., 2010; SOUZA et al., 2016), como resultado há um número expressivo de publicações em agricultura e ciências biológicas.

Em estudo sobre flutuações da umidade do ar, *E. velutina* foi estabelecida como uma espécie indicadora de mudanças climáticas. Foram avaliadas as variações fenológicas em resposta a disponibilidade de água em escala sazonal (BUTZ et al., 2016).

Além disso, a ocorrência de *E. velutina* em ambientes úmidos e secos a torna uma espécie de interesse para estudos de tolerância aos estresses abióticos em níveis fisiológicos, bioquímicos (RIBEIRO et al., 2014) e moleculares. Existem também estudos sobre a diversidade genética dessa espécie, uma preocupação de pesquisadores que identificaram áreas onde a ocorrência natural e biodiversidade dessa espécie está ameaçada pelo uso alternativo do solo (AZEVEDO et al., 2013; GONÇALVES et al., 2014; SOUZA; SILVA-MANN; MELO, 2014).

As publicações nas áreas de farmácia e farmacologia, bioquímica e química medicinal estão relacionadas aos vários compostos bioativos com propriedades medicinais encontrados nessa espécie, e que atualmente estão sendo estudados para determinar sua eficácia e segurança.

Os alcaloides eritrínicos, compostos que caracterizam esse gênero, possuem uma conformação única em espiroamina tetracíclica, apresentando várias propriedades biológicas (Figura 1.1) (MAERTENS; HOMME; CANESI, 2015).



**Figura 1.2.** Estrutura de composição principal de compostos eritrínicos. Fonte: Maertens et al. 2015.

Esses compostos são de grande interesse industrial como alvos para a síntese sintética total (MOSTOWICZ, 2015). O alcaloide indólico hipaforina e quatro alcaloides eritrínicos foram isolados de sementes de *E. velutina* (OZAWA; KISHIDA; OHSAKI, 2011) e a hipaforina apresenta potencial industrial como indutora de sono, como demonstrado em estudos com animais (OZAWA et al., 2008). Além disso, *E. mulungu* tem uso comercial em um fitoterápico indutor de sono e ansiolítico (RECH et al., 2017). Outros alcaloides eritrínicos, tais como: erisotrina-N-óxido, eritralina, 8-oxo-eritralina, erisotrina, erisovina, glicoesisotrina e erimelantina também foram isolados de sementes de *E. velutina*. Esses compostos, juntamente com hipaforina, foram testados em terapias de tratamento de câncer, agindo sinergicamente com Fator de Necrose de Tumor Relacionado a Apoptose (TRAIL) para a indução de apoptose seletiva em células cancerígenas (OZAWA et al., 2009). Outro composto purificado de *E. velutina* é a faseolidina, identificada como *scavenger* de radicais livres (RABELO et al., 2001). A faseolidina também foi extraída de *E. droogmansiana* e apresentou propriedades medicinais. Esse composto também ocorre em *E. burana*, *E. crista-galli*, *E. sandwicensis*, *E. sigmoidea* e *E. variegata*. antioxidantes (EMMANUEL et al., 2016).

Catequinas, esteroides, flavanois, flavanonas, flavanoides, fenois, saponinas, taninos, triterpenoides e xantonas também foram identificadas em extratos aquosos de *E. velutina*, grupos químicos conhecidos por apresentarem propriedades medicinais (CARVALHO et al., 2009). Extratos hidroalcoólicos de *E. velutina* e *E. mulungu* apresentaram atividade ansiolítica, antinoceptiva e anticonvulsiva quando testados em ratos, confirmando o uso popular desta

espécie como sedativo, analgésico e anestésico (RAUPP et al., 2008; TEIXEIRA-SILVA et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2003, 2007).

O extrato etanólico de *E. velutina* apresentou efeitos neuroprotetores em ratos tratados contra o déficit de memória causado por isquemia (SOUSA et al., 2017). Esses efeitos também foram avaliados em cultura *in vitro*. O extrato de *E. velutina* composto de hesperidina, homohesperidina, abissina, sigmoidina C e ácido rizônico agiu como antioxidante, sugerindo que esses compostos possuem potencial terapêutico contra doenças degenerativas como Alzheimer e Parkinson (SILVA et al., 2016). Outra análise *in vitro* sobre o efeito de extrato aquoso de *E. velutina* rico em alcaloides e hexanos, com propriedades anticolinesterásicas indicadas para o tratamento de Alzheimer (ALMEIDA, CASTRO et al., 2016; SANTOS et al., 2012b). A partir de sementes de *E. velutina* também foram purificados inibidores de tripsina, tripsina Kunitz e quimiotripsina, identificados como antitumorais, anti-inflamatórios, anticoagulantes, antielastase e gastroprotetores (MACHADO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2017).

Além das propriedades medicinais, outros usos químicos foram estudados para compostos extraídos de espécies de *Erythrina*. Os alcaloides encontrados em *Erythrina* inibem a síntese de proteínas e DNA em plantas (PARSONS; WILLIAMS, 2000) e apresentam ação genotóxica em células de raízes de cebola (*Allium cepa* L.), formando anormalidades celulares (SILVA et al., 2011). A ação alelopática de extratos de sementes de *E. velutina* influenciaram a germinação e desenvolvimento de alface (*Lactuca sativa* L.), espécie modelo para este tipo de análise (CENTENARO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012). Além disso, foi encontrada evidência de atividade antibacteriana de componentes da casca de *E. velutina* contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (VIRTUOSO et al., 2005). As propriedades bioinseticidas foram observadas em vicilinas extraídas de sementes de *E. velutina* contra *Plodia interpunctella* e *Ceratitis capitata* (Wied) (AMORIM et al., 2008; MACEDO et al., 2008).

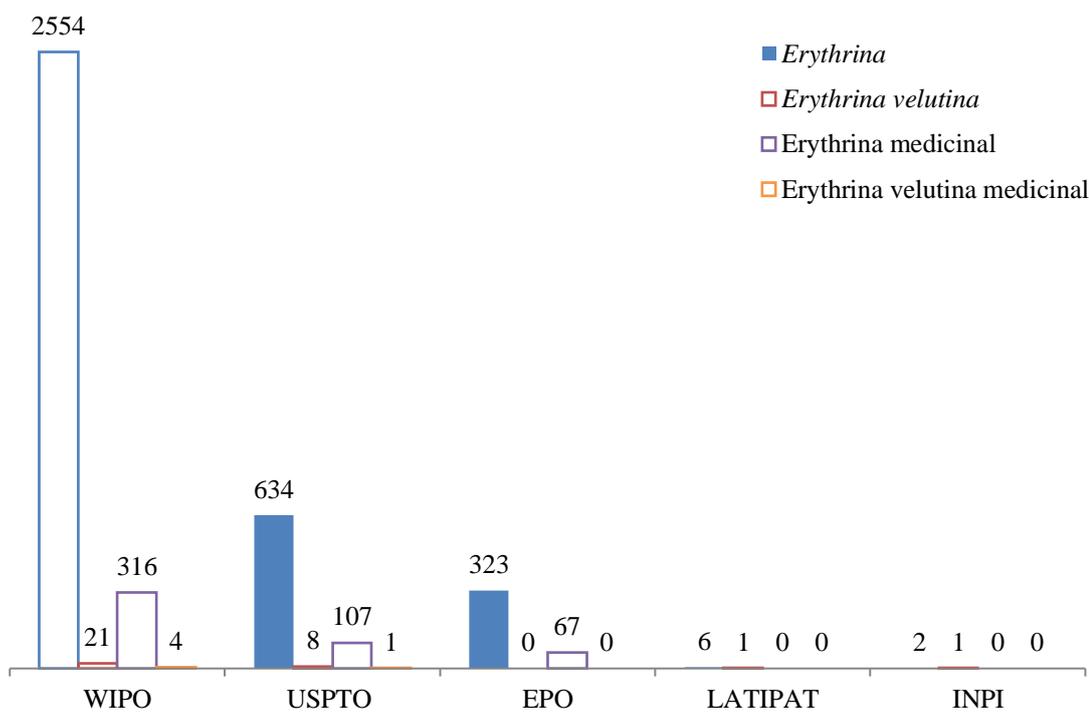
### 4.3.2. Patentes

Assim como para o número de artigos científicos publicados, o número de patentes foi maior para o gênero *Erythrina* (Figura 1.2).

A base de dados WIPO é referência mundial como fonte de dados de propriedade intelectual. Esta base apresentou o mais alto número de depósitos, com uma quantidade expressiva sob o termo “Erythrina”. Outros depósitos, com um número muito mais baixo estão relacionados aos termos “Erythrina medicinal”, “*Erythrina velutina*” e “*Erythrina velutina medicinal*”.

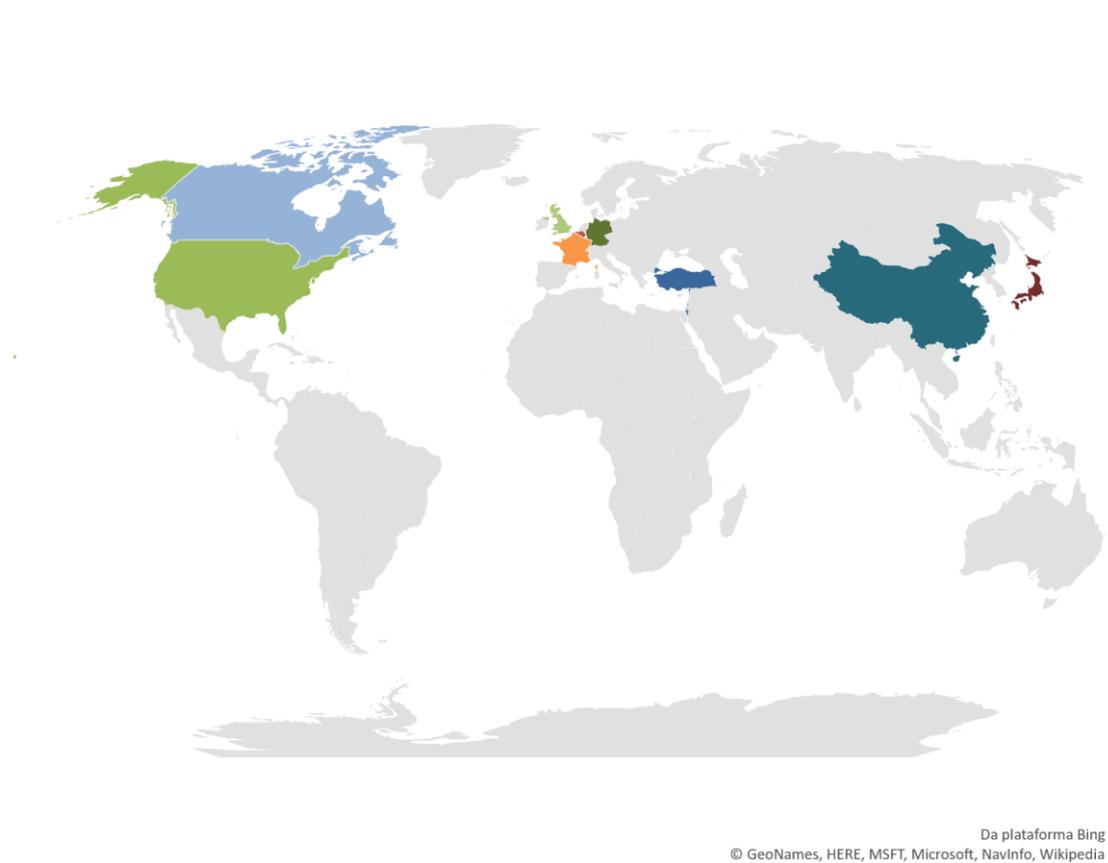
A base de dados americana, USPTO, pertencente a agência federal responsável por conceder patentes e registrar marcas e apresentou os maiores resultados para patentes relacionadas ao termos “Erythrina” e “Erythrina medicinal”.

O escritório de patentes europeu, EPO, apresentou apenas resultados para o gênero *Erythrina* e suas propriedades medicinais. E o Espacenet-Latipat – base de dados para a América Latina e Espanha – e o INPI – autarquia brasileira para a concessão e garantia de propriedade intelectual para a indústria – apresentaram os menores resultados, com apenas seis e dois depósitos para o gênero, e apenas um em cada base de dados para a espécie, não sendo registrados resultados para fins medicinais.



**Figura 1.3.** Número de depósitos de patentes por termo nas bases *World Intellectual Property Organization* (WIPO), *United States Patent and Trademark Office* (USPTO), *European Patent Office* (EPO), Espacenet-Latipat e Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI).

A maioria das patentes relacionadas ao gênero *Erythrina* são de Israel, Bélgica, Estados Unidos e Japão (Figura 1.3) e para *E. velutina*, as patentes são de projetos americanos e brasileiros.



- Evogene (Israel)
- Cropdesign (Bélgica)
- Avon Products (EUA)
- Seeds (Israel)
- Yissum Research Development (Israel)
- CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) (França)
- Israel State
- National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Japão)
- Bayer Cropscience (Alemanha)
- Futuragene Israel (Israel)
- Hainan Zhengye Zhongong Technology (China)
- Konica Minolta (Japão)
- Protalix (Israel)
- Riken (Japão)
- Smartcells (Reino Unido)
- University of Illinois (EUA)
- Yale University (EUA)
- Beijing Kefa Weiye Pesticide Technology Center (Japão)

**Figura 1.4.** Principais empresas depositárias de patentes do gênero *Erythrina*. Fonte: Autor.

No entanto, não há um número alto de publicações de artigos desses países que são os maiores depositários de patentes usando *Erythrina*. Contrariamente, o número de patentes provenientes de projetos brasileiros é muito menor do que artigos publicados, demonstrando a falta de conexão entre a pesquisa e a geração de produtos economicamente viáveis. No Japão, por exemplo, os artigos publicados são mais bem relacionados as patentes geradas, indicando uma pesquisa mais voltada para a criação produtos. Isso ressalta o interesse internacional em desenvolver produtos usando compostos da flora brasileira, considerando que a maioria dos depositários de patentes na área farmacêutica são estrangeiros (MOREIRA et al., 2005).

Várias patentes com *E. velutina* estão associadas a protocolos e usos medicinais em potencial. No entanto, a aplicação de compostos extraídos de plantas em medicamentos industriais é um processo moroso devido a necessidade de testes extensivos para verificar a eficiência e segurança. A maioria das patentes com *E. velutina* na maior base de dados, WIPO, estão associadas a composição de lectinas e métodos para modular a resposta imune a um antígeno (SEGAL; YOUNG, 2018). Outras estão diretamente relacionadas a extratos da planta com propriedades medicinais. Por exemplo, uma patente para um indutor de sono usando hipaforina, dos mesmos pesquisadores japoneses mencionados anteriormente (OSAKI; HONDA, 2008; OZAWA et al., 2008).

Há, também, um novo interesse industrial em usar plantas medicinais nativas em patentes de protocolos moleculares avançados, em consonância com os artigos publicados na área (HAO; XIAO, 2015; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; WILSON; ROBERTS, 2014). Análises genômicas são capazes de elucidar características importantes das plantas, como os genes envolvidos em rotas bioquímicas de fitocompostos ativos e como intensificá-los. Descobertas, como a capacidade de estresses abióticos potencializarem a produção de metabólitos secundários, são usadas como ferramentas de produção industrial desses compostos (CASTELLARIN et al., 2007).



mencionando o termo “*Erythrina*” e seis para “*Erythrina velutina*”. Para o gênero, todos os resultados estavam distribuídos em nove países, a maioria na Costa Rica e para a espécie *E. gibbosa* e *E. lanceolata*. Os resultados para *E. velutina* foram metade para estudos brasileiros e metade para países não identificados.

Os dados para “*Erythrina*” estão relacionados a *barcodes* em estudos de filogenia (DE LUCA et al., 2018), como as relações entre leguminosas faseoloide – baseados em sequências de nucleotídeos de cloroplastos (PFEIL et al., 2009) e; em estudos sobre a eficácia de *barcodes* de DNA no processo de identificação de materiais vegetais processados ou mal conservados comumente usados na medicina tradicional da África do Sul (MANKGA; YESSOUFOU; MOTEETEE, 2013).

Todos os resultados para “*Erythrina velutina*” são para subunidades de Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxigenase (Rubisco) de diferentes tamanhos de pares de bases. Considerando o genoma da Rubisco é de herança extracromossomal, não-recombinante e estruturalmente estável, é um dos melhores genes para *barcodes* de DNA de plantas (GANIE et al., 2015).

A outra base de dados usada nessa categoria, NCBI, fornece acesso a dados biomédicos e genômicos. Nessa base, para o termo “*Erythrina*” foram encontrados 175 nucleotídeos, 35 *popsets* (sequências de DNA derivadas de estudos de populações, filogenéticos, mutações e ecossistemas), 92 grupos de proteínas idênticas, 157 proteínas e 17 estruturas proteicas. E para “*Erythrina velutina*” os resultados foram 10 nucleotídeos, 3 *popsets*, 4 grupos de proteínas idênticas e 5 proteínas. Não foram feitas distinções entre os países depositários dessas informações. A maioria dos resultados são de sequências de nucleotídeos para o genoma de cloroplasto de *E. velutina* e os dados de *popset* estão relacionados a estudos filogenéticos, como encontrado na base de *barcodes* (TRIPATHI et al., 2013). Os resultados de proteínas estão associados aos genes de nucleotídeos e *popsets*.

#### 4.4. Conclusões

*Erythrina velutina* possui alto potencial biotecnológico provado pelos diversos estudos que identificaram compostos bioativos extraídos dessa planta com propriedades medicinais, apesar de medicamentos resultantes desses estudos ainda estarem em fase de desenvolvimento. Existe também um potencial para essa espécie como fonte de compostos para soluções antibacterianas e inseticidas. E, apesar de incipiente, patentes e informações genéticas incluindo o gênero e a espécie também apresentam um forte potencial para uso dessas plantas em programas genéticos avançados devido a sua plasticidade.

