

Expressão gênica diferencial de sementes de *Schinus terebinthifolius* Raddi. submetidas ao estresse combinado de temperatura e restrição hídrica

M. C. Vasconcelos¹; D. C. Gondim²; L. J. Gomes³; R. Silva-Mann³

¹Acaadêmica de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-SE, Brasil

²Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-SE, Brasil

³Professora do Departamento de Engenharia Agrônômica, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-SE, Brasil

michelle_florestal@yahoo.com.br

(Recebido em 31 de agosto de 2010; aceito em 20 de dezembro de 2010)

O *Schinus terebinthifolius* Raddi. é uma espécie recomendada para recuperação de áreas degradadas e marginais, devido ao seu caráter de pioneirismo e agressividade, além da facilidade para se instalar nessas áreas, e também para a recomposição de mata ciliar de áreas com inundações periódicas de rápida duração e com período de encharcamento moderado. Devido a sua plasticidade em se adaptar a várias diferentes condições edafoclimáticas foi avaliada a expressão gênica diferencial de suas sementes submetidas ao estresse combinado de temperatura e restrição hídrica visando a análise de genes que são expressos sob tais condições de estresse. Empregou-se o método de PCR como os *primers* para a sequência da subunidade ribossomal 18S e para proteínas de choque térmico *sHSP18.2*. Considerando ainda dados sobre a morfometria, peso hectolítrico, curva de embebição à 40°C, curva de restrição submetidos a concentrações de Polietilenoglicol 6000 (-0,4; -0,8 e -1,2 MPa) e temperatura de 40°C.

Palavras-chave: pimenta-rosa, estresse abiótico, conservação.

The *Schinus terebinthifolius* Raddi. is a species recommended for the recovery of degraded and marginal because of its pioneering trait and aggressiveness, as well as easy to settle in these areas, and also for the restoration of riparian areas with periodic flooding of short duration and period moderate flooding. Due to its plasticity to overcoming several different edafoclimatics conditions was evaluated the differential gene expression under such conditions of stress. It was utilized the PCR method and primers for the sequence of 18S ribosomal subunit and heat shock proteins *sHSP18.2*. Considering also data on morphometry, test weight, soaking curve at 40° C, subjected to restriction curve concentration of polyethyleneglycol 6000 (-0,4; -0,8 e -1,2 MPa) and temperature of 40°C.

Keywords: pink pepper, abiotic stress, conservation.

1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas, atualmente, vêm sofrendo várias modificações como consequência da má utilização dos recursos naturais pelo homem. Uma vez que podem levar a extinção de algumas espécies vegetais, animais e de microrganismos. Além de provocar a degradação de vários ambientes, com destaque para as matas ciliares.

A espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi. conhecida popularmente como pimenta-rosa está sendo estudada, principalmente pelo seu potencial vegetativo inicial quando plantadas em áreas degradadas e na recomposição de mata ciliar. Além disso, é uma espécie que pode propiciar ao ser humano propriedades medicinais e condimentares, pelo consumo do seu fruto nas cozinhas nacionais e internacionais [1].

Para o estabelecimento desta espécie vários fatores dentre os bióticos e abióticos devem ser observados, pois interferem no desenvolvimento da planta. Alguns dos fatores abióticos que mais interferem no desenvolvimento de uma planta, desde a germinação até a fase adulta, são a disponibilidade de água e a temperatura, principalmente na região nordeste do Brasil.

A água é um fator limitante para a iniciação da germinação, pois é ela que faz com que ocorram as reações enzimáticas que estimulam o surgimento da radícula e da plântula [2]. A temperatura também se apresenta como um fator limitante, pois quando em sua faixa ótima estimula um elevado percentual de germinação, o que não pode ser observado quando estas estão elevadas ou baixas em comparação com as temperaturas ótimas para a espécie, e reduzindo o percentual de germinação, deterioram a semente e a expõe a ação de fungos [3]. Cruzando-se estes dois fatores podemos estabelecer curvas de embebição que tem grande importância no conhecimento das necessidades da semente que vai desde a quantidade de água ideal para o início da germinação até a protrusão da radícula, assim como avaliar condições de déficit hídrico que podem provocar o impedimento ou comprometimento da germinação.

