



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CATHERINE PINHEIRO DE ALMEIDA

**UNINDO FISILOGIA, BIOQUÍMICA E METABOLÔMICA PARA
DESVENDAR RESPOSTAS AOS ESTRESSES ABIÓTICOS DE SOJA
(*Glycine max* (L.) Merrill.) E MAMONA (*Ricinus communis* L.).**

Salvador

2023

CATHERINE PINHEIRO DE ALMEIDA

**UNINDO FISIOLOGIA, BIOQUÍMICA E METABOLÔMICA PARA
DESVENDAR RESPOSTAS AOS ESTRESSES ABIÓTICOS DE SOJA
(*Glycine max* (L.) Merrill.) E MAMONA (*Ricinus communis* L.).**

Dissertação apresentada ao programa de pós
graduação em Química, Instituto de Química,
Universidade Federal da Bahia, como requisito
para a obtenção do grau de Mestre em Química
Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro de
Jesus

Salvador


2023

TERMO DE APROVAÇÃO


CATHERINE PINHEIRO DE ALMEIDA

UNINDO FISILOGIA, BIOQUÍMICA E METABOLÔMICA PARA DESVENDAR RESPOSTAS AOS ESTRESSES ABIÓTICOS DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill.) E MAMONA (*Ricinus communis* L.).


Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre(a) em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 PAULO ROBERTO RIBEIRO DE JESUS
Data: 03/08/2023 10:50:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Jesus
Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular de Plantas, Wageningen University
(Holanda)
Universidade Federal da Bahia

Documento assinado digitalmente
 CALINE GOMES FERRAZ
Data: 02/08/2023 22:05:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Caline Gomes Ferraz
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Documento assinado digitalmente
 FRANCISCO JOSE LIMA ARAGAO
Data: 01/08/2023 12:15:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Francisco José Lima Aragão
Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade de Brasília (UnB)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Documento assinado digitalmente
 TIAGO VENANCIO
Data: 02/08/2023 15:15:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Tiago Venâncio
Doutorado em Físico-Química, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal de São Carlos

Salvador, 01 de agosto de 2023.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de
Ciências e Tecnologias Prof. Omar Catunda, SIBI - UFBA.

A447 Almeida, Catherine Pinheiro

Unindo fisiologia, bioquímica e metabólica para
desvendar respostas aos estresses abióticos de soja (*Glycine max*
(L.) Merrill.) e mamona (*Ricinus communis* L.)./Catherine
Pinheiro de Almeida. – Salvador, 2023.

199 f.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Jesus

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Caline Gomes Ferraz

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de química, 2023.

1. Bioquímica. 2. Fisiologia. 3. Soja. I. Jesus, Paulo Roberto
Ribeiro de. II. Ferraz, Caline Gomes. III. Universidade Federal
da Bahia. IV. Título.

CDU 577.1

Dedico esse trabalho ao meu irmão
Luan Matheus (*in memoriam*), que
nos deixou tão precocemente.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha mãe, por todo amor, dedicação, esforço e incentivo, que me fizeram chegar até aqui, sem ela nada disso seria possível.

Ao professor Paulo Ribeiro, por ser meu orientador desde a iniciação científica, a quem tenho profundo respeito e admiração, como docente e pesquisador. Obrigada por sempre exigir o melhor de mim.

Ao Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (LBBB) por viabilizar boa parte dessa pesquisa. Em especial ao Valdir, Maria Cecília, Diego, Emily, Carine, Isabela e aos professores Renato de Castro e Luzimar Gonzaga, por todo suporte prestado durante parte da etapa experimental deste projeto.

Ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (UFSCar e Laboratório de Bioquímica e Biologia molecular (USP), por proporcionar experiências enriquecedoras dentro de novos laboratórios e por viabilizar os experimentos de RMN e GC-MS.

As minhas amigas Bárbara, Cris e Ashley, por nossa rede de apoio e amor, obrigada por sempre acreditarem em mim e por todos momentos de genuína felicidade.

Aos meus amigos, Renan e Nathália, por todos os conselhos, incentivos e risadas compartilhadas.

À minha amiga Victória, por ser a pessoa mais compreensiva do mundo com minhas ausências por conta da vida acadêmica. Obrigada pelo apoio incondicional e pelos momentos que me fizeram apreciar mais a vida para além da universidade.

Ao meu amigo Luís Enrique, pelas inúmeras ajudas, por estar sempre disposto a me ouvir e entender. Obrigada por ter sido um ponto de refúgio em meio essa jornada por vezes caótica, sem você teria sido ainda mais difícil.

Agradeço aos meus colegas do Metabolomics Research Group, por todo apoio e ajuda sempre. Em especial a Rhaíssa, por ter sido minha parceira e amiga nessa jornada que foi extremamente difícil e desafiadora, obrigada por fazer dos nossos longos dias no laboratório mais leves. A Luíz por toda ajuda na reta final com os experimentos de RMN. A Mary, por todo acolhimento, conversas e momentos compartilhados.

RESUMO

UNINDO FISIOLOGIA, BIOQUÍMICA E METABOLÔMICA PARA DESVENDAR RESPOSTAS AOS ESTRESSES ABIÓTICOS DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill.) E MAMONA (*Ricinus communis* L.).

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das culturas mais importantes do mundo por conta da sua aplicação na agroindústria, indústria de combustíveis e alimentos. A soja é uma planta sensível ao estresse térmico, principalmente na fase reprodutiva, onde o aumento da temperatura causa danos que reduzem sua produção. Um dos objetivos centrais desse estudo foi avaliar o perfil metabólico de sementes e plântulas de soja em resposta a condição de estresse térmico via Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS). A germinação de sementes e o estabelecimento de plântulas de soja foram avaliados a 28/22°C (dia/noite) e a 36/24°C (dia/noite), os dados do perfil metabólico das amostras soja foram submetidos a análise estatística multivariada. O aumento da temperatura não afetou de forma significativa a germinação máxima das sementes. Nas amostras de sementes e plântulas de soja, foram identificados 21 metabólitos via RMN de ^1H e 16 via GC-MS, incluindo aminoácidos (11), ácidos graxos (4), ácidos orgânicos (13), carboidratos (4) e outros (5). A análise de perfil metabólico demonstrou diferenças no metaboloma comparando condição controle e de estresse, essas diferenças podem ser explicadas pela alteração nos níveis de aminoácidos e redução de intermediários do ciclo de Krebs e glicose. Frente ao estresse, sementes e plântulas de soja demonstraram uma regulação positiva do metabolismo energético, ativando importantes vias de catabolismo, como a β -oxidação de ácidos graxos e glicólise. A mamona (*Ricinus communis*) é uma oleaginosa cultivada predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo uma cultura que apresenta bons rendimentos em temperaturas elevadas e escassez de água. Devido a sua grande variabilidade genética e resistência a estresses abióticos, a mamona é uma promissora fonte de genes que podem ser usados no melhoramento genético de outras culturas. Portanto, os efeitos da superexpressão dos genes GDSL esterase/lipase de *R. communis* L. (RcGELP) em sementes de *Arabidopsis thaliana* frente a estresses abióticos foram investigados e o perfil metabólico de sementes *A. thaliana* superexpressando os genes RcGELP frente ao estresse térmico também foi avaliado via RMN de ^1H . Sementes transgênicas superexpressando os genes RcGELP e selvagens (col-0) foram germinadas a 22°C (controle) e a 34°C (estresse) e sob estresse hídrico simulado com manitol (0, 150, 200, 250 e 300 mM). As análises metabolômicas foram conduzidas por meio da análise estatística multivariada. Em condições controle as linhagens transgênicas e sementes selvagem germinaram quase 100%. A 34°C as sementes Col-0 apresentaram germinação máxima de 38%, enquanto que as sementes transgênicas apresentaram até 83% de germinação. Foram identificados 23 metabólitos via RMN de ^1H , incluindo aminoácidos (12), ácidos orgânicos (5) e carboidratos (2) e outros (4). A análise do perfil metabólico mostrou diferenças

entre o metabolôma das sementes transgênicas e selvagens frente ao estresse térmico. Nas sementes transgênicas houve uma mudança no metabolismo de carbono e nitrogênio, com o aumento de aminoácidos importantes, redução de metabólitos fonte de carbono e energia, como ácidos orgânicos e carboidratos. O que pode explicar a germinação aprimorada das sementes de *A. thaliana* superexpressando os genes RcGELP.

Palavras-chave: estresse abiótico; GDSL esterase/lipase e metabolômica.

ABSTRACT

COMBINING PHYSIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND METABOLOMICS TO UNRAVEL RESPONSES TO ABIOTIC STRESSES IN SOYBEAN (*Glycine max* (L.) Merrill.) AND CASTOR BEAN (*Ricinus communis* L.).

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is one of the most important crops in the world due to its application in agribusiness, fuel and food industries. Soybean is a plant sensitive to thermal stress, especially in the reproductive phase, where the increase in temperature causes damage that reduces its production. One of the central objectives of this study was to evaluate the metabolic profile of soybean seeds and seedlings in response to thermal stress conditions via ¹H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC-MS). Seed germination and establishment of soybean seedlings were evaluated at 28/22°C (day/night) and 36/24°C, data from the metabolic profile of soybean samples were submitted to multivariate statistical analysis. The increase in temperature did not significantly affect maximum seed germination. In samples of soybean seeds and seedlings, 21 metabolites were identified via ¹H NMR and 16 via GC-MS, including amino acids (11), fatty acids (4), organic acids (13), carbohydrates (4) and others (5). The metabolic profile analysis showed differences in the metabolome comparing control and stress condition, these differences can be explained by the change in amino acid levels and reduction of Krebs cycle intermediates and glucose. In the face of stress, soybean seeds and seedlings showed a positive regulation of energy metabolism, activating important catabolism pathways, such as β -oxidation of fatty acids and glycolysis. Castor bean (*Ricinus communis* L.) is an oleaginous plant cultivated predominantly in tropical and subtropical regions, being a crop that presents good yields in high temperatures and water scarcity. Due to its great genetic variability and resistance to abiotic stresses, castor bean is a promising source of genes that can be used in the genetic improvement of other crops. Therefore, the effects of overexpression of *R. communis* L. GDSL esterase/lipase genes (RcGELP) in *Arabidopsis thaliana* seeds against abiotic stress were investigated and the metabolic profile of *A. thaliana* seeds overexpressing RcGELP genes against heat stress was also investigated. was evaluated via ¹H NMR. Transgenic seeds overexpressing RcGELP and wild-type (col-0) genes were germinated at 22°C (control) and 34°C (stress) and under simulated water stress with mannitol (0, 150, 200, 250 and 300 mM). Metabolomic analyses were conducted using multivariate statistical analysis. Under control conditions, transgenic lines and wild-type seeds germinated almost 100%. At 34°C, the Col-0 seeds presented a maximum germination of 38%, while the transgenic seeds presented up to 83% of germination. 23 metabolites were identified via ¹H NMR, including amino acids (12), organic acids (5) and carbohydrates (2) and others (4). The analysis of the metabolic profile showed differences between the metabolome of transgenic and wild seeds in the face of thermal stress. In transgenic seeds, there was a change in carbon and nitrogen metabolism, with an increase in important amino acids, a reduction in carbon and energy source metabolites, such as organic acids and carbohydrates. Which may explain the improved germination of *A. thaliana* seeds overexpressing the RcGELP genes.

Key-words: abiotic stress, GDSL esterase/lipase e metabolomics

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Mecanismo de resposta da planta ao estresse hídrico.....	20
Figura 2. Curva de embebição de sementes.....	22
CAPÍTULO 1 – Avaliação metabólica multiplataforma da germinação de sementes de soja (<i>Glycine max (L.) Merrill</i>) sob ao estresse térmico.	
Figura 1. Variedade das sementes de Soja.....	31
Figura 2. Sementes germinadas em estágio de coletada.....	37
Figura 3. Plântulas no estágio de coletada.....	38
Figura 4. Esquema do processo de extração das amostras de Soja para análise via GC-MS.....	40
Figura 5. Esquema do processo de extração das amostras de Soja para análise via RMN.....	42
Figura 6a) Porcentagem de germinação máxima b) tempo médio de germinação das sementes de soja.....	44
Figura 7. Massa fresca de a) endosperma e b) raiz de sementes germinadas a 28/22°C e 36/24°C.....	44
Figura 8. Massa fresca de a) endosperma e b) raiz de plântulas a 28/22°C e 36/24°C.....	45
Figura 9. Espectros sobrepostos de RMN de ¹ H processados no software NMRProcFlow das amostras de soja. Cada cor representa uma amostra diferente.....	46
Figura 10. Ajuste da biblioteca de referência espectral a sinais no espectro experimental.....	47
Figura 11. Ampliações do espectro ¹ H do pool das amostras de soja a) isoleucina, valina, lactato, treonina, alanina, acetato, succinato, asparagina, gaba; b) malonato, colina, betaína, glicina, sarcosina e etileno glicol.....	48
Figura 12. Ampliações do espectro de ¹ H do pool das amostras de soja a) glucose, sacarose e fumarato b) histidina, formato e trigonelina.....	49
Figura 13. Estrutura química dos metabólitos encontrados nas amostras de soja. a) aminoácidos; b) carboidratos.....	50
Figura 14. Estrutura química dos metabólitos encontrados nas amostras de soja. a) ácidos orgânicos; b) vitamina, alcaloide e álcool.....	51
Figura 15. Curva de calibração de alcanos.....	53

Figura 16. Comparação entre os espectros de massas de uma substância desconhecida e uma substância presente na biblioteca NIST.....	54
Figura 17. Estrutura química dos metabólitos encontrados nas amostras de soja via GC-MS. a) ácidos orgânicos b) carboidratos.....	55
Figura 18. Estrutura química dos metabólitos encontrados nas amostras de soja via GC-MS. a) ácidos graxos b) aminoácido, vitamina e triálcool.....	55
Figura 19. Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) do perfil de metabólitos das amostras de sementes de soja a) dados do NmrProcflow b) dados do Chenomix.....	58
Figura 20. Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) do perfil de metabólitos das amostras de plântulas de soja a) dados do NmrProcflow b) dados do Chenomix.....	59
Figura 21a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) b) Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados nas amostras de sementes de soja.....	60
Figura 22. Mapa de calor resumindo as mudanças nos níveis relativos de metabólitos nas sementes de soja.....	61
Figura 23. Via de metilação da glicina para a síntese da betaína.....	62
Figura 24a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) b) Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados nas amostras de endosperma de sementes de soja.....	65
Figura 25a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) b) Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados nas amostras de raiz de sementes de soja.....	66
Figura 26. Via de degradação do GABA (<i>shunt</i> GABA).....	68
Figura 27. Representação esquemática do ciclo de Krebs e via GABA shunt.....	69
Figura 28a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) b) Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados nas amostras de plântulas de soja.....	70
Figura 29. Mapa de calor resumindo as mudanças nos níveis relativos de metabólitos nas plântulas de soja.....	72
Figura 30. estágios da respiração celular: da glicólise a produção de ATP.....	73
Figura 31a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) b) Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados nas amostras de endosperma de plântulas de soja.....	74

Figura 32a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) b) Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados nas amostras de raiz de plântulas de soja.....	75
Figura 33. Esquema simplificado do processo glicólise até o ciclo de Krebs...	78
Figura 34. Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) do conjunto de metabólitos identificados nas amostras de sementes de soja via GC-MS.....	80
Figura 35a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) b) Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados nas amostras de endosperma de sementes de soja via GC-MS.....	81
Figura 36a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) b) Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados nas amostras de raiz de sementes de soja via GC-MS.....	82
Figura 37. Conversão de lipídios em sacarose. a) lipólise de triacilglicerol; b) β-oxidação de ácidos graxos para produzir succinato; c) produção de malato; d) produção de sacarose.....	83
Figura 38. Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) do conjunto de metabólitos identificados nas amostras de plântulas de soja via GC-MS.....	85
Figura 39a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) b) Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados nas amostras de endosperma de plântulas de soja via GC-MS.....	86
Figura 40a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) b) Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados nas amostras de raiz de plântulas de soja via GC-MS.....	87
Figura 41. Assinatura metabólica de sementes e plântulas de soja submetidas ao estresse térmico.....	88

CAPÍTULO 2- Caracterização de genes GDSL esterase/lipase de *Ricinus communis* superexpressos em sementes de *Arabidopsis thaliana*

Figura 1. Variabilidade da folha e caule de <i>Ricinus communis</i>	103
Figura 2. Frutos de <i>Ricinus communis</i> com e sem espinhos.....	103
Figura 3. Variabilidade nas cores e formatos da semente de <i>Ricinus communis</i>	104
Figura 4a) germinação das sementes b) transferência para o solo c) e d) desenvolvimento das plantas e) plantas desenvolvidas em estágio de coleta das sementes.....	116

Figura 5. Esquema da germinação utilizando a placa de Petri e papel germitest.....	120
Figura 6. Esquema do processo de extração dos metabólitos primários e proteínas	121
Figura 7. Esquema do preparo das amostras para análises via RMN.....	123
Figura 8. Relações filogenéticas de GELPs em <i>Ricinus communis</i> e sequências de proteínas GELPs com funções conhecidas em outras plantas.....	130
Figura 9. Motifs conservados e estrutura dos genes RcGELPs. a) árvore filogenética e distribuição de motivos conservados de 96 proteínas RcGELP. Os seis motivos putativos são indicados em caixas de cores diferentes. b) Organização éxons/íntrons dos genes RcGELP.....	135
Figura 10. Representação gráfica de elementos cis reguladores associados aos genes RcGELP. Ácido abscísico (AA), auxina (AX), giberelina (GB), jasmonato de metila (MeJa), respostas de luminosidade (L), MYB, MYC, indução anaeróbica (AI), resposta de defesa ou estresse (DE), expressão induzida por água crise (ES), temperaturas baixas (TB), ácido salicílico (SA), expressão de meristema (EM) e expressão de zeína (EZ).....	138
Figura 11a) Porcentagem de germinação máxima b) tempo médio de germinação de sementes de <i>A. thaliana</i> que superexpressam o gene RcGELP em resposta ao estresse térmico.....	142
Figura 12. Germinação máxima de sementes de <i>A. thaliana</i> que superexpressam o gene RcGELP em resposta ao estresse hídrico simulado com manitol nas concentrações 150 e 200 mM.....	144
Figura 13. Germinação máxima de sementes de <i>A. thaliana</i> que superexpressam o gene RcGELP em resposta ao estresse hídrico simulado com manitol nas concentrações 250 e 300 mM.....	145
Figura 14. Tempo médio de germinação de sementes de <i>A. thaliana</i> que superexpressam o gene RcGELP em resposta ao estresse hídrico simulado com manitol. a) nas concentrações 150 e 200 mM. b) 250 e 300 mM.....	147
Figura 15. Curva de calibração para a quantificação de proteínas totais.....	150
Figura 16. Reação enzimática catalisada pela superóxido dismutase.....	152
Figura 17. Atividade da superóxido dismutase (SOD) em sementes de <i>A. thaliana</i> superexpressando o gene RcGELP em resposta ao estresse térmico.....	153

Figura 18. ampliações do espectro ^1H do pool das amostras de <i>A. thaliana</i> a) isoleucina, valina, lactato, treonina, alanina, acetato, metionina b) acetona, glutamato, succinato, dimetilamina, asparagina, GABA, colina e betaína.....	155
Figura 19. ampliações do espectro ^1H do pool das amostras de <i>A. thaliana</i> a) glicina e etileno glicol; b) Glicose e sacarose; c) Fumarato, histidina, tirosina e formato.....	156
Figura 20. Estrutura química dos aminoácidos encontrados nas amostras de sementes de <i>A. thaliana</i>	157
Figura 21. Estrutura química dos metabólitos encontrados nas amostras de soja. a) carboidratos; b) ácidos orgânicos; c) amina, vitamina, álcool, vitamina e cetona.....	158
Figura 22. Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) do conjunto de metabólitos identificados em sementes de <i>A. thaliana</i> transgênicas e selvagens.....	160
Figura 23. Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados em sementes de <i>A. thaliana</i> transgênicas e selvagens.....	161
Figura 24. Mapa de calor baseado no conjunto de metabólitos identificados em sementes de <i>A. thaliana</i> transgênicas e selvagens.....	160
Figura 25. Vias metabólicas demonstrando a relação entre os metabólitos.....	164
Figura 26. Reação de desaminação da alanina para produzir piruvato.....	165
Figura 27a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) b) Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados em sementes de <i>A. thaliana</i> transgênicas superexpressando o gene RcGELP e selvagens (col-0) frente ao estresse térmico.....	166
Figura 28. Representação esquemática da assinatura metabólica de sementes de <i>A. thaliana</i> superexpressando os genes RcGELP durante a germinação sob estresse térmico.....	168

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO 1 – Avaliação metabolômica multiplataforma da germinação de sementes de *Glycine max* (L.) Merrill sob ao estresse térmico

Tabela 1. Códigos atribuídos as amostras de soja.

Tabela 2. Deslocamento químico, multiplicidade e valores de constante de acoplamento (J) dos metabólitos encontrados nas amostras de Soja.

Tabela 3. Tempo de retenção, índices de retenção e coeficiente de variação dos metabólitos identificados nas amostras de soja via GC-MS.

CAPÍTULO 2- Caracterização de genes GDSL esterase/lipase de *Ricinus communis* superexpressos em sementes de *Arabidopsis thaliana*

Tabela 1. Membros da família do gene GDSL esterase/lipase em *R. communis*.

Tabela 2. Sequências de aminoácidos de seis motivos putativos encontrados em 96 proteínas RcGELP.

Tabela 3. Quantificação de proteínas totais das amostras de sementes de *A. thaliana* superexpressando o gene RcGELP.

Tabela 4. Deslocamento químico, multiplicidade e valores de constante de acoplamento (J) dos metabólitos encontrados nas amostras de sementes de *A. thaliana* superexpressando o gene RcGELP em condições normais e de estresse.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
CONTEXTUALIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	25
REFERÊNCIAS.....	26

CAPÍTULO 1 - Avaliação metabolômica multiplataforma da germinação de sementes e plântulas de *Glycine max* (L.) Merrill sob estresse térmico.

1. INTRODUÇÃO.....	30
2. MATERIAIS E MÉTODOS	36
2.1 Material vegetal.....	36
2.2 Germinação das sementes de <i>Glycine max</i> L.....	36
2.3 Estabelecimento de plântulas.....	37
2.4 Análise metabolômica via Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS).....	39
2.5 Análise metabolômica via Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H (RMN).....	41
2.6 Análise estatística multivariada	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.1 Germinação das sementes de soja e massa fresca	43
3.2 Quantificação dos metabólitos nas amostras de soja via RMN de ¹ H.....	46
3.3 Quantificação dos metabólitos nas amostras de soja via GC-MS.....	53
3.4 Características metabólicas da resposta de soja ao estresse térmico via RMN de ¹ H.....	57
3.4.1 Comparação entre os dados analisados nos softwares NmrProcflow e Chenomix	57
3.4.2 Perfil metabólico das sementes de soja em resposta ao estresse térmico	59
3.4.3 Perfil metabólico das plântulas de soja em resposta ao estresse térmico.....	70
3.5 Características metabólicas da resposta de soja ao estresse térmico via GC-MS.....	79
3.5.1 Perfil metabólico das sementes de soja em resposta ao estresse térmico analisado via GC-MS.....	79

3.5.2 Perfil metabólico das plântulas de soja em resposta ao estresse térmico analisado via GC-MS.....	84
4. CONCLUSÃO	89
5. REFERÊNCIAS	90
APÊNDICE	99

CAPÍTULO 2 - Caracterização de genes GDSL esterase/lipase de *Ricinus communis* superexpressos em sementes de *Arabidopsis thaliana*.

1. INTRODUÇÃO.....	102
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	115
2.1 material vegetal.....	115
2.2 Análises de bioinformática.....	116
2.2.1 Recuperação das sequências de GDSL esterase/lipase no genoma de <i>R. Communis</i>	116
2.2.2 Alinhamentos e análise filogenética.....	118
2.2.3 Identificação de motifs conservados e análise de estrutura gênica	117
2.2.4 Localização subcelular e propriedades físico químicas.....	118
2.2.5 Análise de elementos cis reguladores e análise de duplicação em tandem.....	119
2.3 Análises fisiológicas, bioquímicas e metabolômica.....	119
2.3.1 Testes de germinação.....	119
2.3.2 Extração dos metabólitos primários.....	120
2.3.3 Quantificação de proteínas totais.....	121
2.3.4 Análise da atividade de superóxido dismutase (SOD).....	121
2.3.5 Análise metabolômica via ressonância magnética nuclear de ¹ H (RMN).....	122
2.3.6 Análise estatística multivariada.....	123
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	124
3.1 Análises de bioinformática.....	124
3.1.1 Identificação dos genes da família GDSL esterase/lipase em <i>Ricinus communis</i>	124

3.1.2	Análise filogenética e predição das localizações celulares.....	129
3.1.3	Identificação de motivos conservados das proteínas RcGELP e análise da estrutura gênica.....	133
3.1.4	Identificação de elementos de ação cis em regiões promotoras de RcGELPs.....	137
3.2	Germinação de sementes de <i>A. thaliana</i> que superexpressam os genes RcGELPs em resposta a estresses abióticos.....	141
3.2.1	Estresse térmico.....	141
3.2.2	Estresse hídrico simulado por manitol.....	144
3.3	Quantificação de proteínas totais.....	149
3.4	Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1).....	151
3.5	Quantificação dos metabólitos nas amostras de <i>A. thaliana</i> superexpressando o gene RcGELP.....	154
3.6	Características metabólicas da resposta de sementes de <i>Arabidopsis thaliana</i> superexpressando o gene RcGELP frente ao estresse térmico....	160
4.	CONCLUSÃO.....	168
5.	REFERÊNCIAS.....	170
	APÊNDICE.....	181

INTRODUÇÃO GERAL

Anualmente as plantas sofrem diversos danos causados pelas condições climáticas, como a restrição hídrica e as altas temperaturas. O estresse térmico é definido como o aumento da temperatura além de um nível limite, a temperatura ideal máxima para o crescimento de cada cultura, por um período de tempo suficiente para causar danos ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Geralmente as temperaturas que são consideradas como estresse térmico são aquelas acrescidas de cerca de 10 °C da temperatura ideal (WAHID et al, 2007; LIPIEC et al, 2013). As temperaturas extremas são consideradas um dos principais estresses abióticos que ameaçam diretamente a sobrevivência de organismos vivos, incluindo as plantas (RUCHEL et al, 2020; CHEBROLU et al, 2016). Em continentes como África e Ásia, a elevação da temperatura em 3-4 °C pode diminuir a produtividade das culturas em até 35 % (IMRAN et al, 2021).

As altas temperaturas comumente promovem alterações fisiológicas, morfológicas e bioquímicas, podendo danificar as membranas, influenciar na relação água e nutrientes, causar danos às proteínas, o que afeta todos os aspectos do desenvolvimento das plantas (RUCHEL et al, 2020; NAZ et al, 2018). Imediatamente após a exposição a altas temperaturas ocorrem mudanças em nível molecular, onde o dano causado de forma mais extensa é o aumento da fluidez dos lipídios da membrana, inativação de enzimas e defeitos na integridade da membrana e a desnaturação e degradação de proteína (KIM; YOO; CHO, 2018; LIPIEC et al, 2013).

Além de perder sua atividade biológica, as proteínas desnaturadas agem como moléculas tóxicas. Em temperaturas muito altas, podem ocorrer lesões celulares muito graves induzindo a morte celular, devido a um colapso da organização celular. Esse estresse também causa alterações na expressão de genes envolvidos na proteção contra altas temperaturas e no acúmulo de transcritos, estes genes são responsáveis pela expressão de moléculas osmoprotetoras e enzimas desintoxicantes. Sendo assim, as plantas induzem a produção de proteínas chaperonas, promovendo a dobragem adequada e

impedindo a agregação de proteínas desnaturadas (WAHID et al, 2007; KIM, YOO; CHO, 2018; SHARMA et al, 2019; TANG et al, 2016).

O estresse térmico também pode induzir a produção de metabólitos secundários da classe dos fenólicos, como flavonóides, lignanas, antocianinas e fenilpropanóides. Esses metabólitos desempenham várias funções na tolerância a estresses abióticos, os carotenóides são conhecidos por proteger as estruturas celulares em diversas espécies de plantas contra uma variedade de estresses abióticos (LIPIEC et al, 2013; WAHID et al, 2007).

Além do estresse causado por temperaturas elevadas, as plantas frequentemente também lidam com a restrição hídrica. Devido a suas características climáticas, em regiões áridas e semiáridas as plantas são impostas a essas duas condições adversas de forma concomitante. O estresse hídrico, assim como o térmico, causa alterações nos processos bioquímicos e fisiológicos das plantas, trazendo mudanças no equilíbrio redox, acelera a produção de espécies reativas de oxigênio. As mais comuns são oxigênio singlete (1O_2), radical superóxido ($\bullet O_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\bullet OH$), essas espécies são responsáveis pelo estresse oxidativo (HASANUZZAMAN et al, 2013; LIPIEC et al, 2013; KRASENSKY et al, 2012).

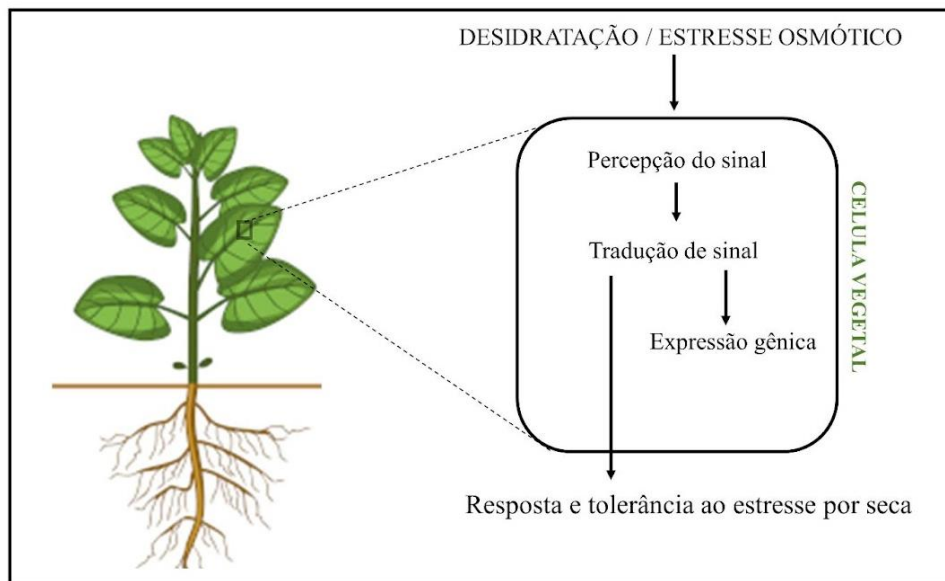
A produção de espécies reativas de oxigênio é importante para que a planta consiga manter sua homeostase, isto é, manter o meio interno em um equilíbrio quase constante, independentemente das alterações que ocorram no ambiente externo, de forma que seu funcionamento não seja comprometido. Entretanto, o desequilíbrio entre a eliminação e geração de espécies reativas de oxigênio, aumentando a propagação das mesmas, acarreta na inativação de enzimas e danos em organelas celulares e em macromoléculas vitais, a exemplo dos ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídios (WAHID et al, 2007). Além dos danos às organelas celulares e proteínas, a produção exacerbada dessas espécies também pode interferir nas vias de sinalização promovida por elas, bem como na fixação de CO_2 em cloroplastos, limitando-a. Em plantas verdes, as espécies reativas de oxigênio podem perturbar a reação molecular da via fotossintética, pois as mesmas reagem com a clorofila durante a fotossíntese, formando o seu estado tripleto, que rapidamente gera o oxigênio singlete (1O_2),

que causa danos aos complexos fotossintéticos (SHARMA et al, 2019; WAHID et al, 2007).

As plantas são submetidas ao estresse hídrico quando a taxa de transpiração se torna muito alta ou o suprimento de água para as raízes se torna difícil. Portanto, a principal defesa da planta contra a desidratação e a perda de água é reduzir a perda de água transpiracional. O hormônio vegetal ácido abscísico (ABA) desempenha um importante papel nas respostas ao déficit hídrico, ele é sintetizado e transportado através do xilema, acumulando-se nas folhas, efetuando o fechamento dos poros estomáticos, que reduz drasticamente a perda de água transpiracional (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1999).

O ABA desempenha um importante papel não só por meio das mudanças morfológicas na planta, ao prevenir a perda de água, mas também por meio de alterações nos mecanismos moleculares e bioquímicos, que incluem o acúmulo de metabólitos específicos e alterações na expressão gênica. A maioria dos genes estudados foram induzidos pelo ABA, o déficit hídrico desencadeia a sua produção, que conseqüentemente, induz vários genes (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1999). Esse processo acontece por meio das cascatas de transdução de sinais, que consistem em mecanismos de detecção do estresse, após isso ocorre a modulação dos sinais de estresse para sinais celulares, etapa na qual mensageiros traduzem os sinais celulares para o núcleo, depois há a sinalização através do ABA e por fim o controle transcricional de genes responsivos ao estresse que permitem a tolerância ao estresse hídrico (figura 1).

Figura 1. Mecanismo de resposta da planta ao estresse hídrico.



Fonte: adaptado de SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1999.

Os genes que são induzidos durante o estresse hídrico atuam protegendo as células contra a falta de água através da produção de proteínas que atuam na tolerância ao estresse, enzimas importantes para a biossíntese de moléculas osmoprotetoras, como a prolina, açúcares, polióis e oligossacarídeos, que se acumulam no citosol, e várias enzimas de desintoxicação, que atuam na eliminação do excesso das espécies reativas de oxigênio.