#### 4.5. Referências bibliográficas

ALMEIDA E CASTRO, V. T. N. DE et al. The anticholinesterase properties of plants from the northeast of Brazil selected by an ethnopharmacological study for disorders relating to the nervous system. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, p. S195–S200, 2016.

ALVES, A. A. C.; AZEVEDO, V. C. R. Embrapa network for brazilian plant genetic resources conservation. **Biopreservation and Biobanking**, v. 16, n. 5, p. 350–360, 2018.

AMORIM, T. et al. Proteolytic digestive enzymes and peritrophic membranes during the development of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Piralidae): Targets for the action of soybean Trypsin Inhibitor (SBTI) and Chitin-Binding Vicilin (EvV). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7738–7745, 2008.

ANDRADE, L. R. B. DE et al. Genetic vulnerability and the relationship of commercial germplasms of maize in Brazil with the nested association mapping parents. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 1–14, 2016.

AZEVEDO, R. M. DE et al. Variabilidade genética em populações de *Erythrina velutina* Willd. por meio de isoenzimas. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 11, n. 566, p. 43–51, 2013.

BUTZ, P. et al. Tree responses to moisture fluctuations in a neotropical dry forest as potential climate change indicators. **Ecological Indicators**, 2016.

CARVALHO, A. C. C. S. et al. Evidence of the mechanism of action of *Erythrina velutina* Willd (Fabaceae) leaves aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 2, p. 374–

378, 2009.

CASTELLARIN, S. D. et al. Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. **Planta**, v. 227, n. 1, p. 101–112, 2007.

CECÍLIA, A. et al. Regulation of herbal medicines in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, p. 503–506, 2014.

CENTENARO, C. et al. Contribuição ao estudo alelopático de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 304–308, 2009.

CHAUDHARY, S.; SHARMA, P. C. Next generation sequencing-based exploration of genomes and transcriptomes of medicinal plants. **Indian Journal of Plant Physiology**, 2016.

DE LUCA, A. et al. DNA barcoding to confirm the morphological identification of the coral trees (*Erythrina* spp., Fabaceae) in the ancient gardens of Naples (Campania, Italy). **Plants**, v. 7, n. 2, 2018.

EMMANUEL, T. et al. Chemical constituents from *Erythrina droogmansiana* (Fabaceae), radical scavenging and antibacterial potential of some extracts and compounds. **Natural Products**, v. 12, n. 1, p. 012–0120, 2016.

EVOGENE. **Isolated polynucleotides and polypeptides, and methods of using same for increasing nitrogen use efficiency, yield, growth rate, vigor, biomass, oil content, and/or abiotic stress tolerance**. United States WIPO, , 2018.

FARIAS, V. DE et al. Phytodegradation Potential of *Erythrina crista-galli* L., Fabaceae, in Petroleum- Contaminated Soil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, n. 1, p. 10–22, 2009.

GANIE, S. H. et al. Authentication of medicinal plants by DNA markers. **Plant Gene**, v. 4, p. 83–99, 2015.

GONÇALVES, L. O. et al. Caracterização genética de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) em áreas de baixa ocorrência. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 2, p. 290–298, 2014.

HAO, D.; XIAO, P. Genomics and Evolution in Traditional Medicinal Plants : Road to a Healthier Life. **Evolutionary Bioinformatics**, n. 11, p. 197–212, 2015.

- HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Publishing Group**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.
- HOANG, N. V. et al. Potential for genetic improvement of sugarcane as a source of biomass for biofuels. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, n. NOV, p. 1–15, 2015.
- HOLANDA, F. S. R. et al. Crescimento inicial de espécies florestais na recomposição da mata ciliar em taludes submetidos à técnica da bioengenharia de solos. **Ciencia Florestal**, v. 20, n. 1, p. 157–167, 2010.
- HUSSAIN, M. M. et al. Constituents of *Erythrina* - a Potential Source of Secondary Metabolites : A Review. **Bangladesh Pharmaceutical Journal**, v. 19, n. 2, p. 237–253, 2016.
- MACEDO, L. et al. Larvicidal effects of a chitin-binding vicilin from *Erythrina velutina* Seeds on the mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 802–808, 2008.
- MACHADO, R. J. A. et al. Characterization and pharmacological properties of a novel multifunctional Kunitz inhibitor from *Erythrina velutina* Seeds. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.
- MAERTENS, G.; HOMME, C. L.; CANESI, S. Total synthesis of natural products using hypervalent iodine reagents. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, n. January, p. 1–16, 2015.
- MANKGA, L. T.; YESSOUFOU, K.; MOTEETEE, A. M. Efficacy of the core DNA barcodes in identifying processed and poorly conserved plant materials commonly used in South African traditional medicine. **Zookeys**, v. 233, p. 215–233, 2013.
- MOREIRA, A. C. et al. Pharmaceutical patents on plant derived materials in Brazil : Policy , law and statistics. **World Patent Information**, 2005.
- MOSTOWICZ, D. Heck cyclization strategy for preparation of Erythrinan alkaloids. **The Journal of Organic Chemistry**, v.80, p. 1957-1963, 2015.
- OLIVEIRA, A. K. et al. Alelopatia de extratos de diferentes órgãos de mulungu na germinação de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 480–483, 2012.
- OLIVEIRA, V. C. DE L. et al. Gastroprotective and antielastase effects of protein inhibitors from *Erythrina velutina* seeds in an experimental ulcer model. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 95, p. 243–250, 2017.

OSAKI, A.; HONDA, K. **Sleep indulging agent and medicinal composition and food containing the same.** Japan, WIPO, 2008.

OZAWA, M. et al. Hypaphorine, an indole alkaloid from *Erythrina velutina*, induced sleep on normal mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 3992–3994, 2008.

OZAWA, M. et al. TRAIL-enhancing activity of Erythrinan alkaloids from *Erythrina velutina*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 1, p. 234–236, 2009.

OZAWA, M.; KISHIDA, A.; OHSAKI, A. Erythrinan alkaloids from seeds of *Erythrina velutina*. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 59, n. 5, p. 564–7, 2011.

PALUMBO, C. F. G.; GARDIN, N. E.; NAKAMURA, M. U. *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth e *Erythrina velutina* Willd. – Aspectos farmacológicos e perspectiva antropológica de plantas brasileiras. **Arte Médica Ampliada**, v. 36, n. 4, p. 152–161, 2016.

PARSONS, A. F.; WILLIAMS, D. A. J. Radical cyclisation reactions leading to polycyclics related to the Amaryllidaceae and *Erythrina* alkaloids. **Tetrahedron**, v. 56, p. 7217–7228, 2000.

PFEIL, B. E. et al. Relationships among phaseoloid legumes based on sequences from eight chloroplast regions. **Systematic Botany**, v. 34, p. 115–128, 2009.

RABELO, L. A. et al. Homohesperetin and phaseollidin from *Erythrina velutina*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 5, p. 543–544, 2001.

RAUPP, I. M. et al. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 2, p. 295–299, 2008.

RECH, K. et al. Brazilian panorama about the registration and use of herbal medicines. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 16, n. 6, p. 556–569, 2017.

RIBEIRO, R. C. et al. Activity of antioxidant enzymes and proline accumulation in *Erythrina velutina* Willd. seeds subjected to abiotic stresses during germination. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 2, p. 231–239, 2014.

ROMANELLI, C. et al. **Connecting Global Priorities: Biodiversity and Human Health: A State of Knowledge Review.** World Health Organization/Secretariat of the UN Convention on Biological Diversity, 2015.

SANTOS, W. P. et al. In vitro and ex vivo anticholinesterase activities of *Erythrina velutina* leaf extracts. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 7, p 919-924, 2012.

SEGAL, A. H.; YOUNG, E. **Lectin compositions and methods for modulating an immune response to an antigen**. United States, WIPO, 2018.

SILVA, A. H. et al. Pharmacognostical analysis and protective effect of standardized extract and rizonic acid from *Erythrina velutina* against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. 48, p. 307–312, 2016.

SILVA, D. S. B. S. et al. Genotoxicity and cytotoxicity of *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae, on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 1, p. 92–97, 2011.

SILVA, P. H. M. DA et al. Selection of *Eucalyptus grandis* families across contrasting environmental conditions. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 47–54, 2019.

SOTO-HERNÁNDEZ, R. M. et al. *Erythrina*, a Potential Source of Chemicals from the Neotropics. **Bioactive Compounds in Phytomedicine**, p. 163–184, 1996.

SOUSA, F. T. R. DE et al. Effects of standard ethanolic extract from *Erythrina velutina* in acute cerebral ischemia in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, n. November, p. 1230–1239, 2017.

SOUZA, D. C. L.; SILVA-MANN, R.; MELO, M. F. DE V. Indicadores de sustentabilidade para conservação genética de *Erythrina velutina* Willd., em área de Mata Ciliar. **Revista Árvore**, v. 38, n. 6, p. 1103–1113, 2014.

SOUZA, E. M. S. et al. A comparative framework of the *Erythrina velutina* tree species in reforested land and native populations. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, 2016.

TEIXEIRA-SILVA, F. et al. Benzodiazepine-like effects of the alcohol extract from *Erythrina velutina* leaves: Memory, anxiety, and epilepsy. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 5, p. 321–328, 2008.

TRIPATHI, A. M. et al. The Internal Transcribed Spacer ( ITS ) Region and trnhH- psbA are suitable candidate loci for DNA Barcoding of tropical tree species of India. **PlosOne**, v. 8, n. 2, 2013.

VASCONCELOS, S. M. M. et al. Antinociceptive activities of the hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *E. mulungu* in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 7, p. 946–949, 2003.

VASCONCELOS, S. M. M. et al. Anticonvulsant activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu*. **Journal of Ethno-pharmacology**, v. 110, p. 271–274, 2007.

VIRTUOSO, S. et al. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 137–142, 2005.

WANGCHUK, P. Therapeutic applications of natural products in herbal medicines, biodiscovery programs, and biomedicine. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 8, n. 1, p. 1-20, 2018.

WILLIS, K. J. **State of the World's Plants 2017**. Royal Botanic Gardens Kew, 2017.

WILSON, S. A.; ROBERTS, S. C. Metabolic engineering approaches for production of biochemicals in food and medicinal plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 174–182, 2014.

## **5. ARTIGO 2: QUALIDADE DE SEMENTES DE *Erythrina velutina* Willd. POR ANÁLISES FISIOLÓGICAS E DE IMAGENS DE RAIOS-X**

**Periódico a ser submetido:** Journal of Seed Science | ISSN: 2317-1537 (Impresso); 2317-1545 (Online)

### **RESUMO**

Sementes ortodoxas toleram o armazenamento prolongado, sendo este uma estratégia de conservação da biodiversidade. No entanto, o tempo sob armazenamento pode afetar a viabilidade e o vigor das sementes, que pode ser monitorado por meio de análises de qualidade. Assim, objetivou-se avaliar dois lotes armazenados em câmara fria de *Erythrina velutina*, espécie nativa ortodoxa, usando-se a análise de imagens de raios-x visando avaliar a viabilidade e o vigor. O lote 1 foi composto de sementes de Pernambuco, coletadas em 2008 e o lote 2 de sementes da Bahia, coletadas em 2016. Foram avaliados o peso de 1.000 sementes, teor de água, condutividade elétrica, análise de imagens de raios-x, morfometria, germinação, tamanho de plântula e relação parte aérea/radícula de plântulas. O lote 1 apresentou maior condutividade elétrica, menor teor de água e menor germinação e vigor. Ainda para esse lote, foram identificadas na análise das imagens de raios-x 18% de sementes com espaços vazios. E usando-se a associação da análise de raios-x, por meio da avaliação da densidade interna das sementes, com os resultados de germinação identificaram-se as sementes com melhor vigor para o lote 2. Os lotes apresentaram germinação de 17% e 43% de germinação, sendo o lote 1 altamente deteriorado após o longo período de armazenamento. A análise da densidade interna das sementes por raios-x diferencia sementes com maior capacidade germinativa em lotes com moderada deterioração.

**Palavras-chave:** mulungu. ImageJ, germinação, análise de imagens

## ABSTRACT

### **Title:** *Erythrina velutina* Willd. seed quality by physiological analysis and x ray images

Orthodox seeds tolerate prolonged storage, which is a strategy for biodiversity conservation. However, the time under storage can affect the viability and vigor of the seeds, which can be monitored through quality analysis. Thus, the objective was to evaluate two lots stored in a cold chamber of *Erythrina velutina*, a native orthodox species, using the analysis of x-ray images in order to quantify the viability and vigor. Lot 1 consisted of seeds from Pernambuco, collected in 2008 and lot 2 from seeds from Bahia, collected in 2016. The weight of 1,000 seeds, water content, electrical conductivity, analysis of x-ray images, morphometry, germination, seedling size and seedling shoot/root ratio were evaluated. Lot 1 showed higher electrical conductivity, lower water content and less germination and vigor. Also, for this lot, 18% x-ray images of seeds with empty spaces were identified in the analysis of the x-ray images. And using the association of the x-ray analysis, through the evaluation of the internal density of the seeds, with the germination results, the seeds with the best vigor for lot 2 were identified. The lots had germination of 17% and 43% % germination, lot 1 being highly deteriorated after the long period of storage. The analysis of the internal density of the seeds by x-rays differentiates seeds with greater germination capacity in lots with moderate deterioration.

**Keywords:** mulungu; ImageJ; germination; image analysis

## 5.1. Introdução

As sementes ortodoxas são características de espécies pioneiras e apresentam tolerância a dessecação e baixos potenciais hídricos adquiridas durante a formação (WALTERS, 2015). Essas sementes, no período de maturação, passam por um processo de secagem e são dispersas com baixos teores de água. Assim, as sementes ortodoxas possuem a capacidade de permanecer no banco de sementes do solo por bastante tempo, variando de acordo com a espécie.

Essas sementes podem ser coletadas e armazenadas para a posterior produção de mudas em ou mesmo na semeadura direta. O armazenamento de sementes é, também, uma das melhores estratégias para conservação *ex situ* da biodiversidade (HAIDET; OLWELL, 2015). No entanto, o armazenamento pode causar a deterioração do material vegetal devido ao contínuo metabolismo celular.

Para assegurar a qualidade das sementes, é necessário avaliar o vigor dos lotes. Sob armazenamento, as sementes devem ser periodicamente monitoradas para a manutenção da capacidade de germinação e o vigor (FU; AHMED; DIEDERICHSEN, 2015). Os aspectos fisiológicos, os atributos físicos, a composição química e o ataque de patógenos e insetos afetam diretamente a germinação. E, enquanto algumas análises de sementes são demoradas, como o obrigatório teste de germinação, e reduzem o volume de sementes no lote, outros métodos são mais rápidos e simples e podem complementar a avaliação dos lotes.

A análise de imagens radiografadas de sementes é um método não destrutivo, rápido e simples para avaliar a qualidade (MARCHI; GOMES JUNIOR, 2017). Os aspectos morfológicos associados a viabilidade de sementes podem ser avaliados por meio da densidade interna dos tecidos, observada através de imagens de raios-x. Geralmente, essa análise é usada para a observação de danos internos causados por impactos, mal formação ou infestação por insetos (MENEZES et al., 2012; ROSENBERG; NORDLANDER; WESLIEN, 2015).

*Erythrina velutina* é uma espécie ortodoxa nativa, popularmente conhecida como mulungu e com ocorrência principalmente na Caatinga, mas também na Mata Atlântica e Cerrado (SILVA JUNIOR et al., 2012a). Essa espécie pioneira é bastante recomendada para o reflorestamento de áreas degradadas, devido ao seu rápido crescimento e capacidade de fixação de nitrogênio (HOLANDA et al., 2010; SANTOS et al., 2012a). Portanto, as sementes de mulungu podem ser armazenadas como fontes de propágulos para a produção de mudas ou semeadura direta. Entretanto, foi identificada a baixa produção de sementes em áreas de ocorrência natural, além da redução dessas áreas pelo uso alternativo do solo (GONÇALVES

et al., 2014). Objetivou-se por meio deste trabalho, avaliar a qualidade de dois lotes de *E. velutina* usando o teste de raios-x associado a parâmetros de viabilidade e vigor de sementes armazenadas.

## 5.2. Material e Métodos

As análises foram realizadas no Laboratório de Sementes (Centro de Ciências Agrárias Aplicadas) da Universidade Federal de Sergipe, em 2017. Os lotes de sementes de *Erythrina velutina* foram compostos por sementes coletadas em Afrânio, Pernambuco em 2008 (lote 1) em área de Caatinga e na região Baixo-Sul, no estado da Bahia em 2016 (lote 2) em área de Mata Atlântica (sementes comerciais da empresa Biosementes). As sementes de ambos os lotes foram armazenadas em câmara fria a 6°C com 60% de umidade relativa, em embalagens plásticas impermeáveis (1,5 mm).

Para a determinação da qualidade dos lotes foram avaliados aspectos físicos e fisiológicos relacionados a viabilidade e vigor de sementes por meio dos parâmetros: peso de 1.000 sementes, teor de água, condutividade elétrica, análise de imagens de raios-x, morfometria, germinação, tamanho de plântulas e relação parte aérea/radícula das plântulas.

O peso de 1.000 sementes foi determinado usando-se oito amostras de 100 sementes de cada lote. Cada amostra foi pesada, a média da massa determinada em gramas e multiplicada por 10, de acordo com as Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

O teor de água foi determinado usando-se quatro subamostras de 10 sementes inteiras e com quebra de dormência. Cada subamostra foi pesada, colocada em uma cápsula de alumínio e seca em estufa com circulação de ar a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  por 24 horas. Os resultados foram expressos em porcentagem de conteúdo de água (BRASIL, 2009).