A expressão gênica é um processo pelo qual as informações codificadas por um determinado gene é decodificado em uma proteína, sendo que a regulação em qualquer de uma das etapas desse processo pode induzir a uma expressão gênica diferencial. A análise do transcriptoma empregada na identificação de genes tem sido utilizada em resposta aos estresses: biótico e abiótico, uma vez que tem a função de compreender o funcionamento do gene e dos mecanismos moleculares envolvidos nos eventos biológicos.

Para a análise da expressão diferencial tem se empregado várias técnicas: hibridação diferencial, subtração eletrônica (incluindo a análise serial da expressão gênica, SAGE), diferencial display transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (DDRT-PCR), a subtração de cDNA e, mais recentemente, chips de DNA [4].

Empregando técnicas para análise de RNA pode-se entender as condições de resistência fisiológica de sementes, resultados estes que contribuíram para o monitoramento do desempenho das mesmas sob condições de estresse que poderão ser correlacionadas a padrões diferenciais de compostos de importância econômica, e ainda poderão ser empregadas na seleção assistida por marcadores em Banco de Germoplasma da espécie em trabalhos de pré-melhoramento.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é estabelecer a curva de germinação das sementes de pimenta-rosa submetidas à embebição em água e restrição hídrica em diferentes potenciais promovidos por soluções de polietilenoglicol-6000 e submetidas a altas temperaturas e a partir disso também avaliar a expressão gênica de sementes de *S. terebinthifolius*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nos Laboratórios de Tecnologia de Sementes e Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal do Departamento de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de Sergipe, localizada no município de São Cristóvão. Foram utilizadas sementes de pimenta-rosa (*S. terebinthifolius*) armazenadas em câmara fria (6 a 8°C) a uma umidade relativa de 65%.

Para os testes de análise de sementes usou-se fungicida de princípio ativo N – triclorometiltio – 4 – ciclohexano – 1,2 – decarboximida [Captan 500 PM (100g i.a./100kg de sementes)]. Este tratamento foi realizado, devido à composição das sementes que propicia a ocorrência de fungos, que interferem no estabelecimento das curvas de embebição e germinação

Curva de Embebição - As sementes foram distribuídas em caixas gerbox, e o substrato utilizado foi o papel mata-borrão embebido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel. As sementes foram mantidas em incubadora tipo B.O.D. à 40°C, na ausência de luz. Para a avaliação do ganho de água pelas sementes foram realizadas pesagens a cada 2 horas nas primeiras 24 horas, e passadas 24 horas as avaliações ocorreram a cada 4 horas até atingir 108 horas.

Curvas de Restrição - As sementes foram distribuídas em caixas gerbox, e o substrato utilizado foi o papel mata-borrão embebido com solução de polietilenoglicol-6.000 (PEG-6000) em potenciais indicados na proporção de 2,5 vezes o peso do papel. As sementes foram mantidas à 40°C, na ausência de luz. Os potenciais utilizados na curva de restrição foram -0,4 MPa, -0,8 MPa e -1,2 MPa, em que a solução foi preparada de acordo com a concentração expressa em

tabela sugerida por Vilela [5]. A obtenção dos dados para a avaliação da curva de restrição foi realizada a cada 2 horas nas primeiras 24 horas, e passadas 24 horas as avaliações ocorreram a cada 4 horas até atingir 108 horas.

Peso Hectolítico - O peso hectolítico foi determinado utilizando-se duas subamostras de 250 mL de sementes de pimenta-rosa. Cada subamostra foi pesada em balança analítica. Ao obter-se o peso das sementes das duas subamostras retirou-se a média do peso e este foi transformado em kg por hectolitro [6].