Germinação de sementes

A germinação é um processo biológico que ocorre naturalmente, onde as sementes saem do seu estado de latência e há a retomada das atividades metabólicas onde processos sequenciais e sincronizados acontecem de tal forma que as atividades anabólicas e catabólicas ocorrem simultaneamente, incluindo a síntese de proteínas, respiração e mobilização de reservas após a

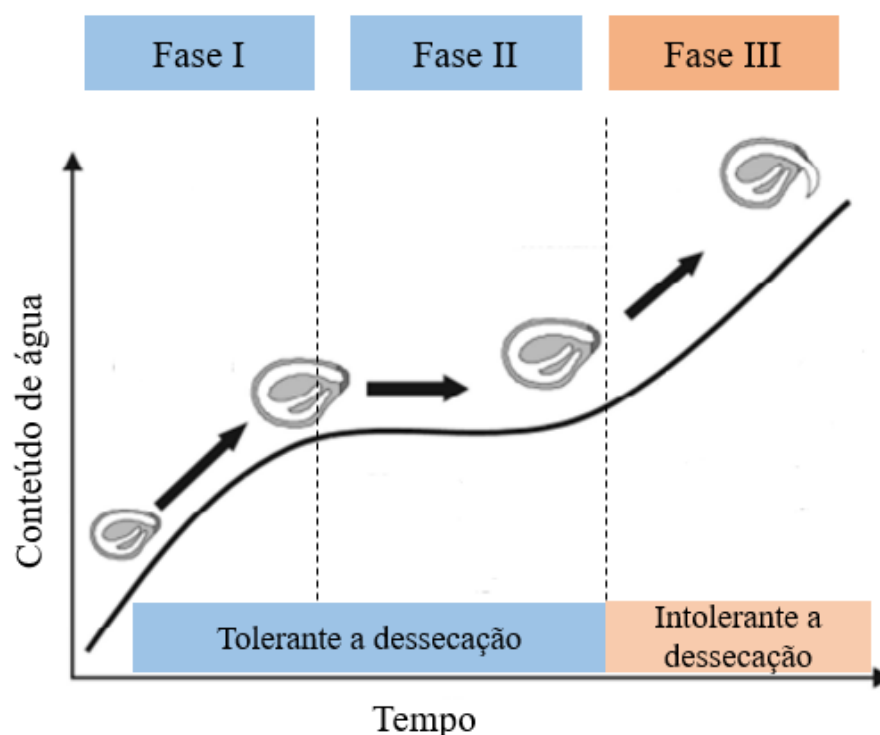
absorção de água (DE CASTRO; BRADFORD; HILHORST, 2004; PINHO, CARVALHO e DELACHIAVE, 2004).

Sementes que estão em estágio de latência, isto é, em repouso metabólico, precisam de condições adequadas para que sua germinação ocorra, como temperatura ambiente adequada. A temperatura afeta de forma significativa o processo germinativo, sendo que sua principal influência recai na absorção de água pela semente e conseqüentemente nas reações bioquímicas que acontecem durante a germinação (MARCOS FILHO, 2005). Todas as sementes germinam dentro de um limite de temperatura, sendo a ideal aquela na qual ocorre a maior porcentagem de germinação em um menor tempo. A temperatura ótima para a germinação de variadas espécies está na faixa de 20°C a 30°C (BORGES; RENA, 1993). O desenvolvimento de estruturas iniciais da plântula, como a raiz primária, possui papel primordial para o estabelecimento da plântula no ambiente. Temperaturas fora do intervalo ótimo afetam diretamente essa estrutura, diminuindo sua capacidade de se desenvolver de forma normal (LARCHER, 2003). Também é necessário o fornecimento de água e oxigênio para o desencadeamento dos processos metabólicos, além de luminosidade nos casos em que a germinação é a promovida pela presença de luz (SANGRONIS; MACHADO, 2007; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; VILAS BOAS; BARCELOS; LIMA, 2002).

Em termos de nutrientes, a germinação é a fase mais completa em todo desenvolvimento vegetal. Nessa etapa ocorrem inúmeras mudanças na composição do grão, principalmente no metabolismo de reserva das sementes, que é composto majoritariamente de carboidratos, proteínas e lipídeos (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Estas substâncias são mobilizadas durante a germinação em um processo pré digestivo, onde as proteínas são decompostas em aminoácidos, os carboidratos complexos em açúcares simples e as gorduras em ácidos graxos. No decorrer do desenvolvimento da plântula os produtos de degradação são utilizados para diversas finalidades, incluindo a melhoria da qualidade nutricional, por meio da prevenção da oxidação lipídica, geração de energia, redução dos fatores antinutricionais e produção de matéria prima para a construção de novas células e tecidos (ZHU et al, 2005; MAYER; POLJAKOFF-MAYBER, 1975).

A germinação é um processo composto por três fases (figura 2): embebição (fase I), indução do crescimento (fase II), onde acontece a retomada das atividades metabólicas e crescimento do embrião (fase III), culminando na protrusão radicular. Na fase I, ocorre a absorção de água pela semente, este fenômeno é essencialmente físico-químico e pode ser completado no intervalo de algumas horas. A rápida entrada de água na semente reidrata os tecidos, repara o sistema de membranas e aumenta a respiração celular (OLIVEIRA; BOSCO, 2013). Este movimento de água acontece de acordo com um gradiente de potencial hídrico decrescente de forma espontânea, sendo qualitativamente o mesmo em sementes dormentes ou não viáveis (VILLELA; DONI; SEQUEIRA, 1991; OLIVEIRA; BOSCO, 2013; BEWLEY; BLACK, 1994).

Figura 2. Curva de embebição de sementes



Fonte: Adaptado DE CASTRO; BRADFORD; HILHORST, 2004

Na fase II ocorre a ativação do metabolismo bioquímico, onde acontece a intensa digestão dos metabólitos de reserva que são convertidos em compostos

mais simples para serem usados no desenvolvimento do embrião (OLIVEIRA; BOSCO, 2013). Nesta fase, a absorção se mantém constante e acontece de forma lenta, de oito a dez vezes menos intensa que na fase anterior, pois os tecidos estão mais hidratados, diminuindo o gradiente de absorção de água (ALBUQUERQUE et al, 2000). Nesta etapa também ocorrem a síntese de enzimas, síntese e duplicação de DNA e o alongamento das células da radícula, além disso, membranas e organelas tomam-se funcionais (CUNHA, 2014).

Na fase III acontece o crescimento visível do eixo embrionário com o alongamento da raiz primária e o rompimento do tegumento. A absorção de água ocorre em sementes não dormentes e viáveis. Nesse estágio as novas células em formação demandam uma maior quantidade de água, portanto ocorre absorção de água de forma rápida e em grande quantidade (OLIVEIRA; BOSCO, 2013; PINNHO, CARVALHO; DELACHIAVE, 2004). Na terceira fase não é possível retroceder fisiologicamente, pois a semente já está comprometida com a germinação e o desenvolvimento da plântula, que é um dos estágios mais delicados em todo ciclo de vida da planta (DE CASTRO; BRADFORD; HILHORST, 2004).

A quantidade de água absorvida pela semente e a velocidade que acontece cada fase são influenciadas por alguns fatores, incluindo as diferenças entre as cultivares, tamanho da semente, composição química, permeabilidade do tegumento, teor inicial de água, potencial osmótico da solução que umidade o substrato e temperatura (ZUCHI et al, 2012; PINHO, CARVALHO; DELACHIAVE, 2004; VILLELA; DONI; SEQUEIRA, 1991). Após a germinação da semente, que tem duração média de dois a três dias, o embrião começa a transformar as reservas nutritivas para serem assimilada pela nova planta. Entre cinco e sete dias a semente já se tornou um broto, apresentando raiz, clorofila e haste (MARCOS FILHO, 2005).

O estresse hídrico prolongado reduz o tamanho e viabilidade das sementes e tanto o estresse térmico quanto o hídrico afetam na uniformidade e na velocidade da germinação, podendo retardar ou inibir totalmente o processo, limitando o crescimento e a produtividade de diversas culturas (MEENA et al, 2017; VASCONCELOS et al, 2017). Estresses abióticos são uma grande

ameaça à produção agrícola em todo o mundo. Com o desenvolvimento global, as emissões de gases por conta das atividades humanas estão aumentando exponencialmente a concentração de gases já existentes no efeito estufa, em particular CO₂ e metano. Diferentes organizações globais apontam que por conta do crescimento na emissão de gases, a temperatura ambiente mundial também aumentará. Um relatório do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), apontou que a temperatura global aumentará em média 0,3 °C a cada década, levando a valores de temperatura aproximadamente de 1 a 3° C acima da atual nos anos de 2025 e 2100, acentuando ainda mais o aquecimento global (WAHID et al, 2007).

Portanto, torna-se extremamente importante a investigação dos processos moleculares e fisiológicos subjacentes a esses estresses ambientais, para possibilitar o desenvolvimento estratégico de cultivares mais resistentes a condições ambientais adversas, melhorando o manejo da produção agrícola (MEENA et al, 2017; VASCONCELOS et al, 2017; HASANUZZAMAN et al, 2013, SHARMA et al, 2019).

Estratégias como estas são ainda mais importantes quando se trata de regiões áridas e semiáridas no mundo, como boa parte do nordeste brasileiro, onde as plantas são expostas a altas temperaturas e também a falta ou o uso restrito de água, reduzindo muito o desenvolvimento e a produtividade de alguns cultivares e até impossibilitando o plantio de outros, trazendo prejuízos não só a economia local, mas de todo o Brasil.

Contextualização da dissertação

O estudo apresentado nessa dissertação buscou explorar as respostas fisiológicas, bioquímicas e metabólicas da cultura *Glycine max* (L.) Merrill e da planta modelo *Arabidopsis thaliana* frente a estresses abióticos. A pesquisa foi dividida de forma lógica em dois capítulos. No capítulo 1 foi feita uma análise abrangente do comportamento de sementes e plântulas de soja germinadas em

altas temperaturas, utilizando uma abordagem de perfil metabólico multiplataforma (RMN de ^1H e GC-MS) e análise estatística multivariada.

No capítulo 2 foi realizada uma avaliação fisiológica de sementes de *A. thaliana* que superexpressam o gene GDSL esterase/lipase de *Ricinus communis* (RcGELP) frente aos estresses térmicos e hídrico. O gene RcGELP foi caracterizado por meio de ferramentas da bioinformática. Das sementes transgênicas sob estresse térmico, foram analisadas a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e a resposta metabólica via RMN de ^1H .

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M. C. F.; RODRIGUES, T. de JD; MENDONÇA, ELIZABETH AF. Absorção de água por sementes de *Crotalaria spectabilis* Roth determinada em diferentes temperaturas e disponibilidade hídrica. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 1, p. 206-215, 2000.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. Second Edition. Plenum Press, New York, 1994.

BORGES, EE de L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. **Sementes florestais tropicais**, p. 83-136, 1993.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 588p., 2000.

CUNHA, Adriano Farina da. Análise do perfil de compostos fenólicos e da atividade antioxidante em sementes de trigo *Triticum eastivum* L. e de cevada *Hordeum vulgare* em diferentes estágios de germinação. 2014.

CHEBROLU, Kranthi K. et al. Impact of heat stress during seed development on soybean seed metabolome. **Metabolomics**, v. 12, n. 2, p. 1-14, 2016.

DE CASTRO, Renato Delmondez; BRADFORD, Kent J.; HILHORST, Henk WM. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. **Germinação: Do básico ao aplicado (AG Ferreira & F. Borghetti, eds.)**. Artmed, Porto Alegre, p. 51-68, 2004.

HASANUZZAMAN, Mirza et al. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 5, p. 9643-9684, 2013.

IMRAN, Muhammad et al. Melatonin ameliorates thermotolerance in soybean seedling through balancing redox homeostasis and modulating antioxidant defense, phytohormones and polyamines biosynthesis. **Molecules**, v. 26, n. 17, p. 5116, 2021.

KIM, Geun-Don; YOO, Sang-Dong; CHO, Young-Hee. STABILIZED1 as a heat stress-specific splicing factor in *Arabidopsis thaliana*. **Plant signaling & behavior**, v. 13, n. 2, p. e1432955, 2018

KRASENSKY, Julia; JONAK, Claudia. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 4, p. 1593-1608, 2012.

LARCHER, Walter. **Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups**. Springer Science & Business Media, 2003.

LIPIEC, Jerzy et al. Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: a review. **International Agrophysics**, v. 27, n. 4, p. 463-477, 2013.

MARCOS FILHO, J. Deterioração de sementes. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: FEALQ**, v. 12, p. 291-352, 2005.

MAYER, Alfred Max; POLJAKOFF-MAYBER, Alexandra. **The germination of seeds: pergamon international library of science, technology, engineering and social studies**. Elsevier, 1982

MEENA, Kamlesh K. et al. Abiotic stress responses and microbe-mediated mitigation in plants: the omics strategies. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 172, 2017.

NAZ, N. et al. Influence of heat stress on growth and physiological activities of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Phyton**, v. 87, p. 225, 2018.

OLIVEIRA, Alexandre Bosco de; BOSCO, Maria Regilia de Oliveira. Biometria, determinação da curva de absorção de água em sementes e emergência inicial de plântulas de *Copernicia hospita* Martius. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 8, n. 1, p. 66-74, 2013.

PINHO, Sheila Zambello de; CARVALHO, Lídia Raquel de; DELACHIAVE, Maria Elena Aparecida. Limit between stages I and II of a seed imbibition curve. **Scientia Agricola**, v. 61, p. 17-20, 2004.

RUCHEL, Queli et al. Effect of high temperature and recovery from stress on crop–weed interaction. **Bragantia**, v. 79, p. 582-591, 2020.

SANGRONIS, E.; MACHADO, C. J. Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 116-120, 2007.

SHARMA, Anket et al. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 2452, 2019.

SHINOZAKI, Kazuo; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko. **Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants**. Austin, TX: RG Landes Company, 1999.

TANG, Ting et al. Sequence analysis of the Hsp70 family in moss and evaluation of their functions in abiotic stress responses. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016.

VASCONCELOS, Paulo de Carvalho Teixeira et al. New insights into the mechanism underlying *Ricinus communis* L. tolerance to drought stress during germination. **Industrial Crops and Products**, v. 103, p. 99-106, 2017.

VILAS BOAS, E. V. B.; BARCELOS, M. F. P.; LIMA, M. A. C. Tempo de germinação e características físicas, químicas e sensoriais dos brotos de soja e de milho nas formas isoladas e combinadas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 1, p. 148-156, 2002.

VILLELA, F. A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E. L. Table of osmotic potential as a function of polyethylene glycol 6000 concentration and temperature. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira (Brazil)**, 1991.

WAHID, Abdul et al. Heat tolerance in plants: an overview. **Environmental and experimental botany**, v. 61, n. 3, p. 199-223, 2007.

ZHU, Danhua et al. Isoflavone contents in germinated soybean seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 60, n. 3, p. 147-151, 2005.

CAPÍTULO 1

Avaliação metabolômica multiplataforma da germinação de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) sob ao estresse térmico.

1. INTRODUÇÃO

A *Glycine max* (L). Merrill (soja) é uma planta herbácea de crescimento anual pertencente à família Fabaceae, também conhecida como feijão chinês e feijão soja (RUCHEL et al, 2020). A soja tem sua origem no continente asiático, mais precisamente na China, sendo uma das culturas mais antigas, cultivada há pelo menos cinco mil anos (ZISKA, 2013). No Brasil o desenvolvimento da soja teve início em 1882 na Bahia, sendo que o país é atualmente o segundo maior produtor do grão no mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (CONAB, 2022.; PAIVA et al, 2006). Na safra 2019/2020 foram cultivados cerca de 36 milhões de hectares de soja, representando 60% de toda a área onde se cultiva diferentes culturas no país (CONAB, 2020). O plantio da leguminosa melhora a fertilidade do solo por meio da fixação de nitrogênio, uma vez que estima-se que a soja pode atender de 50 a 60% da sua demanda de nitrogênio através da fixação biológica (SALBAGIOTTI et al, 2008)

As sementes da soja apresentam características variáveis, podendo ser lisas, ovais, elípticas ou globulosas, e podem ser encontradas nas cores amarela pálido, verde ou preta, com seu hilo variando entre as cores preto, marrom ou amarelo palha (Figura 1). De acordo com as suas características, a semente da soja pode se classificar em dois grupos: soja tipo grão, utilizada para atender a indústria do óleo e do farelo, e a tipo alimento, que apresenta sabor mais agradável para consumo humano (YOKOMIZO, DUARTE e VELLO, 2005).

Figura 1. Variedade das sementes de soja



Fonte: DELLAGOSTIN et al, 2011 e disponível em < <https://www.embrapa.br/soja/>>

A soja é uma das culturas mais importantes do mundo por conta da sua aplicação na indústria. Seu grão é bastante versátil sendo matéria prima de produtos na indústria de combustível, química, alimentos e na agroindústria (RODRIGUES et al, 2021; CANTELLI, 2016; SILVA et al, 2006; VILLALVA, 2008). O consumo de soja na dieta humana tem aumentado ao longo dos anos por ser uma rica fonte de proteínas, gorduras e diversos minerais e vitaminas, proporcionando benefícios a saúde (IMARAN et al, 2021; LI et al, 2020; HERTLE et al, 2013; HARTMAN, WEST e HERMAN). Na agroindústria é a principal matéria prima para ração animal e seu óleo é utilizado como matéria prima para a produção de biodiesel (PESTANA-CALSA et al, 2012).

A soja apresenta uma rica composição química, sendo considerada um alimento quase completo, é composta por cerca de 40% de proteínas, 35 % de carboidratos, 20% de lipídeos, níveis significativos de zinco, magnésio, fosforo, ferro e vitaminas do complexo B (NAOE et al, 2021; NAHAR; HASANUZZAMAN e FUJITA, 2016; MORAES et al, 2006). Apresenta teores de aminoácidos essenciais, incluindo a treonina, metionina, cisteína, triptofano, leucina, lisina, fenilalanina e não essenciais, como a tirosina, arginina, ácido aspártico e o ácido

glutâmico (MANDARINO, 2010; TONIOLO; MOSCA, 1991). A cultura possui um alto valor nutricional, 100 gramas da semente de soja apresentam 446 Kcal, 30,2 g de carboidrato, 36,5 g de proteína, 19,9 g de gordura, 9,3 g de fibra, 15,7 mg de ferro e 377 mg de cálcio (KHEDAR et al, 2008; NAHAR; HASANUZZAMAN e FUJITA, 2016).

Devido as suas propriedades e valor nutricional na indústria alimentícia, a soja e seus derivados vêm sendo extensamente estudados. As sementes de soja contêm metabólitos derivados do metabolismo secundário, incluindo saponinas, fosfolipídios, isoflavononas e flavonoides, que são benéficos a saúde. Estudos indicam que as isoflavononas presentes na soja apresentam efeito antioxidante, podem reduzir os riscos de alguns tipos de câncer, além de possuírem efeitos positivos contra doenças cardiovasculares, cerebrovascular, osteoporose e diabetes (LUI 2004; CIABOTTI et al, 2006). Os flavonóides possuem diversas funções, como, por exemplo, defesa contra fitopatógenos, atividade antioxidante e proteção contra a radiação UV (CHIN, BEHM e MATHESIUS, 2018; GRAHAM, 1998).

Efeito do estresse térmico nas cultivares de soja

As plantas de soja são altamente sensíveis ao estresse térmico, principalmente na fase reprodutiva que é considerada uma das fases mais sensíveis do crescimento (NAHAR; HASANUZZAMAN e FUJITA, 2016; ZHENG et al, 2002). O estresse térmico diminuiu a eficiência fotoquímica em 5,8%, a taxa fotossintética (12,7%) e os níveis de sacarose nas plantas de soja (DJANAGUIRAMAN e PRASAD, 2010). Também houve uma diminuição na atividade das enzimas superóxido dismutase (13,3%), catalase (44,6%) e peroxidase (42,9%) e um aumento da atividade do radical superóxido e teor de peróxido de hidrogênio quando comparado a condição controle. As temperaturas de 38/28 °C (dia/noite) resultaram em dano oxidativo a soja, aumentando o vazamento de eletrólitos da membrana plasmática e diminuindo a capacidade da mesma reter solutos e água (DJANAGUIRAMAN e PRASAD, 2010).

A temperatura é um fator ambiental de considerável influência no desenvolvimento e crescimento das plantas, principalmente no desenvolvimento das sementes, controlando seu vigor, composição e rendimento (REN, BILYEU

e BEUSELINCK, 2009). Altas temperaturas durante a maturação das sementes podem diminuir seu peso, vigor, a taxa de germinação e a taxa de crescimento de plântulas. Sementes de soja colhidas de plantas expostas a altas temperaturas desde a sua germinação tiveram seu peso reduzido, acarretando na redução da taxa de germinação, de forma que o peso do eixo das mudas das plantas foi reduzido em 11%. Os resultados sugeriram que o estresse térmico abreviou a duração do período reprodutivo, resultando na produção de sementes mais leves e com vigor reduzido (DORNBOS e MULLEN, 1991). A exposição de plantas de soja a períodos crescentes de alta temperatura intensifica a redução no vigor das sementes, aumentando a produção de sementes, por essas plantas, com menor qualidade física (KEIGLEY e MULLEN, 1986; EGLI et al 2005).

Curtos períodos de estresse térmico também podem trazer efeitos deletérios às plantas. Ondas de calor impostas à soja utilizando aquecimento por infravermelho durante três dias aumentaram o estresse oxidativo, reduziram a fotossíntese e resultaram em perdas para a produção de soja, com a redução em 10% no rendimento. Foi sugerido que grande parte da redução do rendimento foi consequência dos efeitos das altas temperaturas diretamente nos processos reprodutivos iniciais (SIBEBERS et al, 2015).

A concentração de óleo em sementes de algumas cultivares de soja foi positivamente correlacionada com condições de estresse térmico. As temperaturas altas durante o enchimento de sementes associado com o plantio precoce foram fortemente correlacionadas com o aumento do teor de óleo nas sementes produzidas (KANE et al, 1997). Sementes de um genótipo sensível ao calor também apresentaram concentração elevada de óleo a 36°C (CHEBROLU et al, 2016). No entanto, o estudo de Gibson e Mullen (1996) indicou que a concentração de óleo em sementes de soja aumentou a medida que a temperatura média diária aumentou de 16 °C para 25 °C e diminuiu na medida que a temperatura aumentou de 25°C para 31°C, sugerindo que existe uma temperatura crítica para a concentração máxima de óleo, bem como para a de proteínas (GIBSON e MULLEN, 1996). Além disso, foi demonstrado que os níveis dos ácidos oleico e palmítico foram associados positivamente com o aumento da temperatura, enquanto os ácidos esteárico, linoleico e linolênico tiveram seus níveis diminuídos (KANE et al, 1997; GIBSON e MULLEN, 1996).

Os perfis metabólicos de sementes de soja de genótipos sensíveis e tolerantes ao calor produzidas sob altas temperaturas foram investigados. Um total de 275 metabólitos foram identificados e quantificados, incluindo aminoácidos ou derivados de aminoácidos, lipídeos, carboidratos, peptídeos e hormônios. Também foram identificados compostos antioxidantes, como flavonoides, fenilpropanóides e precursores de ascorbato, tais compostos foram encontrados em maior concentração nas sementes que apresentam o genótipo tolerante ao calor, sugerindo que a maior abundância de moléculas antioxidantes pode ser, em parte, responsável pela maior tolerância ao estresse térmico durante o desenvolvimento das sementes (CHEBROLU et al, 2016).

Metabólitos secundários como tocoferóis e isoflavononas são importantes moléculas antioxidante com o potencial de prevenção de doenças crônicas, incluindo doenças renais e pulmonares (HANSON et al, 2016). Um estudo foi desenvolvido para avaliar os efeitos sobre esses compostos frente ao estresse de alta temperatura imposto a soja durante estágios específicos de desenvolvimento. Foi relatado que as concentrações de tocoferol em sementes maduras foram mais afetadas quando o estresse foi imposto durante todos os estágios de desenvolvimento e o estágio reprodutivo tardio, o α -tocoferol teve sua concentração aumentada em até 752% sob a temperatura de 33/25 °C (dia/noite). Por outro lado, a concentração total de isoflavononas nos mesmos estágios de desenvolvimento foi reduzida quando comparada ao controle (CHENNUPATI, SEGUIN e LIU, et al, 2011).

OBJETIVOS

- Otimização de um protocolo de extração e quantificação de metabólitos primários a partir de sementes e plântulas de *Glycine max* (L.) Merrill.;
- Avaliar o perfil metabólico de sementes e plântulas de *Glycine max* (L.) Merrill em resposta a condição de estresse térmico via Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN) e cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS);
- Comparar o uso de dois softwares, NmrProcflow e Chenomix, usados na área de metabolômica nas análises dos dados gerados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Nos experimentos foram utilizadas sementes de soja da cultivar comercial lote SOJA IAC Foscarin-31 adquiridas através do e-commerce Mercado Livre.

2.2 Germinação das sementes de *Glycine max*

Os testes foram conduzidos com três repetições de 50 sementes (para cada condição de temperatura), as sementes foram acondicionadas em rolos de papel do tipo germitest, utilizando duas camadas de papel, que foram umedecidos com água destilada com pH 6,0 – 7,0, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, seguindo as normas estabelecidas no Regras para Análise de Sementes (RAS). Cada rolo de papel contendo as sementes foi envolvido individualmente em sacos plásticos de polietileno transparente (plástico fino) nas dimensões de 40 cm x 60 cm, para que a umidade fosse mantida.

O germinador utilizado foi uma câmara vertical do tipo B.O.D contendo controle de temperatura e circulador de ar. As sementes foram germinadas a 28/22 °C temperatura dia/noite com fotoperíodo de 14 horas, determinada como condição ótima e a 36/24 °C temperatura dia/noite com fotoperíodo de 16 horas durante a temperatura dia , condição de estresse térmico.

As contagens foram feitas com 24, 48, 72 e 96 horas, na contagem final a porcentagem de sementes germinadas (sementes com 0,5 cm de raiz) foi estabelecida. As sementes germinadas foram coletadas quando atingiram mais ou menos 2,5 cm de raiz (figura 2) O endosperma (os cotilédones são integrados ao endosperma) e a raiz foram separados e armazenados em tubos Falcon em triplicatas. Os tubos falcons foram imediatamente armazenados em um freezer a -80 °C. Por fim, todas as amostras foram liofilizadas durante 24 horas e maceradas com ajuda de um bastão de vidro até se transformarem em um pó fino.

Figura 2. Sementes germinadas no estágio de coleta



Fonte: autoria própria.

2.3 Estabelecimento das plântulas

Para avaliar o estabelecimento das plântulas de soja frente ao estresse térmico quatro repetições de 30 sementes foram acondicionadas em rolos de papel do tipo germitest a 28/22 °C temperatura dia/noite com fotoperíodo de 14 horas. Após dois dias, metade das sementes germinadas, com mais ou menos dois centímetros de raiz, foram transferidas para outro germinador a 36/24 °C temperatura dia/noite com fotoperíodo de 14 horas. Nas duas condições de temperatura, a coleta foi feita quando as raízes atingiram mais ou menos treze centímetros (figura 3), dois dias após a transferência. As raízes e os endospermas foram coletados separadamente, armazenados em tubos falcons em triplicatas, os tubos Falcon foram imediatamente armazenados em um freezer a -80 °C. Por fim, todas as amostras foram liofilizadas durante 24 horas e maceradas com ajuda de um bastão de vidro até se transformarem em um pó fino.

Figura 3. Plântulas no estágio de coleta

As amostras dos testes de germinação e estabelecimento das plântulas receberem códigos de acordo com seus tratamentos e tecidos (tabela 1). Os dados de peso fresco de sementes e plântulas foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) com 5% de probabilidade, e as médias foram comparadas com o Teste de Tukey, utilizando o software de análise estatística SISVAR®.

Tabela 1. Códigos atribuídos as amostras de soja

Códigos	Tratamentos
SSE28	Semente Soja Endosperma 28/22°C
SSE36	Semente Soja Endosperma 36/24°C
SSR 28	Semente Soja Raiz 28/22°C
SSR36	Semente Soja Raiz 36/24°C
PSE28	Plântula Soja Endosperma 28/22°C
PSE36	Plântula Soja Endosperma 36/24°C
PSR28	Plântula Soja Raiz 28/22°C
PSR36	Plântula Soja Raiz 36/24°C

2.4 Análise metabolômica via Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)

Para a análise via GC-MS, 5 mg das amostras foram pesados em tubos de 1,5 mL, separados em triplicatas de acordo com os tratamentos no teste de germinação. A cada tubo foi acrescentado 1,5 mL de clorofórmio, posteriormente esses tubos foram levados para o banho ultrassônico por 5 minutos, o mesmo processo se deu adicionando mais 500 µL de metanol (figura 4). O conteúdo foi transferido para tubos falcons de 14 mL, onde foram adicionados 3 mL de água, os tubos foram levados ao banho ultrassônico por 5 minutos, e, por fim a centrifuga a 25 °C, 17000 rpm. Foram transferidas alíquotas de 1 mL da fase orgânica para tudo de 1,5 mL, onde foi adicionado o agente secante sulfato de sódio, e então foram transferidos 200 µL para vials com inserts para serem injetados no GC-MS.

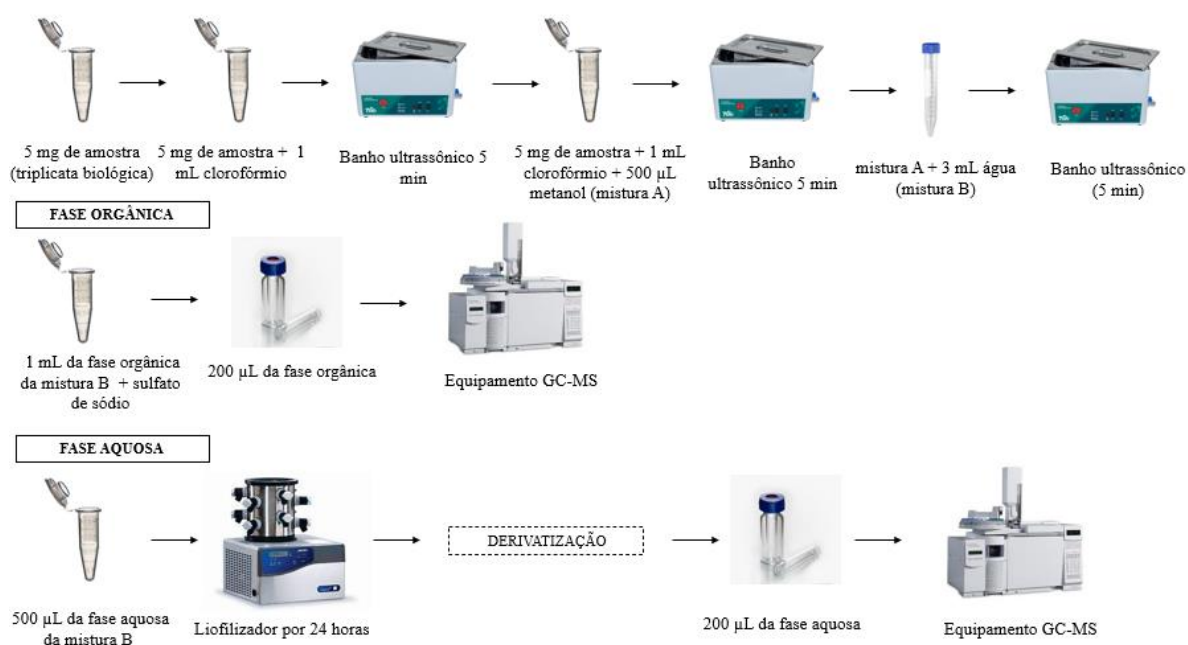
Da fase aquosa, foram transferidas alíquotas de 500 µL para tubos de 1,5 mL que foram levados ao liofilizador por 24 horas (figura 4). Antes da injeção no GC-MS, as amostras foram derivatizadas por sililação com N-Metil-N-(trimetilsil) trifluoroacetamida (MSTFA). As amostras secas foram ressuspensas em 95 µL de cloridrato de metoxiamina/piridina (2,5 mg/mL) e incubadas por 30 minutos a 60°C em bloco térmico, seguido da adição da mistura MSTFA:piridina (45:50) e novamente incubadas pelo mesmo tempo e temperatura. Posteriormente, foram adicionados 10 µL de metiltridecanoato (MTD) em piridina (573 µM), 200 µL da solução foram transferidos para vials com inserts para serem injetados e analisados via GC-MS.

Para curva de calibração foram utilizados padrões de uma série de alceno. Uma solução foi preparada contendo 80 µL de hexano e 10 µL dos padrões C20 e C40 em cada solução.

As análises de GC-MS foram realizadas em um sistema de cromatografia gasosa (modelo 7890 A, Agilent Technologies, CA, EUA) acoplado a um único espectrômetro de massa quadrupolo (modelo 5975 C inert XL, Agilent Tecnologias). Uma coluna HP-5MS (30 m de comprimento, 0,25 mm d.i., com um Filme de 0,25 µm composto por 95% de dimetil e 5% de difenil polissiloxano, da Agilent Technologies) e hélio a uma taxa de fluxo de 1,0 mL min⁻¹ foram

usadas. O injetor de GC foi mantido a 250 °C e as amostras foram injetadas com divisão 1:10, usando He a 10 mL.min⁻¹. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, e 1 min após a injeção, a temperatura aumentou a uma taxa de 10 °C min⁻¹ para atingir uma temperatura final de 300 °C. A temperatura da linha de transferência do detector foi ajustada para 290 °C, a fonte de filamento a 230 °C e o quadrupolo a 150 °C. Os íons foram gerados a 70 eV. O espectrômetro de massa foi operado no modo de varredura completa (50–600 m/z).

Figura 4. Esquema do processo de extração das amostras de Soja para análise via GC-MS.



Fonte: autoria própria.

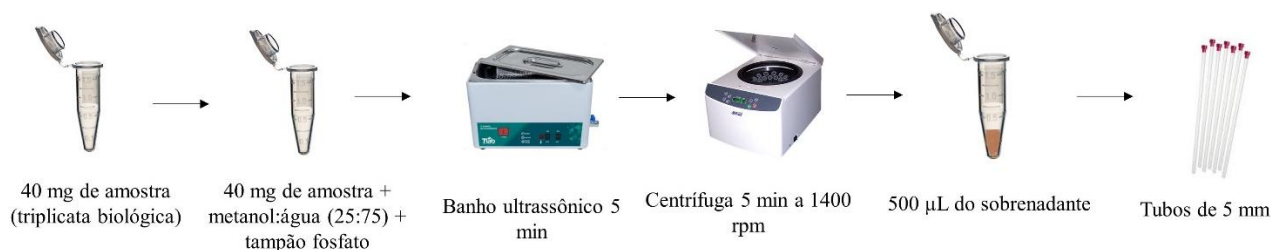
2.5 Análise metabólica via Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H , COSY, e HSQC, foram adquiridos no espectrômetro Bruker 9,4 Tesla (400 MHz para frequência do hidrogênio), AVANCE III e no espectrômetro Bruker 14,1 Tesla (600 MHz para frequência do hidrogênio), AVANCE III, localizado no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. Foi utilizado como padrão de referência o 3-sal de sódio (trimetilsilil) propiônico-2,2,3,3 ácido D4 (TMSP-d4).