O teste de condutividade elétrica foi conduzido com quatro repetições de 25 sementes inteiras e com quebra de dormência, escarificando-se mecanicamente usando-se lixa nº 60, totalizando 100 sementes por lote, colocadas em 75 mL de água destilada por 24 horas em

câmara do tipo BOD a 25°C sem luz (GUEDES et al., 2009b). Os valores de condutividade foram obtidos e expressos em  $\mu\text{mhos cm}^{-1}\text{g}^{-1}$  a 25°C.

Para o teste de raios-x, 100 sementes por lote foram radiografadas em aparelho Faxitron HP MX-20 (Faxitron Corp) a 28 kv com tempo de exposição de 5 segundos. Por meio das imagens obtidas, as sementes foram classificadas em cheias, sem formação ou deterioradas (BRASIL, 2009). As imagens foram, então, analisadas com o programa ImageJ para determinar a morfometria e a densidade integrada de pixels individualmente. Após a obtenção das imagens, as mesmas sementes foram germinadas para a avaliação de viabilidade e vigor.

Realizou-se a assepsia das sementes em hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos, depois estas foram lavadas com água destilada, escarificadas mecanicamente usando-se lixa nº 60 para a quebra de dormência (SANTOS et al., 2013) e germinadas em substrato de papel, umedecido com água destilada com volume 2,5 vezes o peso. A germinação ocorreu em câmara do tipo BOD, a 25°C com fotoperíodo de 12h/luz durante 14 dias e os parâmetros avaliados foram porcentagem de germinação (G%) determinado pelo número de plântulas normais, porcentagem de emissão de radícula (germinação fisiológica por protrusão radicular) (ER%), primeira contagem de germinação (PCG%), porcentagem de sementes deterioradas (De%), porcentagem de sementes duras (Du%), tamanho de plântulas, relação parte aérea/radícula e massa seca determinada (SILVA et al., 2011).

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado (DIC) com 4 repetições de 25 sementes, compondo 100 sementes por lote. As variáveis analisadas foram testadas quando à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e a comparação das médias pelos testes t Student ( $p < 0,05$ ).

### **5.3. Resultados e discussão**

O peso das sementes é determinado pelo desenvolvimento do embrião, endosperma e tegumento, podendo atribuir diferentes capacidades germinativas e vigor entre espécies ou entre

lotes da mesma espécie. O acúmulo de massa seca nos tecidos de reserva durante o desenvolvimento confere características benéficas às sementes, proporcionando maior longevidade sob armazenamento. Assim como os demais aspectos morfológicos das sementes, o peso está relacionado a características intrínsecas à planta, como a composição genética, mas também a interação da planta matriz com o ambiente (LABRA et al., 2017).

O peso de 1.000 sementes para os lotes de *E. velutina* foi de 539,20 g para o lote 1 (2008) e 552,26 g para o lote 2 (2016) após o armazenamento. Ambos os resultados são superiores aos valores de sementes coletadas durante época seca em Sergipe (427,33 g) (SANTOS et al., 2012a). E considerando o peso de 100 sementes, os resultados também são superiores aos valores determinados para esse espécie em regiões semiáridas (42,17g e 46,76 g) (BENTO et al., 2010). Entretanto, para sementes coletadas durante a estação chuvosa na região do semiárido de Areia, na Paraíba, os resultados foram similares (57,14) (GUEDES et al., 2009a).

Para sementes ortodoxas, a dessecação durante a maturação é importante para sua viabilidade, vigor e longevidade, podendo influenciar também diretamente no peso das sementes. O conteúdo de água celular é reduzido durante a maturação, consequentemente, a capacidade metabólica também declina. Contudo, após a dispersão, as sementes continuam a perder água durante o período de armazenamento, apesar da temperatura e umidade em ambientes controlados minimizarem a redução do teor de água (WALTERS, 2015).

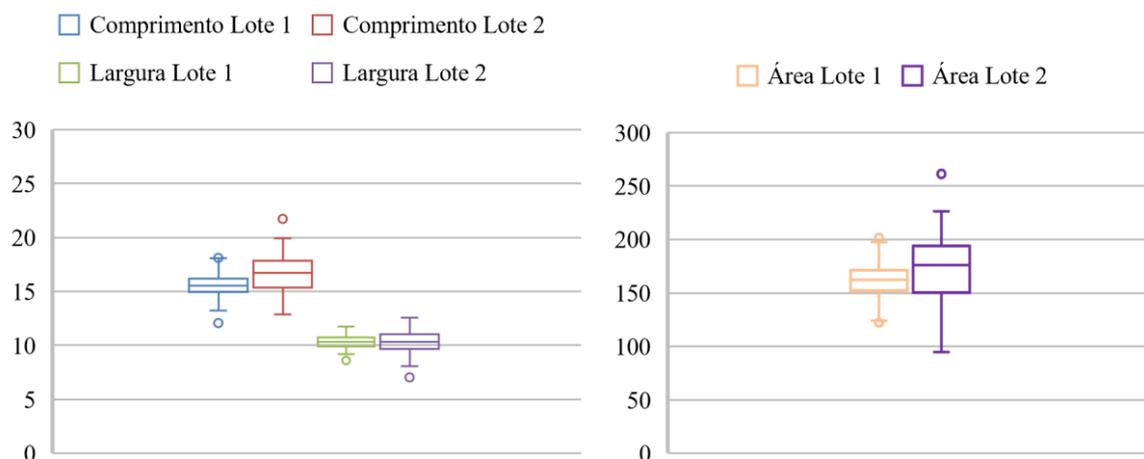
O teor de água nas sementes de mulungu do lote 1 foi de 7,61%, resultados mais elevados do que as sementes de região semiárida na Paraíba, (6,88%, 5,98% e 5,00) (GUEDES et al., 2009a). No entanto, os resultados foram similares a outro lote de sementes de Areia, Paraíba (7,82%) e dois lotes de região semiárida de Carnaúba dos Dantas, Rio Grande do Norte (7,40% e 7,60%) (BENTO et al., 2010). As sementes do lote 02 apresentaram 8,91% de conteúdo de água, valor similar ao outro lote de Areia, Paraíba (8,17%), o mesmo que apresentou peso similar. Porém, em todos os demais estudos, as sementes passaram apenas

poucos meses sob armazenamento e apresentaram altos índices de germinação (~100%). Entre os dois lotes, houve diferença significativa para o teor de água das sementes (1,30%) e a diferença constada manteve-se dentro do recomendado (< 2%) (MARCOS-FILHO, 2015).

Durante o armazenamento, pode ocorrer a perda de vigor das sementes devido danos causados à integridade das membranas celulares decorrentes do lento metabolismo. A condutividade elétrica é um teste que, indiretamente, avalia a extensão da deterioração das sementes pelos danos causados às membranas por meio da quantidade de líquidos exsudados pelas sementes.

A condutividade elétrica para as sementes do lote 1 consistiu em 2603,00  $\mu\text{mhoms cm}^{-1}\text{g}^{-1}$  a 25°C e para o lote 2, 1491,00  $\mu\text{mhoms cm}^{-1}\text{g}^{-1}$ , apresentando diferença significativa entre os lotes. A exsudação de solutos devidos aos danos a integridade da membrana celular decorrentes do maior período de armazenamento podem ter contribuído para a maior condutividade elétrica do lote 1. O aumento na condutividade elétrica também foi associado a perda de vigor de sementes dessa espécie (GUEDES et al., 2009b).

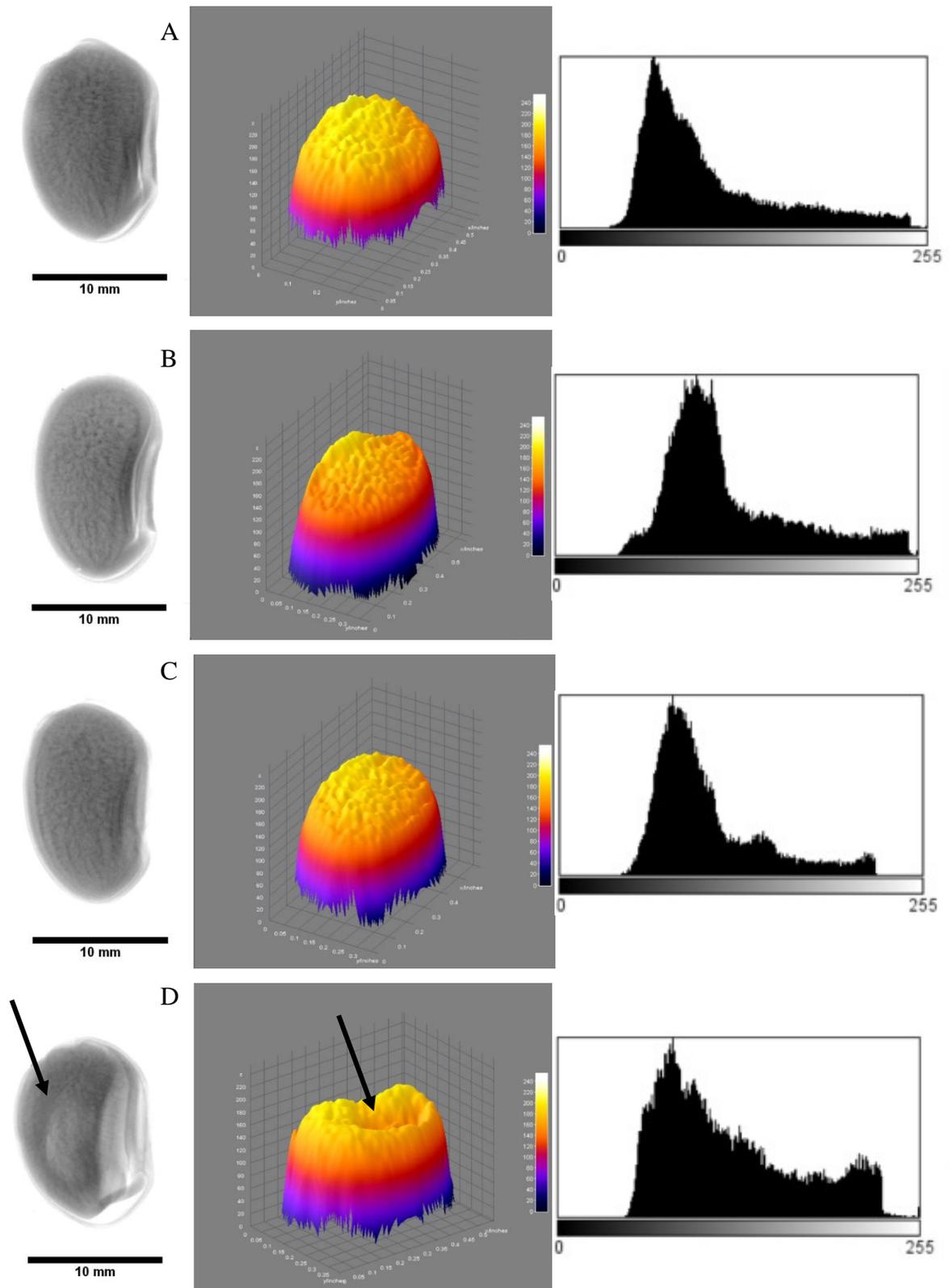
Por meio da avaliação das imagens de raios-x determinou-se a morfometria das sementes com o programa ImageJ. As sementes do lote 1 possuem tamanho médio de 15,56 mm de comprimento, 10,34 mm de largura e 161,29 mm<sup>2</sup> de área. E as sementes do lote 2 possuem média de 16,64 mm de comprimento, 10,24 mm de largura e 171,53 mm<sup>2</sup> de área (Figura 2.1). Ambos os lotes foram compostos por sementes maiores do que as sementes de um lote de Areia, Paraíba (SILVA et al., 2008).



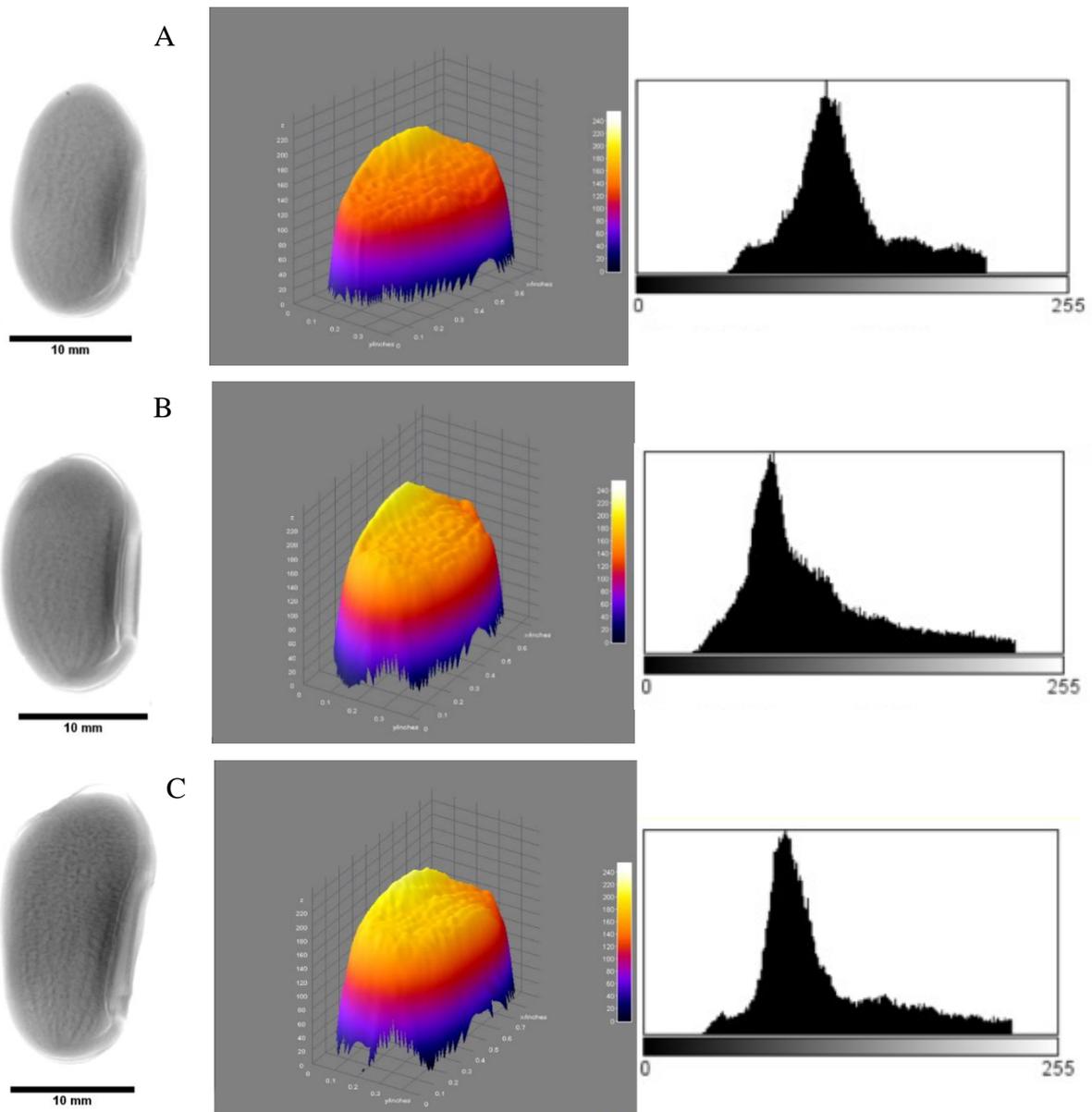
**Figura 2.1.** Gráfico box-plot para o comprimento, largura (cm) e área (cm<sup>2</sup>) de 100 sementes dos lotes 1 e 2 de *Erythrina velutina* Willd.

Não houve diferença significativa de tamanho entre as sementes que apresentaram plântulas normais, emissão de radícula ou sementes deterioradas nos dois lotes. Entretanto houve diferença significativa para os parâmetros morfométricos entre os dois lotes, exceto para a largura das sementes. Em comprimento e área, as menores sementes são do lote 1, coletado em região de Caatinga. Ressalta-se que sementes menores são mais eficientes na embebição de água devido à maior razão superfície/ área, característica vantajosa para regiões de Caatinga, cuja estação seca dura a maior parte do ano. No entanto, características intrínsecas, como diversidade genética e fatores fisiológicos entre as plantas das duas regiões devem ser considerados.

Ainda, através das imagens de raios-x, as sementes foram classificadas de acordo com a sua formação interna. Todas as sementes do lote 2 foram classificadas como cheias, entretanto o lote 1 apresentou 18% de sementes com espaços vazios entre os cotilédones e o tegumento. Embora visíveis, os danos observados nas sementes foram inferiores a 50% da área total, assim não foi possível inferir visualmente quanto a capacidade de germinação das sementes sem a análise da densidade interna obtida pelo programa ImageJ (Figuras 2.2 e 2.3).



**Figura 2.2.** Imagens de raios-x, projeção 3D e histograma das sementes de *Erythrina velutina* Willd. lote 1. A) Semente cheia originando plântula normal, B) semente cheia com emissão de radícula, C) semente cheia deteriorada, D) semente com danos deteriorada durante o teste de germinação do lote 1.