Morfometria - Para a determinação da morfometria de sementes de pimenta-rosa foram empregadas 100 sementes, as quais foram divididas em 4 repetições de 25, as avaliações foram realizadas com o auxílio de paquímetro digital (modelo YT202). Os dados de morfometria foram empregados para a obtenção das médias e estas comparadas pelo teste de Tukey a 5% no programa Sisvar® [7], em seguida foram empregados para obtenção dos gráficos no programa Excel.

Expressão Gênica - As sementes foram submetidas à restrição hídrica a -0,8MPa combinada com temperatura de 40°C, retirando-se uma amostra do tratamento as 0, 2, 4, 6 e 8 horas. Em seguida extraiu-se o RNA usando-se o Kit de extração SV Total RNA Isolation System da Promega. Foi obtido o cDNA para ser submetido ao PCR empregando os *primers 18S e sHSP18.2*, de sequências desenvolvidas para *Arabidopsis thaliana* L. O programa de amplificação do DNA consistiu de uma temperatura inicial de 94°C por 5 min., seguido de 35 ciclos que envolvem temperaturas de 94°C por 1 min., 50°C por 1min, 72°C por 1 min. e uma extensão final a 72°C por 10min. A amplificação ocorreu em termociclador Uniscience Biometra Tpersonal, utilizando microtubos de 200 µL, contendo 20 µL do coquetel. Utilizou-se 10µl dos produtos da amplificação para análise em eletroforese em gel de agarose 1,0% e revelados por brometo de etídio sob luz ultravioleta.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na curva de embebição (Figura 1) pode-se perceber que as sementes de pimenta-rosa têm facilidade de absorver e perder água para o meio, uma vez que houve uma instabilidade no ganho de água pelas sementes, dentro de cada uma das fases da germinação.

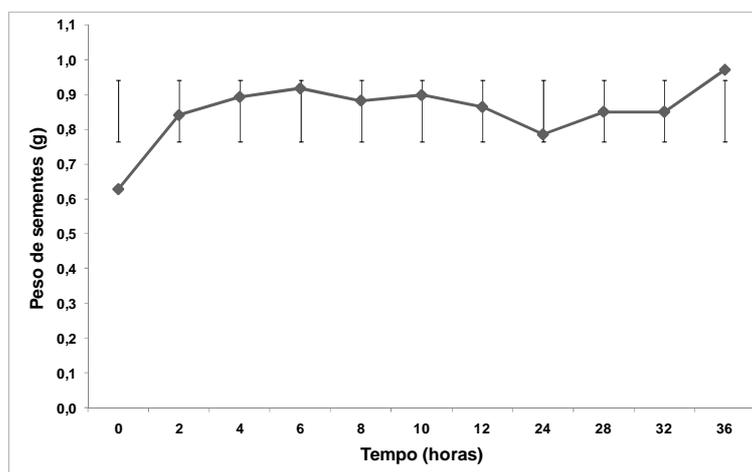


Figura 1: Curva de embebição de sementes *Schinus terebinthifolius* Raddi. UFS, São Cristóvão-SE, 2010.

A primeira etapa da germinação de uma semente é a hidratação, cuja intensidade depende da taxa de absorção de água [8]. O processo de embebição de água pela semente desencadeia uma sequência de mudanças metabólicas que culminam com a protrusão da radícula, quando se refere a sementes viáveis não dormentes [9 e 10].

A quantidade de água absorvida depende da espécie, da semente, variedade ou cultivar, temperatura ambiente, composição química da semente, teor de umidade inicial, natureza do tegumento e quantidade de água disponível. A embebição da maioria das sementes segue um padrão trifásico [11], em que a fase inicial do processo (fase I) constitui um fenômeno essencialmente físico, podendo ser completada em 1 a 2 horas nas sementes cotiledonares, independente da condição fisiológica. Tanto as sementes vivas quanto as sementes mortas ou dormentes, exceto por impermeabilidade do tegumento, que não é o caso das sementes de pimenta-rosa, absorvem água durante esta fase.