Inicialmente, foram realizados alguns testes para definir quais seriam as melhores condições para uma extração mais eficiente dos metabólitos. Os testes foram conduzidos variando a proporção dos solventes metanol:água, de modo que as condições variavam de 100% de metanol a 100% de água. Também foram testadas as temperaturas de 25°C e 50°C. Os melhores resultados foram fornecidos em metanol:água (25:75) a 25°C.

Portanto, para as análises foram pesados 40 mg de cada amostra, solubilizadas em 700 μL da mistura metanol:água (25:75) com tampão fosfato, levadas ao banho ultrassônico por 5 minutos a 25 °C, e, posteriormente a centrifuga por 5 minutos a 25 °C, 14000 rpm. Alíquotas de 500 μL foram coletados do sobrenadante e transferidos para tubos de 5 mm (figura 5). Após a aquisição dos espectros unidimensionais (1D) de RMN de ^1H , foi feito um pool com todas as amostras para a aquisição dos espectros bidimensionais (2D), a exemplo do cosy, gerado pelo acoplamento spin-spin de ^1H e o HSQC (Coerência Heteronuclear Quântica Única), gerado pelo acoplamento de ^1H e ^{13}C . Os sinais utilizados foram selecionados de regiões do espectro de ^1H com o mínimo de sobreposições possível. Todos os espectros foram analisados nos softwares NmrProcflow (<https://nmrprocflow.org/>), Chenomix e MestReNova

Figura 5. Esquema do processo de extração das amostras de Soja para análise via RMN.



Fonte: autoria própria.

2.6 Análise estatística multivariada

O conjunto de dados dos metabólitos obtidos via RMN de ^1H e GC-MS foram carregados e normalizados no MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>), uma plataforma abrangente para estudo de metabolômica de alto rendimento, onde é possível identificar os metabólitos que se expressam de forma diferencial em condições distintas. As análises incluíram Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA), análise hierárquica de agrupamento, mapa de calor, pontuações de Importância Variável na Projeção (VIP). A normalização por mediana permitiu que as diferenças gerais entre as amostras fossem ajustadas. A transformação dos dados de raiz quadrada e a escala de pareto foram executadas para que os fossem comparáveis entre si.

3. RESULTADOS E DISCUSÃO

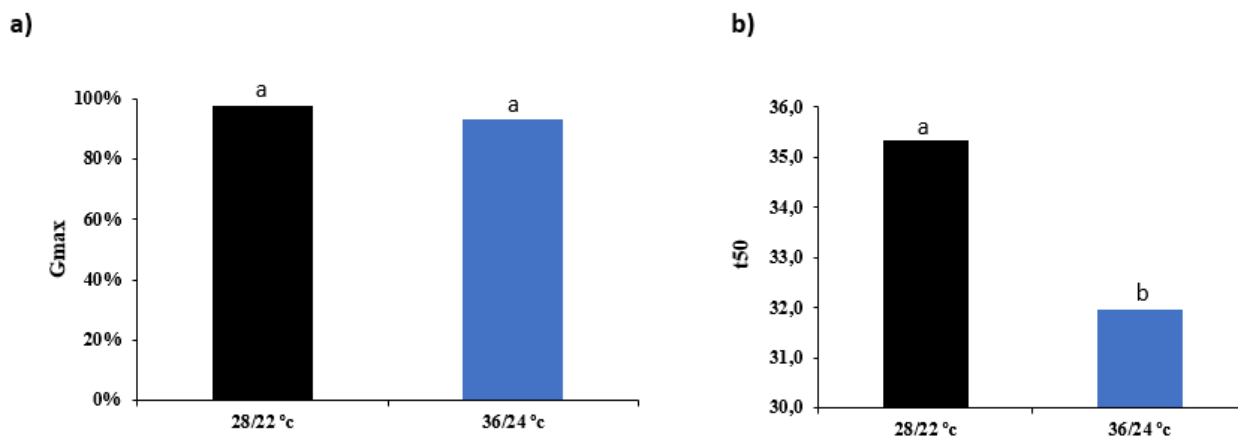
3.1 Germinação das sementes de soja e massa fresca

Durante a germinação as sementes de soja foram impostas as temperaturas de 28/22°C (dia/noite), considerada condição controle e 36/24°C, considerada estresse térmico moderado (CHEBROLU et al, 2016). Na temperatura ótima as sementes apresentaram 98% de germinação máxima, já em 36/24°C a taxa de germinação ficou em 93% (figura 6a). Sendo assim, estatisticamente não houve diferença entre os dois tratamentos, o que significa que o estresse térmico moderado não afetou a viabilidade das sementes. A temperatura afeta tanto a germinação máxima, como o sincronismo e a velocidade, por estar intimamente relacionada as reações bioquímicas necessárias para o início do processo germinativo (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

A Velocidade de germinação, aqui medida como t50, seguiu um padrão diferente da porcentagem de germinação máxima. Na condição controle foram necessárias 35,3 horas para que 50% das sementes germinassem e sob estresse foram necessárias 32 horas (figura 6b), isto é, o aumento da temperatura aumentou a velocidade de germinação. Sementes de genótipos variados de trigo para pão indiano (*Triticum aestivum* L.) demonstraram maior velocidade na germinação em condições de estresse (25°C) quando comparado ao controle (20°C), isso pode ser atribuído a maior taxa de mobilização das reservas energéticas nas sementes (SHARMA et al, 2022). Temperaturas acima da ideal para a porcentagem máxima de germinação, comumente acelera a velocidade com que a semente germina, porém apenas sementes com alto vigor e viabilidade conseguem germinar (ROBERTS, 1988).

Figura 6a) Porcentagem de germinação máxima b) tempo médio de germinação das sementes de soja

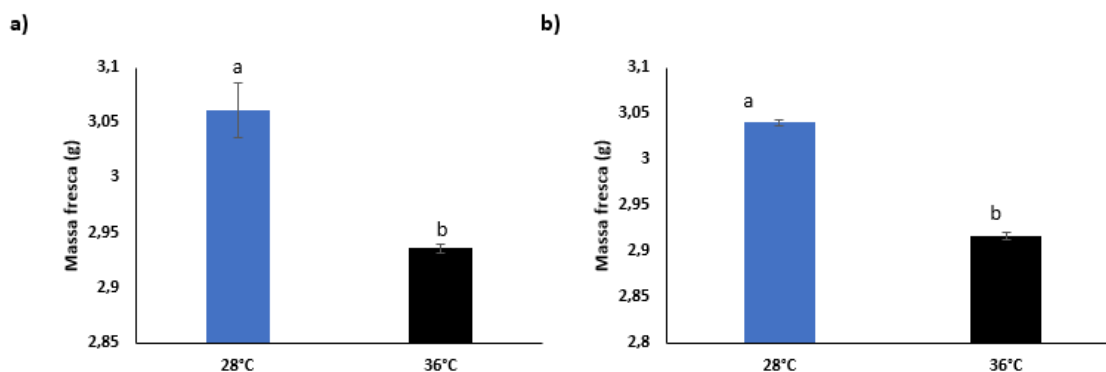
Letras diferentes acima das barras designam diferenças entre as amostras pelo HSD de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: autoria própria.

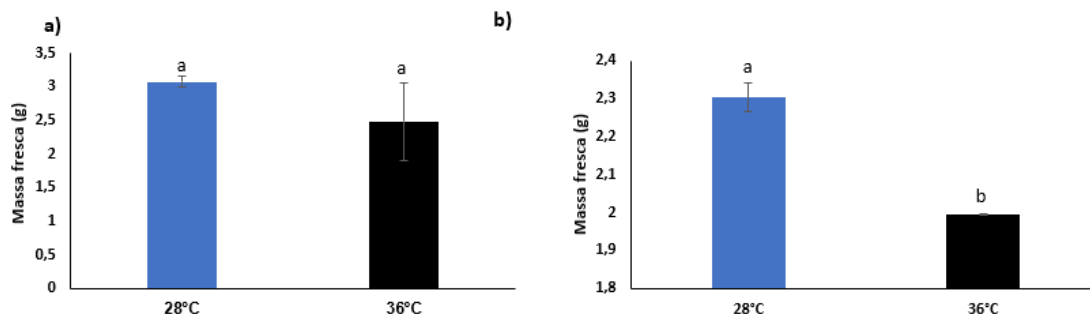
Para analisar os efeitos da temperatura em sementes e plântulas de soja, a massa fresca do endosperma e raiz também foi medida. Foi observada uma diminuição significativa na massa do endosperma e raiz das sementes a 36°C (figuras 7a e b). Nas plântulas, não foi observada diferença significativa na massa fresca do endosperma, em contra partida, houve um decréscimo na raiz (figura 8a e b).

Figura 7. Massa fresca de a) endosperma e b) raiz de sementes germinadas a 28/22°C e 36/24°C.



Fonte: autoria própria.

Figura 8. Massa fresca de a) endosperma e b) raiz de plântulas a 28/22°C e 36/24°C.



Fonte: autoria própria.

O aumento da temperatura causou uma diminuição no conteúdo fresco das sementes, esta diminuição está atrelada aos processos germinativos. Durante a germinação, há uma mobilização do conteúdo de reserva (carboidratos, proteínas e lipídios) armazenados no endosperma para que a protusão da radícula aconteça (HOH, 2012). O decréscimo na massa seca do endosperma sugere que essas reservas foram consumidas em maior quantidade para apoiar a germinação sob uma condição estressante. O peso fresco em sementes de arroz (*Oryza sativa*) germinadas sob estresse térmico também foi reduzido.

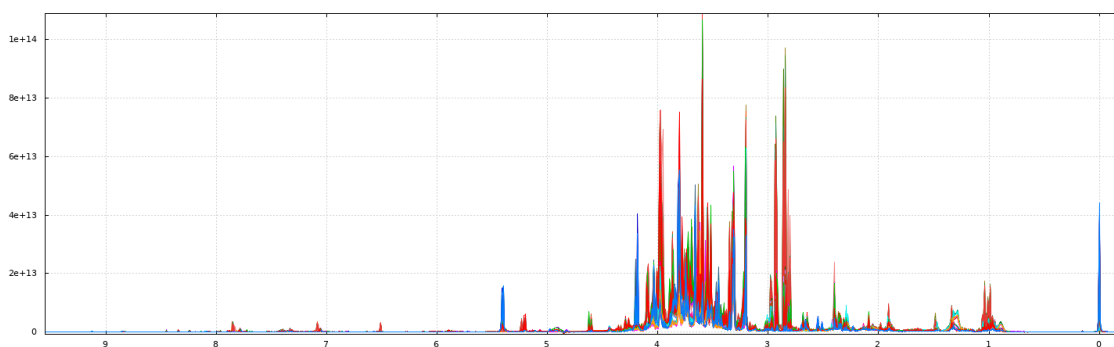
As plântulas submetidas as temperaturas de 36/24°C tiveram o desenvolvimento das raízes afetado, isso foi evidenciado pela perda de massa fresca das raízes em comparação com o controle (28/22°C) (figura 8b), o mesmo aconteceu com as sementes (figura 7b). Temperaturas altas podem influenciar negativamente o crescimento e desenvolvimento do sistema radicular (TAIZ; et al, 2015). O desenvolvimento adequado da raiz nas plantas é especialmente importante, visto que a raiz ancora e sustenta a planta e absorve água e sais minerais. Portanto, o estabelecimento de plantas saudáveis está intimamente ao desenvolvimento da raiz. Em plântulas de trigo e alface também apresentaram o mesmo efeito de redução da massa fresca sob estresse térmico (SONG; LEI TIAN, 2005; COONS; KUEHL; SIMONS, 1990). Os resultados evidenciam que

as sementes de soja ativam mecanismos que permitem que as sementes germinem mesmo que em condição de estresse, no entanto, o desenvolvimento do sistema radicular é prejudicado, o que pode causar efeitos negativos no estabelecimento e desenvolvimento de plantas de soja em um ambiente estressante.

3.2 Quantificação dos metabólitos nas amostras de soja via RMN de ^1H

Os processamentos dos espectros unidimensionais de ^1H foram realizados através dos softwares NMRProcFlow e Chenomx. O NMRProcFlow é um software online especialmente dedicado a metabolômica, nele é possível agrupar múltiplos espectros (figura 9), o que possibilita a identificação e quantificação dos metabólitos de interesse em diversas amostras em apenas uma única análise, este software possibilitou fazer a quantificação relativa.

Figura 9. Espectros sobrepostos de RMN de ^1H processados no software NMRProcFlow das amostras de soja. Cada cor representa uma amostra diferente.

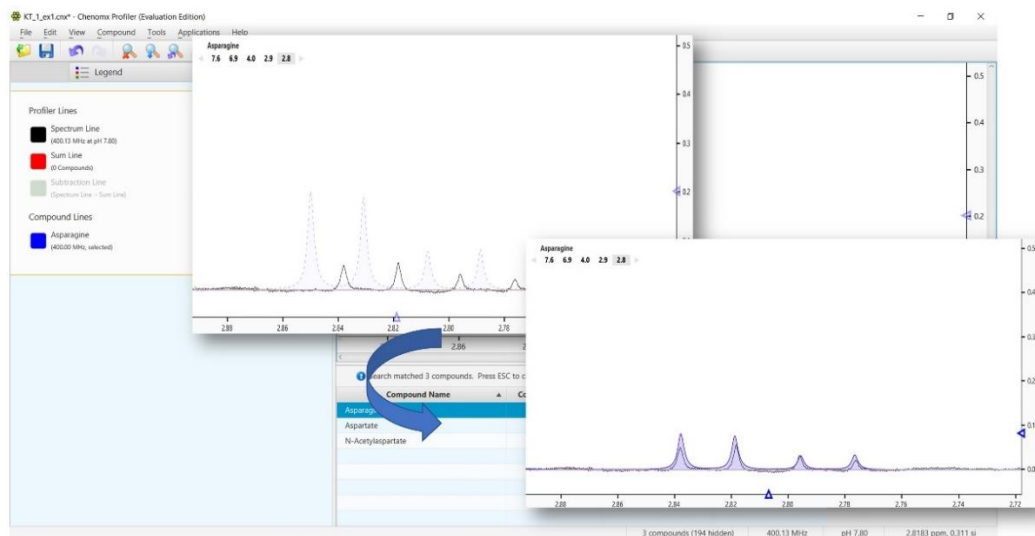


Fonte: print do software NmrProcflow

O Chenomx é um software especializado em análise de misturas para aplicações em ciências da vida como a alimentação/nutrição e a metabolômica. O software funciona através do ajuste manual da biblioteca de referência espectral aos sinais apropriados dentro do espectro (figura 10), permitindo que o usuário ajuste a intensidade e a localização dos sinais para valores de concentração absoluta ajustáveis. Também acontece o ajuste automático da

biblioteca de referência para refletir as condições de aquisição do espectro, como pH e intensidade do campo aplicado.

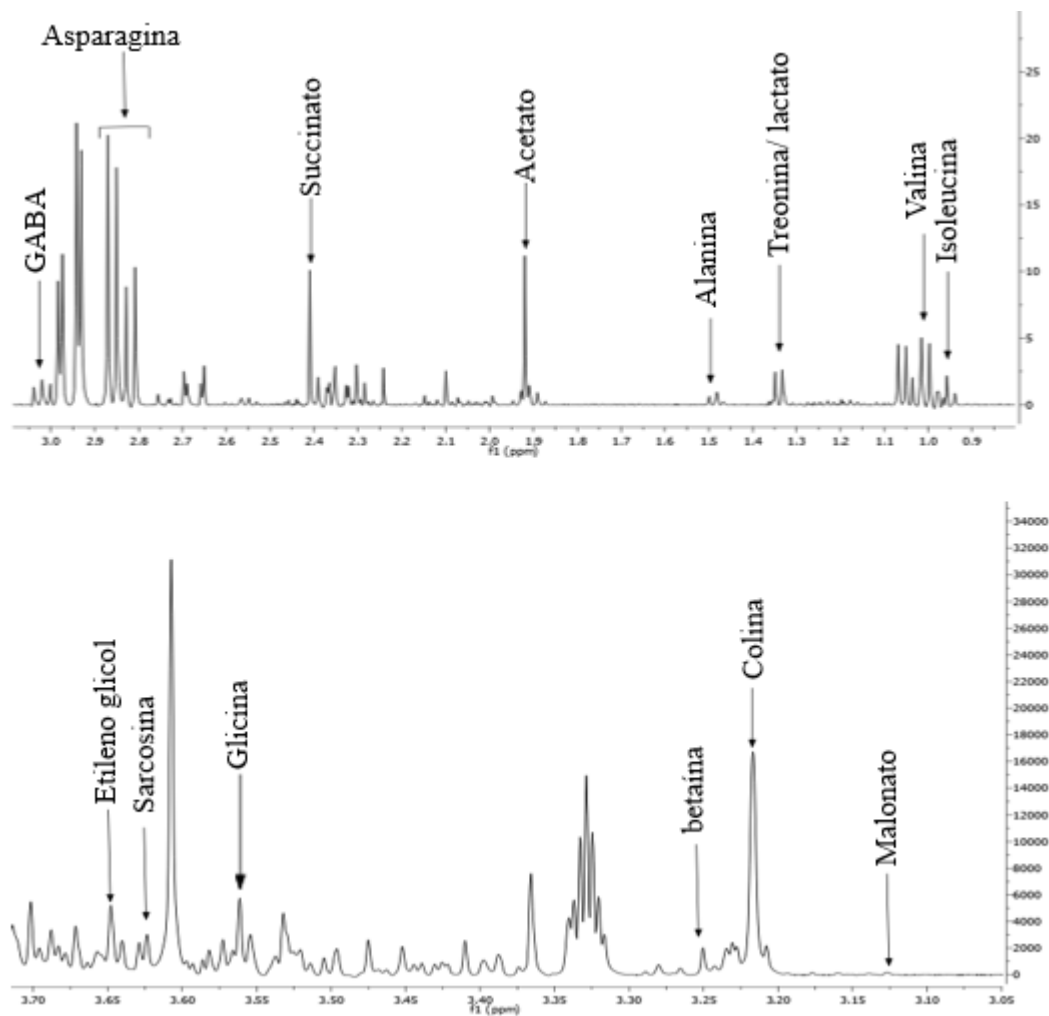
Figura 10. Ajuste da biblioteca de referência espectral a sinais no espectro experimental.



Fonte: adaptado do software Chenomix

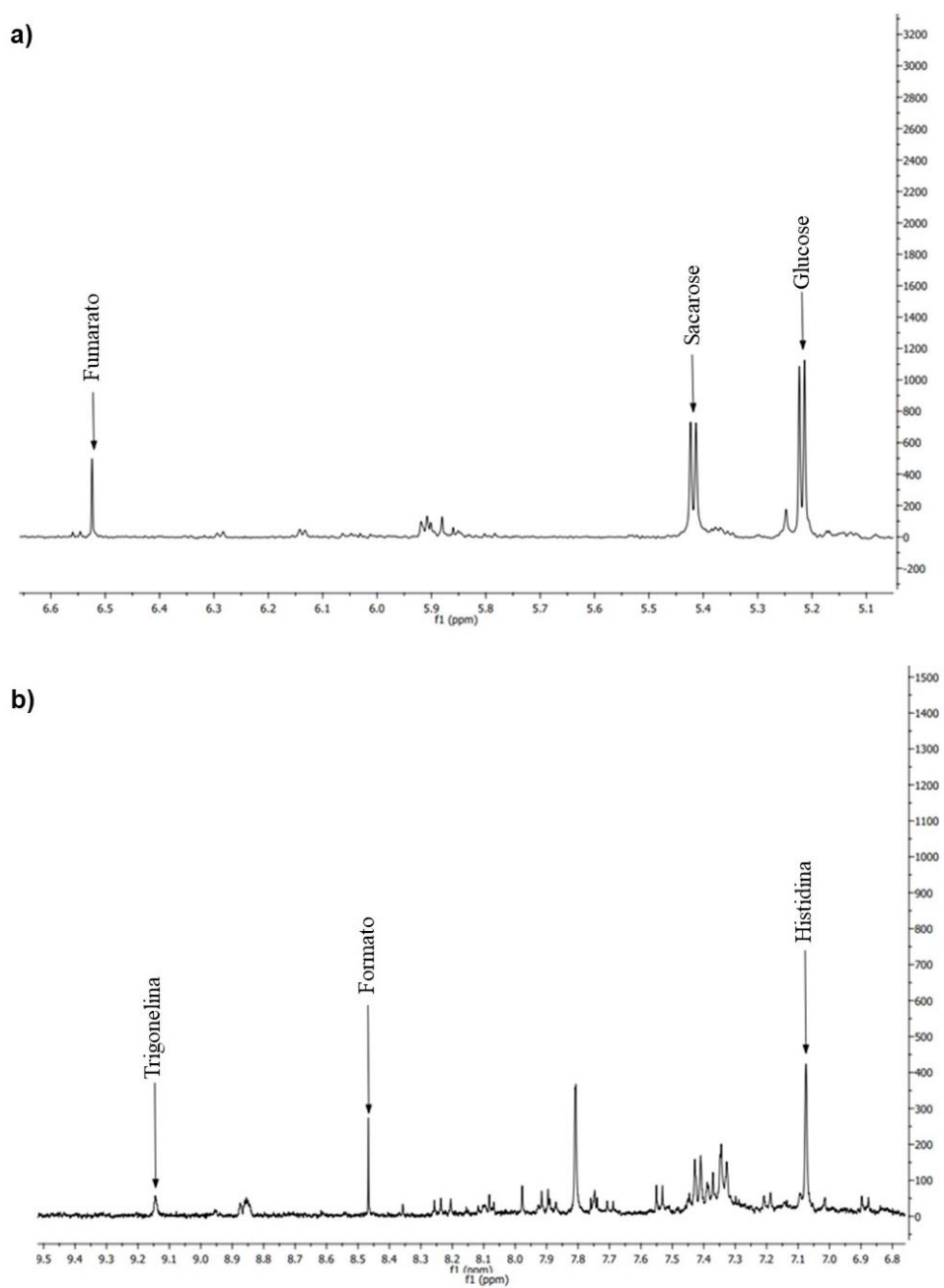
Os sinais utilizados para identificar e quantificar os metabólitos presentes nas amostras de soja foram os mesmos no processamento utilizando os dois softwares (figuras 11 e 12), identificados através de dados da literatura. Buscando informações adicionais que possam comprovar a identidade dos metabólitos identificados, os seguintes espectros em 2D foram obtidos: COSY (do inglês, COrrrelation SpectroscopY, apêndice 1), que indica quais átomos de hidrogênio estão acoplado entre si e HSQC (do inglês, Heteronuclear Single Quantum Correlation, apêndice 2), neste tipo de experimento é possível analisar a correlação entre os núcleos de ^{13}C e ^1H que estão distante por uma ligação química, assim, há a indicação de qual carbono está ligado a qual hidrogênio. Para a aquisição desses espectros foi feito um pool com todas as amostras, os espectros foram processados no software MestReNova.

Figura 11. Ampliações do espectro ^1H do pool das amostras de soja **a)** isoleucina, valina, lactato, treonina, alanina, acetato, succinato, asparagina, gaba; **b)** malonato, colina, betaína, glicina, sarcosina e etileno glicol.



Fonte: autoria própria.

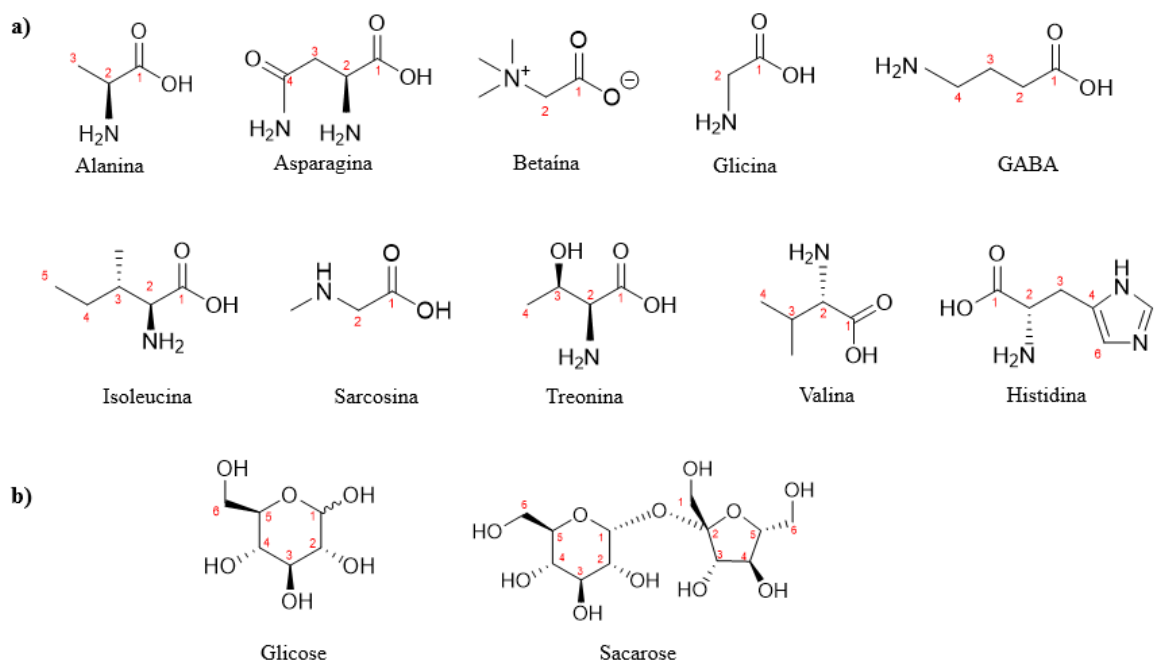
Figura 12. Ampliações do espectro de ^1H do pool das amostras de soja **a)** glucose, sacarose e fumarato **b)** histidina, formato e trigonelina.



Fonte: autoria própria.

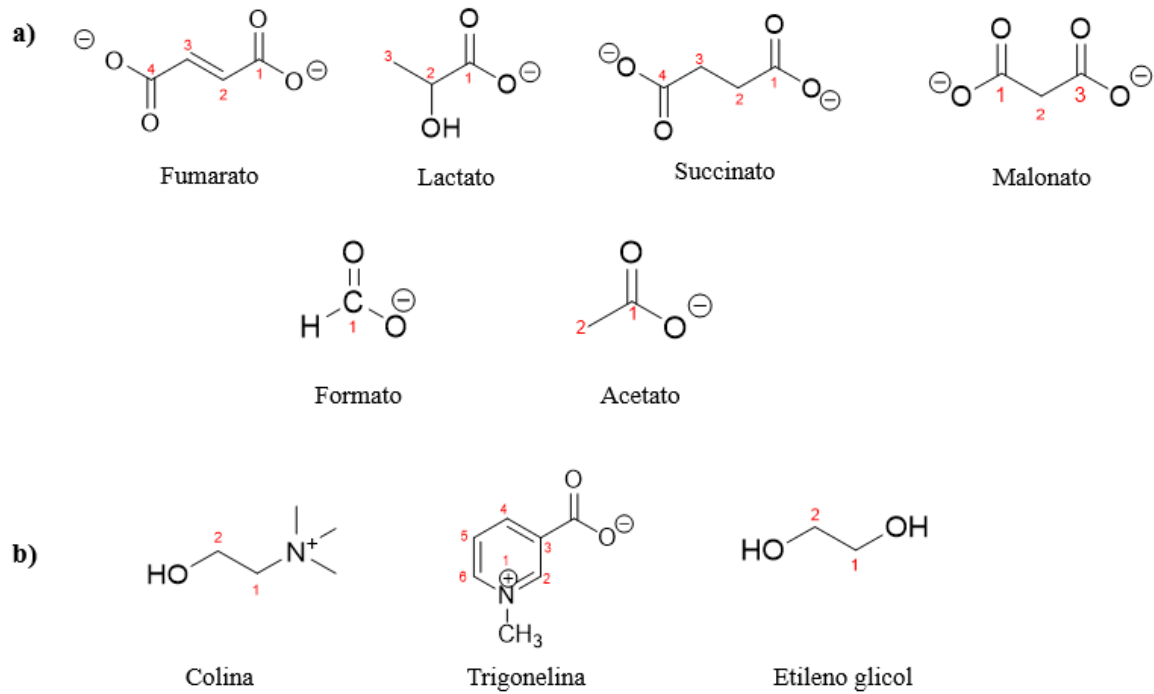
No total, foram identificados e quantificados vinte e um metabólitos nas amostras, incluindo dez aminoácidos, dois carboidratos (figura 13a e b), seis ácidos orgânicos, um álcool, uma vitamina e um alcaloide (figura 14a e b). Os sinais utilizados para identificar tais metabólitos estão descritos em termos de deslocamento químico, multiplicidade e valores de constante de acoplamento (J) na tabela 2.

Figura 13. Estrutura química dos metabólitos encontrados nas amostras de soja. **a)** aminoácidos; **b)** carboidratos.



Fonte: autoria própria.

Figura 14. Estrutura química dos metabólitos encontrados nas amostras de soja.
a) ácidos orgânicos; **b)** vitamina, alcaloide e álcool.



Fonte: autoria própria.

Tabela 2. Deslocamento químico, multiplicidade e valores de constante de acoplamento (J) dos metabólitos encontrados nas amostras de Soja.

Metabólitos	Nº do carbono	Deslocamento químico (ppm)	Multiplicidade e constante de acoplamento (J Hz)
Ácido γ -aminobutírico (GABA)	4	3,01	t (7,6)
Acetato	2	1,91	s
Alanina	3	1,48	d (7,2)
Asparagina	3	2,83	dd (8,0/8,8)
Betaína	N(CH ₃)	3,25	s
Colina	N(CH ₃)	3,19	s
Etileno glicol	1 e 2	3,66	s
Formato	1	8,45	s
Fumarato	2 e 3	6,51	s
Glicina	2	3,54	s
Glicose	1	5,20	d (3,6)
Histidina	6	7,08	s
Isoleucina	5	0,94	t (7,6)
Lactato	3	1,33	d (6,4)
Malonato	2	3,11	S
Sacarose	1	5,4	d (3,6)
Sarcosina	2	3,59	s
Succinato	2 e 3	2,39	s
Treonina	4	1,32	d (6,8)
Trigonelina	2	9,13	s
Valina	4	0,99	d (7,2)

Fonte: autoria própria.

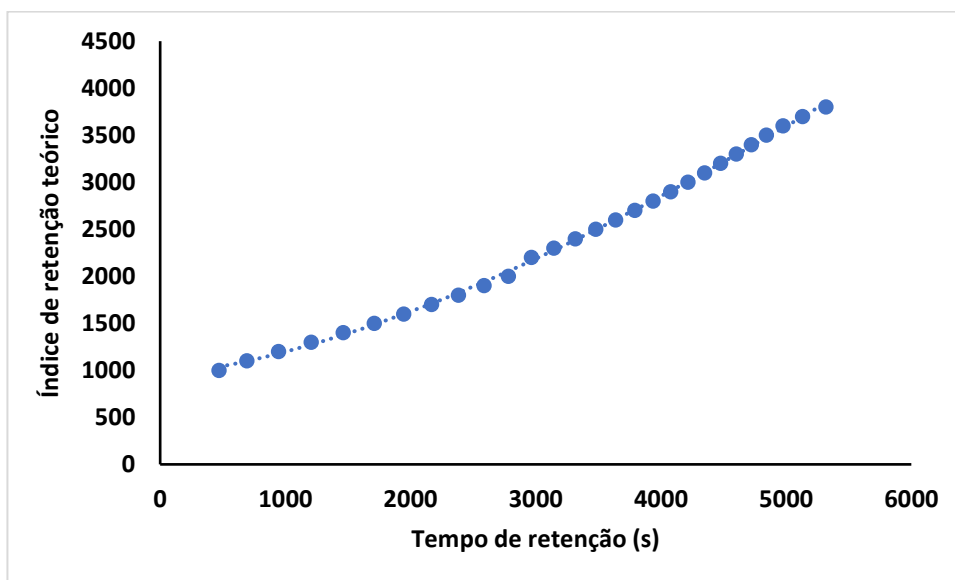
3.3 Quantificação dos metabólitos nas amostras de soja via GC-MS

O processamento dos cromatogramas da fase aquosa de GC-MS foi feito através dos softwares PARADISE e AMDIS. O software PARADISE é um programa de software para resolução de dados não direcionados de espectrometria de massa de cromatografia gasosa (GC-MS). Ele foi utilizado para a construção de uma curva de calibração usando uma série de alcanos, com o número de carbonos variando de C10 a C38, (figura 15) e a identificação dos metabólitos. A quantificação dos compostos identificados foi feita via AMDIS, onde foi possível obter as áreas correspondentes a cada pico.

Figura 15. Curva de calibração de alcanos

Equação da reta = $-0,000000005x^3 + 0,000095558x^2 + 0,174011245x + 933,060580400$

Coefficiente de correlação $R^2 = 0,999$



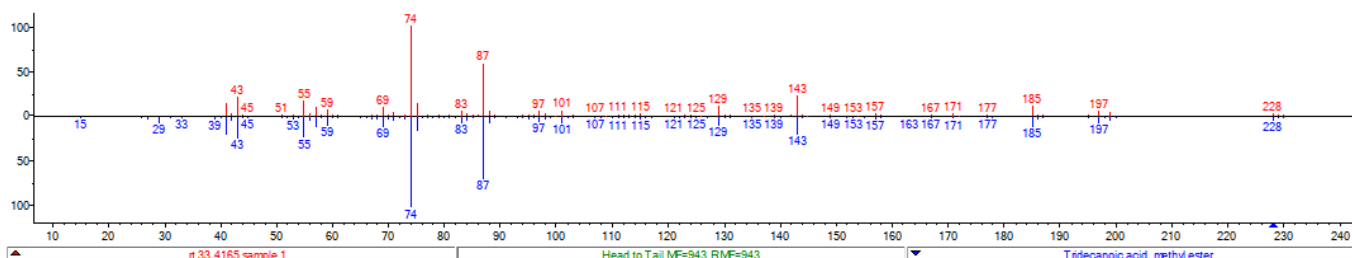
Fonte: autoria própria

Inicialmente foi feito um levantamento de potenciais metabólitos comparando as semelhanças dos espectros de massas de substâncias desconhecidas com

as existentes na biblioteca NIST no PARADISE (figura 16). Posteriormente, a seleção dos metabólitos foi feita a partir da comparação do índice de retenção (IR) experimental, calculado com o auxílio da curva de calibração com o índice de retenção dado na literatura.