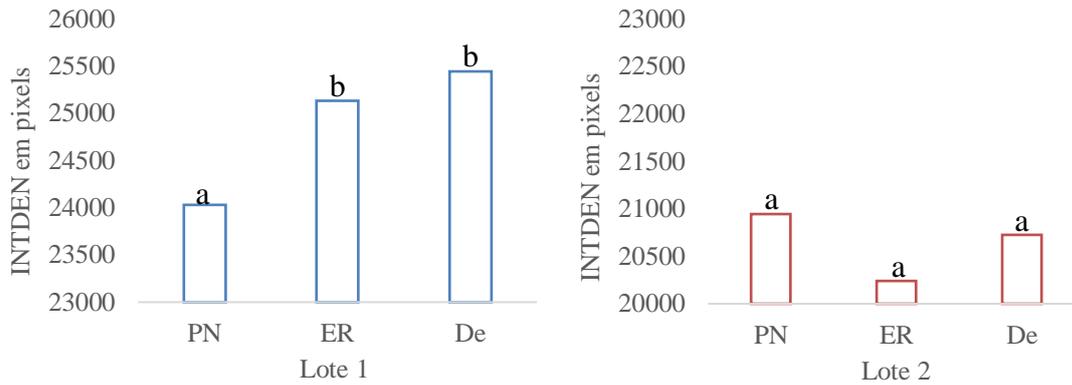
**Figura 2.3.** Imagens de raios-x, projeção 3D e histograma das sementes de *Erythrina velutina* Willd. lote 2. A) Semente cheia originando plântula normal, B) semente cheia com emissão de radícula, C) semente cheia deteriorada durante o teste de germinação do lote 2.

A primeira contagem de germinação ocorreu após sete dias e o lote 1 apresentou 23% de emissão de radícula e 76% de sementes deterioradas pela ação de fungos e, conseqüentemente, mortas. Ao final da germinação, após 14 dias, esse lote apresentou 7% de emissão de radícula e 17% de plântulas normais. E para o lote 2, a primeira contagem, 54% das sementes haviam emitido radícula e 46% estavam mortas. Ao final do teste, houve 10% de emissão de radícula, 43% de plântulas normais e 47% de sementes mortas. Sementes recém coletadas dessa espécie, provenientes de região de Caatinga no estado de Sergipe, apresentaram

44% de germinação e 51% de emissão de radícula em teste de germinação (Capítulo 4). Não houve sementes duras em ambos os lotes. Esses resultados demonstram a qualidade dos dois lotes, que foram altamente susceptíveis a ação de fungos associados ao tegumento, sendo os de maior ocorrência *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp e *Botritis* sp identificados anteriormente por Oliveira et al., 2009.

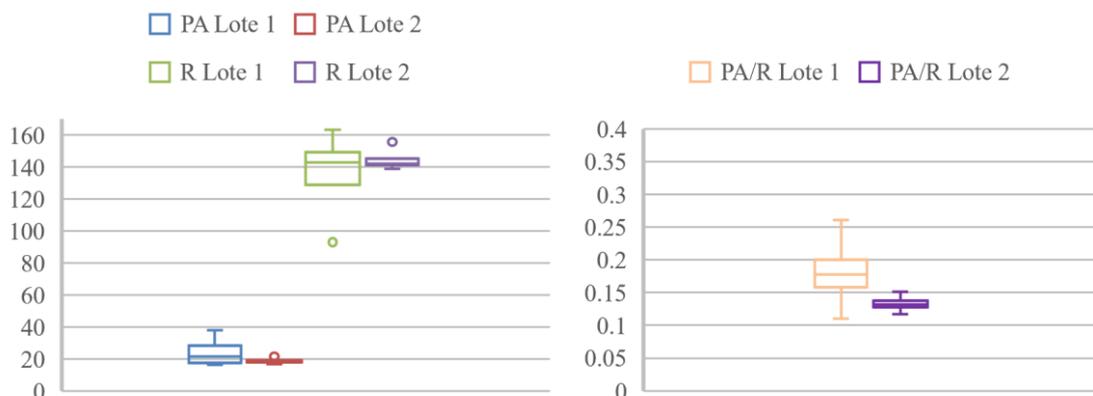
Em relação a germinação de sementes dessa espécie, identificou-se que as sementes provenientes de região de Caatinga apresentaram velocidade de germinação superior, indicando uma possível maior eficiência de absorção de água (SILVA JUNIOR et al., 2012a). Apesar de possuir tegumento impermeável, sendo necessária escarificação física para germinação das sementes, a influência da região hilar (envolvendo rafe e micrópila) no balanço hídrico entre a semente e o seu exterior também foi considerada em estudo sobre a germinação de *E. velutina* (MATHEUS et al., 2010; SILVA et al., 2008).

Depois da germinação, analisou-se a densidade de pixels nas imagens de raios-x associada a viabilidade das sementes. Identificou-se que as sementes deterioradas do lote 1, apesar de não apresentarem diferenças na formação interna, possuem menor densidade, avaliada pela variável densidade integrada (IntDen) (Figura 2.4). A medida do IntDen avalia a relação pixels/tamanho da estrutura e estabelece como vazios valores de 255 pixels. Portanto sementes que apresentaram os maiores valores dessa variável possuem menor densidade. Não houve diferença significativa para densidade de sementes quanto as plântulas normais, emissão de radícula e sementes deterioradas para o lote 2. Lote este que apresentou baixa porcentagem de germinação e emissão de radícula e alta deterioração.



**Figura 2.4.** Densidade das sementes dos lotes 1 e 2 de *Erythrina velutina* Willd., entre as classes de Plântulas Normais (PN), Emissão de Radícula (ER) e sementes Deterioradas (De), estabelecida pelo parâmetro IntDen, por meio da densidade de pixels em imagens de raios-x avaliadas no programa ImageJ.

As plântulas do lote 1 apresentaram parte aérea de 25,84 mm, radícula com 155,07 mm e razão parte aérea/radícula 0,16. E para o lote 2, as plântulas apresentaram parte aérea com 18,80 mm, radícula com 161,08 mm e razão de 0,11 (Figura 2.5). O comprimento das plântulas foi menor em comparação a outros trabalhos, indicando o baixo vigor desses lotes após o armazenamento (BENTO et al., 2010).



**Figura 2.5.** Gráfico box-plot para o tamanho da parte aérea (PA), radícula (R) e relação parte aérea/radícula (PA/R) para as plântulas dos lotes 1 e 2 de *Erythrina velutina*.

A média da massa seca foi avaliada usando-se quatro plantas por repetição. Foram apresentados resultados similares para ambos os lotes, com 2,07 g de massa seca e 18,80% de

umidade nas plântulas para o lote 1 e 2,02 g de massa seca e 19,15% de umidade nas plântulas para o lote 2.

Na tabela a seguir traz-se o resumo da análise de variância para os parâmetros avaliados (Tabela 2.1).

**Tabela 2.1.** Peso de 1.000 sementes (Peso), condutividade elétrica (CE), teor de água (TA), comprimento, largura e área de sementes, germinação (%), primeira contagem de germinação (PCG%), tamanho da parte aérea (PA), radícula (R), relação parte aérea/radícula (PA/R) e massa seca de plântulas dos lotes 1 e 2 de sementes de *Erythrina velutina* Willd.

Lote	Semente							
	Peso	CE	TA	Comprimento	Largura	Área	% G	% PCG
1	539,2 a	2603,0 a	7,61 b	15,56 b	10,34 a	161,29 b	17 a	0 a
2	552,26 a	1491,0 b	8,92 a	16,64 a	10,24 a	171,53 a	43 a	0 a
CV(%)	6,08	10,72	6,27	8,17	9,24	14,79	28,05	0,00

Lote	Plântula			
	PA	R	PA/R	Massa seca
1	25,84 a	155,07 a	0,16 a	2,07 a
2	18,80 a	161,08 a	0,11 a	2,02 a
CV(%)	32,90	16,60	28,51	0,01

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste *t* Student.

#### 5.4. Conclusão

Ambos os lotes apresentaram viabilidade e vigor afetados pelo tempo de armazenamento, porém o lote 1 encontra-se altamente deteriorado devido ao maior período sob armazenamento. A análise de densidade interna de sementes por meio da avaliação de imagens de raios-x é capaz de diferenciar sementes dessa espécie com maior capacidade germinativa em lotes com moderada deterioração.

#### 5.5. Referências Bibliográficas

BENTO, S. R. S. DE O. et al. Eficiência dos testes de vigor na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mulungu (*Erythrina velutina* WILLD.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 4, p. 111–117, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. 2009.

FU, Y. B.; AHMED, Z.; DIEDERICHSEN, A. Towards a better monitoring of seed ageing under ex situ seed conservation. **Conservation Physiology**, v. 3, n. 1, p. 1–16, 2015.

GUEDES, R. S. et al. Teste de comprimento de plântula na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Erythrina velutina* Willd. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 4, p. 793–802, 2009a.

GUEDES, R. S. et al. Resposta fisiológica de sementes de *Erythrina velutina* Willd. ao envelhecimento acelerado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 2, p. 323–330, 2009b.

GONÇALVES, L. O. et al. Caracterização genética de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) em áreas de baixa ocorrência. *Revista Ciencia Agronomica*, v. 45, n. 2, p. 290–298, 2014.

HAIDET, M.; OLWELL, P. Seeds of Success: A National Seed Banking Program Working to Achieve Long-Term Conservation Goals. **Natural Areas Journal**, v. 35, n. 1, p. 165–173, 2015.

HOLANDA, F. S. R. et al. Crescimento inicial de espécies florestais na recomposição da mata ciliar em taludes submetidos à técnica da bioengenharia de solos. **Ciencia Florestal**, v. 20, n. 1, p. 157–167, 2010.

LABRA, M. H. et al. Plasticity of seed weight compensates reductions in seed number of oilseed rape in response to shading at flowering. **European Journal of Agronomy**, v. 84, p. 113–124, 2017.

MARCHI, J. L. DE; GOMES JUNIOR, F. G. Use of image analysis techniques to determine the embryo size of *Senna multijuga* (Rich.) seeds and its relation to germination and vigor. **Journal of Seed Science**, v. 39, n. 1, p. 013–019, 2017.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2015.

MATHEUS, M. T. et al. Superação da dormência em sementes de duas espécies de *Erythrina*. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 3, p. 48–53, 2010.

MENEZES, N. L. DE et al. Using X-Rays to evaluate fissures in rice seeds dried artificially. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 1, p. 70–77, 2012.

OLIVEIRA, M. D. DE M. et al. Tratamentos térmico e químico em sementes de mulungu e efeitos sobre a qualidade sanitária e fisiológica. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 3, p. 150–155,

2009.

ROSENBERG, O.; NORDLANDER, G.; WESLIEN, J. Effects of different insect species on seed quantity and quality in Norway spruce. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 17, n. 2, p. 158–163, 2015.

SANTOS, L. W. DOS et al. Armazenamento e métodos para a superação da dormência de sementes de mulungu. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 171–178, 2013.

SANTOS, P. L. et al. Estabelecimento de espécies florestais nativas por meio de semeadura direta para recuperação de áreas degradadas. **Revista Árvore**, v. 36, n. 2, p. 237–245, 2012.

SILVA JUNIOR, V. T. et al. *Erythrina velutina* WILLD. (LEGUMINOSAE-PAPILIONOIDEAE) ocorrente em Caatinga E Brejo De Altitude De Pernambuco : Biometria, embebição e germinação. **Revista árvore, Viçosa**, v. 36, n. 2, p. 247–257, 2012.

SILVA, K. B. et al. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e plantas de *Erythrina velutina* Willd., leguminosae - Papilionidae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 3, p. 104–114, 2008.

SILVA, K. B. et al. Armazenamento de sementes de *Erythrina velutina* Willd. **Revista Árvore**, v. 35, n. 4, p. 809–816, 2011.

WALTERS, C. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. **Planta**, v. 242, n. 2, p. 397–406, 2015.

## 6. ARTIGO 3: VIABILIDADE E INTEGRIDADE DE RNA DE SEMENTES DE *Erythrina velutina* WILLD. SOB RESTRIÇÃO HÍDRICA

**Periódico submetido:** Journal of Seed Science | ISSN: 2317-1537 (Impresso); 2317-1545 (Online)

### RESUMO

O estresse abiótico causado por condições ambientais rigorosas, tais como restrição hídrica, causa efeitos negativos em plantas. Espécies de áreas áridas e semiáridas possuem mecanismos para manter a viabilidade das sementes. Analisou-se a qualidade inicial, resposta a restrição hídrica e integridade de RNA de dois lotes de sementes de *Erythrina velutina* coletadas em Sergipe em 2012 (lote 1) e em Pernambuco, em 2008 (lote 2) sob restrição hídrica. A viabilidade e o vigor foram avaliados por testes de germinação e condutividade elétrica. As sementes foram submetidas a embebição por 0, 24, 48 e 72 horas em substrato de papel com solução de polietilenoglicol (PEG) a -0,8MPa e foram coletados embriões para extração de RNA. Após essas condições de estresse não houve germinação para nenhum dos tempos de embebição e as sementes foram colocadas para germinar em substrato de papel umedecido com água. O lote 1 possui sementes mais vigorosas que o lote 2. A embebição por 24h em solução PEG proporcionou melhor germinação para o lote 2. A quantidade de RNA para sementes sob restrição hídrica indica comprometimento da síntese de RNA; contudo o vigor não é completamente afetado, indicando mecanismos de tolerância que contribuem para a manutenção da viabilidade.

**Palavras-chave:** déficit hídrico; vigor de sementes; viabilidade de sementes; mulungu

## ABSTRACT

### **Title: Seed viability and RNA integrity of *Erythrina velutina* Willd. under drought stress**

Abiotic stress caused by harsh environmental conditions, such as water stress, has negative effects on plants. Species from arid and semi-arid areas have mechanisms to maintain seed viability. The initial quality, response to drought stress and RNA integrity of two lots of *Erythrina velutina* seeds collected in Sergipe in 2012 (lot 1) and in Pernambuco (2008) under drought stress were analyzed. Viability and vigor were evaluated by germination and electrical conductivity tests. The seeds were subjected to imbibition for 0, 24, 48 and 72 hours on paper substrate with polyethylene glycol solution (PEG) at -0.8MPa and embryos were collected for RNA extraction. After these stress conditions, there was no germination for any of the imbibition times and the seeds were germinated on paper substrate moistened with water. Lot 1 has more vigorous seeds than lot 2. Immersion for 24h in PEG solution provided better germination for lot 2. The amount of RNA for seeds under drought stress indicates impairment of RNA synthesis; however, vigor is not completely affected, indicating tolerance mechanisms contributing to maintaining viability.

**Keywords:** water deficit; seed vigor; seed viability; mulungu

### **6.1. Introdução**

A seca é um fenômeno frequente em áreas tropicais, ocorrendo em regiões áridas e semiáridas com altas temperaturas e baixa pluviosidade. Além das condições climáticas naturais, as mudanças climáticas induzidas pelo aquecimento global tem expandido as áreas afetadas pela seca e criado novas regiões com déficit hídrico (DAI, 2013). No Nordeste brasileiro, uma grande região semiárida constitui a Caatinga, área com médias anuais de temperatura de 28°C e 500 mm de precipitação, compondo uma condição climática rigorosa (MARENGO, 2008a, 2008b).

As condições ambientais durante a seca expõem as plantas ao estresse abiótico, causado principalmente pelo déficit hídrico associado a altas temperaturas (ARANDA et al., 2012; CLAEYS; INZÉ, 2013). Os efeitos do estresse podem induzir a produção de substâncias endógenas tóxicas às plantas, como as ERO (Espécies Reativas de Oxigênio), muito prejudiciais a moléculas de RNA, como consequência de sua estrutura de fita simples e possível falta de mecanismos de reparo (SANO et al., 2016). Para a avaliação em laboratório da resposta de sementes a tratamentos que envolvam o restrição hídrica foram realizados diversos estudos com testes de germinação (JI et al., 2014; O'DONNELL et al., 2013; PATANÈ; SAITA; SORTINO, 2013). A solução mais usada nessas simulações é a solução aquosa osmótica de polietilenoglicol (PEG), um composto quimicamente inerte e atóxico, que simula eficazmente o déficit hídrico sem penetrar na célula vegetal (AZERÊDO; DE PAULA; VALERI, 2016; PELEGRINI et al., 2013).

Além da elucidação das limitações das plantas sob restrição hídrica, as simulações de déficit hídrico podem ser usadas em técnicas para estimular a tolerância em sementes ou dar subsídio para a padronização de tratamentos pré-germinativos, como o condicionamento osmótico. Esta é uma técnica que visa a germinação parcial de sementes sob condições moderadas de estresse, sem a protrusão da radícula. Essa técnica induz a resposta aos estresses em sementes como a mobilização de reservas, ativação e síntese de DNA, produção de ATP e reparo em membranas celulares (JISHA; VIJAYAKUMARI; PUTHUR, 2013; PAPARELLA et al., 2015; VENTURA et al., 2012). Sementes sob condicionamento apresentaram resultados de germinação mais rápida e uniforme, com maior tolerância aos estresses abióticos (WOJTYLA et al., 2016).

*Erythrina velutina* Willd. é espécie arbórea nativa do Brasil com alto potencial biotecnológico. As folhas e casca de *E. velutina* são usados na medicina tradicional como sedativos, característica atribuída a ação de alcaloides eritrínicos (ALBUQUERQUE et al., 2007); e a segurança e a eficácia do suas propriedades medicinais foram testadas em animais

(CRAVEIRO et al., 2008; MARCHIORO et al., 2005). Essa espécie ocorre, principalmente na região Nordeste, em florestas ripárias da Caatinga, mas também é encontrada em brejo de altitude, florestas ombrófilas e campos rupestres. Essa árvore tolera índices pluviométricos entre 326 e 2.500 mm e temperaturas entre 22,4°C e 26,6°C, adaptando-se tanto a climas mais úmidos quanto mais secos, possuindo alta plasticidade de ocorrência. Conseqüentemente, estudar as respostas de *E. velutina* a restrição hídrica contribui para a elucidação de mecanismos de tolerância envolvidos nas adaptações das espécies a diferentes condições climáticas.