Na segunda etapa (fase II) ocorrem atividades metabólicas, porque as reservas estão sendo convertidas em compostos necessários para a germinação [11]. A absorção de água nessa fase é lenta, de 8 a 10 vezes mais longa que a anterior. Contudo, o tempo de duração de cada etapa depende de propriedades inerentes às sementes de cada espécie e das condições térmicas e hídricas durante a hidratação [12]. Assim, a importância da curva com as fases de embebição está relacionada tanto a estudos de permeabilidade de tegumento, como na determinação da duração de tratamentos com reguladores vegetais, condicionamento osmótico e pré-hidratação em sementes [9 e 13].

A velocidade de embebição e o ganho de peso são bastante rápidos [9], essa fase possui duração de uma a duas horas. Entretanto, as sementes de pimenta-rosa atingiram essa etapa após 4 horas de embebição, sendo este o ponto de mudança para a fase II. A duração da fase I em sementes de pimenta-rosa corrobora com as afirmações de Coll [14], o qual relata que a velocidade de absorção e a quantidade de água embebida variam com a natureza e composição do tegumento. A fase II, caracterizada pelas reduções drásticas da velocidade de hidratação e da intensidade da respiração. Após essa fase tem-se a seqüência com a fase III em que se observa a protrusão da radícula, mas com as sementes de pimenta-rosa não se pode observar essa fase por causa da ausência de germinação.

Na curva de restrição (Figura 2) pode-se observar que após 32 horas houve um decréscimo na absorção de água para as três concentrações, -0,4; -0,8 e -1,2 MPa. A concentração de -1,2 MPa foi a que apresentou menor absorção de água.

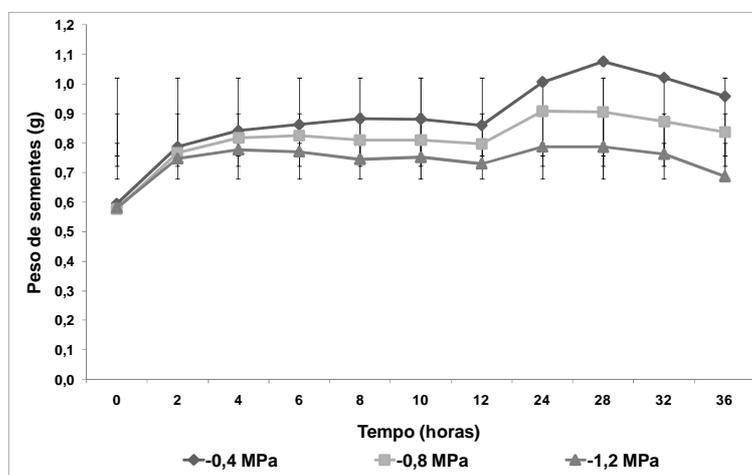


Figura 2: Curva de restrição de sementes *Schinus terebinthifolius* Raddi. UFS, São Cristóvão-SE, 2010.

A partir de 4 horas de embebição, para todos os tratamentos, iniciou-se a fase II, na qual se observou uma redução na absorção de água pelas sementes, pois é nessa fase que ocorre às atividades metabólicas necessárias para a protrusão da radícula e o desenvolvimento da plântula.

A partir das 24 horas, de modo geral, verificou-se lento incremento no teor de água das sementes condicionadas em PEG, o que poderia se caracterizar com o início da fase III, se as sementes de pimenta-rosa tivessem iniciado a protrusão da radícula. A protrusão da radícula não pode ser observada devido à ausência de germinação.