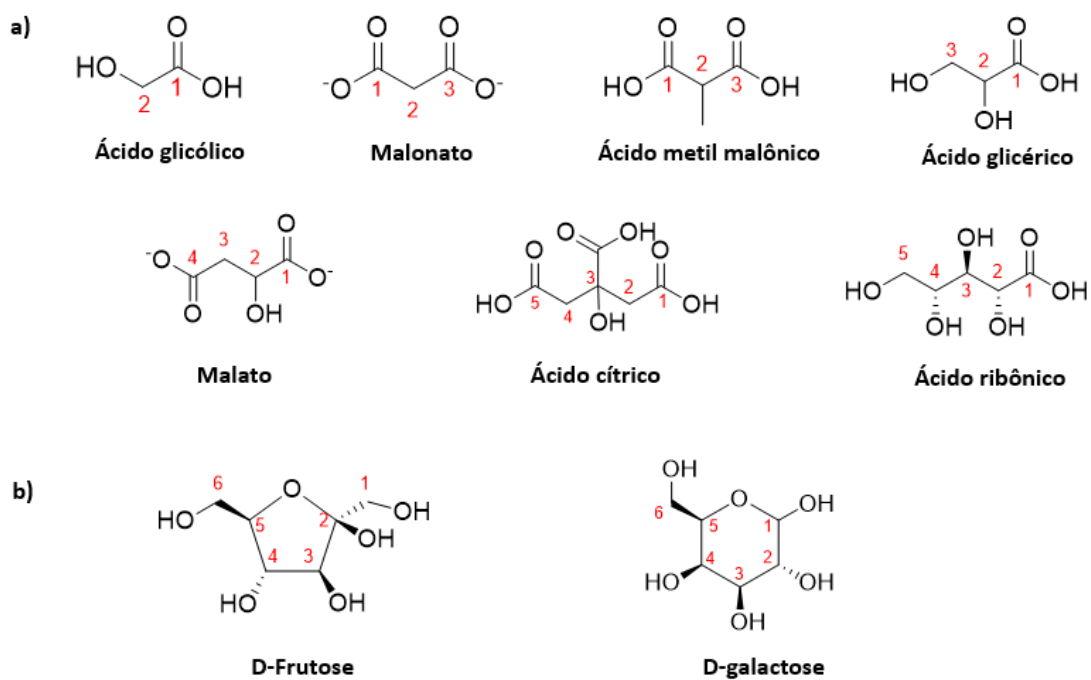
Figura 16. Comparação entre os espectros de massas de uma substância desconhecida e uma substância presente na biblioteca NIST.

Espectro em vermelho = substância desconhecida; espectro em azul = biblioteca NIST. Os espectros da figura são do ácido tridecanóico, onde houve uma compatibilidade de 90%.



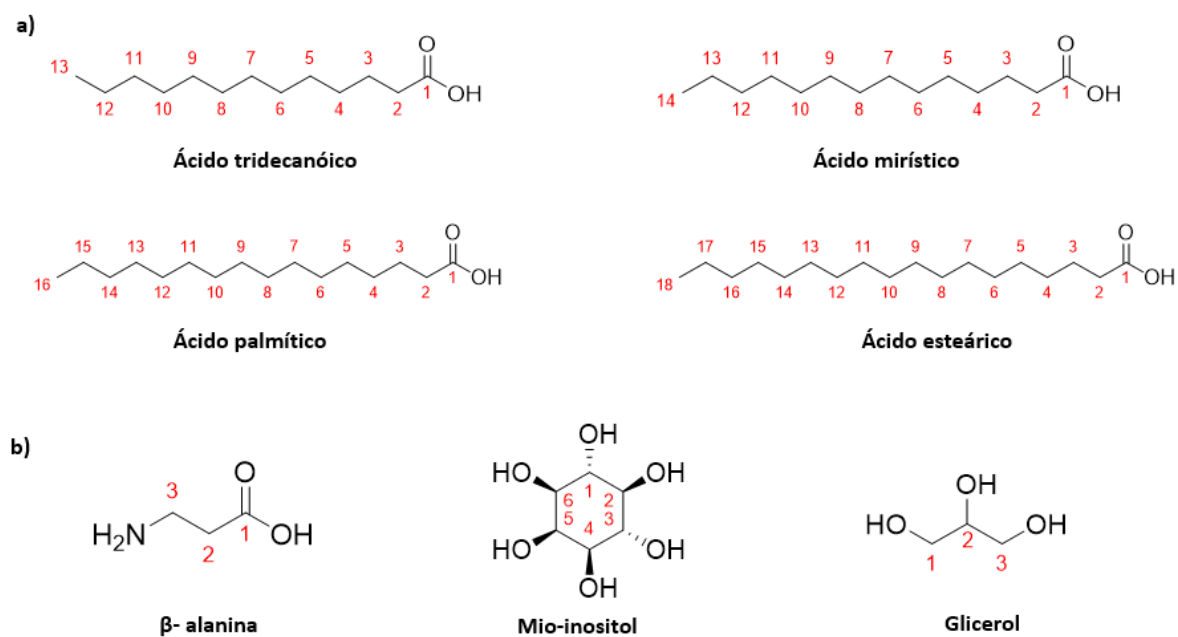
Por fim, foram selecionados apenas os metabólitos que apresentaram um coeficiente de variação com relação aos índices de retenção menor de 15%. No total foram quantificados 16 novos metabólitos, incluindo sete ácidos orgânicos, dois carboidratos (figura 17), quatro ácidos graxos, um aminoácido, uma vitamina do complexo b e um triálcool (figura 18). Os picos utilizados para identificar os metabólitos estão descritos em termos de tempo de retenção, índice de retenção experimental e teórico e coeficiente de variação na tabela 3.

Figura 17. Estrutura química dos metabólitos encontrados nas amostras de soja via GC-MS. **a)** ácidos orgânicos **b)** carboidratos.



Fonte: autoria própria

Figura 18. Estrutura química dos metabólitos encontrados nas amostras de soja via GC-MS. **a)** ácidos graxos **b)** aminoácido, vitamina e triálcool.



Fonte: autoria própria.

Tabela 3. Tempo de retenção, índices de retenção e coeficiente de variação dos metabólitos identificados nas amostras de soja via GC-MS.

RT= tempo de retenção; IR= índice de retenção; CV= coeficiente de variação.

Metabólitos	RT(min)	IR Literatura	IR experimental	CV%
Ácido glicólico, 2TMS	13,12	1085	1126,82	3,85
Malonato, 2TMS	15,88	1214	1181,28	-2,69
glicerol, 3TMS	19,02	1295	1248,66	-3,58
Ácido metilmalônico, 2TMS	20,69	1220	1286,77	5,47
Ácido glicérico, 3TMS	21,37	1319,95	1302,74	-1,30
β-Alanina, 3TMS	25,36	1423,66	1401,46	-1,56
Ácido málico, 3TMS	28,05	1479,12	1472,75	-0,43
Ácido tridecanóico, metil ester	33,47	1631	1627,39	-0,22
D-frutose, 5TMS	39,77	1864	1824,45	-2,14
Ácido cítrico, 4TMS	40,33	1838	1842,82	0,26
Ácido mirístico, tms	41,35	1843,20	1876,62	1,81
D-galactose, 5TMS	45,77	1897,60	2028,04	6,87
Ácido ribônico, 5TMS	45,99	1799	2035,78	13,16
Ácido palmítico, TMS	47,74	2040	2098,02	2,84
myo-inositol, 6TMS	48,83	2096	2137,38	1,97
Ácido esteárico, TMS	53,64	2234,10	2316,22	3,68

Para que fosse possível propor as contribuições e mecanismos nos quais estes metabólitos estariam envolvidos quando sementes e plântulas de soja são germinadas sob estresse térmico, foi utilizada uma abordagem apoiada no perfil de metabólitos analisado via RMN de ^1H e GC-MS onde foram usadas ferramentas da estatística multivariada.

3.4 Características metabólicas da resposta de soja ao estresse térmico via RMN de ^1H

3.4.1 Comparação entre os dados analisados nos softwares NmrProcflow e Chenomix

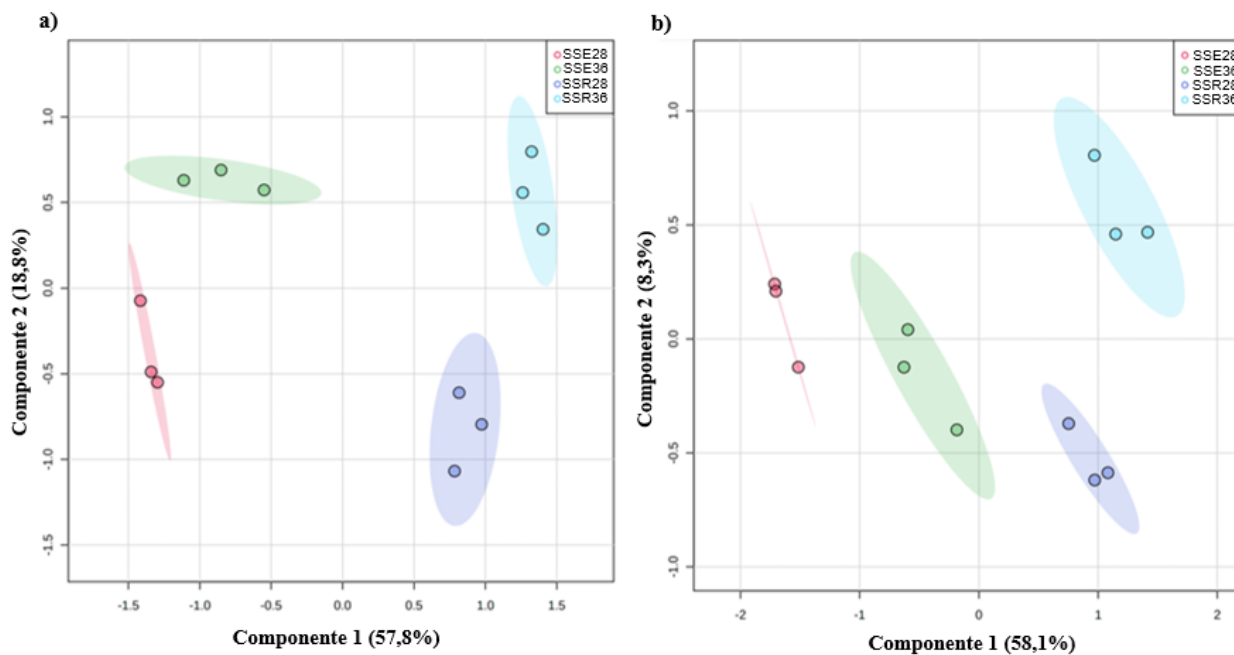
Com intuito de definir qual seria o conjunto de dados mais adequado para analisar o metabolôma das amostras de soja, os mesmos foram divididos entre os grupos de semente e plântula e foram submetidos a uma análise estatística multivariada inicial. Para tanto, os dados foram transformados usando o mesmo tipo de normalização dentro de cada grupo.

A análise de discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) é utilizada para demonstrar a separação das amostras em grupos de acordo com um conjunto de variáveis. Os gráficos de PLS-DA (figura 19) mostraram que ambos os conjuntos de dados foram satisfatoriamente separados em quatro grupos de acordo com o tecido (raiz e endosperma) e a temperatura (28 °C e 36 °C). A taxa de variação explicada pelo componente 1 foi muito semelhante para os dois softwares, bem como a variação dentro de cada grupo, representada pelas elipses. Por outro lado, o componente 2 explica apenas 8,3% (autovalor 0,83) da variação para os dados do Chenomix e 18,8% (autovalor 1,88) para NmrProcflow.

O critério de autovalor ou critério de Kaiser identifica se um modelo utilizado é adequado para o ajuste dos dados, componentes com autovalor maior que 1 pode ser potencialmente usado para explicar a distribuição das amostras no gráfico de PLS-DA (CARVALHO et al, 2021). Portanto, admite-se que os dados obtidos no NmrProcflow descrevem melhor o comportamento das amostras de semente de soja e análises posteriores serão feitas com base nestes dados.

Figura 19. Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) do perfil de metabólitos das amostras de sementes de soja **a)** dados do NmrProcflow **b)** dados do Chenomix.

SS= semente soja, E28= endosperma 28 °C, E36= endosperma 36 °C, R28= raiz 28°C, R36= raiz 36 °C.

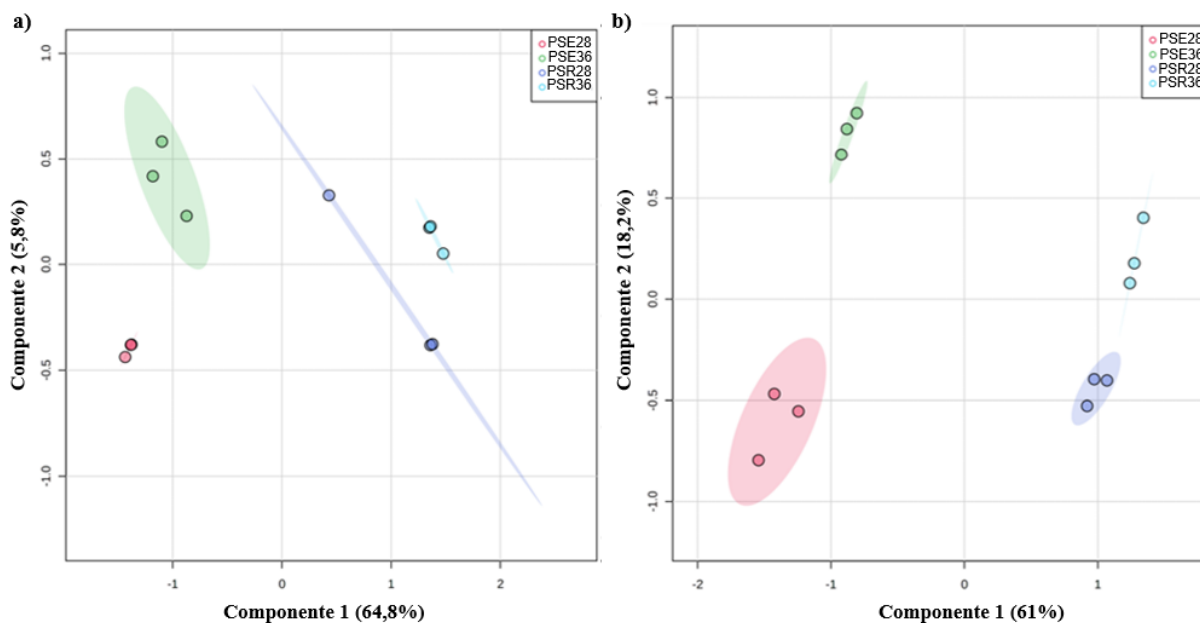


Fonte: autoria própria

A análise de discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) para as amostras de plântulas também demonstrou que ambos os conjuntos de dados foram satisfatoriamente separados em quatro grupos de acordo com o tecido (raiz e endosperma) e a temperatura (28 °C e 36 °C), com a taxa de variação sendo explicada pelo componente 1 muito semelhantes para os dois softwares (figura 20). O componente 2 explicou 5,8% (autovalor 0,58) da variação para os dados do NmrProcflow e 18,2% (autovalor 1,82) para Chenomix, portanto, entende-se que os dados obtidos no Chenomix descrevem melhor o comportamento das amostras de plântula de soja e análises posteriores serão feitas com utilizando esses dados.

Figura 20. Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) do perfil de metabólitos das amostras de plântulas de soja **a)** dados do NmrProcflow **b)** dados do Chenomix.

PS= plântula soja, E28= endosperma 28 °C, E36= endosperma 36 °C, R28= raiz 28°C, R36= raiz 36 °C



Fonte: autoria própria

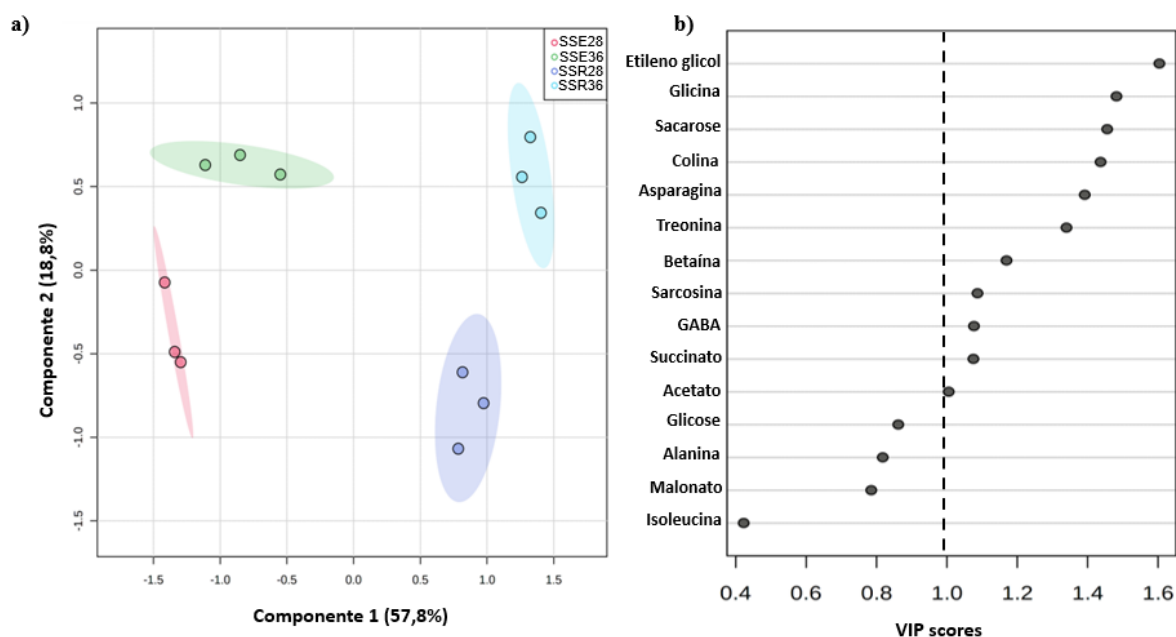
3.4.2 Perfil metabólico das sementes de soja em resposta ao estresse térmico

Como visto no tópico anterior, a análise discriminante dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foi inicialmente feita para avaliar de forma geral como as amostras de semente e plântula de soja se agrupavam em termos de metabolôma associado a temperatura e aos diferentes tecidos da planta (figura 17a). Nas amostras de semente ficou claro que ao longo do eixo x existe uma separação pronunciada entre o metabolôma dos tecidos (raiz e endosperma) e ao longo do eixo y a separação está associada com a temperatura. A análise de grupamento hierárquico acoplada ao mapa de calor (figura 22) também indicou

a presença de dois grupos sendo agrupados de acordo com o tecido da planta, corroborando com as informações fornecidas pelo gráfico de PLS-DA.

Figura 21a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) **b)** Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados nas amostras de sementes de soja.

SS= semente soja, E28= endosperma 28 °C, E36= endosperma 36 °C, R28= raiz 28°C, R36= raiz 36 °C



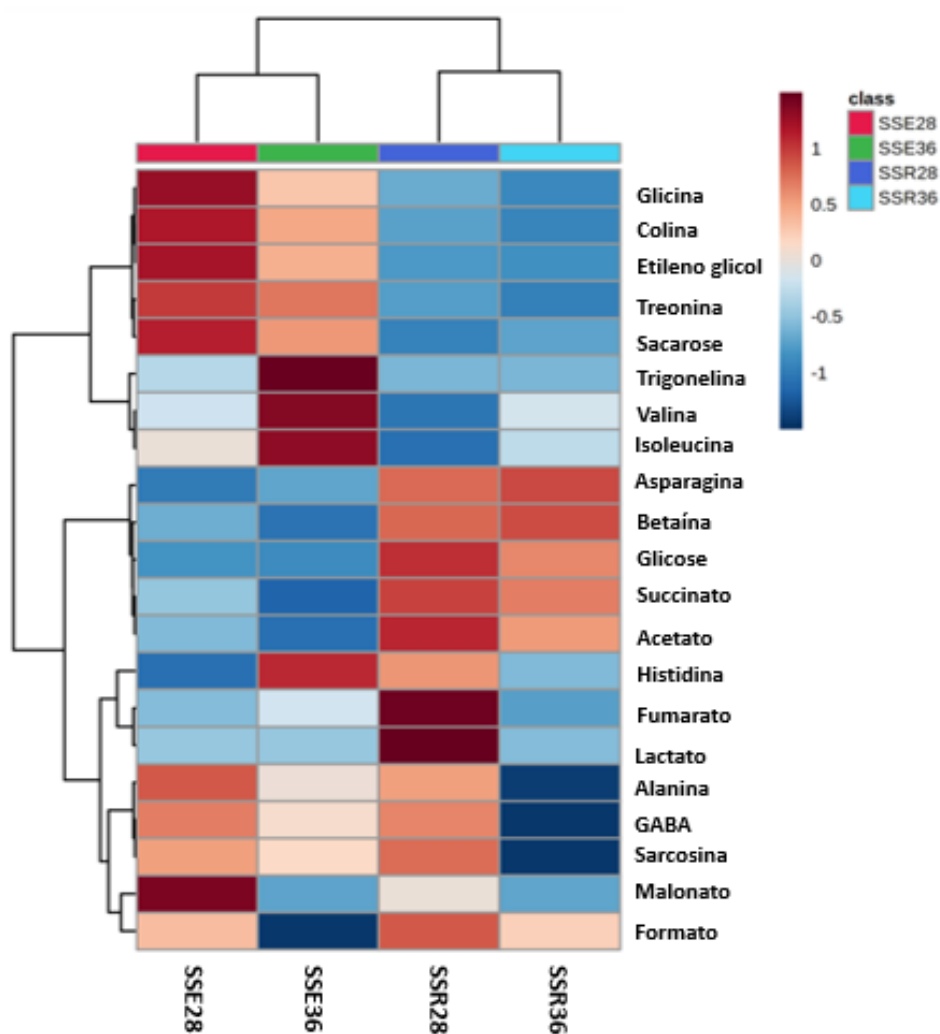
Fonte: autoria própria

Essas diferenças podem ser explicadas pelo comportamento de alguns metabólitos através da Importância variável na projeção (VIP, figura 21b). O VIP é a medida da importância de cada variável no modelo PLS-DA, resumindo a contribuição de cada variável (BANERJEE et al, 2013), neste caso, metabólitos. Uma vez que a média quadrática dos VIP scores é igual a 1, o critério maior que 1 é utilizado para selecionar as variáveis (CHONG et al, 2019). Isto é, apenas metabólitos acima de 1 estão contribuindo de forma significativa para as diferenças em termos de metabolôma. O VIP scores demonstrou a contribuição de 11 metabólitos, incluindo etileno glicol, glicina, sacarose, colina, asparagina, treonina, betaína, sarcosina, GABA, succinato e acetato (figura 21b). Através do mapa de calor é possível ter uma visualização geral da distribuição de cada um

desses metabólitos nas amostras, onde as cores representam os níveis dos metabólitos (figura 22).

Figura 22. Mapa de calor resumindo as mudanças nos níveis relativos de metabólitos nas sementes de soja.

SS= semente soja, E28= endosperma 28 °C, E36= endosperma 36 °C, R28= raiz 28°C, R36= raiz 36 °C.



Fonte: autoria própria.

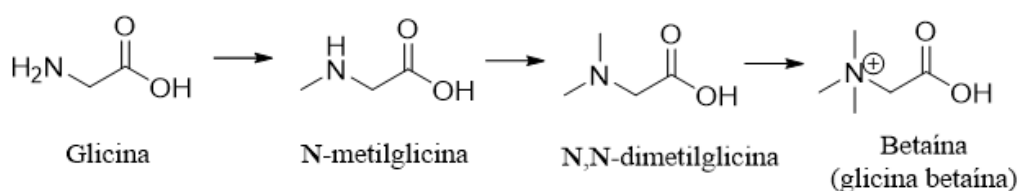
As altas temperaturas provocaram acúmulo de sacarose, asparagina e betaína na raiz. Glicina, colina, treonina, sarcosina, acetato, GABA e succinato

foram reduzidos no endosperma e raiz. Etileno glicol foi reduzido no endosperma (figura 22).

Em plantas superiores a betaína, também chamada de glicina betaína, é sintetizada em altos níveis em resposta a estresses ambientais (CHEN; MURATA, 2002). Estudos indicam que a betaína atua estabilizando a estrutura quaternária de proteínas (CHEN; MURATA, 2002; GORHAM, 1995), evitando a desnaturação dessas proteínas que perdem sua ação biológica e também agem como moléculas tóxicas, causando a morte celular. Além disso, a betaína desempenha um papel importante na proteção de membranas e macromoléculas dos efeitos deletérios do estresse, e seu acúmulo reduz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), amenizando o estresse oxidativo causado pelo estresse térmico (YANG et al, 2007; MCNEIL; NUCCIO; HANSON, 1999).

A glicina é um aminoácido não essencial formado a partir do 3-fosfoglicerato, um subproduto da glicólise. Aminoácidos como a glicina podem atuar de forma direta ou indireta nas respostas das plantas frente ao estresse oxidativo causado pelo estresse térmico. Em mudas de canola expostas ao estresse térmico foi identificado uma redução nos níveis de glicina (VIANA et al, 2022). Foi sugerido que a redução de glicina nas plantas frente a estresses abióticos pode estar relacionada a formação de glicina betaína (figura 23), metabólito que também foi identificado como acumulado nas raízes de sementes de soja, corroborando com a hipótese da atuação indireta da glicina e indicando que a mesma age como precursor para um metabólito, que quando acumulado em tecidos vegetais sob condições desfavoráveis, atua protegendo-os.

Figura 23. Via de metilação da glicina para a síntese da betaína.



Fonte: autoria própria

Plantas de tabaco transformadas para produzir altas concentrações de betaína foram significativamente mais tolerantes a altas temperaturas (YANG; LIANG; LU, 2005), sementes de *Arabidopsis thaliana* transformadas foram capazes de germinar a 50 °C e o crescimento de mudas de plantas transgênicas foi mais acelerado frente as de *Arabidopsis thaliana* não transformadas (HAYASHI; MURATA, 1998).

Açúcares como a sacarose e frutose desempenham função essencial no metabolismo vegetal, eles são precursores na biossíntese de aminoácidos, ácidos graxos e, em última escala, todos os outros presentes nas plantas (SMEEKENS, 2000). A sacarose é o principal açúcar de transporte na maioria das espécies de plantas, sob condições de estresse seus níveis são aumentados (ROLLAND; BAENA-GONZALEZ; SHEEN, 2016; CALDANA et al, 2011). Em plantas *Arabidopsis thaliana* o choque térmico causou o acúmulo de sacarose e outros açúcares que estavam atrelados a termotolerância da planta (KAPLAN et al, 2004). Os açúcares não funcionam apenas como fonte de carbono e energia, mas também atuam como compostos sinalizadores alterando o sistema de expressão gênica (SMEEKENS, 2000; BOLOURI MOGHADDAM; VAN DEN ENDE, 2013).

Tanto o acúmulo quanto a redução da sacarose podem aumentar ou silenciar a expressão de genes (KOCH, 1996). Os genes responsivos aos açúcares representam um importante mecanismo para a sobrevivência das plantas frente a estresses ambientais, foi relatado que vários genes induzidos por temperatura apresentavam elementos responsivos ao açúcar (KAPLAN et al, 2004).

A sacarose é um dissacarídeo que está diretamente envolvido na formação de um ambiente celular pró-oxidante, associado aos processos de fotossíntese e respiração, e também antioxidante, associado a biossíntese de carotenoides (metabólito secundário antioxidante) e a via oxidativa das pentoses-fosfato (SAVCHENKO e TIKHONOV, 2021). Estresses como estresse hídrico e altas temperaturas causam um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), são seguidos por um aumento da sacarose, que teve funções antioxidantes sugeridas principalmente em tecidos onde seus níveis foram aumentados (MORELLI et al, 2003; VAN DEN ENDE;

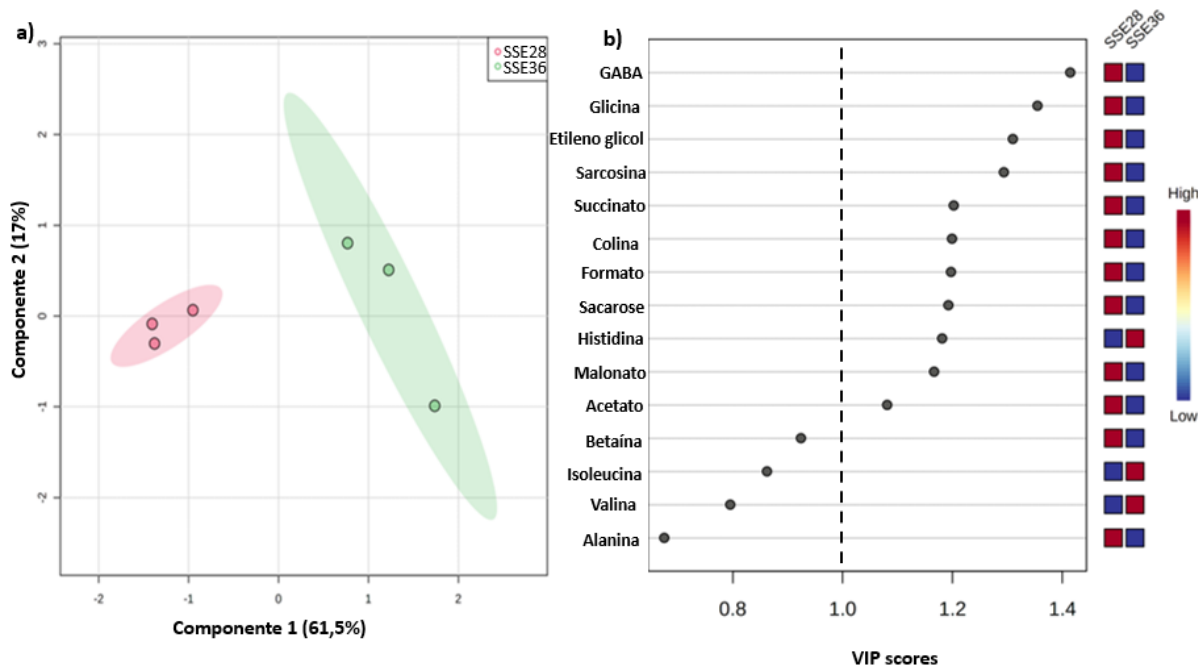
VALLURU, 2009). O acúmulo na raiz, além de estar ligado com produção de energia para que a raiz se desenvolva e seja possível o estabelecimento de plântulas e plantas saudáveis, também pode sugerir que a sacarose esteja atuando como uma molécula osmoprotetora mitigando os efeitos do estresse oxidativo e modulando a expressão gênica de modo a sustentar o crescimento da raiz.

A redução da sacarose no endosperma pode ser explicada pelo consumo da mesma no metabolismo energético, contribuição para a síntese de aminoácidos e construção de paredes celulares para suportar a geminação frente as altas temperaturas (KUHN; GROF, 2010).

Como visto na análise discriminante dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA. Figura 17a) a maior parte da variação no metabolôma da semente foi atribuída aos diferentes tecidos (endosperma e raiz) e a menor variação é atribuída a temperatura. Portanto, para dissecar melhor os efeitos da temperatura, decidiu-se analisar os tecidos separadamente. Analisando o efeito da temperatura no endosperma, o componente principal 1 (PC1) explicou 61,5% (autovalor 6,15) da variação dos dados e o componente principal 2 (PC2) explicou 17% (autovalor 1,7). É possível notar que existe uma diferença no metabolôma das amostras de endosperma de soja relacionada com a temperatura (figura 24a). O VIP scores demonstrou a contribuição de 11 metabólitos para essas diferenças, dentre os quais, GABA, glicina, etileno glicol, sarcosina, succinato, colina, sacarose e acetato se repetem. Histidina e malonato aparecem como novos metabólitos significativos como consequência do maior enfoque na temperatura (figura 24b).

Figura 24a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) **b)** Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados nas amostras de endosperma de sementes de soja.