O objetivo deste estudo foi analisar a resposta de sementes armazenadas de *E. velutina* a tratamentos de restrição hídrica, avaliar a qualidade e integridade de RNA após o tratamento e determinar o tempo de tratamento pré-germinativo indicado para a espécie.

## 6.2. Material e Métodos

As análises foram realizadas no Laboratório de Sementes e no Laboratório de Melhoramento e Biotecnologia (Centro de Ciências Agrárias Aplicadas) da Universidade Federal de Sergipe, em 2016. As sementes de dois lotes de *E. velutina* foram coletadas em áreas de Caatinga em Lagarto, Sergipe, em 2012 (lote 1) e em Afrânio, Pernambuco, em 2008 (lote 2) e armazenadas em câmara fria (6°C e 60% de umidade relativa em embalagem impermeável). Para a avaliação da qualidade das sementes após o armazenamento, foram avaliadas a germinação e condutividade elétrica.

A germinação foi realizada em substrato de papel e em areia devido à alta ocorrência de fungos associados ao tegumento das sementes. As sementes foram submetidas a assepsia em hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos, lavadas em água destilada e escarificadas mecanicamente usando-se lixa nº 60 para a quebra de dormência (SANTOS et al., 2013) e germinadas em papel e areia estéril com 60% de umidade. Os parâmetros avaliados foram porcentagem de germinação (G%) para determinar a viabilidade das sementes, Índice de Velocidade de Germinação (IVG) ( $IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$ ; sendo:  $G_1, G_2, G_n =$

número de sementes germinadas computadas na primeira, segunda e enésima contagem,  $N_1$ ,  $N_2$  e  $N_n$  = número de dias da sementeira à primeira, segunda e a enésima contagem) para determinar o vigor das sementes (MAGUIRE, 1962).

O teste de condutividade elétrica foi conduzido com 4 repetições de 25 sementes, totalizando 100 sementes por lote, colocadas em 75 mL de água destilada por 24 horas. Os valores de condutividade elétrica foram expressos em  $\mu\text{mhoms cm}^{-1}\text{g}^{-1}$ .

Amostras de sementes foram mantidas em papel umedecido em solução PEG 6000 a -0,8MPa por 0, 24, 48 e 72 horas e depois foram germinadas em condições ideais em substrato de papel umedecido em água (REIS; DANTAS; PELACANI, 2012).

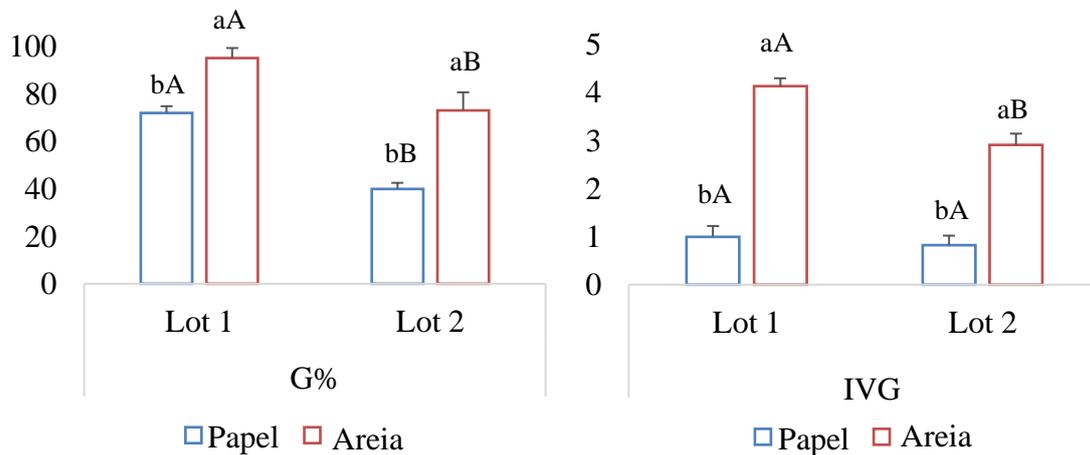
O RNA foi extraído de embriões de sementes sob restrição hídrica por 0, 24, 48 e 72 horas usando-se dois protocolos de extração, com Trizol e com o kit comercial Nucleospin® RNA II (Macherey-Nagel), de acordo com as instruções do fabricante. Como controle, foram usados embriões de sementes secas. A quantidade e qualidade de RNA foram determinadas por nanoespectrofotometria a 260, 230 e 280 nm. Para avaliar a integridade realizou-se a análise eletroforética em gel de agarose 1% com 1  $\mu\text{g}$  de RNA com Gel Ready™ e visualização com transiluminador UV. O RNA quantificado foi tratado usando-se a enzima DNase I, RNase Free (Thermo Scientific™) de acordo com o protocolo do fabricante.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado (DIC) com 4 repetições de 25 sementes, compondo 100 sementes por tratamento e os dados analisados em esquema fatorial 2x4, sendo dois lotes e 4 tratamentos pré-germinativos em solução de PEG 6000 a -0,8MPa (0, 24, 48 e 72 horas). As variáveis analisadas foram testadas quando à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e a comparação das médias pelos testes t Student e Tukey ( $p < 0,05$ ). A comparação das médias da qualidade inicial com as dos tratamentos resultantes do fatorial foi realizada pelo teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ).

### 6.3. Resultados e Discussão

Os testes de viabilidade e vigor permitem a identificação de lotes de sementes com maior probabilidade de germinação, sobrevivência em campo e/ou conservação em condições de armazenamento. Por meio desses testes é possível identificar as diferenças fisiológicas entre lotes de sementes e avaliar a qualidade inicial do material vegetal.

Para a análise da qualidade dos lotes, as sementes do lote 1 apresentaram resultados melhores para parâmetros de germinação e vigor quando comparado ao lote 2 (Figura 3.1). Esses resultados indicam a maior deterioração das sementes do lote 2 devido ao longo tempo de armazenamento. Em outro estudo, as semente de *E. velutina* apresentaram redução de 25% em germinação com apenas 1 ano de armazenamento (PEREIRA et al., 2014).



**Figura 3.1.** Porcentagem de germinação (G%) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes dos lotes 1 e 2 de *Erythrina velutina* Willd. germinadas em papel e areia. Letras minúsculas diferem significativamente entre métodos e letras maiúsculas diferem significativamente entre lotes pelo teste t ( $p < 0,05$ ).

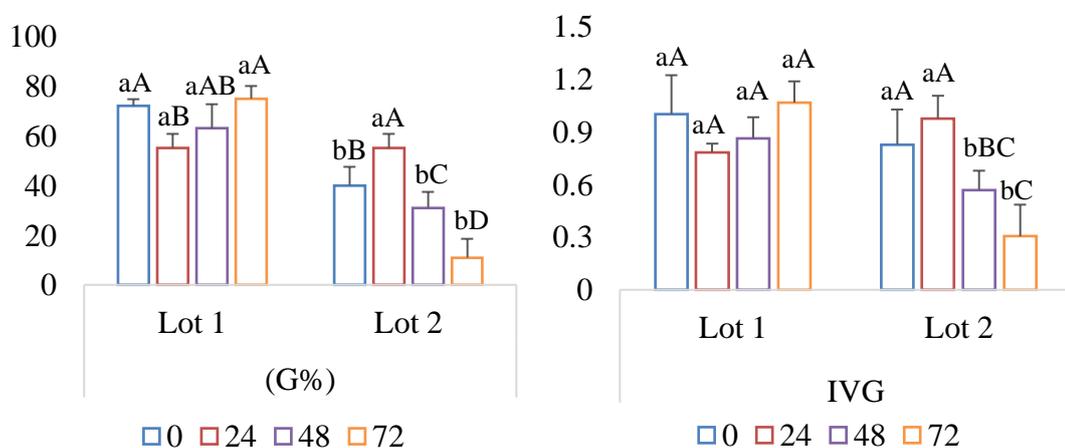
Ambos os lotes apresentaram porcentagem de germinação superior para a germinação em areia, resultados esperados devido a proliferação de fungos na germinação em papel. Outros estudos com espécies de *Erythrina* também mostraram melhor desenvolvimento e germinação em areia (ALVES et al., 2008).

O resultado de condutividade elétrica foi 67% maior para o lote 2 ( $2681,00 \mu\text{mhoms cm}^{-1}\text{g}^{-1}$ ) quando comparado ao lote 1 ( $1602,00 \mu\text{mhoms cm}^{-1}\text{g}^{-1}$ ), indicando uma maior exsudação

em sementes, provavelmente relacionada ao maior período de armazenamento que contribui para o comprometimento da integridade de membranas celulares. Um estudo de envelhecimento acelerado demonstrou a relação direta entre o aumento na condutividade elétrica e a perda de vigor pelo envelhecimento das sementes de *E. velutina* (GUEDES et al., 2009c).

Os resultados de germinação mostram um menor vigor para o lote 2. A perda de vigor em sementes armazenadas é atribuída a alterações no metabolismo e síntese de DNA, afetando o desenvolvimento do embrião e tornando-o susceptível ao estresse abiótico (VENTURA et al., 2012; WANG et al., 2014).

Os testes de restrição hídrica em substrato de papel e o condicionamento de sementes buscam simular em laboratório as condições naturais de restrição hídrica, como o observado em regiões áridas e semiáridas, para avaliar a resposta fisiológica das sementes ao estresse abiótico. As sementes de *E. velutina* apresentaram respostas de vigor variadas sob diferentes períodos em restrição hídrica em papel com solução de PEG a -0,8 MPa (Figura 3.2).



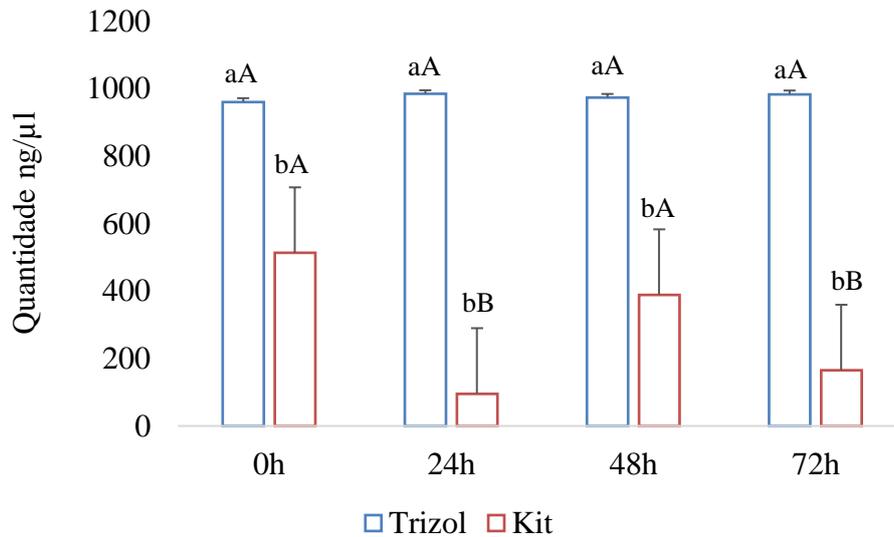
**Figura 3.2.** Porcentagem de germinação (G%) e Índice de Velocidade de Germinação de sementes dos lotes 1 e 2 de *Erythrina velutina* Willd. após restrição hídrica em solução de PEG (6000) a -0,8 MPa por 0, 24, 48 e 72 horas. Letras minúsculas diferem significativamente entre lotes e letras maiúsculas diferem significativamente entre tratamentos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para o lote 1, o aumento no tempo sob restrição hídrica em papel com solução de PEG a -0,8 MPa resultou no aumento da germinação com a porcentagem mais alta em 72 horas. Os resultados foram iguais à germinação sob condições plenas de disponibilidade de água. O lote 2 apresentou os maiores resultados para germinação e IVG com 24 horas sob restrição hídrica, resultados melhores que em condições plenas de disponibilidade de água. Esse resultado também é confirmado pelo teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ), sendo constatado resultado superior a qualidade inicial. Em sementes de *Sesbania virgata* (CAV.) PERS a embebição em solução de PEG (8000) por 24 horas também resultou em melhores valores de germinação (MASETTO et al., 2013).

Ambos os lotes germinaram quando levados ao substrato com água após o tratamento, mesmo com 72 horas de restrição hídrica, demonstrando a tolerância de *E. velutina* a condições de déficit hídrico.

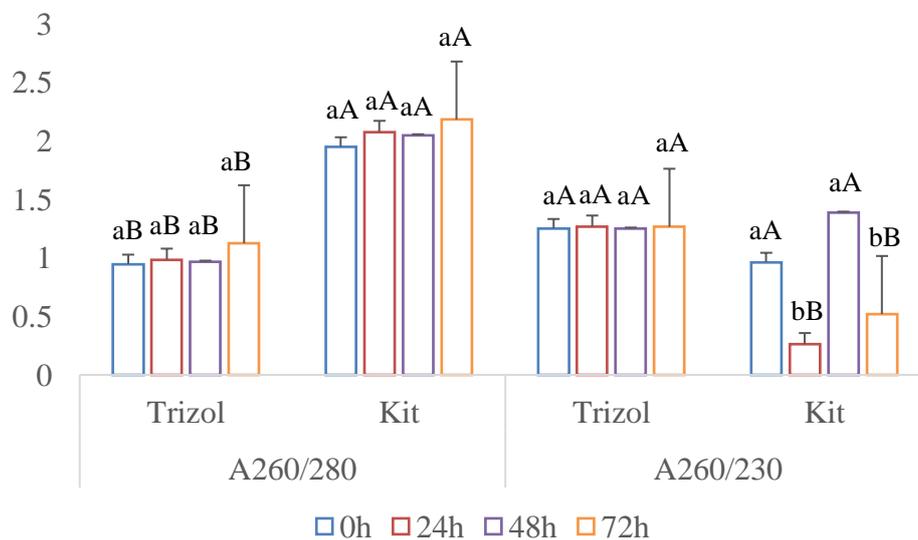
Apesar de existirem mecanismos de reparo de danos para o DNA, as moléculas de RNA não possuem mecanismos de reparo identificados e são vulneráveis a oxidação causada pelo estresse, afetando a germinação. Estudos demonstram também a degradação de transcritos devido ao armazenamento prolongado (FLEMING et al., 2018; FLEMING; HILL; WALTERS, 2019; FLEMING; RICHARDS; WALTERS, 2017) e as sementes dos lotes desses trabalhos apresentaram menor vigor. Portanto, realizou-se a avaliação da quantidade e qualidade de RNA de embriões de sementes do lote 2 sob restrição hídrica em papel com solução de PEG -0,8 MPa por 0, 24, 48 e 72 horas.

A extração com Trizol apresentou concentrações mais altas de RNA (Figura 3.3). No entanto, houve baixa qualidade do material, indicada pelas relações A260/280 e A260/230, com contaminação por proteínas e/ou polissacarídeos.



**Figura 3.3.** Quantificação de RNA de embriões de *Erythrina velutina* Willd. após restrição hídrica em solução de PEG (6000) a -0,8 MPa por 0, 24, 48 e 72 horas. Letras minúsculas diferem significativamente entre métodos e letras maiúsculas diferem significativamente entre tratamentos pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para a extração de RNA com o kit, apesar da quantidade ter sido menor, a relação A260/280 indicou um material com maior pureza (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Qualidade de RNA de embriões de *Erythrina velutina* Willd. após restrição hídrica em solução de PEG (6000) a -0,8 MPa por 0, 24, 48 e 72 horas. Letras minúsculas diferem significativamente entre tratamentos e letras maiúsculas diferem significativamente entre métodos pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

Durante a maturação, as sementes possuem altos níveis de transcritos de RNA, determinante na síntese de proteínas durante a germinação (NELSON; ARIIZUMI; STEBER, 2017). Portanto, a quantidade de RNA foi menor em todas as sementes sob restrição hídrica quando comparadas ao controle. Exceto para 48h, onde a quantidade de RNA foi estatisticamente igual ao controle, como demonstrado pela extração com o kit. Independentemente de tratamento, não houve diferença para a qualidade do RNA pela relação A260/280.

Os géis de integridade continham as bandas para subunidades ribossomais 18S e 28S para todas as amostras, sob restrição hídrica e o controle, e ambos os métodos, Trizol e Kit de extração. Bandas mais robustas foram visíveis em amostras controle, indicando a presença de RNA não-degradado no material. Esses resultados corroboram a resiliência de *E. velutina* ao estresse abiótico como demonstrado pelos resultados de germinação.

#### **6.4. Conclusões**

As sementes toleram a restrição hídrica como comprovado pela avaliação da viabilidade e vigor. E o tempo de embebição em solução PEG 6000 a -0,8 MPa por 24 horas proporciona incremento na germinação de lote com sementes de menor vigor, sendo indicado como tratamento pré-germinativo.

A quantidade de RNA em sementes sob restrição hídrica indica que há comprometimento da síntese; entretanto não afeta completamente a viabilidade e vigor das sementes. A determinação da quantidade e qualidade de RNA pode auxiliar na avaliação da qualidade de sementes e determinar tratamentos pré-germinativos.

#### **6.5. Referências Bibliográficas**

ALBUQUERQUE, U. P. DE et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325–354, 2007.