O entendimento da expressão gênica diferencial dos genes pode contribuir para o entendimento do comportamento das sementes sob tais condições de estresse que poderão ser correlacionadas a padrões diferenciais de compostos de importância econômica.

Foram empregadas sequências desenvolvidas para *Arabidopsis* e observou-se para os cinco períodos de tempo: 0, 2, 4, 6 e 8 horas, que houve expressão para o gene *18S* que é constitutivamente expresso. Porém não houve expressão diferencial para o gene *sHSP18.2* que identifica tolerância ao estresse, durante os períodos testados (Figura 3).

4. CONCLUSÃO

A curva de embebição de água das sementes de *Schinus terebinthifolius* Raddi. segue uma tendência de padrão trifásico, no entanto, sem a protrusão da radícula devido à ausência de germinação. No entanto, pode-se verificar que após 2 horas de embebição todos os tratamentos atingiram a fase I e após 4 horas a fase II.

As sementes apresentaram para estas condições expressão diferencial para o gene *18S*, embora não tenham apresentando nenhum tipo de expressão para o gene *sHSP18.2*, levando-nos a sugerir mais estudos de expressão gênica para a presente espécie.

-
1. LENZI, M.; ORTH, A. I. Fenologia reprodutiva, morfologia e biologia floral de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), em restinga da Ilha de Santa Catarina, Brasil. *Biotemas*, v.17, n 2, 2004.
 2. BOTELHO, B. A.; PEREZ, S. C. J. G. A. Estresse hídrico e reguladores de crescimento na germinação de sementes de canafístula. *Scientia Agricola*, v. 58, n. 1, p. 43-49, 2001.
 3. OLIVEIRA, I. V. M.; ANDRADE, R. A. A.; MARTINS, A. B. G. Influência da temperatura na germinação de sementes de *Annona montana*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, v. 27, n. 2, 2005.
 4. VEDDOY, C.G.; Bengtson, M.H.; Sogayar, M.C. Hunting for differentially expressed genes. *Brazilian Journal Medical Biological Research*, Riberão Preto, v.32, n.7, 1999.
 5. VILLELA, F. A.; FILHO, L. D.; SIQUEIRA, D. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 26, n.11/12, 1991.
 6. BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. *Regras para Análise de Sementes*. Brasília, 2009.
 7. FERREIRA, D. F. *Sisvar*. DEX/UFLA. 2000.
 8. SOUZA, L. S.; CARVALHO, M. L. M.; NETO, A. L. S.; SANTOS, D. C.; KATAOKA, V. Y. Curva de embebição de água em sementes de mamona. *III Congresso Brasileiro de Mamona*, 2008.
 9. CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. *Sementes: ciências, tecnologia e produção*. Campinas, Fundação Cargil, p. 96 – 174, 2000.
 10. LABORIAU, L. G. A. Germinação das sementes. Washington: *Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos*, 1983. 171 p.
 11. BEWLEY, J. D.; BLACK, M. *Seeds: physiology of development and germination*. 2 nd ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
 12. VERTUCCI, C. W. The kinetics of seed imbibition: controlling factors and relevance to seedling vigor. In: STANWOOD, P. C.; McDONALD, M. B. (Ed.). Seed moisture. SYMPOSIUM SPONSORED BY DIVISION C-4 AND C-2 OF THE CROP SCIENCE SOCIETY, 1987, Atlanta. *Proceedings*. Madison: Crop Science Society, 1989. p.93-115. (Special Publication, 14).
 13. ALBUQUERQUE, M. C. F.; RODRIGUES, T. de J. D.; MENDONÇA, E. A. F. Absorção de água por sementes de *Crotalaria spectabilis* Roth determinada em diferentes temperaturas e disponibilidade hídrica. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v. 22, p. 206-215, 2000.
 14. COLL, J. B.; RODRIGO, G. N.; GARCIA, B. S.; TAMES, R. S. *Fisiologia Vegetal*. Madrid: Ediciones Pirámide, 2001. 566 p.