SS= semente soja, E28= endosperma 28 °C, E36= endosperma

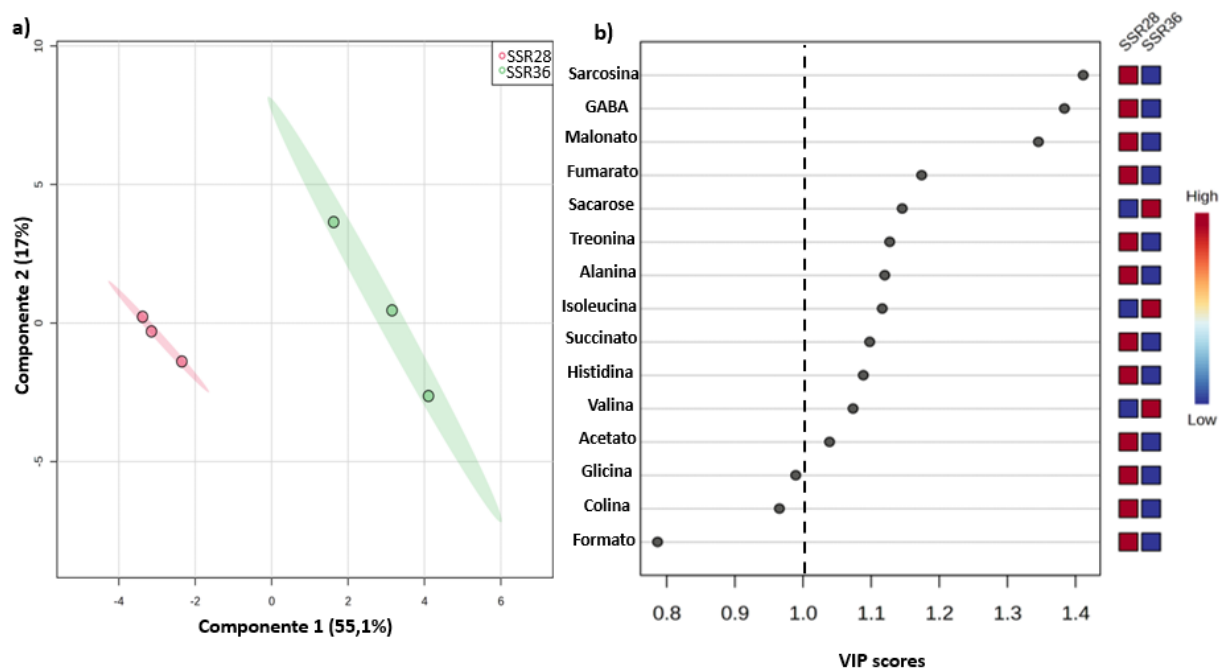


Fonte: autoria própria, 2022

Analisando o efeito da temperatura na raiz, o componente principal 1 (PC1) explicou 55,1% (autovalor 5,51) da variação dos dados e o componente principal 2 (PC2) explicou 17% (autovalor 1,7), também é possível notar que há uma clara diferença no metaboloma das amostras das raízes de soja relacionada com a temperatura (figura 25a). O VIP scores demonstrou a contribuição de 12 metabólitos para essas diferenças, dentre os quais, sarcosina, GABA, fumarato, sacarose, treonina, alanina, isoleucina, succinato, histidina e acetato. Valina e malonato aparecem como novos metabólitos significativos relacionados a temperatura (figura 25b).

Figura 25a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) **b)** Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados nas amostras de raiz de sementes de soja.

SS= semente soja, R28= raiz 28°C, R36= raiz 36 °C.



Fonte: autoria própria, 2022

Comparando os metabólitos que contribuíram para a variação no metabolôma das sementes (endosperma e raiz), sementes (endosperma) e sementes (raiz) é possível notar que há uma semelhança, confirmando coerência dos dados. As diferenças se dão por conta do efeito da temperatura tornar-se mais evidente quando é feita a análise dos tecidos separadamente. O estresse térmico provocou a variação de alguns metabólitos, como o acúmulo de histidina no endosperma e a redução de GABA, succinato, sacarose, glicina, formato, malonato, acetato, etileno glicol e colina (figura 24b). Na raiz foram acumulados maiores níveis dos aminoácidos isoleucina e valina e também houve o acúmulo de sacarose, além da redução de GABA, succinato, fumarato, treonina, malonato, acetato, histidina e alanina (figura 25b).

Leucina, valina e isoleucina formam um grupo denominado aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), classificados assim por apresentar resíduos de hidrocarbonetos ramificados (BINDER et al, 2010). Os aminoácidos fornecem

blocos de construção para a síntese de proteínas e também são importantes em muitas redes metabólicas que controlam o crescimento e desenvolvimento das plantas, atuando como precursores de metabólitos secundários protetores, como alcaloides e glicosídeos (PRATELLI; PILOT, 2014; TAN et al, 2021). Os BCAAs são conhecidos por se acumularem sob condições de estresse abiótico e biótico (XING; LAST, 2017; ZEIER, 2013), esses metabólitos foram acumulados sob estresse térmico durante desenvolvimento de sementes de soja com genótipos tolerantes a altas temperaturas (CHEBROLU et al, 2016).

Estudos demonstram que os níveis de valina e isoleucina foram acumulados em raízes de tomateiro bravo (*Solanum nigrum*) sob estresse de metais pesados (XU et al, 2012) e em tecidos vegetais frente ao estresse hídrico (JOSHI et al, 2010). Esses resultados sugerem que os aminoácidos podem atuar como moléculas osmoprotetoras e sequestradores de espécies reativas de oxigênio (ROS), diminuindo os efeitos do estresse oxidativo (YOU et al, 2019; JOSHI et al, 2010). Outro papel plausível para os aminoácidos, especialmente os BCAAs, é serem doadores alternativos de elétrons para a cadeia de transporte mitocondrial para produzir ATP, isto é, produção de energia (OBATA; FERNIE, 2012).

Também foram demonstradas mudanças nos níveis de histidina em muitas espécies de plantas em resposta a estresses abióticos. Mudas de canola (*Brassica napus L.*) e plantas de festuca dura cultivadas sob altas temperaturas apresentam um acúmulo de histidina (VIANA et al, 2022; WANG et al, 2018). No gergelim (*Sesamum indicum*), a intensidade relativa de alguns aminoácidos, incluindo a histidina, foi maior frente ao estresse hídrico em um genótipo tolerante a seca (YOU et al, 2019). Portanto, o acúmulo de histidina no endosperma, isoleucina e valina na raiz de sementes de soja pode estar contribuindo para desenvolvimento dessas sementes frente ao estresse térmico, modulando o metabolismo energético e contribuindo para a homeostase celular.

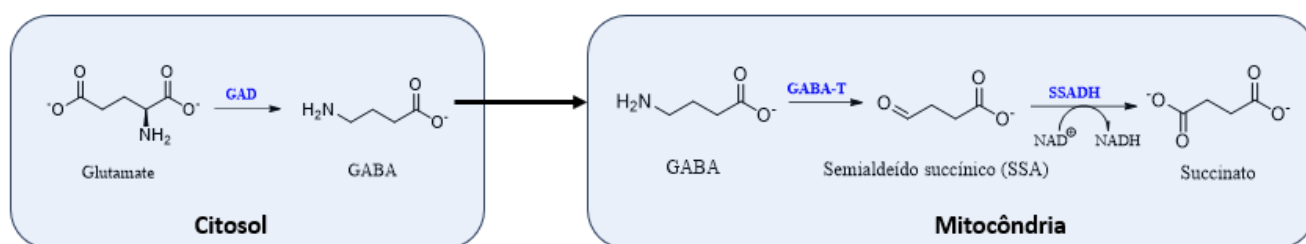
O GABA é um metabólito bastante discutido no que se refere as respostas das plantas frente a estresses, diversos estudos apontam sua rápida e ampla produção na resposta a estresses abióticos (BAXTER et al, 2007; BOUCHE; FROMM, 2004; KINNERSLEY, 2000). O GABA é sintetizado para atuar como uma molécula osmoprotetora, podendo induzir a tolerância ao calor. No

endosperma e nas raízes de sementes de soja houve uma redução do GABA, sugerindo que seu catabolismo foi aumentado a 36°C. Uma vez que o GABA atua como uma molécula de sinalização, eram esperados níveis maiores deste metabólito nas sementes estressadas em comparação com as germinadas em condições normais. Uma das hipóteses que estes resultados podem levantar é que sementes de soja quando submetidas as altas temperaturas não adotam esse mecanismo de defesa e sinalização.

Um dos produtos do catabolismo do GABA através da via *shunt* GABA é o succinato (figura 26), ácido orgânico intermediário do ciclo de Krebs. O succinato também apresentou níveis reduzidos no endosperma e raiz, ou seja, o succinato que foi catabolizado pode estar sendo utilizado para alimentar o ciclo de Krebs, que é uma via chave na produção de energia e para os processos metabólicos que conduzem as defesas da planta (ANSARI, 2021; JANSE VAN RENSBURG; LIMAMI; VAN DEN ENDE, 2021).

Figura 26. Via de degradação do GABA (*shunt* GABA).

O GABA é sintetizado a partir do glutamato via glutamato descarboxilase (GAD) no citosol. Na mitocôndria, a enzima GABA transaminase (GABA-T) catalisa a produção de semialdeído succínico (SSA), que produz succinato e NADH através da ação da enzima semialdeído succínico desidrogenase (SSADH).



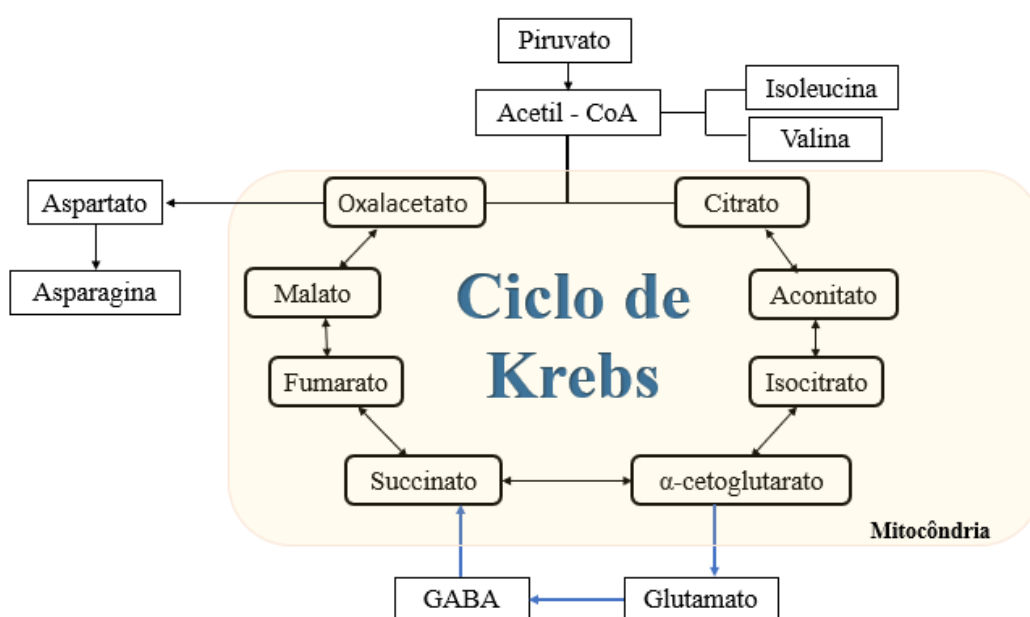
Fonte: autoria própria.

Para além da redução de GABA e succinato no endosperma e raiz das sementes de soja, a redução de fumarato nas raízes (figura 25b) corrobora com a hipótese de que, sob estresse térmico, os intermediários do ciclo de Krebs (figura 27) estão sendo consumidos para alimentar o ciclo e aumentar sua

atividade. Outras culturas também apresentaram uma redução nos níveis de fumarato e succinato quando expostas a estresses abióticos. Plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas ao aquecimento prologado apresentaram níveis de fumarato e succinato diminuídos (WANG et al, 2020), assim como em raízes submetidas ao estresse oxidativo (LEHMANN et al, 2012).

Figura 27. Representação esquemática do ciclo de Krebs e via GABA shunt

As setas em azul representam a via GABA shunt de forma simplificada.



Fonte: autoria própria.

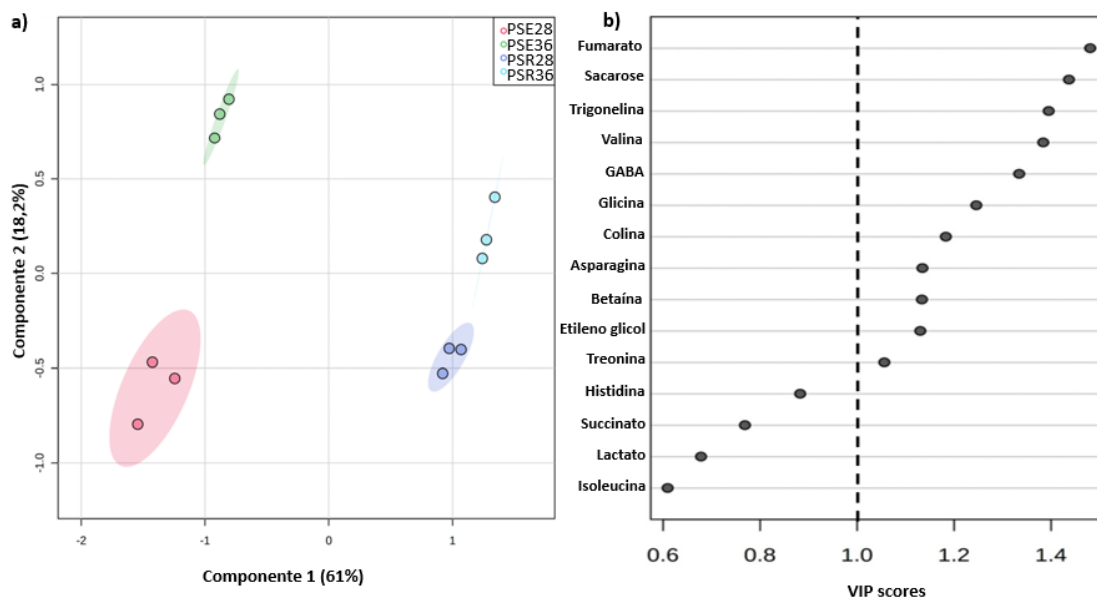
Portanto, a redução de succinato, fumarato e GABA estão regulando a resposta das sementes ao estresse de modo que acontece uma mobilização para o fornecimento de energia através do ciclo de Krebs, uma via intermediária no metabolismo vegetal, que é um dos principais responsáveis por fornecer elétrons para cadeia de transporte de elétrons mitocondrial para produzir ATP (OBATA; FERNIE, 2012). Adicionalmente, pode-se sugerir que a redução dos metabólitos citados esteja subsidiando a produção de aminoácidos ligados direta e indiretamente ao ciclo de Krebs, como, por exemplo, asparagina, valina e isoleucina que apresentam níveis aumentados.

3.4.3 Perfil metabólico das plântulas de soja em resposta ao estresse térmico

Nas amostras de plântulas ficou claro que ao longo do eixo x existe uma separação entre o metaboloma dos tecidos (raiz e endosperma) e ao longo do eixo y a separação está associada com a temperatura (figura 28a), com o componente 1 explicando 61% da variação total (autovalor 6,1) e o componente 2 explicando 18% (autovalor 1,8). As diferenças no metaboloma podem ser explicadas pelo comportamento de alguns metabólitos, através da Importância variável na projeção (VIP, figura 24b). O VIP scores demonstrou a contribuição de 11 metabólitos, incluindo fumarato, sacarose, trigonelina, valina, GABA, glicina, colina, asparagina, betaína, etileno glicol e trigonelina (figura 28b).

Figura 28a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) **b)** Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados nas amostras de plântulas de soja.

PS= plântula soja, E28= endosperma 28 °C, E36= endosperma 36 °C, R28= raiz 28°C, R36= raiz 36 °C



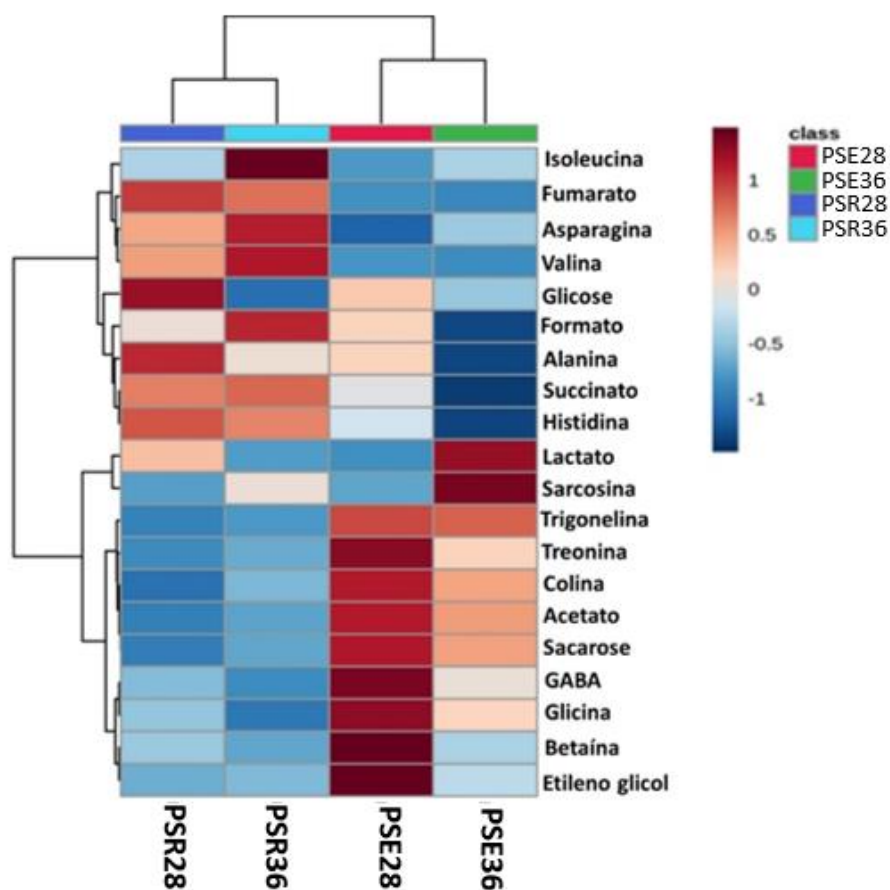
Fonte: autoria própria.

O estresse térmico nas plântulas provocou o acúmulo de asparagina no endosperma e raiz, além disso, trigonelina, valina e colina também tiveram seus níveis aumentados na raiz. Houve redução de fumarato, GABA e glicina na raiz e endosperma. Treonina e sacarose demonstraram acúmulo na raiz e redução no endosperma. Etileno glicol foi reduzido no endosperma e betaína foi reduzida na raiz e aumentada no endosperma.

A trigonelina é um alcaloide pertencente ao metabolismo secundário das plantas, seus níveis são aumentados quando as plantas são estressadas. Folhas de soja com deficiência de ferro apresentaram concentrações maiores de trigonelina, foi sugerido que este alcaloide pode estar envolvido na cadeia de transdução de sinal ligada à resposta da planta ao estresse oxidativo (LIMA et al, 2014). A trigonelina também é responsiva ao estresse salino, à medida que folhas de soja foram expostas a concentrações progressivas de NaCl, houve um aumento no teor de trigonelina, sugerindo que a mesma esteja atuando como molécula osmoprotetora (CHO; LIGHTFOOT e WOOD, 1999). Além de estar atuando como molécula sinalizadora e osmoprotetora, a trigonelina pode estar impedindo a inibição da atividade de várias enzimas, visto que o papel deste alcaloide na proteção de enzimas vegetais e animais conferindo estabilidade térmica as mesmas também já foi demonstrado (JONES et al, 1991).

Figura 29. Mapa de calor resumindo as mudanças nos níveis relativos de metabólitos nas plântulas de soja.

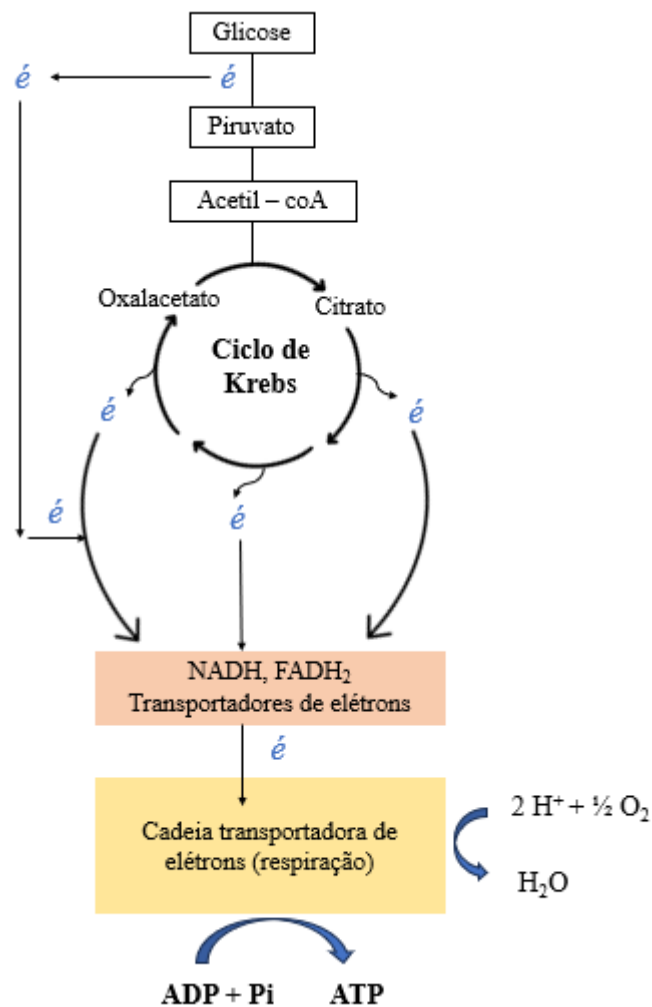
PS= semente soja, E28= endosperma 28 °C, E36= endosperma 36 °C, R28= raiz 28°C, R36= raiz 36 °C.



A redução do fumarato no endosperma e raiz de plântulas (figura 29) pode ser um indicativo de que houve um aumento da atividade do ciclo de Krebs, - assim como nas sementes-, aumentando a fonte de energia e regulando positivamente a respiração celular, tendo em vista que a respiração envolve as vias da glicólise, ciclo de Krebs e cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (WANG, et al, 2020). Além disso, como já citado, este ciclo desempenha um importante papel no metabolismo vegetal, por ser acoplado à síntese de ATP (figura 30) e por fornecer carbono para diversas vias metabólicas (NASCIMENTO, 2017).

Figura 30. estágios da respiração celular: da glicólise a produção de ATP

Os processos que acontecem na glicólise e no ciclo de Krebs são oxidativos, onde elétrons são liberados e são capturados pelas coenzimas NADH e FADH₂, que transportam esses elétrons para uma cadeia transportadora de elétrons, a cadeia respiratória, reduzindo ao final O₂ a H₂O. A quantidade de energia liberada nesses processos é conservada na forma de ATP, por meio da fosforilação oxidativa.



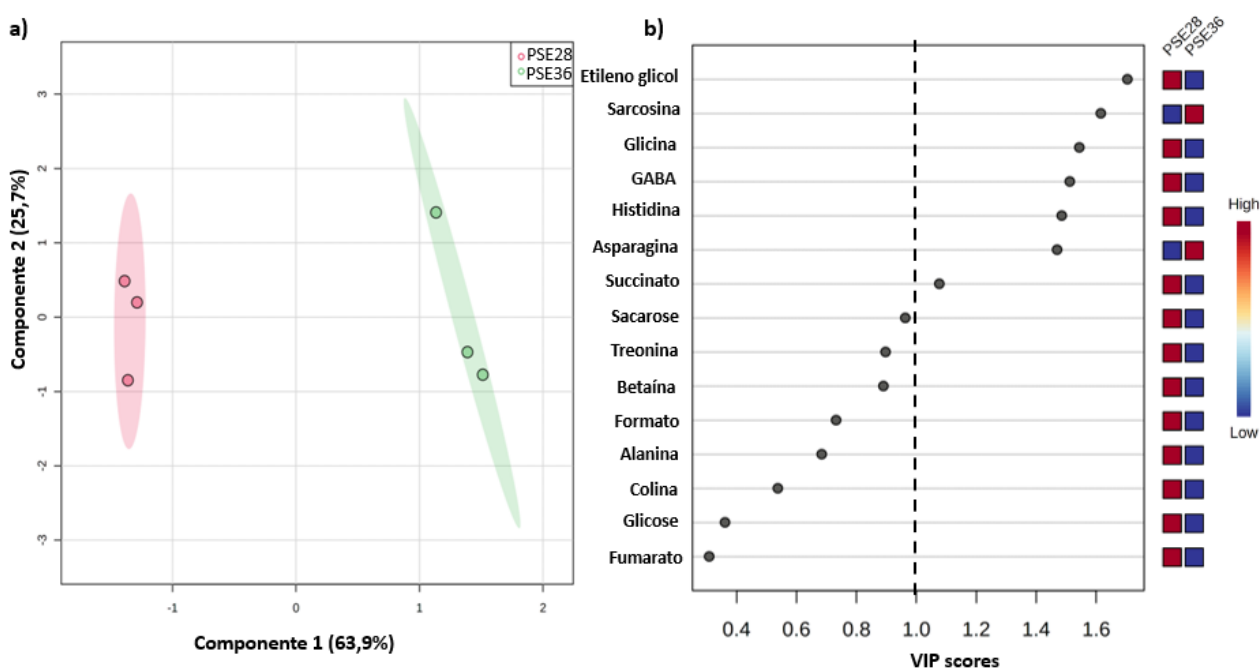
Fonte: adaptado de Nelson e Cox, 2014.

Assim como para as amostras de sementes, a análise discriminante dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para as amostras de plântulas de soja também demonstrou que a maior parte da variação no metaboloma da semente é atribuída aos diferentes tecidos (endosperma e raiz) e a menor variação é atribuída à temperatura. Logo, os tecidos também foram analisados separadamente para um maior entendimento dos efeitos da temperatura.

Analisando o efeito da temperatura no endosperma, o componente principal 1 (PC1) explicou 63,9% (autovalor 6,39) da variação dos dados e o componente principal 2 (PC2) explicou 25,7% (autovalor 2,57), é possível notar que há uma clara diferença no metaboloma em resposta a temperatura (figura 31a). O VIP scores apontou a contribuição de 8 metabólitos para essas diferenças, incluindo etileno glicol, sarcosina, glicina, GABA, histidina, asparagina, succinato e sacarose (figura 31b).

Figura 31a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) **b)** Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados nas amostras de endosperma de plântulas de soja.

PS= semente soja, E28= endosperma 28 °C, E36= endosperma 36 °C



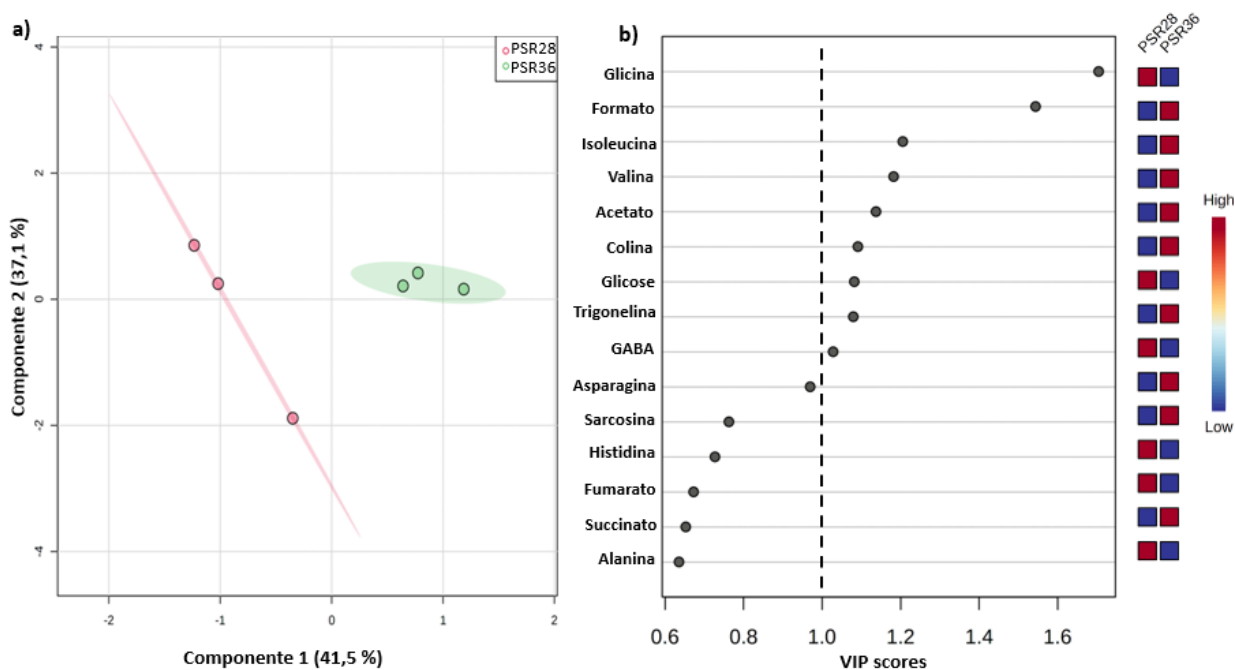
Fonte: autoria própria, 2022

Analisando o efeito da temperatura nas raízes de plântulas de soja, o componente principal 1 (PC1) explicou 41,5% (autovalor 4,15) da variação dos dados e o componente principal 2 (PC2) explicou 37,1% (autovalor 3,71), também é possível notar que há uma diferença no metaboloma das amostras

das raízes de plântulas de soja relacionada com a temperatura (figura 32a). O VIP scores demonstrou a contribuição de 10 metabólitos para essas diferenças: glicina, formato, isoleucina, valina, acetato, colina, glicose, trigonelina, GABA e asparagina (figura 32b).

Figura 32a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) **b)** Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados nas amostras de raiz de plântulas de soja.

PS= semente soja, R28= endosperma 28 °C, R36= endosperma 36 °C



Fonte: autoria própria.

No endosperma foi demonstrado um acúmulo dos aminoácidos asparagina e sarcosina, e redução de succinato, GABA, sacarose, histidina, glicina e glicose (Figura 31b). Nas raízes das plântulas houve o acúmulo dos ácidos orgânicos, formato e acetato, dos aminoácidos valina, asparagina, isoleucina, e também de colina e trigonelina, além da redução da glicose, GABA e glicina (figura 32b).

No geral, plantas submetidas ao calor e a outros estresses abióticos podem apresentar como resposta o acúmulo de ácidos orgânicos (PARIDA; PANDA; RANGANI, 2018). Em plantas de girassol (*Helianthus annuus L.*) e erva-fina (*Agrostis stolonifera*), essa classe de metabólitos foi regulada positivamente durante o estresse hídrico (ANDRADE, 2021.; Li et al, 2017).

Os ácidos orgânicos desempenham diversas funções nas plantas em resposta a diferentes tipos de estresses, como, por exemplo, contrabalancear a absorção desigual de íons (cargas catiônicas), visto que ocorrem como ânions carboxílicos sob pH fisiológico, além de atuar como osmoprotetores (ANDRADE, 2021). Também atuam reduzindo um possível desequilíbrio iônico ocasionado pelo estresse térmico. Os ácidos orgânicos como formato e acetato, podem ser fontes de carbono mais prontamente disponíveis subsidiando o crescimento e desenvolvimento das raízes de plântulas de soja frente ao estresse.

Várias condições de estresse abiótico levam as plantas a produzirem níveis aumentados de aminoácidos (SAVCHENKO; TIKHONOV, 2021.; PARIDA; PANDA; RANGANI, 2018.; DI MARTINO et al, 2003). A sarcosina foi acumulada no endosperma, assim como asparagina teve seus níveis aumentados no endosperma e raiz. Na raiz das plântulas, também houve o acúmulo de isoleucina e valina (figura 32b) e um leve acúmulo de treonina (29). Brotos de canola (*Brassica napus L*) estressados pelo calor apresentaram um acúmulo expressivo de asparagina, assim como em sementes de soja produzidas a partir de plantas com gene tolerante ao calor (CHEBROULU et al, 2016). O estresse hídrico também provocou um aumento de asparagina e sarcosina em uva (*Vitis vinífera*) e milho (*zea mays*) (GAVAGHAN et al, 2011.; KATAM et al, 2022).

Os aminoácidos são importantes metabólitos primários relacionados ao estresse térmico, são sintetizados em maiores níveis durante o estresse para serem utilizados com osmólitos compatíveis e também como fonte de nitrogênio orgânico, um dos nutrientes exigidos em maior quantidade pelas plantas (HILDEBRANDT, 2018.; ZEIER, 2013). Além disso, os conteúdos desses metabólitos ajudam na tolerância ao estresse por meio da regulação do pH intracelular e desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (KHAN et al, 2020). Em contrapartida, aminoácidos como GABA, glicina (figura 31b) e betaína

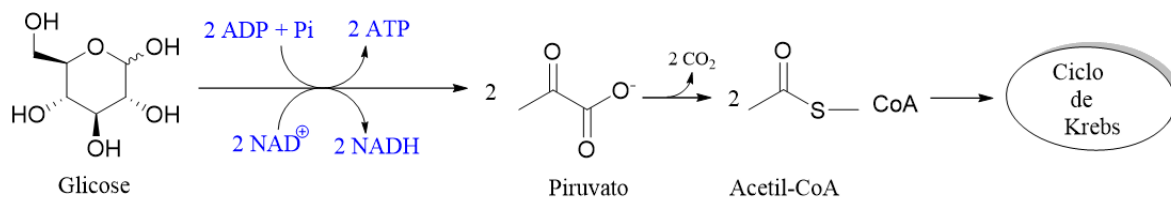
foram reduzidos no endosperma e raiz das plântulas (figura 29). É provável que esta redução esteja intimamente ligada com a produção de proteínas, uma vez que, aminoácidos são blocos de construção para essas macromoléculas. As proteínas vegetais atuam em plântulas emergentes como fonte de nutrição para que as mesmas possam se desenvolver, desempenhando funções enzimáticas e estruturais (RASHEED, et al, 2020). Temperaturas elevadas podem causar a desnaturação de proteínas, sendo assim, as plântulas de soja podem utilizar aminoácidos para a construção de novas unidades.

Assim como nas sementes de soja estressadas, houve a redução de succinato e GABA no endosperma das plântulas, fumarato também apresentou níveis reduzidos frente às altas temperaturas. Novamente, a alteração nos níveis destes metabólitos indica que houve uma alteração positiva no funcionamento do ciclo de Krebs nas plântulas.

Nas raízes e endosperma das plântulas foi demonstrado uma redução nos níveis de glicose e GABA sob altas temperaturas (figura 31b 32b). A glicose é uma das principais moléculas que fornecem energia (figura 30) e uma importante molécula de sinalização, regulando o metabolismo intermediário e respiratório das plantas, além de modular a expressão gênica (ROLLAND; BAENA-GONZALEZ; SHEEN, 2006). Outras culturas como o milho, cevada (*Hordeum vulgare L.*) e canola (*Brassica napus L.*) apresentaram redução de glicose frente a estresses abióticos, incluindo estresse térmico (GAVAGHAN et al, 2011.; PATTERSON et al, 2009.; VIANA et al, 2022).