ALVES, E. U. et al. Substratos par testes de emergência de plântulas e vigor de sementes de

- Erythrina velutina* Willd., Fabaceae. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 69–82, 2008.
- AMBIKA, S.; MANONMANI, V.; SOMASUNDARAM, G. Review on Effect of Seed Size on Seedling Vigour and Seed Yield. **Research Journal of Seed Science**, p. 1–8, 2014.
- ARANDA, I. **Plant Responses to Drought Stress**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012. p. 293–333.
- BENTO, S. R. S. DE O. et al. Eficiência dos testes de vigor na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mulungu (*Erythrina velutina* WILLD.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 4, p. 111–117, 2010.
- CLAEYS, H.; INZÉ, D. The agony of choice: How plants balance growth and survival under water-limiting conditions. **Plant Physiology**, v. 162, n. 4, p. 1768–1779, 2013.
- CRAVEIRO, A. C. S. et al. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. SUPPL., p. 739–743, 2008.
- DAI, A. G. Increasing drought under global warming in observations and models. **Nature Climate Change**, v. 3, n. 1, p. 52–58, 2013.
- AZERÊDO de, G. A.; DE PAULA, R. C.; VALERI, S. V. Germinação de sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth. sob estresse hídrico. **Ciencia Florestal**, v. 26, n. 1, p. 193–202, 2016.
- FLEMING, M. B. et al. Exploring the fate of mRNA in aging seeds : protection , destruction , or slow decay? **Jounal of Experimental Botany**, v. 69, n. 18, p. 4309–4321, 2018.
- FLEMING, M. B.; HILL, L. M.; WALTERS, C. The kinetics of ageing in dry-stored seeds : a comparison of viability loss and RNA degradation in unique legacy seed collections. **Annals of Botany**, v. 123, p. 1133–1146, 2019.
- FLEMING, M. B.; RICHARDS, C. M.; WALTERS, C. Decline in RNA integrity of dry-stored soybean seeds correlates with loss of germination potential. **Jounal of Experimental Botany**, v. 68, n. 9, p. 2219–2230, 2017.
- GUEDES, R. S. et al. Resposta fisiológica de sementes de *Erythrina velutina* Willd. ao envelhecimento acelerado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, p. 323–330, 2009.

Ji, H. et al. PEG-mediated osmotic stress induces premature differentiation of the root apical meristem and outgrowth of lateral roots in wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 17, p. 4863–4872, 2014.

JISHA, K. C.; VIJAYAKUMARI, K.; PUTHUR, J. T. Seed priming for abiotic stress tolerance: An overview. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 5, p. 1381–1396, 2013.

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

MARCHIORO, M. et al. Anti-nociceptive activity of the aqueous extract of *Erythrina velutina* leaves. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7–8, p. 637–642, 2005.

MARENGO, J. A. Água e Mudanças Climáticas. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 63, p. 83–96, 2008a.

MARENGO, J. A. Vulnerabilidade, impactos e adaptação à mudança do clima no semi-árido do Brasil. **Parcerias Estratégicas**, v. 13, n. 27, p. 149–176, 2008b.

MASETTO, T. E. et al. Condicionamento osmótico de sementes de *Sesbania virgata* (CAV.) PERS. **Cerne**, v. 19, n. 4, p. 629–636, 2013.

NELSON, S. K.; ARIIZUMI, T.; STEBER, C. M. Biology in the dry seed: Transcriptome changes associated with dry seed dormancy and dormancy loss in the *Arabidopsis* GA-insensitive *sleepy1-2* mutant. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, p. 1–21, 2017

O'DONNELL, N. H. et al. Effects of PEG-induced osmotic stress on growth and dhurrin levels of forage sorghum. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 73, p. 83–92, 2013.

PAPARELLA, S. et al. Seed priming: state of the art and new perspectives. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 8, p. 1281–1293, 2015.

PATANÈ, C.; SAITA, A.; SORTINO, O. Comparative effects of salt and water stress on seed germination and early embryo growth in two cultivars of sweet sorghum. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 199, p. 30–37, 2013.

PELEGRINI, L. L. et al. Efeito do estresse hídrico simulado com NaCl, manitol e PEG (6000) na germinação de sementes de *Erythrina falcata* Benth. **Ciencia Florestal**, v. 23, n. 2, p. 513–521, 2013.

PEREIRA, A. M. S. et al. Seed Germination and Production of *Erythrina mulungu* and *Erythrina velutina* Plantlets. **AMERICAN JOURNAL OF PLANT SCIENCES**, v. 5, n. March, p. 535–540, 2014.

REIS, R. C. R.; DANTAS, B. F.; PELACANI, C. R. Mobilization of reserves and germination of seeds of *Erythrina velutina* Willd. (leguminosae-papilionoideae) under different osmotic potentials. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 4, p. 580–588, 2012.

SANO, N. et al. Staying alive: Molecular aspects of seed longevity. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, n. 4, p. 660–674, 2016.

SANTOS, L. W. DOS et al. Armazenamento e métodos para a superação da dormência de sementes de mulungu. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 171–178, 2013.

SILVA JUNIOR, V. T. et al. *Erythrina velutina* WILLD. (LEGUMINOSAE-PAPILIONOIDEAE) ocorrente em Caatinga s Brejo de Altitude de Pernambuco : Biometria, embebição e germinação. **Revista árvore**, v. 36, n. 2, p. 247–257, 2012.

SILVA, K. B. et al. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e plantas de *Erythrina velutina* willd., leguminosae - Papilionoideae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 3, p. 104–114, 2008.

SNIDER, J. L. et al. The impact of seed size and chemical composition on seedling vigor, yield, and fiber quality of cotton in five production environments. **Field Crops Research**, 2016.

VENTURA, L. et al. Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 60, p. 196–206, 2012.

WANG, W. Q. et al. Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 86, n. November, p. 1–15, 2014.

WOJTYLA, Ł. et al. Molecular processes induced in primed seeds—increasing the potential to stabilize crop yields under drought conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 203, p. 116–126, 2016.

## 7. ARTIGO 4: EXPRESSÃO GÊNICA DE LEA E sHSP EM SEMENTES DE *Erythrina velutina* SOB CONDICIONAMENTO OSMÓTICO

**Periódico a ser submetido:** Journal of Agricultural Science | ISSN: 1916-9752 (Impresso); 1916-9760 (Online)

### RESUMO

*Erythrina velutina* é uma espécie nativa com tolerância ao déficit hídrico, em parte, devido a suas sementes ortodoxas. Essas sementes possuem mecanismos de resistência ao estresse como a síntese de proteínas LEA e sHSP para a preservação da capacidade germinativa, influenciando longevidade e vigor. Para o estímulo da tolerância pode ser usado o condicionamento osmótico, ativando-se a ação de genes para a síntese de proteínas que agem na proteção de membranas, outras proteínas e ácidos nucleicos, sem que ocorra a protrusão radicular. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão gênica em sementes de *E. velutina* submetidas ao condicionamento osmótico usando-se RT-qPCR. Sementes coletadas em Pernambuco, em 2008 (lote 1), Bahia em 2016 (lote 2) e Sergipe em 2018 (lote 3) foram avaliadas pela germinação e vigor, amostras foram submetidas a restrição hídrica em quatro potenciais (0; -0,4; -0,8 e -1,2 MPa), e outras osmocondicionadas. Os embriões das sementes osmocondicionadas foram extraídos para a avaliação da expressão gênica por RT-qPCR. Houve diferença entre os resultados de germinação e vigor entre os três lotes, sendo o lote 3 o mais vigoroso. E os dois lotes com maior tempo de armazenamento (lotes 1 e 2) responderam positivamente ao condicionamento osmótico. Houve diferença em expressão gênica entre os lotes para *Em6* (LEA grupo 1) e *sHSP 18.2*. Os genes *Em6* e *sHSP18.2* são expressos em sementes com alto e intermediário vigor após osmocondicionamento.

**Palavras-chave:** RT-qPCR; mulungu; LEA; HSP; restrição hídrica

## ABSTRACT

### **Title: Gene expression of LEA and sHSP in *Erythrina velutina* seeds under osmopriming**

*Erythrina velutina* is a native species with tolerance to water deficit, in part, due to its orthodox seeds. These seeds have stress resistance mechanisms such as the synthesis of LEA and sHSP proteins for the preservation of germination capacity, influencing longevity and vigor. To stimulate tolerance, osmotic conditioning can be used, activating the action of genes for the synthesis of proteins that act in the protection of membranes, other proteins and nucleic acids, without radicle protrusion. The objective of this work was to evaluate gene expression in *E. velutina* seeds submitted to osmotic conditioning using RT-qPCR. Seeds collected in Pernambuco in 2008 (lot 1), Bahia in 2016 (lot 2) and Sergipe in 2018 (lot 3) were evaluated for germination and vigor, samples were subjected to water restriction in four potentials (0; -0.4 ; -0.8 and -1.2 MPa), and other osmoconditioned. The embryos of the osmoconditioned seeds were extracted for the evaluation of the gene expression by RT-qPCR. There was a difference between the results of germination and vigor between the three lots, with lot 3 being the most vigorous. And the two lots with the longest storage time (lots 1 and 2) responded positively to osmotic conditioning. There was a difference in gene expression between the lots for *Em6* (LEA group 1) and *sHSP18.2*. The *Em6* and *sHSP18.2* and genes are expressed in seeds with high and intermediate vigor after conditioning.

**Keywords:** RT-qPCR; mulungu; LEA; HSP; drought stress.

### **7.1. Introdução**

*Erythrina velutina* é uma árvore nativa pertencente à família Fabaceae com alta plasticidade de ocorrência no Brasil. Adaptada a regiões de Caatinga, Mata Atlântica e Cerrado, essa espécie desenvolve-se tanto em climas mais úmidos quanto áridos (OLIVEIRA et al., 2016; SILVA JUNIOR et al., 2012b). Essa tolerância é devida, em parte, a suas sementes ortodoxas com resistência ao déficit hídrico (REIS; DANTAS; PELACANI, 2012). Em sementes ortodoxas, a atividade de genes que sintetizam proteínas como as acumuladas nos

últimos estádios de desenvolvimento - *late embryogenesis abundant* (LEA) e as proteínas de choque térmico - *heat shock proteins* (HSP), que conferem tolerância à dessecação e estresses abióticos, preservando a capacidade germinativa (SANO et al., 2016). Nessas sementes, o vigor e longevidade estão diretamente relacionados ao acúmulo dessas moléculas protetoras.

As proteínas LEA são encontradas em diversas plantas e tecidos vegetais. Essas proteínas são membros de um grande grupo de proteínas hidrofílicas, estáveis e sintetizadas em várias plantas sob situações de estresse abiótico, principalmente o déficit hídrico (KE et al., 2016). Os genes que as sintetizam são diversos, estão localizados em muitas organelas, como núcleo, cloroplastos e mitocôndrias, e possuem ampla função na tolerância aos estresses (MAGWANGA et al., 2018). Durante o estresse, as LEA estabilizam membranas, lipossomos e conferem aspecto vítreo protegendo os tecidos vegetais de danos celulares (LI et al., 2015).

Entre as HSP, o grupo de *small heat shock proteins* (sHSP) é expresso durante a embriogênese, maturação – presentes no eixo embrionário e cotilédones - e no início da germinação das sementes, além de sob condições de estresse. As sHSP, assim como as LEA são hidrofílicas, estáveis e encontradas em várias organelas. Para evitar a agregação e desnaturação de proteínas, as sHSP ligam-se a outras proteínas em tecidos vegetais sob estresses térmico, hídrico, salino e oxidativo.

Para o estímulo da tolerância a restrição hídrica em plantas, um dos melhores métodos é o condicionamento osmótico com solução de polietilenoglicol (PEG), o qual consiste no estabelecimento da tolerância ao se aplicar um moderado estresse osmótico (SHETEIWY et al., 2016). Nas plantas, o condicionamento osmótico com a embebição em PEG confere a habilidade de tolerar a restrição hídrica ao inibir a protrusão radicular e regular a expressão de genes relacionados ao metabolismo, modificações na membrana plasmática, síntese de ABA (ácido abscísico), respostas aos estresses, mecanismos antioxidantes, síntese de LEA, sHSP (GOSWAMI; BANERJEE; RAHA, 2013; GUO et al., 2012; SAHU et al., 2018).

Os transcritos de *LEA* e *sHSP* reduzem progressivamente com a perda da tolerância a dessecação; e, são novamente acumulados durante a indução a tolerância em sementes de *Medicago truncatula* Gaertn., *Arabidopsis thaliana*, *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (MASETTO et al., 2013) tratadas com PEG e germinadas. A submissão de plantas a uma condição de estresse moderado pode ativar mecanismos de tolerância cruzada, preparando as plantas para reagir a diversos tipos de estresse e formando uma memória genética como resposta a esse estímulo. Os fatores relacionados com o efeito memória estão potencialmente ligados a ativação de genes relacionados aos mecanismos de acumulação de proteínas sinalizadoras ou osmoprotetoras. (HOSSAIN et al., 2018; TABASSUM et al., 2017).

Os padrões de expressão gênica indicam os mecanismos de ação e regulação molecular. Para a quantificação dessa expressão, uma das técnicas mais utilizadas é a transcrição reversa associada a PCR quantitativa em tempo real (RT qPCR), um método com alta sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e acurácia (DIE; ROMÁN, 2012; LE; PAGTER; HINCHA, 2015). Por meio de resultados de RT-qPCR é possível comparar a expressão gênica entre plantas sob diferentes condições.

Objetivou-se, por meio desse trabalho, avaliar a expressão de genes que codificam para proteínas LEA e sHSP em sementes de *Erythrina velutina* submetidas ao condicionamento osmótico.

## **7.2. Material e Métodos**

As análises foram realizadas no Laboratório de Sementes (Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Sergipe, Brasil e no Laboratório de Análise de RNA e Proteínas do grupo Genética Molecular de Plantas (Instituto de Ciências de Plantas e Microbiologia) da Universidade de Hamburgo, Alemanha, em 2018. As sementes de *E. velutina* foram coletadas em Afrânio, Pernambuco em 2008 (lote 1) em área de Caatinga; na região Baixo-Sul, no estado da Bahia em 2016 (lote 2) em área de Mata Atlântica (sementes comerciais da empresa Biosementes); e em Pinhão, Sergipe em 2018 (lote 3) em área de Caatinga. Foram armazenadas

em câmara fria a 6°C com 60% de umidade relativa, em embalagens plásticas impermeáveis (1,5 mm).

Para as avaliações fisiológicas dos lotes, realizou-se a assepsia das sementes em hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos, depois lavadas com água destilada, escarificadas mecanicamente (SANTOS et al., 2013) e germinadas em substrato de papel, umedecido com volume 2,5 vezes o peso. A simulação da restrição hídrica ocorreu com a germinação em papel embebido em soluções de polietilenoglicol (PEG) 6000 com diferentes potenciais osmóticos (0; -0,4, -0,8 e -1,2 MPa) (VILLELA; DONI FILHO; SEQUEIRA, 1991), com 4 repetições de 25 sementes por lote. Sementes não submetidas aos tratamentos foram denominadas controle. A germinação ocorreu em câmara do tipo BOD, a 25°C com fotoperíodo de 12h/luz durante 14 dias.

Os parâmetros avaliados foram germinação (G%), emissão de radícula (germinação fisiológica por protrusão radicular) (ER%), sementes deterioradas (De%), sementes duras (Du%) e tamanho e massa seca do epicótilo e hipocótilo. Além disso, obteve-se a curva de embebição em água e curva de restrição hídrica em diferentes potenciais osmóticos (0; -0,4, -0,8 e -1,2 MPa) avaliando o incremento em peso das sementes com a absorção de água e início das atividades metabólicas até a protrusão da radícula.

A partir dos resultados da curva de restrição, determinou-se o potencial osmótico para a realização do condicionamento, onde 100 sementes por lote foram submersas em solução de PEG por 24 horas com aeração constante. Após esse período, as sementes foram germinadas em substrato de papel umedecido com água e mantidas em câmara do tipo BOD, como descrito acima.

Os embriões de sementes osmocondicionadas foram extraídos para avaliação da expressão gênica. A extração de RNA foi realizada com o kit comercial Monarch Total RNA Miniprep (New England BioLabs Inc.) de acordo com as instruções do fabricante e utilizando-se maceração em nitrogênio líquido para auxiliar na quebra da parede celular. A quantidade e

qualidade do RNA extraído foi mensurada e avaliada usando-se nanoespectrofotômetro do tipo Nano Drop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific<sup>TM</sup>), aferindo-se a concentração de RNA (ng/μl) e as relações A260/280 e A260/230. A integridade do RNA extraído foi determinada usando-se o Bioanalyzer RNA 6000 (Agilent Technologies), com o parâmetro RNA Integrity Number (RIN). Apenas amostras que apresentaram RIN satisfatório (> 6,0) foram utilizadas.

A partir do RNA extraído, as amostras foram tratadas com DNase I, RNase Free (Thermo Scientific<sup>TM</sup>) para remoção de contaminantes residuais. Depois, ocorreu a síntese de cDNA com RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific<sup>TM</sup>). Para a avaliação da integridade do cDNA, realizou-se PCR convencional com desnaturação inicial a 95° C por 60 s., 40 ciclos de 95°C por 30 s., 55°C por 30 s. e 72°C por 60 s. e extensão final a 72°C por 5 min. usando o PCR Master Mix (Thermo Scientific<sup>TM</sup>) e os primers de estudo. As amplificações foram avaliadas em gel de agarose 1% com Gel Ready<sup>TM</sup>.

As amplificações em PCR em tempo real foram realizadas usando-se triplicatas biológicas e triplicatas técnicas para o controle e os tratamentos (embriões com ou sem osmocondicionamento). As reações ocorreram com agente fluorescente intercalante (Luna Universal qPCR Master Mix – New England BioLabs Inc.) e constituídas de desnaturação inicial a 95°C, 40 ciclos de 95°C por 15 s. e 60°C por 30 s. e curva de dissociação no QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems<sup>TM</sup>). O software Data Assist (v3.01 Applied Biosystems<sup>TM</sup>) foi utilizado para calcular a variação de amplificação (*fold change*) entre as amostras e o método do C<sub>t</sub> Comparativo para determinar a quantificação relativa da expressão gênica entre o gene de referência e os genes alvo. Foram realizados também, testes de eficiência para cada primer e utilizados apenas os que apresentaram valores entre 80% e 120%.