Açúcares como a glicose desempenham efeitos importantes em todos o ciclo de vida da planta, desde a germinação, crescimento vegetativo até o desenvolvimento reprodutivo (SMEEKENS, 2000). Na glicólise, uma molécula de glicose é oxidada a duas moléculas de piruvato. O piruvato é oxidado, gerando o grupo acetil da acetil-coenzima A, que é então completamente oxidado no ciclo de Krebs (figura 33). Para cada molécula de glicose degradada, são geradas duas moléculas de ATP (energia) e duas moléculas de NADH (NELSON; COX, 2014). Os elétrons produzidos nessas reações de oxidação são transportados pela cadeia de transporte mitocondrial (figura 30) alimentando a respiração nas células vegetais (PLAXTON, 1996).

Figura 33. Esquema simplificado do processo glicólise até o ciclo de Krebs.



Fonte: autoria própria.

A diminuição no conteúdo de glicose na raiz e endosperma das plântulas de soja sugere um aumento no fornecimento de energia, tendo em vista que mais moléculas de glicose estão sendo degradadas e, conseqüentemente, mais elétrons estão sendo transportados para o sistema respiratório. Esta hipótese pode ser reforçada pelo aumento na atividade do ciclo de Krebs, etapa que acontece subsequente a glicose e que também está ligada a produção de energia e respiração celular.

Em linhas gerais, foi demonstrado que o estresse térmico induziu o acúmulo de alguns aminoácidos nas sementes, incluindo os aminoácidos de cadeia ramificada, asparagina, betaína e histidina. Nas plântulas também houve o acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada e asparagina, além de treonina e sarcosina. Esta parece ser uma resposta sistêmica das plantas quando submetida as altas temperaturas, visto que, há diversos estudos que relatam esse tipo de alteração frente a estresses abióticos (OBATA; FERNIE, 2012; JOSHI et al, 2010; SANCHEZ et al, 2008; PARIDA; PANDA; RANGANI, 2018; BINDER, 2010). Todavia, a redução no conteúdo de outros aminoácidos como, GABA, glicina, e alanina, parece estar contribuindo para a construção de novas proteínas.

O aumento da temperatura regulou positivamente o ciclo de Krebs e a atividade da glicólise, duas importantes vias metabólicas que estão ligadas a produção energética e a respiração celular, indicada pela diminuição dos intermediários do ciclo, succinato e fumarato, e de GABA e a diminuição de glicose. Os resultados até aqui demonstram como uma característica forte em

sementes e plântulas de soja a modulação do metabolismo energético para lidar com os efeitos adversos do estresse abiótico.

Até o momento, os dados baseados nas análises via RMN de ^1H nos auxiliam na compreensão sobre quais os comportamentos de metabólitos importantes quando sementes e plântulas de soja são submetidas as altas temperaturas. Essa investigação continuou analisando os dados de GC-MS.

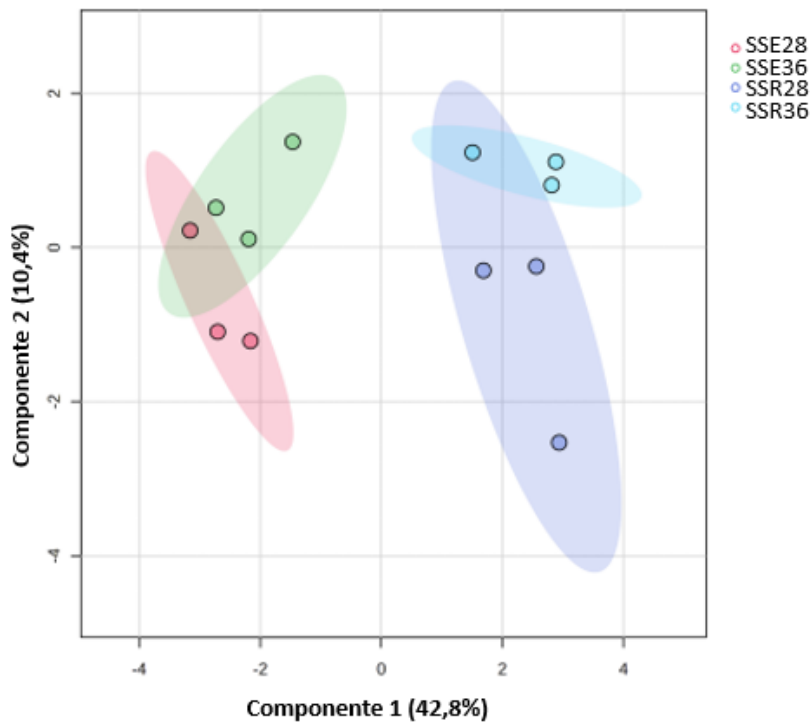
3.5 Características metabólicas da resposta de soja ao estresse térmico via GC-MS

3.5.1 Perfil metabólico das sementes de soja em resposta ao estresse térmico analisado via GC-MS.

A análise de discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) demonstrou que o conjunto de amostras foi separado em dois grupos, nota-se uma clara separação ao longo do eixo x que se dá em termos dos tecidos da planta (figura 34). É possível visualizar que quase não há separação das amostras em virtude da temperatura, onde o componente 2 explicou apenas 10,4% (autovalor 1,04) exemplifica bem esta observação. Portanto, para avaliar os efeitos que as altas provocaram no metabolôma das sementes de soja, os tecidos foram analisados separadamente.

Figura 34. Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) do conjunto de metabólitos identificados nas amostras de sementes de soja via GC-MS.

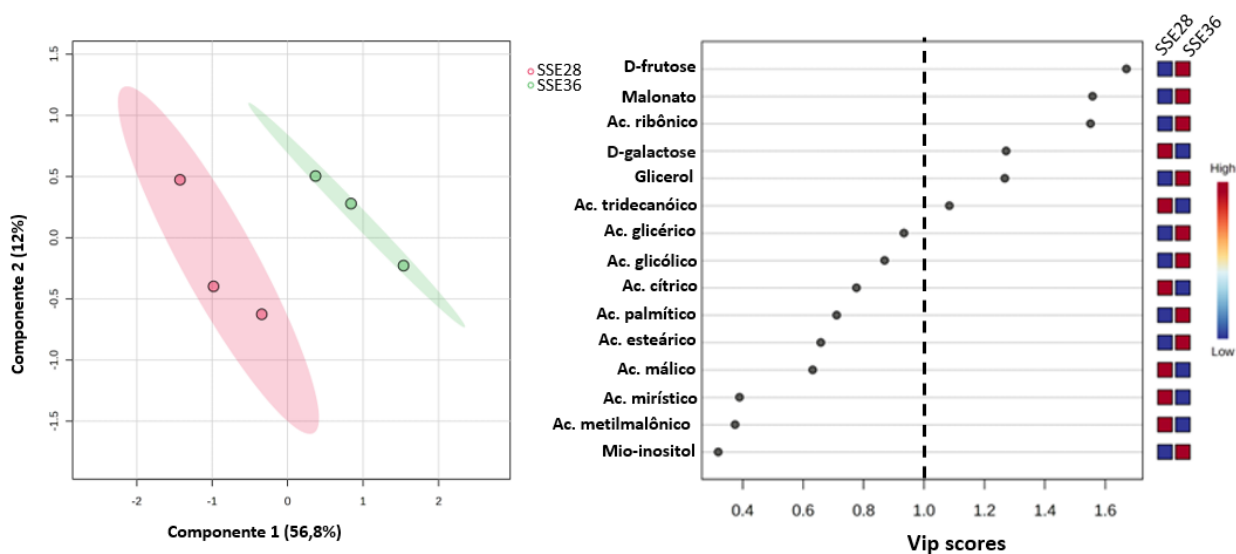
SS= semente soja, E28= endosperma 28 °C, E36= endosperma 36 °C, R28= raiz 28°C, R36= raiz 36 °C.



Fonte: autoria própria.

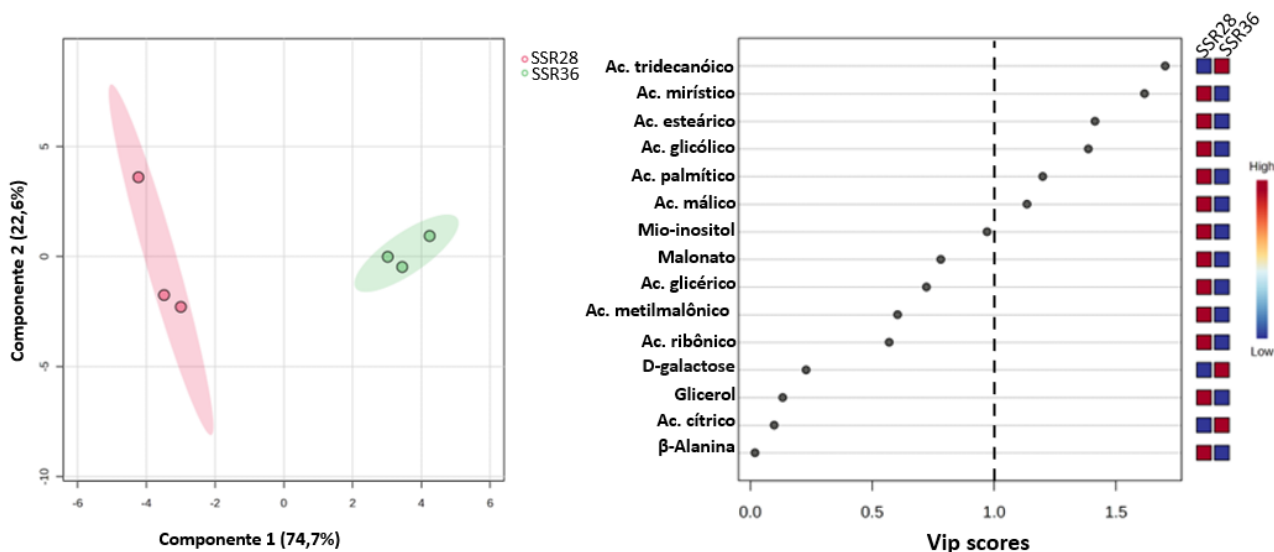
Analisando o efeito da temperatura no endosperma, é perceptível que existe uma diferença no metaboloma relacionada ao estresse térmico (figura 35a), onde o componente principal 1 explica 56,8% (autovalor 5,68) da variação dos dados e o componente principal 2 explica 12% (autovalor 1,2%). O VIP scores apontou a contribuição de 8 metabólitos (figura 35b) que explicam essa diferença: D-frutose, malonato, ácido ribônico, D-galactose, glicerol, ácido tridecanóico e os ácidos glicérico e glicólico também foram selecionados por estarem próximos ao 1.

Figura 35a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) **b)** Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados nas amostras de endosperma de sementes de soja via GC-MS.



Analisando o efeito da temperatura na raiz, o componente principal 1 (PC1) explicou 74,7% (autovalor 7,47) da variação dos dados e o componente principal 2 (PC2) explicou 22,6% (autovalor 2,26). Também é possível notar que há uma grande diferença no metabolôma das amostras das raízes de soja relacionada com a temperatura (figura 36a). O VIP scores demonstrou a contribuição de 8 metabólitos para essas diferenças: ácido tridecanóico, ácido mirístico, ácido esteárico, ácido glicólico, ácido palmítico, além de mio-inositol e malonato, que também foram selecionados por estarem próximos a 1 (figura 36b).

Figura 36a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) **b)** Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados nas amostras de raiz de sementes de soja via GC-MS.



Tanto no endosperma quanto na raiz das sementes de soja houve uma redução de ácidos graxos, o endosperma apresentou menores níveis do ácido tridecanóico e, na raiz, os ácidos mirístico, esteárico e palmítico foram reduzidos na condição de estresse. D-galactose, malonato e os ácidos glicérico e ribônico também foram reduzidos no endosperma e glicerol foi aumentado. Na raiz, mio-inositol, malonato e os ácidos málico e glicólico apresentaram níveis reduzidos.

Os lipídeos na forma de triacilgliceróis (TGA) são os compostos de armazenamento de energia mais abundantes em sementes de muitas culturas, como girassol (*Helianthus annuus*), milho (*Zea mays*) e soja (*Glycine max L.*). Os TAGs são as principais reservas de ácidos graxos essenciais para a produção de energia durante a germinação das sementes e o estabelecimento inicial de plântulas (XU; SHANKLIN, 2016.; GRAHAM, 2008).

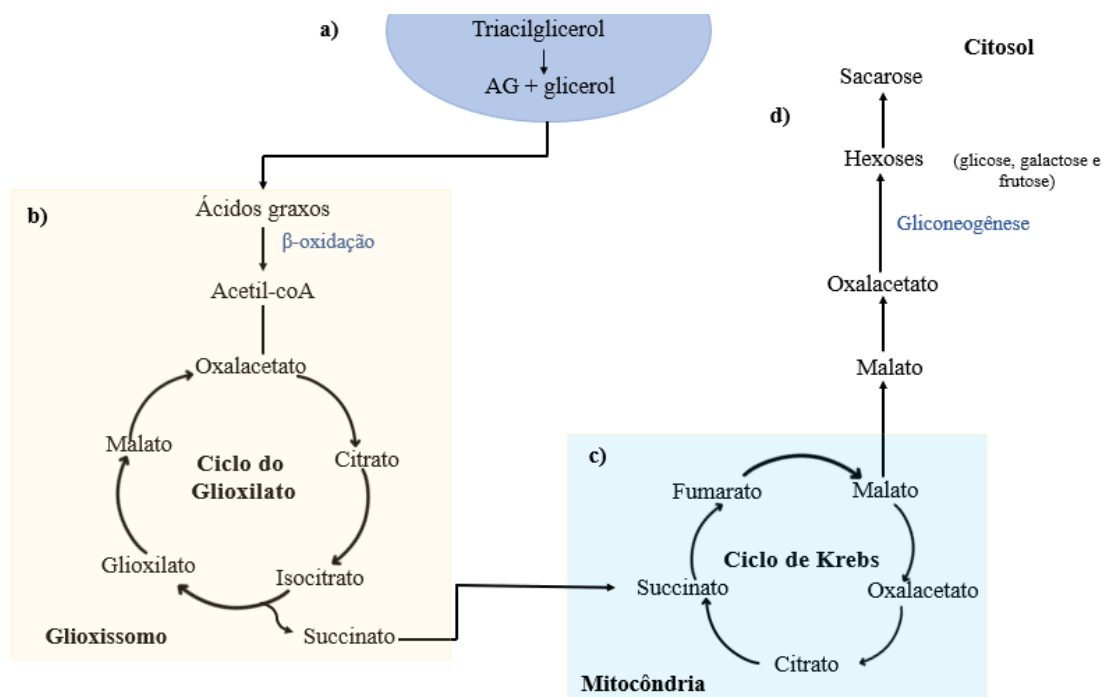
A mobilização dos lipídeos armazenados envolve a indução coordenada de algumas vias bioquímicas. A primeira etapa é marcada pela lipólise dos TAGs catalisada pelas lipases para produzir ácidos graxos livres e glicerol (figura 34a). Os ácidos graxos são transportados para o glioxissomo, onde são catabolizados através da via da β -oxidação para a produção de acetil-coA, essa via fornece energia metabólica e esqueletos de carbono durante a germinação (EASTMOND, 2000; GRAHAM, 2008). Neste estudo, nas sementes estressadas

pela temperatura foi observado uma diminuição nos níveis dos ácidos graxos, seguido pelo aumento de glicerol no endosperma. Isso sugere que lipólise está sendo positivamente regulada e os ácidos graxos estão sendo catabolizados em acetil-coA. A acetil-coA é metabolizada no glioxissomo através do ciclo do glioxilato para a produção de succinato (figura 33b), que é então transportado para a mitocôndria, onde é convertido primeiro em fumarato depois em malato via ciclo de Krebs (figura 33c) (TAIZ et al, 2015).

Nas sementes, como já relatado, houve uma redução de succinato e fumarato, e a redução do malato (ácido málico) também foi demonstrada por meio dos dados de GC-MS (figura 35b e 36b). Uma vez que, a β -oxidação foi aumentada com o aumento da temperatura, a redução nos níveis desses metabólitos intermediários indica que os mesmos estão sendo catabolizados para fornecer energia para os processos de germinação e manter a homeostase celular.

Figura 37. Conversão de lipídios em sacarose. **a)** lipólise de triacilglicerol; **b)** β -oxidação de ácidos graxos para produzir succinato; **c)** produção de malato; **d)** produção de sacarose.

AG= ácido graxo



Fonte: autoria própria.

Por fim, o malato produzido na mitocôndria é transportado para o citosol, onde é convertido a hexoses e posteriormente a sacarose através da via da gliconeogênese (figura 37d), o catabolismo do malato indica que esse processo está sendo alimentado quando as sementes experimentam altas temperaturas. Hexoses são monossacarídeos formados por uma cadeia carbônica de seis átomos, esses monossacarídeos podem ser utilizados para a construção de parede celular ou serem convertidos em sacarose (GRAHAM, 2008).

Foi registrado uma redução de D-galactose e sacarose no endosperma das sementes (figura 35b), enquanto que nas raízes a sacarose foi aumentada (figura 36b). Tanto sacarose quanto D-galactose podem estar sendo utilizadas para a construção de paredes celulares no endosperma, de modo a apoiar a germinação sob estresse. Além disso, as plantas transportam a sacarose produzida no endosperma para suportar o crescimento de outros tecidos, como a raiz (TAIZ et al, 2015), o que explica o aumento de sacarose na raiz das sementes.

O mio-inositol é um composto bastante versátil e apresenta um papel importante da biologia vegetal. Além de ser usado no crescimento e desenvolvimento das plantas, o mio-inositol é utilizado como precursor para muitos metabólitos importantes, incluído ascorbato e solutos compatíveis como galactinol e oligossacarídeos da família da rafinose (VALLURU; VAN DEN ENDE, 2011). Esses derivados participam de várias funções celulares vitais como transdução de sinal e tolerância ao estresse (JIA et al, 2019). A sua redução na raiz da semente pode estar sinalizando o estresse térmico, assim como seu catabolismo pode estar contribuindo para produção de seus derivados, que por consequência pode ajudar no crescimento da raiz.

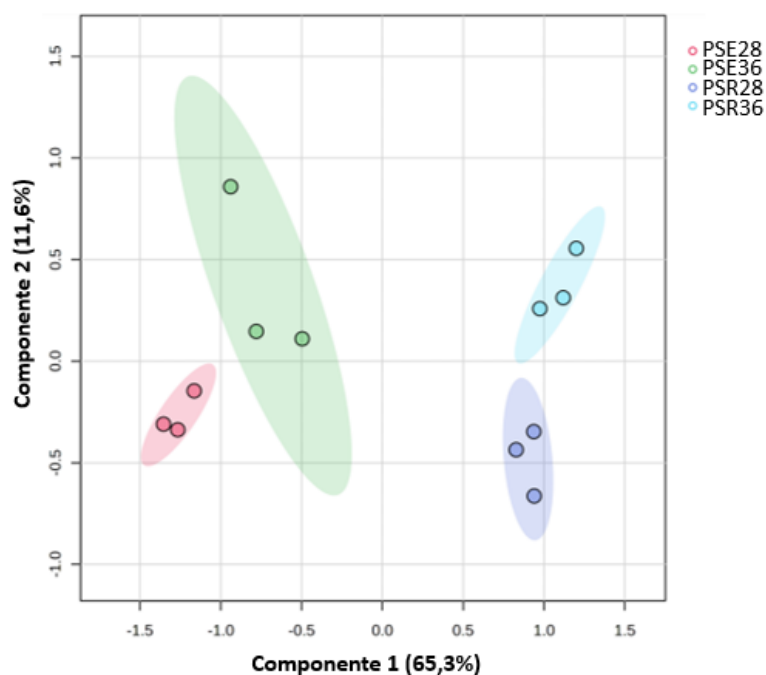
3.5.2 Perfil metabólico das plântulas de soja em resposta ao estresse térmico analisado via GC-MS.

Analisando o gráfico de PLSA-DA para as amostras de plântulas, percebe-se a divisão de quatro grupos relacionados ao tecido (raiz e endosperma) e a temperatura (22 e 36 °C). Ao longo do eixo x existe uma grande separação entre os metabolômas dos tecidos e ao longo do eixo y a uma

separação significativamente menos expressiva está associada com a temperatura (figura 38), com o componente 1 explicando 65% da variação total (autovalor 6,5) e o componente 2 explicando 11,6% (autovalor 1,16). Uma vez que as amostras de plântula demonstraram que a maior variação no metabolôma foi atribuída aos diferentes tecidos e não a temperatura, as amostras dos tecidos serão analisadas separadamente, buscando um entendimento mais amplo dos efeitos das altas temperaturas.

Figura 38. Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) do conjunto de metabólitos identificados nas amostras de plântulas de soja via GC-MS.

PS= plântula soja, E28= endosperma 28 °C, E36= endosperma 36 °C, R28= raiz 28°C, R36= raiz 36 °C



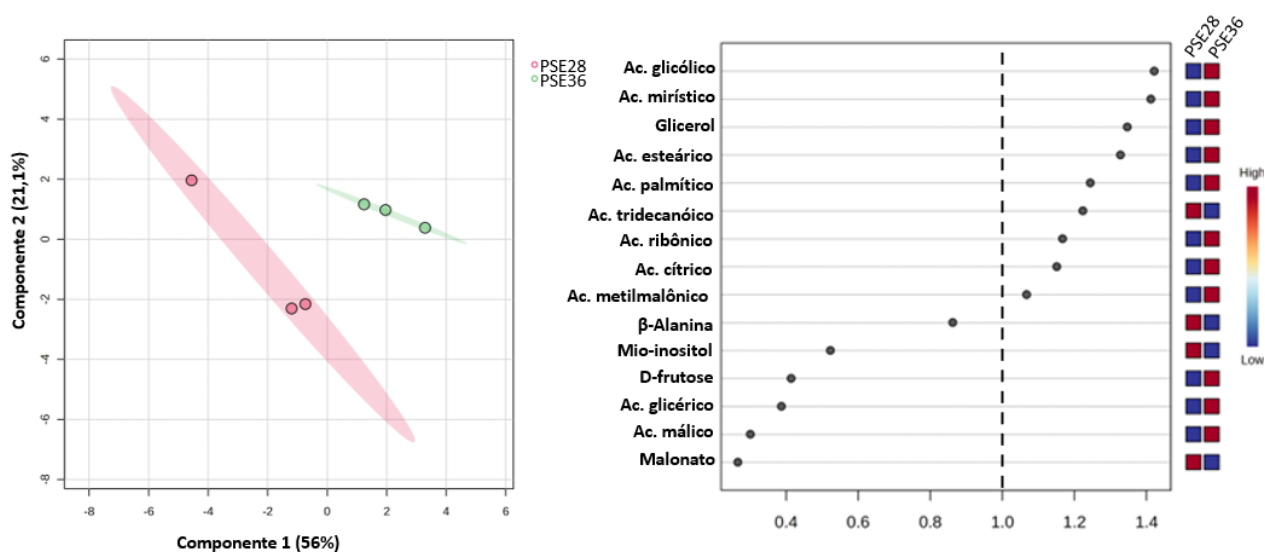
Fonte: autoria própria

Analisando o efeito da temperatura no endosperma, o componente principal 1 explicou 56% (autovalor 5,6) da variação dos dados e o componente principal 2 explicou 21,1% (autovalor 2,11) (figura 39a). O VIP scores apontou a contribuição de 10 metabólitos: ácido glicólico, ácido mirístico, glicerol, ácido

esteárico, ácido palmítico, ácido tridecanóico, ácido ribônico, ácido cítrico, ácido metilmalônico e β -Alanina (figura 39b).

Figura 39a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) **b)** Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados nas amostras de endosperma de plântulas de soja via GC-MS.

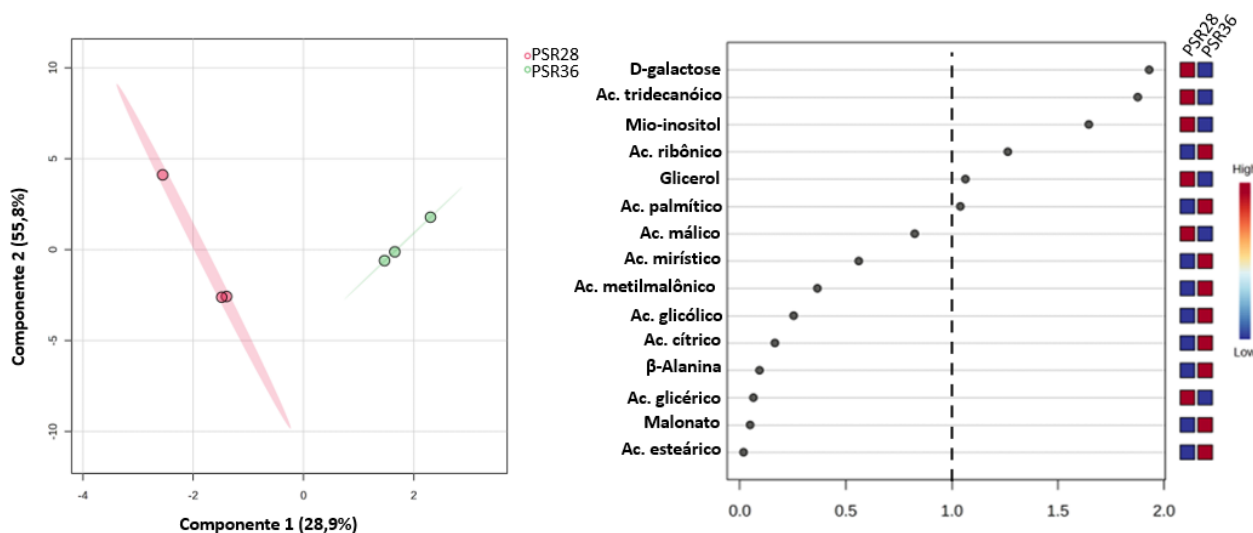
PS= semente soja, E28= endosperma 28 °C, E36= endosperma 36 °C



Nas amostras das raízes de plântulas de soja, o gráfico de PLS-DA demonstrou que existe diferença no metaboloma de acordo com a temperatura, com componente principal 1 explicando 28,8% (autovalor 2,88) da variação dos dados e o componente principal 2 explicando 55,8% (autovalor 5,58) (figura 40a). O VIP scores demonstrou a contribuição de 8 metabólitos: D-galactose, ácido tridecanóico, mio-inositol, ácido ribônico, glicerol, ácido palmítico, em adição, ácido málico e ácido mirístico também foram selecionados (figura 40b).

Figura 40a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) **b)** Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados nas amostras de raiz de plântulas de soja via GC-MS

PS= semente soja, R28= endosperma 28 °C, R36= endosperma 36 °C



O aumento na temperatura provocou um aumento nos níveis dos ácidos graxos mirístico, esteárico e palmítico e uma redução no ácido tridecanóico no endosperma da plântula, essas mudanças foram seguidas pelo aumento do glicerol (figura 39b). Maiores níveis de glicerol indicam uma maior produção de ácidos graxos, e uma vez que os mesmos foram acumulados no endosperma, esta observação sugere que a degradação via β -oxidação está sendo suprimida. Nas raízes foi demonstrado uma redução de glicerol, sugerindo uma menor produção de ácidos graxos quando comparado com condições normais. O ácido graxo tridecanóico foi reduzido e o palmítico foi aumentado a 36°C, além disso, ácido málico, D-galactose e mio-inositol também foram reduzidos (figura 40b).

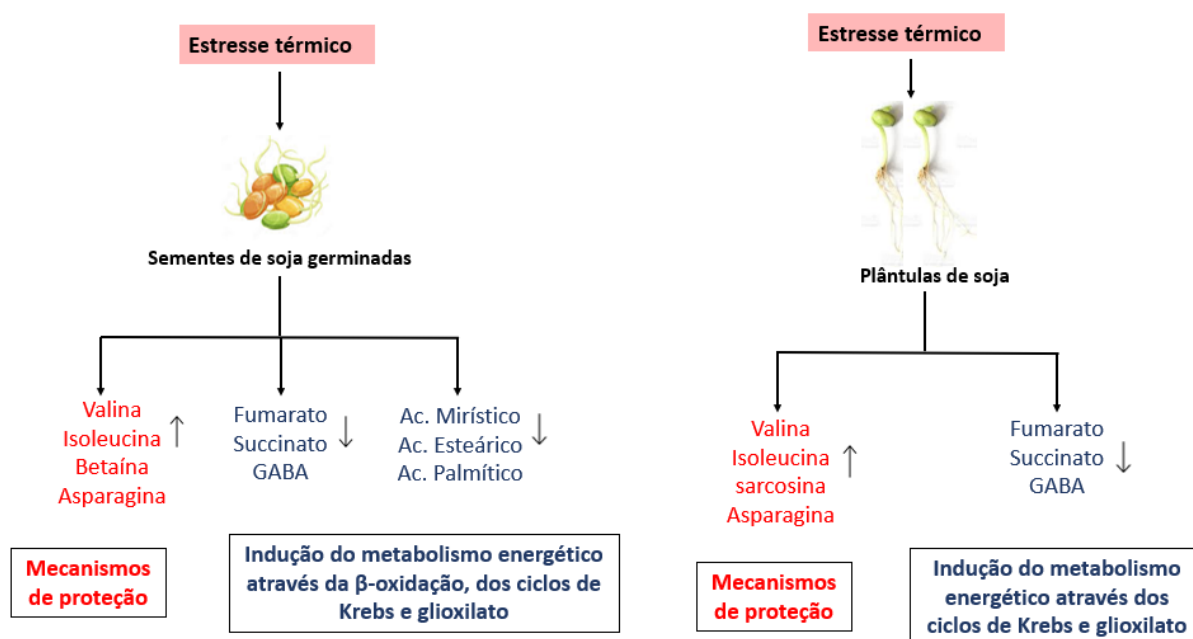
O estabelecimento bem sucedido de plântulas após a germinação é o estágio crítico para o crescimento de plantas e produção agrícola, esse estágio é sustentado pela mobilização eficiente das reservas de energia (CAI et al, 2020; HSIAO et al, 2014). Como a mobilização de lipídios foi reduzida nos tecidos das plântulas, é plausível predizer que em altas temperaturas as plântulas de soja não estejam usando esses compostos como principal fonte de

energia para sustentar seu crescimento. Por algum motivo a lipólise de triacilgliceróis e a β -oxidação estão sendo prejudicadas, é necessário um estudo mais aprofundado para estabelecer as causas.

Como já foi discutido anteriormente, as altas temperaturas regularam positivamente o ciclo de Krebs e a atividade da glicólise, duas importantes vias metabólicas que estão ligadas a produção energética. Desta forma é possível prever que a principal fonte de energia nas plântulas seja derivada do catabolismo de carboidratos como sacarose e glicose, dois metabólitos que apresentaram níveis reduzidos nas amostras de plântulas.

Sementes e plântulas apresentaram perfis metabólicos muito semelhantes frente ao estresse térmico (figura 41). No geral, houve um aumento nos níveis de aminoácidos, que são metabólitos protetores contra estresses abióticos. Intermediários dos ciclos de Krebs e glicoxilato foram reduzidos, o que sugere uma modulação do metabolismo energético, a fim de fornecer energia para a germinação e estabelecimento de plântulas. Nas sementes o metabolismo energético também foi afetado positivamente pelo aumento da β -oxidação de ácidos graxos.

Figura 41. Representação da assinatura metabólica de sementes e plântulas de soja submetidas ao estresse térmico.



Fonte: autoria própria.

4. CONCLUSÃO

A temperatura é um fator chave na germinação de sementes e estabelecimento de plântulas. Foi notado que o estresse térmico não reduziu de forma significativa a germinação, sugerindo que sob altas temperaturas as sementes ativam mecanismos de modo a compensar os efeitos do estresse e manter uma boa taxa de germinação.

Através de uma abordagem multiplataforma utilizando RMN de ^1H e GC-MS, foi possível notar que aumento da temperatura provocou mudanças no metaboloma de sementes e plântulas de soja. Os resultados indicaram um aumento geral nos níveis de alguns aminoácidos como asparagina, histidina, valina e isoleucina aminoácidos, importantes moléculas osmoprotetoras. Por outro lado, outros aminoácidos como GABA e glicina tiveram sua redução ligada ao fornecimento de outros metabólitos. Além disso, também foi sugerida uma forte modulação do metabolismo energético, em resposta as altas temperaturas sementes e plântulas de soja ativam vias catabólicas para gerar energia.

Compreender a assinatura metabólica e os mecanismos que são desencadeados quando plantas enfrentam estresses abióticos como altas temperaturas podem ser importante para o desenvolvimento de protocolos de plantio melhorados e de culturas mais resistentes, especialmente no cenário ambiental em que temperaturas anuais tendem a aumentar.

5. REFERÊNCIAS

ANDRADE, Andrea et al. Comparative hormonal and metabolic profile analysis based on mass spectrometry provides information on the regulation of water-deficit stress response of sunflower (*Helianthus annuus* L.) inbred lines with different water-deficit stress sensitivity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 168, p. 432-446, 2021.

ANSARI, Mohammad Israil et al. GABA shunt: a key-player in mitigation of ROS during stress. **Plant Growth Regulation**, v. 94, p. 131-149, 2021.

BANERJEE, Priyanka et al. Identification of key contributory factors responsible for vascular dysfunction in idiopathic recurrent spontaneous miscarriage. **Plos one**, v. 8, n. 11, p. e80940, 2013.

BAXTER, Charles J. et al. The metabolic response of heterotrophic *Arabidopsis* cells to oxidative stress. **Plant physiology**, v. 143, n. 1, p. 312-325, 2007.

BINDER, Stefan. Branched-chain amino acid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists**, v. 8, 2010.

BORGES, EE de L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. **Sementes florestais tropicais**, p. 83-136, 1993.

BOLOURI MOGHADDAM, Mohammad Reza; VAN DEN ENDE, Wim. Sweet immunity in the plant circadian regulatory network. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 6, p. 1439-1449, 2013.

BOUCHE, Nicolas; FROMM, Hillel. GABA in plants: just a metabolite? **Trends in plant science**, v. 9, n. 3, p. 110-115, 2004.

CAI, Guangqin et al. Transcriptional regulation of lipid catabolism during seedling establishment. **Molecular plant**, v. 13, n. 7, p. 984-1000, 2020.