Os primers testados foram desenvolvidos para os genes a partir das espécies modelo *Arabidopsis thaliana* e *Medicago truncatula*, esta última também pertencente à família Fabaceae (Tabela 4.1):

**Tabela 4.1.** Lista de sequências gênicas para a determinação da expressão gênica em embriões de *Erythrina velutina* Willd. (FARIA, 2006).

Gene	Função	Organismo modelo	Primer
<i>18S</i>	Subunidade ribossomal	<i>Medicago truncatula</i>	TGACGGAGAATTAGGGTTCG (F)
			CCTCCAATGGATCCTCGTTA (R)
<i>ACT</i>	Actina – tolerância à dessecação	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TTCCGCTCTTTCTTTCCAAGCTCA (F)
			AAGAGGCATCAATTTCGATCACTCA (R)
<i>Em6</i>	<i>Late Embryogenesis Abundant</i> (LEA) protein – tolerância a restrição hídrica	<i>Medicago truncatula</i>	GGCAAAGCAAGGAGAGACTG (F)
			ACCTTCCTCTTCAGCACGTT (R)
<i>sHSP 18.2</i>	<i>small Heat Shock Protein</i> – tolerância ao estresse térmico	<i>Medicago truncatula</i>	CACGTGTGGACTGGAAAGAA (F)
			TCTCTCAACACGATGCCACT (R)
<i>PER1</i>	Peroxirredoxina – tolerância a estresse oxidativo	<i>Medicago truncatula</i>	GCACATACTCCAGGTGCAAA (F)
			ACCACCCTCAGCACTTCATC (R)
<i>CTS</i>	Desenvolvimento da semente	<i>Medicago truncatula</i>	GGTCTTCCACATGGCAAGTAA (F)
			AAACCCAAGGCCAAGTAACA (R)

As médias dos resultados dos parâmetros fisiológicos foram comparadas e o desenho experimental foi inteiramente casualizado (DIC).

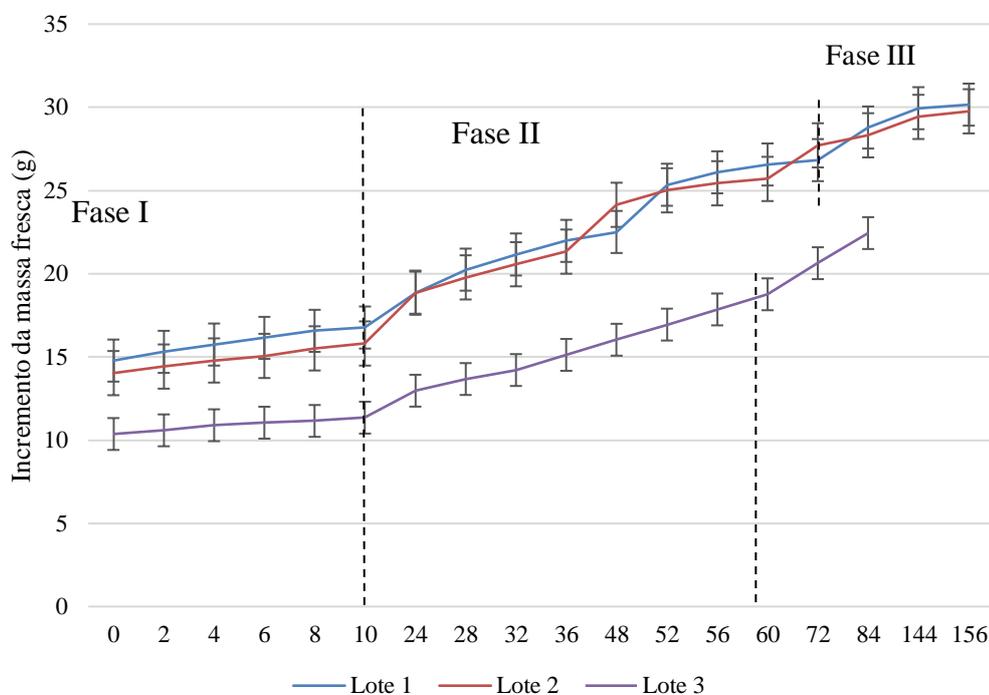
### 7.3. Resultados e discussão

A primeira fase da embebição, caracterizada pela alta entrada de água para o início do processo germinativo, ocorreu nas 10 primeiras horas nas sementes de *E. velutina* (Figura 4.1). Apesar de apresentar dormência tegumentar, *E. velutina* apresenta alta absorção de água durante

a fase I quando a dormência é rompida, assim como outras espécies do gênero (MATHEUS et al., 2010; SANTOS et al., 2013; SILVA et al., 2007).

A alta absorção de água na fase I é determinada pelo potencial matricial das sementes, estabelecido no período de dessecação durante a maturação. E, por ser um processo físico e independente de atividade metabólica, a fase I da embebição ocorreu em 10 horas para todos os lotes, independentemente do vigor. Sementes ortodoxas, como *Poincianella pyramidallis* e *Anadenanthera colubrina*, com ocorrência também na Caatinga, apresentam rápida absorção de água na fase I da germinação como estratégia de colonização de ambientes com climas áridos (CASTRO; GUIMARÃES; FARIA, 2017; SILVA; DANTAS, 2016).

Todos os lotes apresentaram incremento no ganho de peso e absorção de água nas horas seguintes. Para o lote 3 (2018), a fase II durou entre 10 e 60 horas, a partir de então entrando na fase III evidenciada pela protrusão da radícula. As sementes dos lotes 1 (2008) e 2 (2016) apresentaram protrusão apenas com 72 horas sob embebição, em porcentagem bastante reduzida.

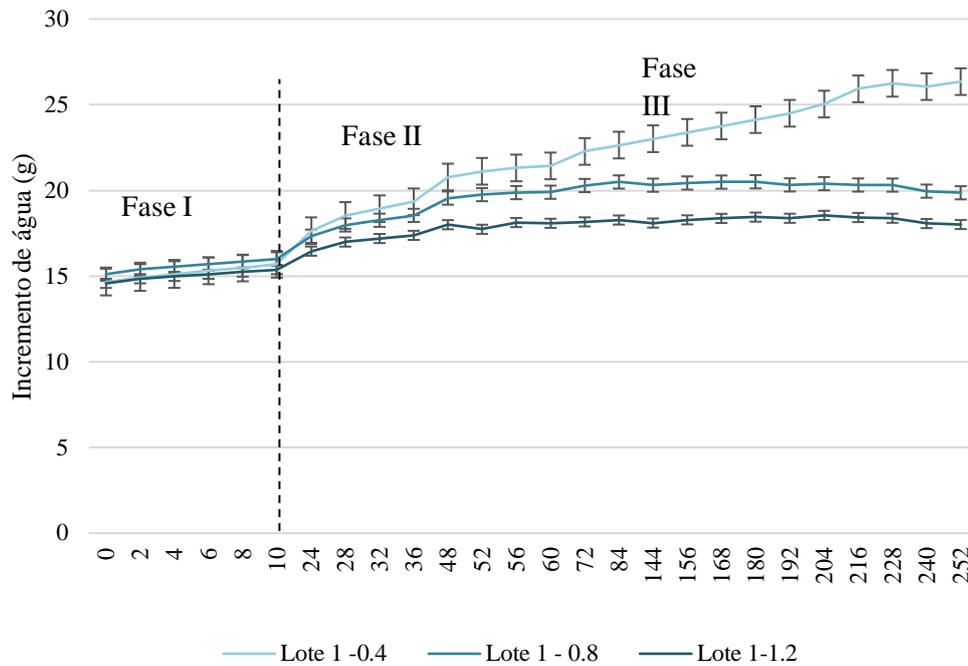


**Figura 4.1.** Curva de embebição em água por incremento de massa fresca de três lotes de sementes de *Erythrina velutina* Willd.

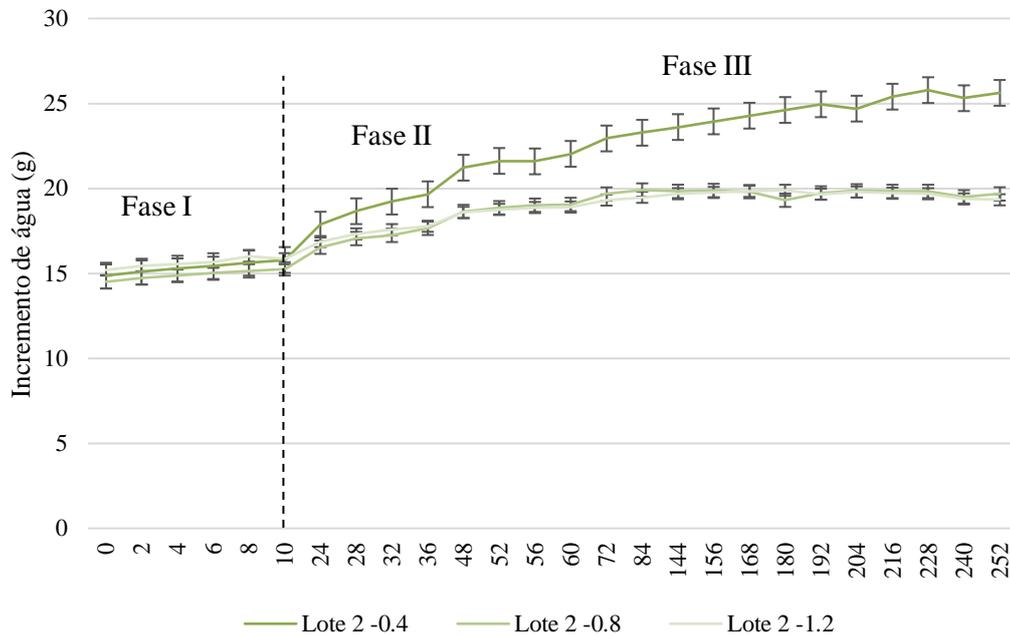
De acordo com as diversas condições ambientais, as sementes determinam o momento ideal para a protrusão radicular e formação de plântula. É um momento crítico para as sementes, devido a dependência de água para a sobrevivência das plantas. Em estudos foi identificada a relação direta entre o aumento no estresse e a redução do potencial germinativo de lotes de sementes (CHAMORRO; PARRA; MORENO, 2016; LIU et al., 2015).

Os testes de germinação realizados sob condições de estresse permitem a previsão da germinação de sementes sob condições não ideais de desenvolvimento. Os lotes 1 e 2 apresentaram baixa protrusão de radículas sob restrição hídrica a  $-0,4$  MPa e nenhuma protrusão para os demais potenciais até o final do teste, com 252 horas (Figuras 4.2 e 4.3). E não houve sementes duras em nenhuma das condições de germinação.

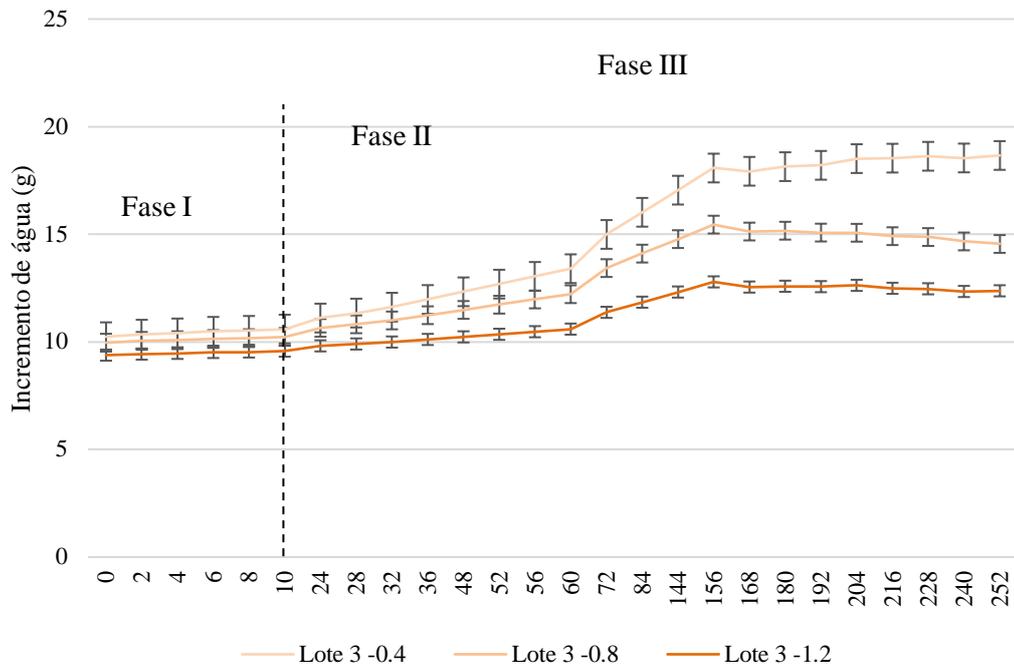
A fase I durou 10 horas para todos os lotes sob todos os potenciais de restrição (Figuras 4.2, 4.3 e 4.4). O comportamento de embebição foi proporcional para o lote 3 entre os diferentes potenciais, sendo maior a  $-0,4$  MPa e menor a  $-1,2$  MPa. Para esse lote, houve protrusão radicular a partir de 60 horas em todos os potenciais, mas em maior porcentagem para os potenciais menos restritivos (Figura 4.5).



**Figura 4.2.** Curva de restrição hídrica em solução de polietilenoglicol por incremento de água do lote 1 de sementes de *Erythrina velutina* Willd., sob os potenciais osmóticos -0,4 MPa, -0,8 MPa e -1,2 MPa.

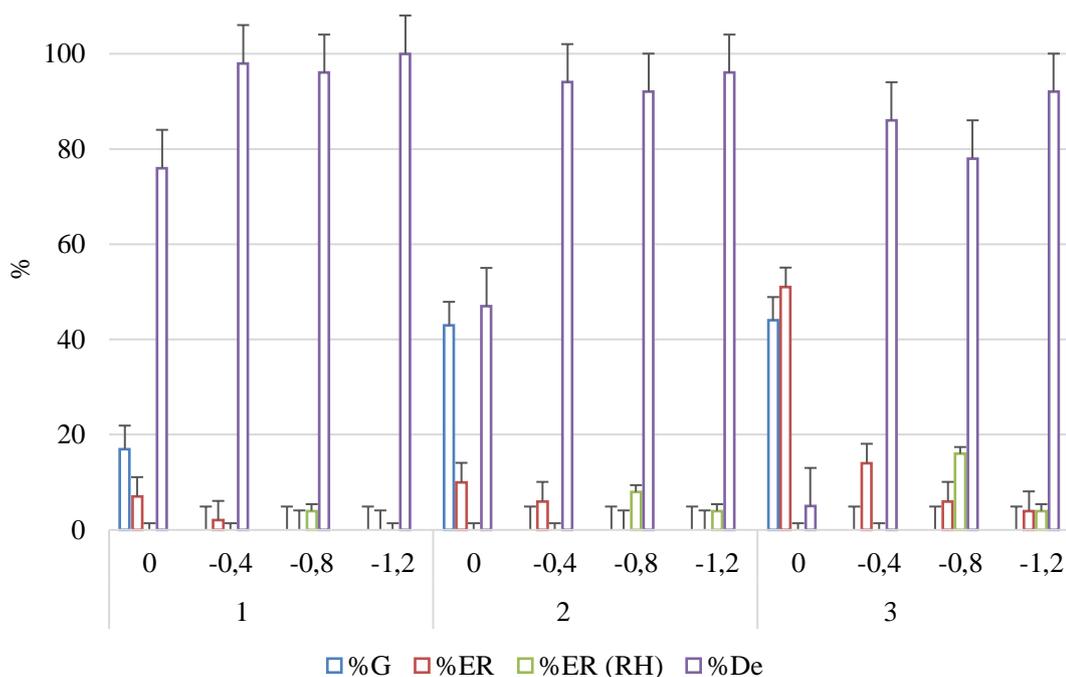


**Figura 4.3.** Curva de restrição hídrica em solução polietilenoglicol por incremento de água do lote 2 de sementes de *Erythrina velutina* Willd., sob os potenciais osmóticos -0,4 MPa, -0,8 MPa e -1,2 MPa.



**Figura 4.4.** Curva de restrição hídrica em solução polietilenoglicol por incremento de água do lote 3 de sementes de *Erythrina velutina* Willd., sob os potenciais osmóticos -0,4 MPa, -0,8 MPa e -1,2 MPa.

As sementes sob restrição hídrica que não germinaram foram colocadas em condições ideais de germinação em água e observou-se protrusão de radícula para o potencial -0,8 MPa em todos lotes; e para -1,2 MPa apenas para os lotes 2 e 3 (Figura 4.5). Portanto, o potencial osmótico de -0.8 MPa foi utilizado para o condicionamento osmótico de todos os lotes de sementes.



**Figura 4.5.** Porcentagem de germinação (%G), emissão de radícula (%ER), emissão de radícula após restrição hídrica (%ER (RH)) e sementes deterioradas (%De) de três lotes de sementes de *Erythrina velutina* Willd., sob os potenciais osmóticos -0,4 MPa, -0,8 MPa e -1,2 MPa.

O condicionamento osmótico é uma técnica que propicia o processo germinativo sem a protrusão da radícula, evitando-se a perda da tolerância ao estresse. Os benefícios da técnica dependem de vários fatores como, o grau de deterioração, tamanho e capacidade de absorção de água das sementes e a duração do tratamento. A embebição lenta e ativação de mecanismos de sobrevivência proporcionados pelo condicionamento osmótico podem levar a recuperação do vigor em lotes de sementes deterioradas durante o armazenamento (XIA et al., 2016, 2017).

As sementes de *E. velutina* após o osmocondicionamento apresentaram incremento na emissão de radícula em 11% para lote 1 e 13% para o lote 2. O lote 3 não apresentou maior germinação após o condicionamento osmótico (40%), com resultados próximos a germinação em água (44%).

O efeito benéfico do condicionamento osmótico apenas em sementes com menor vigor também foi relatado para a espécie *Digitalis purpurea*. As sementes dessa espécie demonstraram resultados semelhantes aos observados para *E. velutina*, com efeitos negativos

para sementes de alto vigor e positivos para sementes de baixo vigor, que foram armazenadas por um período mais longo, demonstrando a relação entre a deterioração de sementes e os benefícios do condicionamento (BUTLER et al., 2009). Sementes com vigor reduzido requerem mais tempo para reparos ao dano celular, intensificado durante o armazenamento (WATERWORTH; BRAY; WEST, 2015), e podem ser favorecidas pela absorção lenta durante o condicionamento.

Para a determinação da expressão gênica, extraiu-se o RNA de embriões de sementes de *E. velutina* condicionadas osmoticamente em solução de PEG -0,8MPa por 24 horas sob aeração constante. A relação A260/280 indica a pureza das amostras de RNA em relação a contaminação com DNA e proteínas e valores acima de 1,8 indicam materiais com alta qualidade (TAYLOR et al., 2010). E a relação A260/230 está relacionada a concentração de contaminantes como sais, polissacarídeos e polifenóis e amostras com valores acima de 1,6 são consideradas com alta qualidade. As concentrações de RNA e a relação A260/280 e A260/230 indicaram amostras com boa qualidade para a síntese cDNA (Tabela 4.2).

**Tabela 4.2.** Quantificação (ng/ $\mu$ l) e qualidade de RNA extraído de embriões de sementes de três lotes de *Erythrina velutina*.

	Lote	Tratamento	[ ] ng/ $\mu$ l	A260/280	A260/230
PE	1	Controle	355,4	2,1	2,0
		Tratada	1010,9	2,1	2,3
BA	2	Controle	429,1	2,1	1,8
		Tratada	948,9	2,1	2,1
SE	3	Controle	284,2	2,0	1,4
		Tratada	154,8	2,1	2,2

A análise da integridade das amostras avaliada pelo Bioanalyzer RNA 6000 apresentou as subunidades ribossomais 18S e 28S em todas as amostras, indicando a presença de RNA íntegro. Entretanto, os números RIN (RNA Integrity Number) resultados dessas amostras foram entre 6,0 e 6,5 – indicando degradação parcial do material e podendo ser considerados baixos para análises que requerem longos fragmentos de RNA. Contudo, avaliações utilizando RT-

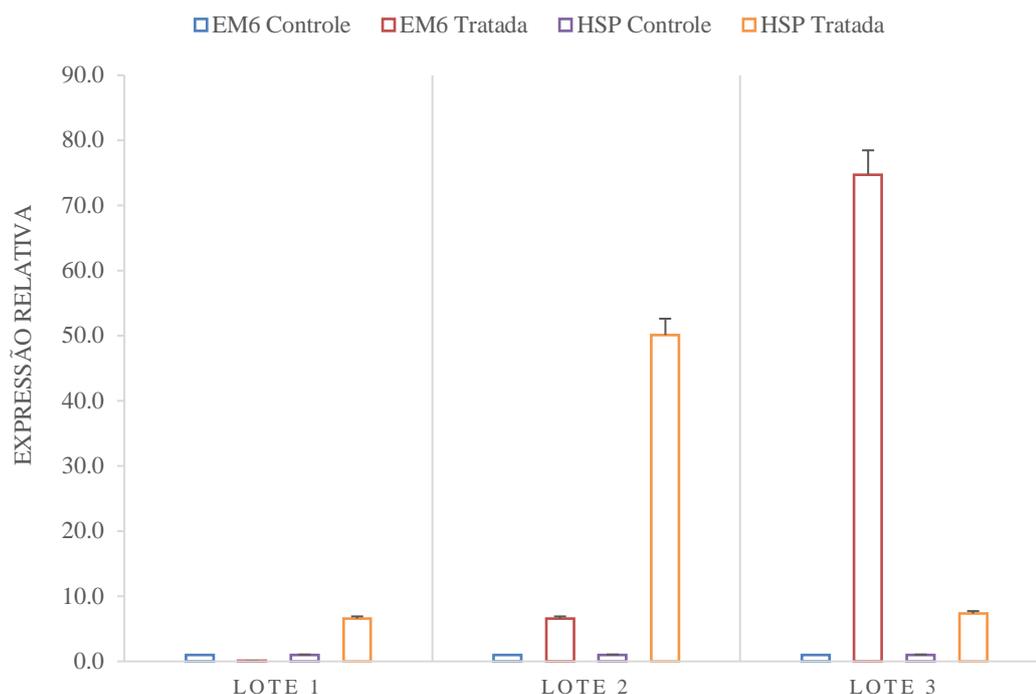
qPCR analisam regiões menores do RNA, sendo mais tolerantes a RNA parcialmente degradado (DIE; ROMÁN, 2012; FLEIGE; PFAFFL, 2006), e valores acima de 5 são considerados apropriados. Portanto, o material foi utilizado para a síntese de cDNA, apresentando resultados satisfatórios para concentração e pureza de ácidos nucleicos (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3.** Quantificação (ng/ $\mu$ l) e qualidade de cDNA sintetizado de embriões de sementes de três lotes de *Erythrina velutina*.

	Lote	Tratamento	[ ] ng/ $\mu$ l	A260/280	A260/230
PE	1	Controle	1550,0	1,5	1,9
		Tratada	1635,5	1,8	2,2
BA	2	Controle	1927,3	1,6	2,0
		Tratada	1671,8	1,8	2,2
SE	3	Controle	1995,8	1,7	2,1
		Tratada	1692,3	1,8	2,2

O cDNA obtido foi utilizado para a avaliação da expressão gênica por meio de RT-qPCR. Os primers foram testados quanto a eficiência de amplificação para o gene específico. Apenas os primers *18S*, *Em6* e *sHSP 18.2* apresentaram eficiência de amplificação (100%, 119% e 120%). O primer *18S* apresentou expressão estável entre controle e tratamento, sendo usado como gene de referência e *Em6* e *sHSP 18.2* como genes alvo para a análise pelo método do  $C_t$  Comparativo.

O lote 1 apresentou a menor expressão gênica para todos os genes alvo, sob condicionamento osmótico as sementes desse lote apresentaram expressão do gene *Em6* reduzida, demonstrando o efeito negativo do condicionamento em sementes de baixo vigor (Figura 4.6). Porém, a expressão do gene *sHSP* foi levemente aumentada após o condicionamento osmótico, indicando um potencial de recuperação molecular. O lote 2 apresentou maior expressão de ambos os genes após o condicionamento osmótico, sendo mais expressivo o aumento de *sHSP*. E o lote 3 também apresentou maior expressão de ambos os genes após o condicionamento em solução de PEG -0,8 MPa. Porém o gene com maior expressão foi *Em6*.



**Figura 4.6.** Expressão relativa dos genes *Em6* e *sHSP* em embriões de três lotes de sementes osmocondicionadas de *Erythrina velutina*, em solução de polietilenoglicol -0,8 MPa.

Esses resultados indicam que em sementes com menor vigor, a ação de *HSP* é ativada como mecanismo de tolerância a estresses abióticos. Enquanto, em sementes com maior vigor, a ação de genes *LEA* do grupo 1, como o *Em6*, é maior. Em sementes de *Brassica oleracea* a expressão de *Em6*, outros genes do grupo *LEA* e genes relacionados a estresses contribuíram para a tolerância nessas sementes completamente maduras e osmocondicionadas (SOEDA et al., 2005). A regulação da expressão desse gene para a tolerância a restrição hídrica e salino foi também observada em *Arabidopsis* e alfafa (CABELLO et al., 2016). Em estudos com diferentes espécies de *Coffea* e *Medicago truncatula*, a expressão de *Em6* e dois genes *sHSP* foi observada em espécies tolerantes à dessecação, participando na proteção de membranas e proteínas, além de realizar o controle de perda de água devido as propriedades hidrofílicas de suas proteínas (CHATELAIN et al., 2012; STAVRINIDES et al., 2019). E em sementes de *Pisum sativum*, o tratamento com PEG resultou na reindução da tolerância à dessecação, o aumento na taxa de viabilidade do lote de sementes e nos níveis de transcritos associados a proteínas *LEA* e *sHSP* (SAHU et al., 2018).

#### 7.4. Conclusões

O condicionamento osmótico com solução de polietilenoglicol -0,8 MPa induz o reestabelecimento do vigor em sementes deterioradas de *E. velutina*.

As sementes dessa espécie com alto e intermediário vigor apresentam maior expressão dos genes *Em6* e *sHSP 18.2* quando osmocondicionadas, demonstrando os mecanismos moleculares ativados que podem promover a tolerância aos estresses abióticos.

#### 7.5. Referências Bibliográficas

BUTLER, L. H. et al. Priming and re-drying improve the survival of mature seeds of *Digitalis purpurea* during storage. **Annals of Botany**, v. 103, n. 8, p. 1261–1270, 2009.

CABELLO, J. V. et al. The sunflower transcription factor HaHB11 confers tolerance to water deficit and salinity to transgenic *Arabidopsis* and alfalfa plants. **Journal of Biotechnology**, v. 257, p. 35–46, 2016.

CASTRO, L. E.; GUIMARÃES, C. C.; FARIA, J. M. R. Physiological, cellular and molecular aspects of the desiccation tolerance in *Anadenanthera colubrina* seeds during germination. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 4, p. 774–780, 2017.

CHAMORRO, D.; PARRA, A.; MORENO, J. M. Reproductive output, seed anatomy and germination under water stress in the seeder *Cistus ladanifer* subjected to experimental drought. **Environmental and Experimental Botany**, v. 123, p. 59–67, 2016.

CHATELAIN, E. et al. Temporal profiling of the heat-stable proteome during late maturation of *Medicago truncatula* seeds identifies a restricted subset of late embryogenesis abundant proteins associated with longevity. **Plant, Cell and Environment**, v. 35, n. 8, p. 1440–1455, 2012.

DIE, J. V.; ROMÁN, B. RNA quality assessment: a view from plant qPCR studies. **Journal of Experimental Botany**, p. 1–9, 2012.

FARIA, J. M. R. **Desiccation tolerance and sensitivity in *Medicago truncatula* and *Inga vera* seeds**. Wageningen University, 2006.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 126–139, 2006.

GOSWAMI, A.; BANERJEE, R.; RAHA, S. Drought resistance in rice seedlings conferred by seed priming: Role of the anti-oxidant defense mechanisms. **Protoplasma**, v. 250, n. 5, p. 1115–1129, 2013.

GUO, Y. et al. Effects of water stress and seed mass on germination and antioxidative enzymes of *Xanthoceras sorbifolia*. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 18, p. 4187–4195, 2012.

HOSSAIN, M. A. et al. Heat or cold priming-induced cross-tolerance to abiotic stresses in plants: key regulators and possible mechanisms. **Protoplasma**, v. 255, n. 1, p. 399–412, 2018.

KE, Y.-T. et al. Characterization of rice Group 3 LEA genes in developmental stages and under abiotic stress. **Plant Molecular Biology Reporter**, n. 1, 2016.

LE, M. Q.; PAGTER, M.; HINCHA, D. K. Global changes in gene expression, assayed by microarray hybridization and quantitative RT-PCR, during acclimation of three *Arabidopsis thaliana* accessions to sub-zero temperatures after cold acclimation. **Plant molecular biology**, v. 87, n. 1–2, p. 1–15, 2015.

LI, L. et al. Expression of the moss *PpLEA4-20* gene in rice enhances membrane protection and client proteins stability. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 460, n. 2, p. 386–391, 2015.

LIU, M. et al. Effects of drought stress on seed germination and seedling growth of different maize varieties. **Journal of Agricultural Science**, v. 7, n. 5, p. 231–240, 2015.

MAGWANGA, R. O. et al. Characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) proteins family and their role in drought stress tolerance in upland cotton. **BMC Genetics**, v. 19, n. 1, p. 1–31, 2018.

MASETTO, T. E. et al. Condicionamento osmótico de sementes de *Sesbania virgata* (CAV.) PERS. **Cerne**, v. 19, n. 4, p. 629–636, 2013.

MATHEUS, M. T. et al. Superação da dormência em sementes de duas espécies de *Erythrina*. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 3, p. 48–53, 2010.

OLIVEIRA, M. K. T. et al. Desenvolvimento inicial de *Erythrina velutina* sob restrição hídrica.

**Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 36, n. 88, p. 481–488, 2016.

REIS, R. C. R.; DANTAS, B. F.; PELACANI, C. R. Mobilization of reserves and germination of seeds of *Erythrina velutina* Willd. (leguminosae-papilionoideae) under different osmotic potentials. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 4, p. 580–588, 2012.

SAHU, B. et al. Gene expression of late embryogenesis abundant proteins, small heat shock proteins and peroxiredoxin and oxidation of lipid and protein during loss and re-establishment of desiccation tolerance in *Pisum sativum* seeds. **South African Journal of Botany**, v. 119, p. 28–36, 2018.

SANO, N. et al. Staying alive: Molecular aspects of seed longevity. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, n. 4, p. 660–674, 2016.

SANTOS, L. W. DOS et al. Armazenamento e métodos para a superação da dormência de sementes de mulungu. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 171–178, 2013.

SHETEIWY, M. S. et al. Seed priming with polyethylene glycol induces antioxidative defense and metabolic regulation of rice under nano-ZnO stress. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 19, p. 19989–20002, 2016.

SILVA, F. F. S. DA; DANTAS, B. F. Quantification of storage proteins during seed imbibition of native species from the Brazilian Caatinga vegetation. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 1733–1744, 2016.

SILVA JUNIOR, V. T. et al. *Erythrina velutina* Willd. (leguminosae-papilionoideae) ocorrente em caatinga e brejo de altitude de Pernambuco: biometria, embebição e germinação. **Revista Árvore**, v. 36, n. 2, p. 247–257, 2012.

SILVA, K. B. et al. Quebra de Dormência em Sementes de *Erythrina velutina* Willd. **Revista Brasileira de Biociências**, p. 180–182, 2007.

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.

STAVRINIDES, A. K. et al. Seed comparative genomics in three coffee species identify desiccation tolerance mechanisms in intermediate seeds. **Journal of Experimental Botany**, n. November, 2019.

TABASSUM, T. et al. Seed priming and transgenerational drought memory improves tolerance against salt stress in bread wheat. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 362–369, 2017.

TAYLOR, S. et al. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. **Methods**, v. 50, n. 4, p. S1–S5, 2010.

VILLELA, F. A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 1991.

WATERWORTH, W. M.; BRAY, C. M.; WEST, C. E. The importance of safeguarding genome integrity in germination and seed longevity. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 12, p. 3549–3558, 2015.

XIA, F. S. et al. Antioxidant and ultrastructural responses to priming with PEG in aged, ultra-dry oat seed. **Seed Science and Technology**, v. 44, n. 3, p. 556–568, 2016.

XIA, F. S. et al. Responses of mitochondrial ultrastructure and physiological variations to PEG-priming on ultra-dried oat (*Avena sativa* L.) seeds after ageing. **Seed Science and Technology**, v. 45, n. 3, p. 622–637, 2017.

## 8. CONCLUSÃO GERAL

*Erythrina velutina* é um recurso vegetal nativo com alto potencial biotecnológico. As suas propriedades bioquímicas são de grande relevância para a medicina, agricultura e química. Entretanto, é necessária a transformação dessas propriedades em produtos por meio de patentes. Em um processo produtivo, *E. velutina* tem o potencial de integrar biofábricas de compostos ativos. E em campo, a espécie é um bioindicador de mudanças climáticas e altamente recomendada para recuperação de áreas degradadas. Porém, a pressão antrópica em áreas naturais tem reduzido a ocorrência dessa espécie. Além disso, a produção de sementes também tem reduzido, dificultando a conservação tanto *in situ*, quanto *ex situ*. E para otimizar o uso dos recursos disponíveis sob conservação *ex situ* – com o armazenamento em câmaras frias – métodos de avaliação da qualidade das sementes, como a análise de imagens de raios-x associada a mensuração da densidade interna das sementes, tornam-se cada vez mais importantes. Essa e outras técnicas, como ressonância magnética e microscopia de varredura podem contribuir para a elucidação dos fenômenos que ocorrem durante o armazenamento e, consequente, deterioração de sementes de *E. velutina*. Sementes estas, que por serem ortodoxas, toleram a dessecação e a restrição hídrica por meio da ativação e de genes específicos. Apesar da expressão de genes *Em6* e *sHSP* não ser alta em lotes de sementes deteriorados, devido ao longo tempo sob armazenamento, lotes com deterioração de moderada a baixa, apresentam alta expressão de genes de tolerância a estresses quando as sementes são condicionadas. Essa estratégia, além de poder melhorar o desempenho da espécie em campo, confere resistência a futuras mudanças climáticas e identifica materiais com potencial para a engenharia genética. Os estudos sobre a expressão de genes relacionados a qualidade e vigor de sementes de *E. velutina*, sob estresses abióticos, podem ainda contribuir para o incremento da produção de compostos bioativos, sendo diversos deles influenciados por condições ambientais. Sendo assim, essa espécie possui uma ampla base de potenciais e os trabalhos aqui desenvolvidos

contribuem relevantemente para o desenvolvimento de estudos e tecnologias a partir desse importante recurso da flora brasileira.