CALDANA, Camila et al. High-density kinetic analysis of the metabolomic and transcriptomic response of *Arabidopsis* to eight environmental conditions. **The Plant Journal**, v. 67, n. 5, p. 869-884, 2011.

CANTELLI, K. C. Caracterização de linhagens de soja *Glycine max* (L.) Merrill para produção de brotos. 2016.

CARVALHO, Fernanda V. et al. Combination of a multiplatform metabolite profiling approach and chemometrics as a powerful strategy to identify bioactive metabolites in *Lepidium meyenii* (Peruvian maca). **Food Chemistry**, v. 364, p. 130453, 2021.

CIABOTTI, Sueli et al. Avaliações químicas e bioquímicas dos grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, p. 920-929, 2006.

CHEBROLU, Kranthi K. et al. Impact of heat stress during seed development on soybean seed metabolome. **Metabolomics**, v. 12, n. 2, p. 1-14, 2016.

CHEN, Tony HH; MURATA, Norio. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 3, p. 250-257, 2002.

CHENNUPATI, Pratyusha; SEGUIN, Philippe; LIU, Wucheng. Effects of high temperature stress at different development stages on soybean isoflavone and tocopherol concentrations. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 24, p. 13081-13088, 2011.

CHIN, Sabrina; BEHM, Carolyn A.; MATHESIUS, Ulrike. Functions of flavonoids in plant–nematode interactions. **Plants**, v. 7, n. 4, p. 85, 2018.

CHO, Youngkoo; LIGHTFOOT, David A.; WOOD, Andrew J. Trigonelline concentrations in salt stressed leaves of cultivated *Glycine max*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 7, p. 1235-1238, 1999.

CHONG, Jasmine; WISHART, David S.; XIA, Jianguo. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. **Current protocols in bioinformatics**, v. 68, n. 1, p. e86, 2019.

CONAB – Companhia Nacional de Abastacimento. Grãos, Safra 2022/2021 . quarto levantamento, janeiro 2022. Disponível em:< <https://www.conab.gov.br/>> Acesso em: 20 maio 2022.

CONAB – Companhia Nacional de Abastacimento. Grãos, Safra 2020/2021. Segundo levantamento, janeiro 2022. Disponível em:< <https://www.conab.gov.br/>> Acesso em: 20 maio 2022.

COONS, Janice M.; KUEHL, Robert O.; SIMONS, Nancy R. Tolerance of ten lettuce cultivars to high temperature combined with NaCl during germination. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 115, n. 6, p. 1004-1007, 1990.

DELLAGOSTIN, Marisa et al. Dissimilaridade genética em população segregante de soja com variabilidade para caracteres morfológicos de semente. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, p. 689-698, 2011.

DI MARTINO, Catello et al. Free amino acids and glycine betaine in leaf osmoregulation of spinach responding to increasing salt stress. **New phytologist**, v. 158, n. 3, p. 455-463, 2003.

DJANAGUIRAMAN, Maduraimuthu; PRASAD, PV Vara. Ethylene production under high temperature stress causes premature leaf senescence in soybean. **Functional Plant Biology**, v. 37, n. 11, p. 1071-1084, 2010.

DORNBOS JR, D. L.; MULLEN, R. E. Influence of stress during soybean seed fill on seed weight, germination, and seedling growth rate. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 71, n. 2, p. 373-383, 1991.

EASTMOND, Peter J. et al. Promoter trapping of a novel medium-chain acyl-CoA oxidase, which is induced transcriptionally during Arabidopsis seed germination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 44, p. 34375-34381, 2000.

EGLI, D. B. et al. Air temperature during seed filling and soybean seed germination and vigor. **Crop Science**, v. 45, n. 4, p. 1329-1335, 2005.

GAVAGHAN, Claire L. et al. Application of NMR-based metabolomics to the investigation of salt stress in maize (*Zea mays*). **Phytochemical Analysis**, v. 22, n. 3, p. 214-224, 2011.

GIBSON, L. R.; MULLEN, R. E. Soybean seed composition under high day and night growth temperatures. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 6, p. 733-737, 1996.

GORHAM, John. Betaines in higher plants-biosynthesis and role in stress metabolism. **Amino acids and their derivatives in higher plants**, p. 172-203, 1995.

GRAHAM, Ian A. Seed storage oil mobilization. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 59, p. 115-142, 2008.

GRAHAM, Terrence L. Flavonoid and flavonol glycoside metabolism in Arabidopsis. **Plant Physiol. Biochem**, v. 98, n. 9428/98, p. 1-2.

HANSON, Corrine et al. Serum tocopherol levels and vitamin E intake are associated with lung function in the normative aging study. **Clinical Nutrition**, v. 35, n. 1, p. 169-174, 2016.

HARTMAN, Glen L.; WEST, Ellen D.; HERMAN, Theresa K. Crops that feed the World 2. Soybean—worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. **Food Security**, v. 3, n. 1, p. 5-17, 2011.

HAYASHI, Hidenori; SAKAMOTO, Atsushi; MURATA, Norio. Enhancement of the tolerance of Arabidopsis to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of glycinebetaine. **The Plant Journal**, v. 16, n. 2, p. 155-161, 1998.

HERTLE, Alexander P. et al. PGRL1 is the elusive ferredoxin-plastoquinone reductase in photosynthetic cyclic electron flow. **Molecular cell**, v. 49, n. 3, p. 511-523, 2013.

HILDEBRANDT, Tatjana M. Synthesis versus degradation: directions of amino acid metabolism during Arabidopsis abiotic stress response. *Plant molecular biology*, v. 98, n. 1, p. 121-135, 2018.

HOH, Yin Kiong. **Longman A-Level Biology: Growth, Development and Reproduction**. Pearson Education South Asia, 2002.

HSIAO, An-Shan et al. Gene expression in plant lipid metabolism in Arabidopsis seedlings. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107372, 2014.

JANSE VAN RENSBURG, Henry Christopher; LIMAMI, Anis M.; VAN DEN ENDE, Wim. Spermine and spermidine priming against Botrytis cinerea modulates ROS dynamics and metabolism in Arabidopsis. **Biomolecules**, v. 11, n. 2, p. 223, 2021.

JIA, Qi et al. The function of inositol phosphatases in plant tolerance to abiotic stress. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 16, p. 3999, 2019.

JONES, G. P. et al. In vitro thermal and salt stability of pyruvate kinase are increased by proline analogues and trigonelline. **Functional Plant Biology**, v. 18, n. 3, p. 279-286, 1991.

JOSHI, Vijay et al. Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. **Amino acids**, v. 39, p. 933-947, 2010.

KANE, Mark V. et al. Early-maturing soybean cropping system: III. Protein and oil contents and oil composition. **Agronomy Journal**, v. 89, n. 3, p. 464-469, 1997.

KAPLAN, Fatma et al. Exploring the temperature-stress metabolome of Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 136, n. 4, p. 4159-4168, 2004.

KATAM, Ramesh et al. Advances in Plant Metabolomics and Its Applications in Stress and Single-Cell Biology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 13, p. 6985, 2022.

KEIGLEY, Pamela Jane; MULLEN, R. E. Changes in soybean seed quality from high temperature during seed fill and maturation 1. **Crop Science**, v. 26, n. 6, p. 1212-1216, 1986.

KHAN, Naeem et al. Role of sugars, amino acids and organic acids in improving plant abiotic stress tolerance. **Pak. J. Bot.**, v. 52, n. 2, p. 355-363, 2020.

KHEDAR, O. P. **Pulses: status and cultivation technology**. Aavishkar Publishers, 2008.

KÜHN, Christina; GROF, Christopher PL. Sucrose transporters of higher plants. **Current opinion in plant biology**, v. 13, n. 3, p. 287-297, 2010.

KINNERSLEY, Alan M.; TURANO, Frank J. Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, n. 6, p. 479-509, 2000.

KOCH, K. E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. **Annual review of plant biology**, v. 47, n. 1, p. 509-540, 1996.

LEHMANN, Martin et al. Metabolic recovery of *Arabidopsis thaliana* roots following cessation of oxidative stress. **Metabolomics**, v. 8, p. 143-153, 2012.

LI, Zhou et al. Metabolic pathways regulated by abscisic acid, salicylic acid and γ -aminobutyric acid in association with improved drought tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). **Physiologia plantarum**, v. 159, n. 1, p. 42-58, 2017.

LI, Yuanfu et al. Integrated proteomics, metabolomics and physiological analyses for dissecting the toxic effects of halosulfuron-methyl on soybean seedlings (*Glycine max merr.*). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 157, p. 303-315, 2020.

LIMA, Marta RM et al. Nuclear magnetic resonance metabolomics of iron deficiency in soybean leaves. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 6, p. 3075-3087, 2014.

LIU, Keshun. Soybeans as a powerhouse of nutrients and phytochemicals. **Soybeans as functional foods and ingredients**, p. 1-22, 2004.

MCNEIL, Scott D.; NUCCIO, Michael L.; HANSON, Andrew D. Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. **Plant physiology**, v. 120, n. 4, p. 945-949, 1999.

MANDARINO, J. M. G. Compostos antinutricionais da soja: caracterização e propriedades funcionais. **COSTA, NMB; ROSA, COB Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos. Rio de Janeiro: Rubio**, p. 177-192, 2010.

MARCOS FILHO, J. Deterioração de sementes. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: FEALQ**, v. 12, p. 291-352, 2005.

MORAES, Rita Maria Alves de et al. Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 715-729, 2006.

MORELLI, Roberto et al. Fenton-dependent damage to carbohydrates: free radical scavenging activity of some simple sugars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 25, p. 7418-7425, 2003.

NAHAR, Kamrun; HASANUZZAMAN, Mirza; FUJITA, Masayuki. Heat stress responses and thermotolerance in soybean. In: **Abiotic and biotic stresses in soybean production**. Academic Press, 2016. p. 261-284.

NAOE, Alessandra Maria de Lima et al. Effect of water deficit and sowing date on oil and protein contents in soybean co-inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 51, 2021.

NASCIMENTO, Gutenberg de Almeida. Enxofre e arsênio em *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms: Metabolômica, fitohormônios, tióis e fitorremediação. 2017.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2022.

OBATA, Toshihiro; FERNIE, Alisdair R. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, p. 3225-3243, 2012.

PAIVA, B. M.; ALVES, R. M.; HELENO, N. M. Aspecto socioeconômico da soja. **Revista Informe Agropecuário**, v.27 n.230, p.7-14, Belo Horizonte-MG, 2006.

PARIDA, Asish K.; PANDA, Ashok; RANGANI, Jaykumar. Metabolomics-guided elucidation of abiotic stress tolerance mechanisms in plants. In: **Plant metabolites and regulation under environmental stress**. Academic Press, 2018. p. 89-131.

PATTERSON, John H. et al. Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 14, p. 4089-4103, 2009.

PESTANA-CALSA, Maria Clara et al. Cell wall, lignin and fatty acid-related transcriptome in soybean: Achieving gene expression patterns for bioenergy legume. **Genetics and molecular biology**, v. 35, p. 322-330, 2012.

PRATELLI, Réjane; PILOT, Guillaume. Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 19, p. 5535-5556, 2014.

REN, Composition; BILYEU, Kristin D.; BEUSELINCK, P. R. Composition, vigor, and proteome of mature soybean seeds developed under high temperature. **Crop science**, v. 49, n. 3, p. 1010-1022, 2009.

RASHEED, Faiza et al. Modeling to understand plant protein structure-function relationships—implications for seed storage proteins. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 873, 2020.

RIBEIRO, Maiara Iadwizak et al. Curva de embebição, anatomia e mobilização de reservas em sementes de *Mimosa flocculosa* submetidas à superação de dormência. **Iheringia, Série Botânica.**, v. 76, 2021.

ROBERTS, E. H. Temperature and seed germination. In: **Symposia of the Society for Experimental Biology**. 1988. p. 109-132.

RODRIGUES, Juliano Mendonça et al. BiP-overexpressing soybean plants display accelerated hypersensitivity response (HR) affecting the SA-dependent sphingolipid and flavonoid pathways. **Phytochemistry**, v. 185, p. 112704, 2021.

ROLLAND, Filip; BAENA-GONZALEZ, Elena; SHEEN, Jen. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, v. 57, p. 675-709, 2006.

RUCHEL, Queli et al. Effect of high temperature and recovery from stress on crop–weed interaction. **Bragantia**, v. 79, p. 582-591, 2020.

SALVAGIOTTI, Fernando et al. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. **Field Crops Research**, v. 108, n. 1, p. 1-13, 2008.

SAVCHENKO, Tatyana; TIKHONOV, Konstantin. Oxidative stress-induced alteration of plant central metabolism. **Life**, v. 11, n. 4, p. 304, 2021.

SIEBERS, Matthew H. et al. Heat waves imposed during early pod development in soybean (*Glycine max*) cause significant yield loss despite a rapid recovery from oxidative stress. **Global change biology**, v. 21, n. 8, p. 3114-3125, 2015.

SILVA, Maria Sebastiana et al. Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 571-576, 2006.

SMEEKENS, Sjef. Sugar-induced signal transduction in plants. **Annual review of plant biology**, v. 51, n. 1, p. 49-81, 2000.

SONG, S. Q.; LEI, Y. B.; TIAN, X. R. Proline metabolism and cross-tolerance to salinity and heat stress in germinating wheat seeds. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 52, p. 793-800, 2005.

TAN, Piaopiao et al. Metabolic profiles of *Brassica juncea* roots in response to cadmium stress. **Metabolites**, v. 11, n. 6, p. 383, 2021.

TAIZ, Lincoln et al. **Plant physiology and development**. Sinauer Associates Incorporated, 2015.

TONIOLO, L.; MOSCA, G. **O cultivo da soja**. Lisboa: Presença, 95p., 1991.

VAN DEN ENDE, Wim; VALLURU, Ravi. Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 1, p. 9-18, 2009.

VALLURU, Ravi; VAN DEN ENDE, Wim. Myo-inositol and beyond—emerging networks under stress. **Plant science**, v. 181, n. 4, p. 387-400, 2011.

VIANA, Vívian Ebeling et al. Metabolic profile of canola (*Brassica napus* L.) seedlings under hydric, osmotic and temperature stresses. **Plant Stress**, v. 3, p. 100059, 2022.

VILLALVA, Meliza Maricela Huamancaja. Modificação química para obtenção de um isolado protéico de soja com solubilidade semelhante à da caseína humana. 2008.

WANG, Jinyu et al. Differential responses of amino acids and soluble proteins to heat stress associated with genetic variations in heat tolerance for hard fescue.

Journal of the American Society for Horticultural Science, v. 143, n. 1, p. 45-55, 2018.

WANG, Li et al. Differential physiological, transcriptomic and metabolomic responses of Arabidopsis leaves under prolonged warming and heat shock. **BMC Plant Biology**, v. 20, p. 1-15, 2020.

XING, Anqi; LAST, Robert L. A regulatory hierarchy of the Arabidopsis branched-chain amino acid metabolic network. **The Plant Cell**, v. 29, n. 6, p. 1480-1499, 2017.

XU, Changcheng; SHANKLIN, John. Triacylglycerol metabolism, function, and accumulation in plant vegetative tissues. **Annual Review of Plant Biology**, v. 67, p. 179-206, 2016.

XU, Jin et al. Comparative physiological responses of *Solanum nigrum* and *Solanum torvum* to cadmium stress. **New Phytologist**, v. 196, n. 1, p. 125-138, 2012.

YANG, Xinghong; LIANG, Zheng; LU, Congming. Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine enhances photosynthesis against high temperature stress in transgenic tobacco plants. **Plant physiology**, v. 138, n. 4, p. 2299-2309, 2005.

YANG, Xinghong et al. Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine enhances thermotolerance of photosystem II in tobacco plants. **Planta**, v. 225, p. 719-733, 2007.

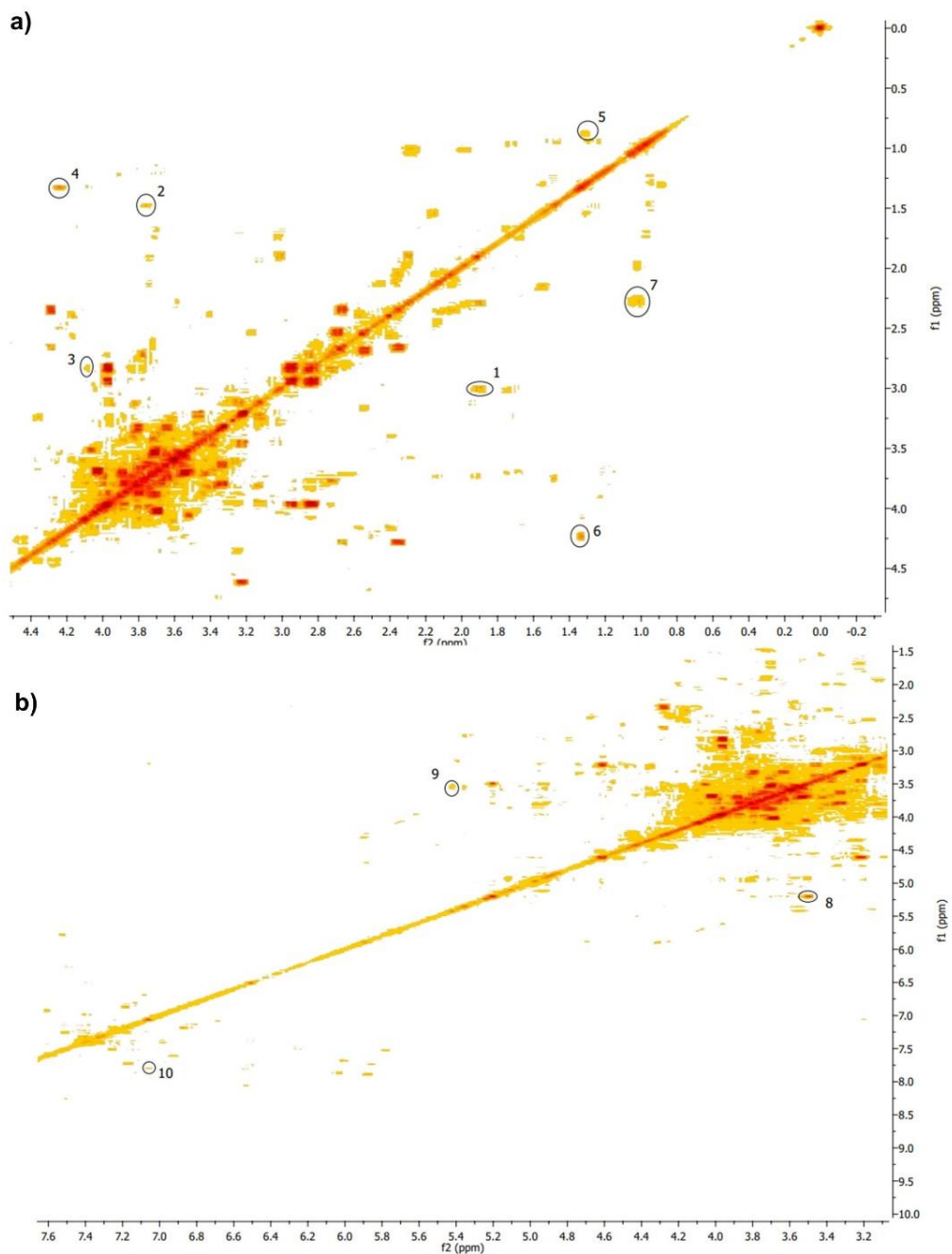
YOU, Jun et al. Transcriptomic and metabolomic profiling of drought-tolerant and susceptible sesame genotypes in response to drought stress. **BMC plant biology**, v. 19, n. 1, p. 1-16, 2019.

YOKOMIZO, Gilberto Ken-Iti; DUARTE, João Batista; VELLO, Natal Antonio. Correlações fenotípicas entre tamanho de grãos e outros caracteres em topocruzamentos de soja tipo alimento com tipo grão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2235-2241, 2000.

ZEIER, Juergen. New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. **Plant, Cell & Environment**, v. 36, n. 12, p. 2085-2103, 2013.

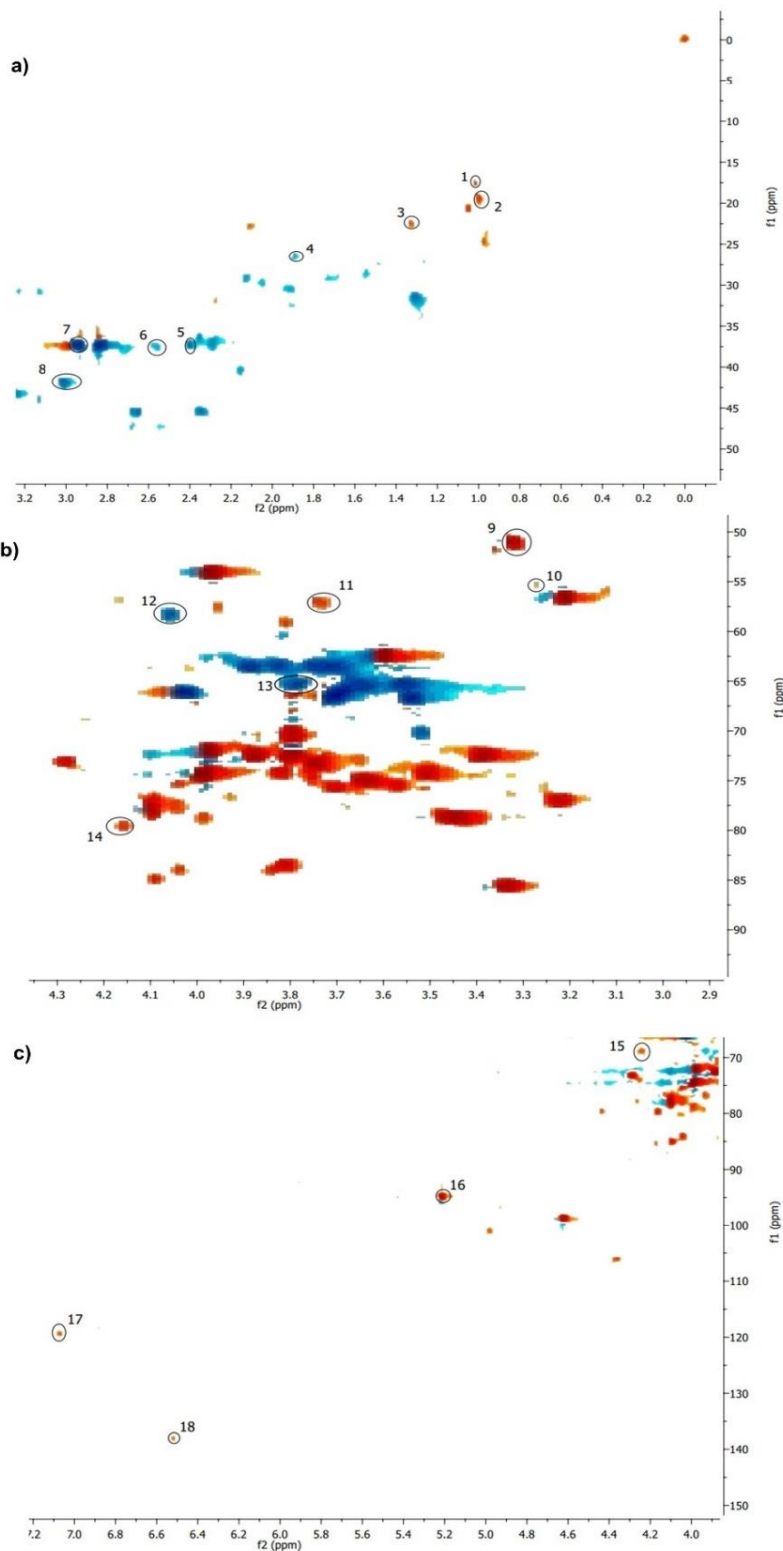
ZISKA, Lewis. Observed changes in soybean growth and seed yield from *A butilon theophrasti* competition as a function of carbon dioxide concentration. **Weed Research**, v. 53, n. 2, p. 140-145, 2013.

APÊNDICE 1. Mapa de correlação Cozy do pool das amostras de sementes e plântulas de Soja. **a)** 1- GABA, 2-alanina 3-asparagina, 4- ácido lático, 5- isoleucina, 6-treonina; 7-valina; **b)** 8-glicose, 9-sacarose, 10-histidina.



Fonte: autoria própria, 2022.

APÊNDICE 2. Mapa de correlação HSQC do pool das amostras de sementes e plântulas de Soja. **a)** 1-Isoleucina, 2-valina, 3-ácido lático, 4-acetato, 5-succinato, 6-sarcosina, 7-asparagina, 8- GABA; **b)** 9- malonato, 10-betaína, 11-alanina, 12-colina, 13-etileno glicol, 14-sacarose; **c)** 15-treonina, 16-glicose, 17-histidina, 18-fumarato.



Fonte: autoria própria, 2022

CAPÍTULO 2

**Caracterização de genes GDSL esterase/lipase de *Ricinus communis*
superexpressos em sementes de *Arabidopsis thaliana***

1. INTRODUÇÃO

A Ricinus communis

A *Ricinus communis*, mais comumente conhecida como mamona ou carrapateira, é uma planta nativa da África oriental, pertencente à família Euphorbiaceae. Esta espécie é uma importante oleaginosa cultivada predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais de clima quente do mundo (VASCONCELOS et al, 2017; RIBEIRO, 2015). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial da espécie, ficando atrás apenas da China e Índia, e segundo exportador do óleo obtidos através das sementes (MENDES et al, 2010; CANGEMI; SANTOS; CLARO NETO, 2010). A mamona é principalmente cultivada por pequenos agricultores familiares da região do Nordeste Brasileiro, onde 86% da produção nacional se concentra no estado da Bahia. Desde os tempos mais remotos há relatos do seu uso em várias partes do mundo, como China, Índia, África e Europa, onde seu uso na medicina tradicional se estendia desde cura de doenças inflamatórias até doenças cardiovasculares (SCARPA; GUERCI, 1982).

A mamoneira possui uma variedade de seis subespécies contando com vinte e cinco variedades botânicas, além de híbridos espalhados pelo mundo e cultivares comerciais. Sendo assim, as plantas que fazem parte da espécie apresentam características bastante variáveis, como folhas e caule apresentando coloração, verde, vermelho ou rosa (figura 1), tamanho e hábitos de crescimento.

Figura 1. Variabilidade da folha e caule de *Ricinus communis*



Fonte: disponível em

<<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/mamona>>

Logo, pode-se encontrar tipos botânicos que apresentam o porte arbóreo ou baixo, ciclo anual ou semiperene, frutos com ou sem espinho (figura 2) (MILANI; MIGUEL JUNIOR e SOUZA, 2009).

Figura 2. Frutos de *Ricinus communis* com e sem espinhos



Fonte: disponível em

<<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/mamona>>

As sementes da mamona também apresentam bastante variação na sua forma, podendo ser arredondada ou em forma de elipse, com a superfície dorsal arqueada; na coloração, que pode ser preta, marrom, castanho, vermelho branca ou rajada de diversas cores (figura 3). Além disso, os teores de óleo variam com o tipo da semente, que também contém ricina, uma proteína altamente tóxica (MOREIRA et al, 1996; RIVAROLA et al, 2011).

Figura 3. Variabilidade nas cores e formatos da semente de *Ricinus communis*



Fonte: disponível em

<<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/mamona>

A *R. communis* é uma cultura bastante produtiva e de grande interesse econômico devido ao óleo produzido por suas sementes, o óleo de rícino, que contém altos teores de ácido ricinoleico (até 90% do óleo) (BRITO, 2020). Este é mais viscoso e denso que o proveniente de outras culturas como o dendê, girassol e algodão, e ainda é o único na natureza solúvel em álcool, o que o torna bastante versátil em termos de aplicação. Na medicina tradicional tem sido usado principalmente como purgante ou laxante para combater a constipação e na indústria é utilizado como matéria prima para plásticos, fibras sintéticas, resinas, lubrificantes, fármacos e uma variedade de cosméticos.

Além disso, óleo da mamona desempenha um papel importante na área médica, na confecção de biopolímeros que são matéria prima para a produção de órgãos artificiais do corpo humano (MENDES et al, 2009; GONZÁLEZ-CHÁVEZ, 2015; RIBEIRO, 2014). No Brasil e na Índia o óleo da mamona tem sido sugerido como uma boa alternativa para a produção de biodiesel, um combustível biodegradável, renovável e ecologicamente correto (MENDES et al, 2009; PATEL et al, 2016).

Devido a sua alta produção e o rendimento anual de sementes, a *R. communis* é considerada umas das culturas oleaginosas não comestíveis mais promissoras (PATEL et al, 2016). A espécie pode ser cultivada sob as condições ambientais adversas de regiões áridas e semi-áridas ao redor do mundo, e, ainda assim apresentar bons rendimentos, característica que outras culturas não apresentam (BRITO, 2020; KUMAR et al, 1997). Portanto, considere-se que a espécie é resistente a uma gama de estresses abióticos, incluindo as altas temperaturas, salinidade, restrição hídrica e até metais pesados como o chumbo, tendo um grande potencial para a fitorremediação de solos contaminados com este metal (XIAOHAI et al, 2008).

O gene GDSL esterase/lipase de *Ricinus communis*

As GDSL esterases/lipases são enzimas hidrolíticas, uma subclasse pertencente à família das enzimas lipolíticas, com propriedades multifuncionais, como ampla especificidade e regiosseletividade no substrato (AKOH et al, 2004; CHEPYSHKO et al, 2012). As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são uma classe especial de esterases (EC 3.1.1.1) que desempenham um papel importante no metabolismo lipídico, são classificadas como hidrolases atuando na sobre ligações de éster presentes em acilgliceróis, liberando glicerol e ácidos graxos (MESSAOUDI, 200; DALLA-VECCHIA e NASCIMENTO, 2004; BHARDWAJ et al, 2001).

As esterases catalisam reações de substratos solúveis em água e de cadeia longa, enquanto que as lipases agem em substratos insolúveis em água de cadeia acil inferior a 10 átomos de carbono, essas enzimas são consideradas

por grande parte de pesquisadores e cientistas bastante versáteis (DALLA-VECCHIA e NASCIMENTO, 2004; LI et al, 2016; SHAKIBA et al, 2016).

Todas as enzimas das famílias das lipases e esterases apresentam um trio catalítico formado por resíduos de serina (Ser), ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina (His). O resíduo de serina possui o papel nucleofílico nessas enzimas, esse resíduo faz parte do motivo (ou região conservada) pentapeptídeo Gly-x-Ser-x-Gly (x pode ser qualquer aminoácido) com o sítio ativo serina situado próximo ao centro da sequência conservada, entretanto, nem todas as enzimas lipolíticas possuem essa região conservada em comum. As enzimas pertencentes à família GDSL apresentam uma região conservada diferente com o sítio ativo de serina localizado próximo ao N-terminal (AKOH et al, 2004.; SULLIVAN et al, 1999; LAI et al, 2017).

Enzimas do tipo GDSL possuem uma sequência de consenso que é dividida em cinco blocos (I-V). Esta família ainda é classificada como SGNH hidrolase devido a alta conservação dos resíduos catalíticos serina (Ser), glicina (Gly), asparagina (Asn) e histidina (His) dentro dos blocos conservados I, II, III e V respectivamente (LI et al, 2000.; CHEPYSHKO et al, 2012.; OKAMURA et al, 2010).

Estudos demonstraram que as esterase/lipase do tipo GDSL possuem um sítio ativo flexível que permite que sua conformação original sofra mudanças estruturais com a presença de diferentes substratos, de acordo com o mecanismo do ajuste induzido proposto por Koshland. Sendo assim, algumas enzimas deste tipo podem apresentar atividades enzimáticas diversas, incluindo atividade de protease, esterase, tioesterase, lisofosfolipase e arilesterase na mesma enzima (CHEPYSHKO et al, 2012).

As esterases/lipases são encontradas em todos os reinos da vida, sendo amplamente distribuídas em plantas, microorganismos e animais. Por conta da sua vasta especificidade no substrato, essas enzimas são consideradas altamente promissoras com potencial uso para aplicações biotecnológicas em uma série de indústrias, como, por exemplo, cosméticos, alimentos, fragrâncias, farmacêutica, têxtil e indústria de detergentes (VUJAKLIJA et al, 2002; CHEPYSHKO et al, 2012).

Uma grande quantidade de genes microbianos de GDSL lipase foi clonada e caracterizada, atualmente as estruturas cristalinas para *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptomyces scabies* são relatadas na literatura. Suas enzimas apresentam ampla atividade hidrolítica com diversos tipos de substratos, incluindo uma grande quantidade de ésteres e derivados de aminoácidos e acil-CoAs (LI et al., 2000; DING et al, 2019; LO et al, 2003). O gene TEP-I foi clonado e sequenciado da cepa de *Escherichia coli* e a enzima superexpressa demonstrou atividade hidrolítica em relação aos substratos citados acima, além disso, a enzima se comportou como uma arilesterase, hidrolisando ésteres aromáticos, incluindo α -naftil acetato, α -naftil butirato, acetato de fenil, acetato de benzila e oito ésteres pnitrofenílicos (LEE, CHEN e SHAW, 1997).

Uma lipase GDSL de *Xanthomonas vesicatoria* codifica uma proteína que preferencialmente hidrolisa triacilgliceróis de cadeia curta (até C8) e nitrofenilésteres para-substituídos. Outro gene da *Salmonella typhimurium* codifica uma esterase que hidrolisa uma gama de ésteres naitílicos e de ésteres não-nitrofenílicos de ácidos graxos de C6 a C12 (CARINATO et al, 1998). As estruturas da GDSL esterase/lipase que já foram descritas são compostas por múltiplas hélices α e dobras β de forma esférica com três resíduos catalíticos conservados e pertencem à superfamília de proteínas dobráveis α / β -hidrolase. Várias estruturas das proteínas de origem bacteriana foram determinadas, mas nenhuma estrutura de origem vegetal foi resolvida (CHEPYSHKO et al, 2012; DING 2019).

Teoricamente enzimas vegetais apresentam vantagem sobre as enzimas microbianas ou animais, por conta da maior disponibilidade de fontes naturais, facilidade na purificação e menor custo. Entretanto, as pesquisas sobre as esterase/lipases GDSL vegetais começaram depois dos estudos das esterases/lipases GDSL microbianas e animais. Portanto, o conhecimento atual sobre essas enzimas vegetais, desde sequências até mecanismos funcionais, ainda é um tanto quanto limitado (LING et al, 2008; CHEPYSHKO et al, 2012)

Muito pouco se sabe sobre as esterases/lipases vegetais, especialmente sobre suas estruturas 3D e conseqüentemente sobre o mecanismo de sua catálise, embora a família do gene GDSL em espécies de plantas inclua vários

membros em muitos genomas de plantas totalmente sequenciados. Um gene de lipase GDSL foi relatado pela primeira vez na literatura no ano de 1995, compreender esse gene é uma área de estudo relativamente nova (DING et al, 2019; LING et al, 2006).

Com o desenvolvimento da bioinformática e o sequenciamento completo de mais genomas de plantas, as esterase/lipases GDSL tornaram-se assuntos muito atraentes, suas características, funções e propriedades vêm sendo investigadas, elas representam uma grande família de gene em plantas. Foi relatado que o gene codifica 114 e 118 proteínas nas plantas modelo *Oryza sativa L. japonica* e *Arabidopsis thaliana*, respectivamente (LING et al, 2008; CHEPYSHKO et al, 2012). As espécies *Brassica rapa*, *Vitis vinifera*, *Sorghum bicolor*, *Populus trichocarpa*, *Physcomitrella patens* e *Zea mays* apresentam 121, 96, 130, 126, 57 e 53 membros da família GDSL, respectivamente. Os genomas de *Selaginella moellendorfi*, *Medicago truncatula*, *Chlamydomonas reinhardtii* e *Phaeodactylum tricornutum*, *Ostreococcus tauri* e *Glycine max* contêm 90, 88, 102, 75, 59 e 194 membros do gene, respectivamente (DONG et al, 2016; VOLOKITA et al, 2011; DING et al, 2019; SU et al, 2020).

Várias GDSL esterase/lipase de plantas, incluindo alfafa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*) e *Arabidopsis thaliana*, foram isoladas, sequenciadas e caracterizadas funcionalmente. Um gene de lipase de pimenta (*Capsicum frutescens*) do tipo GDSL, *CaGLIP1*, demonstrou atividade hidrolítica para esteres p-nitrofenílicos de cadeia curta e longa (HONG et al, 2008). Uma esterase/lipase GDSL, *Enod8*, encontrado na alfafa (*Medicago sativa*) apresentou atividade de acetil e butil esterase (COQUE et al, 2008). O gene Ara-1 recombinante de *Arabidopsis* apresentou atividade lipolítica contra Tween 80 e hidrolítica para butirato de p-nitrofenila. Uma enzima GDSL que demonstrou atividade de hidrolase de aciléster foi isolada e purificada das sementes de girassol (*Helianthus annuus*) pós germinadas. Assim como outras enzimas GDSL não específicas com a mesma atividade foram isoladas e purificadas de farelo de arroz, caules de batata e folhas de soja (BEISSON et al, 1997).

As lipases GDSL de plantas compõem uma grande família de genes, onde os membros da família apresentam características de expressão bastante

distintas. Alguns dos genes são expressos em estágios de desenvolvimento e tecidos específicos, enquanto outros são amplamente expressos em vários estágios do desenvolvimento da planta (DING et al, 2019). BnGILP1 de canola (*Brassica napus*) demonstrou uma expressão específica no 3º dia de germinação das sementes, mas não foi expresso em outros tecidos, como raízes e mudas, portanto, assumiu-se que o gene está envolvido no metabolismo de lipídeos durante a fase da germinação (LING et al, 2006).

A GDSL lipase 2 (*AtGLIP2*) de *Arabidopsis thaliana* é expressa apenas no caule e raiz, enquanto que seu homólogo, *AtGLIP2*, é fortemente expresso nas folhas e raízes, e fracamente expresso no caule e na flor (LEE et al, 2009). Coque et al (2009), demonstrou que a esterase/lipase GDSL *Enod8* de alfafa (*Medicago sativa*) aparece durante a fixação de nitrogênio e formação do nódulo, mas não é expressa em outras partes das raízes. Sendo assim, esses genes podem desempenhar papéis específicos nos diferentes estágios de desenvolvimento e tecidos e os diversos níveis de expressão podem ser reflexo da evolução dos membros da família GDSL para se adaptar aos processos fisiológicos (DING et al, 2019).

Fisiologicamente as GDSL esterase/lipase até então descritas são apontadas por desempenhar um importante papel na regulação do desenvolvimento, morfogênese e metabolismo lipídico das plantas (LAI et al, 2017; AKOH et al, 2004). Dois genes da família GDSL foram clonados do genoma do arroz, o *GER1* e *WDL1*, os estudos sugeriram que suas funções fisiológicas estavam associadas a regulação no alongamento do coleóptilo (primeira folha do embrião das plantas) e também no crescimento da planta no estágio de muda (RIEMANN et al, 2007; PARK et al, 2010). Em uva (*Vitis vinifera*) foram identificados 83 genes de esterases/lipases do tipo GDSL (*VvGELP*), os genes *VvGELP76* e *VvGELP82* foram expressos em todos os estágios de desenvolvimento, as análises baseadas nos resultados de qRT-PCR apontam que os *VvGELPs* envolvidos no amadurecimento e desenvolvimento da uva. (NI, JI e GUO, 2020).

Um redutor de ácido graxo pertencente à família das GDSL lipases/esterases de *Arabidopsis thaliana* (*SFAR4*) aumentou a expressão de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos durante a germinação e o

desenvolvimento das plântulas. Além disso, as plantas de *Arabidopsis* transgênicas que tiveram esse gene superexpresso, apresentaram uma taxa de germinação mais alta e tolerância ao estresse de glicose (HUANG et al 2015). Um gene de milho (*Zea mays*), *ZmMs30*, que codifica uma lipase do tipo GDSL foi relatado por estar diretamente envolvido no desenvolvimento das anteras da planta, a perda da função desse gene, causa danos a estrutura da antera do milho e leva a esterilidade masculina completa (AN et al, 2019).

O gene *BrEXL6* foi isolado da espécie *Brassica rapa* (nabo) e análises de PCR semiquantitativo indicaram que tanto *BrEXL6*, quanto a sua proteína codificada foram significativamente mais expressos nas anteras de botões férteis, especialmente nos estágios de desenvolvimento do pólen. Porém, em outros tecidos e órgãos florais de plantas férteis, houve uma fraca expressão, indicando que *BrEXL6* é um gene relacionado ao desenvolvimento de pólen (JI et al, 2017). Três genes da proteína GDSL esterase/lipase de arroz (*Oryza sativa*), *OsGELP34*, *OsGELP110* e *OsGELP115*, foram expressos nas anteras do arroz também durante o desenvolvimento do pólen (ZHANG et al, 2020).

As lipases GDSL também possuem membros de sua família no genoma do algodão (*Gossypium hirsutum* L), o gene *GhGLIP* foi obtido a partir de óvulos e fibras em desenvolvimento. A superexpressão de *GhGLIP* em plantas de *Arabidopsis thaliana* resultou no aumento do comprimento e do peso das sementes, assim como também, o conteúdo de proteínas e açúcares foram significativamente maiores em plantas transgênicas, quando comparado com os controles. Os resultados indicaram que a superexpressão do gene está intimamente ligada com melhores desenvolvimento e crescimento da planta (MA et al, 2018).

A superexpressão de uma lipase do tipo GDSL presente no genoma da *Brassica napus* (*BnGDSL1*) promoveu uma melhor taxa de germinação das sementes de *Brassica*, melhor estabelecimento de plântulas em comparação ao tipo selvagem, assim como também promoveu o catabolismo lipídico, diminuindo o teor de óleo nas sementes (DING et al, 2019). No dendê (*Elaeis guineensis*) o gene *EgGDSL* foi associado ao conteúdo de óleo, sua expressão em *A. thaliana* aumentou o teor de ácidos graxos totais em 9,5% quando comparado com o tipo selvagem (ZHANG et al, 2018).

As GDSL esterase/lipase também desenvolvem um papel importante na síntese de metabólitos secundários, resposta a estresses abiótico e bióticos e defesa de patógenos (DING et al, 2019; LING et al, 2008; DONG et al, 2016; 2017; AKOH et al, 2004). No estudo de Lai et al (2017), foram identificados 105 genes de esterase/lipase do tipo GDSL em *Arabidopsis thaliana*, as análises de expressão e filogenética sugeriram que a família de genes *AtGELP* pode estar envolvida em várias condições de estresse ou estágios de desenvolvimento em *Arabidopsis*. As plantas transgênicas de genes *AtGELP* foram utilizadas para elucidar as características fenotípicas em vários estágios de desenvolvimento ou condições de estresse. Os resultados sugerem que os genes *AtGELP* possuem diversas funções fisiológicas, como afetar a taxa de germinação e o crescimento inicial de mudas submetidas a altas concentrações de glicose, ou estar envolvidos em respostas de estresse biótico.

o gene GDSL LIPASE-LIKE 1 de *A. thaliana* (*AtGLIP1*) desempenha um papel crucial na imunidade das plantas, provocando uma resistência local e sistêmica nas plantas. A superexpressão de *AtGLIP1* em *Arabidopsis* aumentou a resistência a patógenos necrotróficos, incluindo *Alternaria brassicicola*, *Erwinia carotovora* e a bactéria *Pseudomonas syringae* (KWON et al 2009). A superexpressão de *AtLTL1* aumentou a tolerância ao estresse salino em plantas transgênicas de *Arabidopsis*, permitindo a germinação de sementes na presença de concentrações tóxicas de LiCl e NaCl e estimulando o crescimento vegetativo (NARANJO et al, 2006)

A erva asiática *Sedum alfredii Hance* é um hiper acumulador de metais pesados, tornando-se uma planta candidata a fitorremediação. Uma GDSL esterase/lipase presente no genoma da erva (*SaGLIP8*) aumentou a tolerância e o acúmulo de cádmio em leveduras transgênicas superexpressando o gene, destacando o papel de uma GELP nas respostas das plantas às condições de estresse por metais pesados (LI et al, 2019).

A superexpressão do gene de uma GDSL lipase de *Capsicum annuum* (*CaGLIP1*) em *A. thaliana* conferiu tolerância ao estresse osmótico e salino durante a germinação das sementes e o crescimento da planta. Bem como regulou o estresse oxidativo e melhorou a resposta da planta a ataque de patógenos, demonstrando que a enzima pode modular a suscetibilidade a

doenças e a tolerância ao estresse abiótico nas plantas (HONG et al, 2008). O gene *GmGELP28* de *Glycine max* também modulou as respostas de plantas transgênicas frente a estresses abióticos. Plantas transgênicas de *A. thaliana* e soja que superexpressam o gene *GmGELP28*, apresentaram um perfil fenótipo tolerante ao estresse salino e a seca (SU et al, 2020).

Os genes da família GDSL também respondem aos hormônios de defesa exógenos. Uma lipase GDSL em *A. thaliana* (*AtGLIP1*) aumenta a resistência de vários tipos de fungos e bactérias patogênicos, a indução das respostas imunes estavam relacionadas com a sinalização de etileno (KIM et al, 2014; KWON et al, 2009). Em contrapartida, o *AtGLIP2* teve seus níveis de transcrição elevados pelo tratamento com ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno e mediou a resistência da planta transgênica a bactéria *Erwinia carotovora* (LEE et al, 2009).

Uma proteína secretada no néctar da árvore do *Jacaranda mimosifolia* (*JNP1*) classificada como uma lipase GDSL com atividades de esterase e lipolítica, foi relatada por desempenhar um papel antimicrobiano, diminuindo o crescimento de bactérias dentro do néctar do jacarandá (KRAM et al, 2008). A superexpressão do gene *GDSL1* de *Arabidopsis thaliana* na colza (*Brassica napus* L.) foi associada com o aumento da ativação das vias de defesas relacionadas com espécies reativas de oxigênio, bem como, com o aumento da resistência ao fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (DING et al, 2020).

Diversos genes em plantas têm suas expressões reguladas em resposta a estresses abióticos, como altas temperaturas, salinidade, frio e seca, os produtos gênicos funcionam como resposta e tolerância aos estresses (GUJJAR et al., 2014). Genes da família GDSL esterase/lipase foram identificados na leguminosa arbórea *Leucaena leucocephala* quando as mudas da espécie foram submetidas a estresse hídrico (HONDA et al., 2018). No damasco (*Prunus armeniaca* L.) os genes GDSL esterase/lipase *EXL3* e *LTL1* foram expressos nas cultivares que apresentavam tolerância ao frio (YU et al., 2020). Em duas variedades de uvas (*Vitis vinifera*) cultivadas em uma região com seca prolongada e altas temperaturas, dois genes que codificam membros da família GDSL Lipase/Esterase foram regulados positivamente nas folhas (SALEH et al., 2018).

As GDSL esterase/lipase de plantas induzem respostas a estresses, afetam a resistência a patógenos, além de estarem envolvidas no metabolismo lipídico, crescimento e desenvolvimento das plantas. Sendo assim, elas apresentam alto potencial para aplicações na agricultura, principalmente no que diz respeito à produção de novas variedades de cultivares de melhor qualidade e alta resistência (DING et al, 2019; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI).

O estudo de genes que apresentam características interessantes para as plantas no tocante ao estresse abiótico é especialmente importante, pois, os efeitos dos estresses abióticos na produtividade agrícola podem ser reduzidos através do melhoramento genético, e, para isso é necessário conhecer os mecanismos fisiológicos e moleculares que determinados genes ativam nas plantas.

OBJETIVOS

- Caracterizar a família do gene GDSL esterase/lipase utilizando ferramentas da bioinformática;
- Caracterizar o comportamento fisiológico de sementes de *Arabidopsis thaliana* que superexpressam o gene GDSL esterase/lipase de *Ricinus communis* em resposta aos estresses térmico e hídrico;
- Avaliar a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) das sementes de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o gene GDSL esterase/lipase de *Ricinus communis*, frente ao tipo selvagem;
- Avaliar o perfil metabólico de sementes de *Arabidopsis thaliana* que superexpressam o gene GDSL esterase/lipase de *Ricinus communis* em resposta às condições de restrição hídrica e/ou temperaturas elevadas por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H .

2. MATERIAIS E MÉTODOS

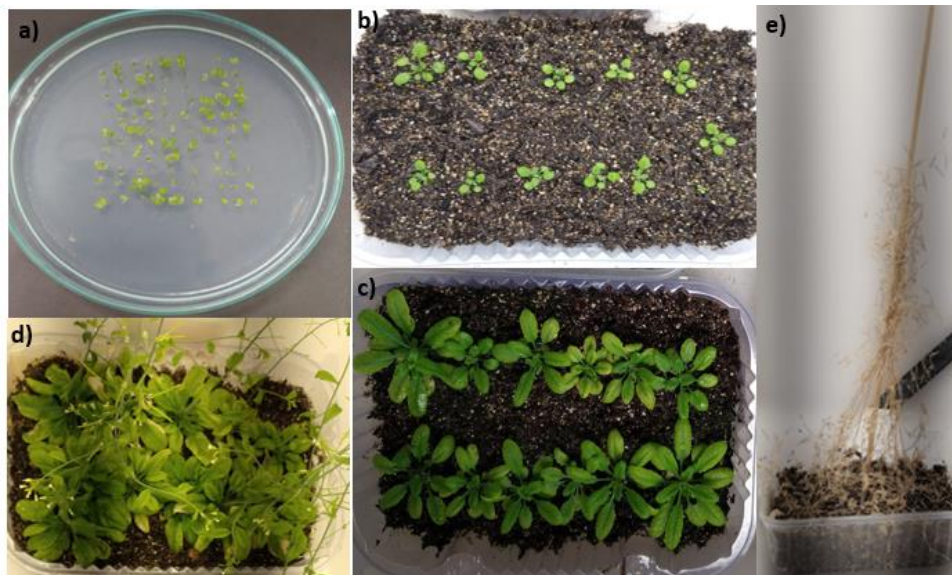
2.1 Material vegetal

As sementes superexpressando o gene *RcGELP* de *R. communis* (28147.m000025) utilizadas neste estudo foram produzidas em parceria com o Laboratory of Plant Physiology da Universidade de Wageningen, Holanda. A clonagem do gene *RcGELP* foi realizada utilizando a tecnologia Gateway®. Regiões de codificação completas foram amplificadas a partir de amostras de cDNA de *R. communis*, os produtos amplificados (gene alvo) foram recombinados no plasmídeo doador pDONr207. Este plasmídeo foi transferido para células de *Escherichia coli* por eletroporação. Na segunda transformação de *E. coli*, o plasmídeo de expressão pGD625 abriga um promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV). Células competentes (estirpe: DH5 α) da bactéria *E. coli* foram transformadas com o produto LR utilizando eletroporação.

Foram selecionadas um total de quatro linhagens: *RcGELPO.1*, *RcGELPO.2*, *RcGELPO.3* e *RcGELPO.4*. Também foram utilizadas sementes de uma linhagem selvagem (Col-0), isto é, sementes que não estavam superexpressando o gene.

Para obter uma quantidade de sementes que fosse satisfatória para desenvolver todas as análises propostas, foi realizado o processo de propagação, método pelo qual as plantas se reproduzem. Nesse processo as sementes foram germinadas em meio de cultivo sólido Murashige e Skoog (meio MS) a 22 °C por um período de sete dias, até o crescimento de suas raízes (figura 4a). As plântulas foram então transferidas para o solo, trinta e seis plântulas por linhagem, divididas em três replicatas (figura 4b). As plântulas foram regadas diariamente com solução nutritiva até o completo desenvolvimento para o estágio de planta, onde foi possível coletar novas sementes (figura 4e).

Figura 4a) germinação das sementes **b)** transferência para o solo **c)** e **d)** desenvolvimento das plantas **e)** plantas desenvolvidas em estágio de coleta das sementes



2.2 Análises de bioinformática

2.2.1 Recuperação das sequências de GDSL esterase/lipase no genoma de *R. Communis*

Inicialmente a base de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi utilizada para o levantamento das sequências de aminoácidos dos genes GDSL esterase/lipase presentes no genoma da espécie *Ricinus communis*, para o levantamento foram utilizadas as palavras chaves “GDSL esterase/lipase AND ricinus communis”. Uma dessas sequências foi carregada no Simple Modular Architecture Research Tool (SMART; <http://smart.embl-heidelberg.de/>), banco de dados biológico usado na identificação e análise de domínios de proteínas em sequências de proteínas, para a obtenção da sequência do domínio GDSL.

Posteriormente, as sequências de aminoácidos, genômica e CDS com domínio GDSL presentes no genoma das espécies *Ricinus communis* e *Arabidopsis thaliana* foram obtidas utilizando a sequência do domínio GDSL no programa Phytozome v12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), um centro comparativo para dados e análises de genoma de planta e família de

genes. Todas as proteínas tiveram sua identidade confirmada através do The Universal Protein Resource (UniProt; <https://www.uniprot.org/>), uma base de dados de sequência de proteínas e suas funções biológicas.

Na base de dados NCBI outras treze sequências de proteínas vegetais, presentes em doze espécies de plantas, com funções já elucidadas, foram obtidas através dos seus respectivos números de acesso coletados em estudos anteriores (LAI et al, 2017): *Agave americana* (AgaSGNH), *Alopecurus myosuroides* (AmGDSH1), *Brassica napus* (BnSCE3/BnLIP), *Brassica rapa* (BrSIL1), *Capsicum annuum L* (CaGL1), *Capsicum annuum L* (CaGLIPI), *Digitalis lanata* (LAE), *Hevea brasiliensis* (Hev b 13), *Jacaranda mimosifolia* (JNP1), *Macroptilium atropurpureum* (MaAChE), *Rauvolfia serpentina* (AAE), *Salicornia europaea* (Salicornia AChE) *Zea mays L* (ZmAChE).

2.2.2 Alinhamentos e análise filogenética

O alinhamento das sequências de proteínas com o domínio GDSL em *R. communis* e as treze com funções já elucidadas foi realizado utilizando a ferramenta MUSCLE, disponível no Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X; <https://www.megasoftware.net/>), software para a realização de análises evolutivas, o programa realiza uma série de análises baseadas em alinhamentos múltiplos de sequências.

A partir do alinhamento foi construída uma árvore filogenética usando o conjunto completo de sequências das proteínas de GDSL esterase/lipase em *R. communis* (*RcGELP*) e em outras doze espécies vegetais: *Rauvolfia serpentina* (pimenta do diabo), *Agave americana* (agave), *Alopecurus myosuroides*, *Brassica napus* (canola), *Brassica rapa* (repolho chinês), *Capsicum annuum L* (pimenta), *Jacaranda mimosifolia*, *Digitalis lanata* (dedaleira), *Macroptilium atropurpureum* (siratro/feijão roxo), *Salicornia europaea* (sal verde), *Hevea brasiliensis* (seringueira) e *Zea mays L* (milho). A análise filogenética foi realizada no MEGA X, utilizando o método junção de vizinhos (Neighbor-Joining) com distâncias calculadas por p-distância. Uma vez construída as árvores, foi possível identificar

proteínas iguais com o auxílio do banco de dados NCBI utilizando a ferramenta blastx e excluí-las. Todas as proteínas receberam códigos próprios.

2.2.3 Identificação de motivos conservados e análise de estrutura gênica

As configurações de éxon/intron dos genes GDSL esterase/lipase de *R. communis* (*RcGELP*) foram analisadas comparando as sequências CDS e DNA genômica correspondente, usando o programa online Gene Structure Display Server (GSDS v.2.0; <http://gsds.gao-lab.org/index.php>), projetado para a visualização de características do gene, como a composição e a posição de éxons, íntrons e elementos conservados. Para a identificação dos motivos conservados das proteínas foi utilizada a ferramenta Multiple Em for Motif Elicitation (MEME v.5.3.2; <https://meme-suite.org/meme/tools/meme>), com busca de seis motivos a serem encontrados.

2.2.4 Localização subcelular e propriedades físico químicas

A localização subcelular das proteínas RcGELP foi predita importando o arquivo fasta das sequências de proteínas no Subcellular Localization Predictor (CELLO v.2.5; <http://cello.life.nctu.edu.tw/>), um sistema de máquinas e vetores de suporte de dois níveis para atribuir a localização celular com base na posição de vários n-peptídeos.

Os parâmetros físico químicos como, o número de aminoácidos, peso molecular, ponto isoelétrico teórico, índice de estabilidade, índice alifático, hidropaticidade grande média (GRAVY) e número de resíduos carregados negativamente (Asp + Glu) e positivamente (Arg + Lys) das proteínas foram analisados utilizando a ferramenta online Protparam fornecida pelo portal de recursos bioinformáticos Expert Protein Analysis System (Espasy, <https://www.expasy.org/resources/protparam>).

2.2.5 Análise de elementos *cis* reguladores e análise de duplicação em tandem

Para identificar potenciais elementos *Cis* reguladores nas sequências promotoras dos genes RcGELP, as sequências genômicas de 1000 pares de bases upstream a start codon foram analisadas utilizando o software PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), um banco de dados de elementos reguladores de ação *cis*, realçadores e repressores da planta. A duplicação em tandem foi analisada no software PTG base (<http://ocri-genomics.org/PTGBase/>), plataforma de recursos por meio da qual genes duplicados em tandem podem ser estudados através de comparação intra e inter genômica.

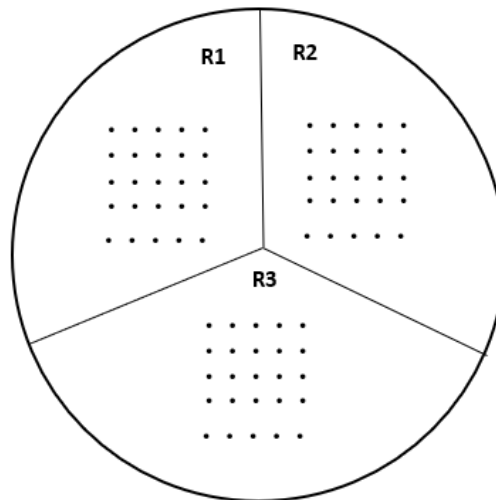
2.3 Análises fisiológicas, bioquímicas e metabolômicas

2.3.1 Testes de germinação

Os testes de germinação foram conduzidos utilizando papel germitest como substrato sobre placas de Petri. Foram selecionadas 25 sementes de *Arabidopsis thaliana*, sementes transgênicas e selvagens, por triplicata, somando um total de 75 sementes de cada linhagem por placa (figura 5). A cada placa foram adicionados 3 mL de água destilada (para a condição controle) e soluções de diferentes concentrações de manitol. As placas foram vedadas com plástico filme e levadas para uma geladeira a 4 °C sem luz para a estratificação por 72 horas, nesse processo há a quebra de dormência das sementes. Após as 72 horas, as placas da condição controle e tratamento com manitol e foram transferidas para uma câmara germinadora a 22 °C (temperatura ótima de crescimento) e para o ensaio sob estresse térmico, as placas nas quais foram adicionadas água foram transferidas para uma câmara germinadora a 34 °C. A germinação foi acompanhada no período de 24 a 56 horas, onde foram consideradas germinadas aquelas sementes que houve a protusão da radícula. Os dados de germinação foram processados usando o pacote de software Germinator e a análise T de teste, onde foram avaliados os parâmetros

porcentagem máxima de germinação (G_{max}) e tempo médio para 50% da germinação (T_{50}).

Figura 5. Esquema da germinação utilizando a placa de Petri e papel germitest

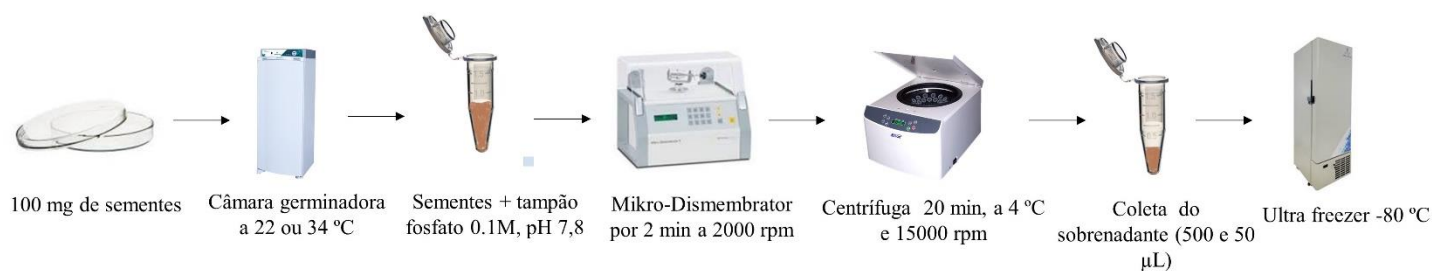


Fonte: autoria própria.

2.3.2 Extração dos metabólitos primários e proteínas

Para a extração de metabólitos primários das sementes de *Arabidopsis thaliana*, foram pesados cerca de 100 mg de todas as linhagens transgênicas e também das sementes selvagens. As sementes na condição controle e tratamento com manitol foram levadas para câmara germinadora a 22 °C, já as sementes sob estresse térmico foram colocadas a 34°C. Após a germinação, as sementes foram coletadas e transferidas para micro tubos, onde foram adicionados 650 µL de tampão fosfato de pH 7,8 (SAMBROOK et al, 1989). Estes tubos foram levados ao Mikro-Dismembrator por 2 min a 2000 rpm, e, por fim foram levados para a centrifuga durante 20 minutos, a 4 °C e 15000 rpm (figura 6). Após a centrifugação, 500 µL do sobrenadante foram coletados para as análises metabolômicas e 50 µL para a quantificação de proteínas totais e avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), os conteúdos foram armazenados em ultra-freezer a -80 °C.

Figura 6. Esquema do processo de extração dos metabólitos primários e proteínas



Fonte: autoria própria

2.3.3 Quantificação de proteínas totais

As proteínas totais dos extratos coletados na etapa anterior foram quantificadas de acordo com método proposto por Bradford (BRADFORD, 1976). Inicialmente, foi preparada uma curva analítica padrão com albumina de soro bovino (BSA) e a solução Bradford Protein Assay (Bio-Rad), que foi usada como reagente corante. Uma solução estoque de BSA a $1440 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi usada para a construção da curva com concentrações variando de 3 a $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Em um segundo momento foram tomadas alíquotas de $20 \mu\text{L}$ dos extratos, que foram diluídos em $130 \mu\text{L}$ de tampão fosfato pH 7,8, a esta solução foram adicionados $100 \mu\text{L}$ do reagente de Bradford. As soluções foram transferidas para uma placa de 96 poços, a absorbância dos extratos foi medida no espectrofotômetro (VersaMax™, EUA), utilizando o comprimento de onda de 595 nm. A concentração total das proteínas nos extratos foi determinada através da equação obtida no cálculo da regressão linear da curva analítica com BSA, utilizando três replicatas técnicas.

2.3.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade de SOD foi determinada a partir da detecção espectrofotométrica do produto de redução do azul de nitro-tetrazólio – NBT, o

formazan a 560 nm. A riboflavina quando submetida a luz sofre fotólise, perdendo um elétron para o oxigênio do ambiente (O_2), resultando no íon radicalar superóxido ($O_2^{\bullet-}$), este íon reduz o NBT a formazan. Na presença da enzima SOD, a reação é inibida, essa inibição foi usada para determinar a atividade da enzima nos extratos (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977)

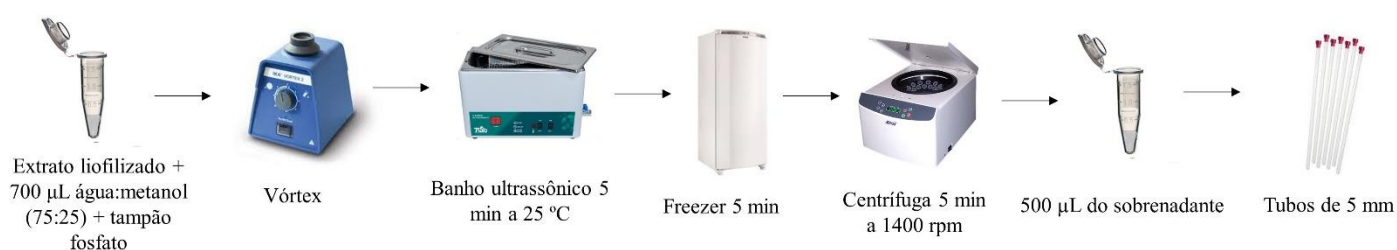
Inicialmente, a velocidade da reação de fotoredução foi determinada através da absorbância medida em 560 nm. Posteriormente, a inibição da formação do formazan a partir do NBT utilizando o extrato foi avaliada. Para o teste enzimático foi preparado um meio reacional composto por tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, NBT 75 μ M, riboflavina 2 μ M e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 μ M. Foram misturados 6 μ L dos extratos a 194 μ L do meio reacional, totalizando 200 μ L que foram transferidos para uma placa de 96 poços, este procedimento foi feito em triplicata. A reação foi iniciada colocando a placa de 96 poços sob uma lâmpada de 30 W (distância de 10 cm entre a placa e lâmpada) a 25 °C por 15 minutos, em um ambiente totalmente escuro), passados os 15 minutos foi feita a leitura de absorbância a 560 nm. A atividade enzimática foi expressa como unidade de atividade de SOD (U) por mg de proteína total. Uma unidade da atividade de SOD equivale a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da redução do NBT no procedimento experimental. Nesta reação a SOD atua protegendo o NBT da redução, quão menor for o percentual de redução do NBT, maior será a atividade de SOD nos extratos.

2.3.5 Análise metabolômica via ressonância magnética nuclear de 1H (RMN)

Os espectros de RMN de 1H , COSY, HSQC foram adquiridos no espectrômetro Bruker AVANCE III de 400 MHz para frequência do hidrogênio e 100 MHz para frequência do carbono, e no espectrômetro Bruker AVANCE III de 600 MHz para frequência do hidrogênio e 150 MHz para frequência do carbono, localizado no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. Foi utilizado como padrão interno de referência o 3-sal de sódio (trimetilsilil) propiônico-2,2,3,3 ácido D4 (TMSP-d4).

Para conduzir a análise, os extratos aquosos da extração de metabólitos primários foram liofilizados por 24 horas e ressuspensos utilizando 700 μL da mistura de solvente deuterados água:metanol (75:25) com tampão fosfato, levados ao vórtex, ao banho ultrassônico por 5 minutos a 25 $^{\circ}\text{C}$, posteriormente ao freezer por 5 minutos (para ajudar a precipitar as proteínas), e, por fim a centrifuga por 5 minutos a 25 $^{\circ}\text{C}$, 14000 rpm (figura 7). Alíquotas de 500 μL foram coletados do sobrenadante e transferidos para tubos de 5 mm. Após a aquisição dos espectros de ^1H , foi feito um pool com todas as amostras para a aquisição dos espectros de COSY e HSQC. Todos os espectros foram analisados nos softwares NmrProcflow (<https://nmrprocflow.org/>), Chenomix e MestReNova.

Figura 7. Esquema do preparo das amostras para análises via RMN



Fonte: autoria própria

2.2.6 Análise estatística multivariada

O conjunto de dados dos metabólitos obtidos via RMN de ^1H e GC-MS foram carregados e normalizados no MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>), uma plataforma abrangente para estudo de metabolômica de alto rendimento, onde é possível identificar os metabólitos que se expressam de forma diferencial em condições distintas. As análises incluíram Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA), análise hierárquica de agrupamento, mapa de calor, pontuações de Importância Variável na Projeção (VIP). A normalização por soma permitiu que as diferenças gerais entre as amostras fossem ajustadas. A transformação dos dados de raiz quadrada e a centralização média foram executadas para que os fossem comparáveis entre si.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises de bioinformática

3.1.1 Identificação dos genes da família GDSL esterase/lipase em *Ricinus communis*

Inicialmente a identificação da família de genes GDSL esterase/lipase em *R. communis* (*RcGELP*) foi realizada na base de dados NCBI, onde foram encontradas 98 proteínas com o domínio GDSL, que foram nomeadas de RcGELP1 a RcGELP98. Posteriormente, as sequências de aminoácidos foram analisadas no banco de dados SMART para a confirmação dos domínios conservados, nesta etapa duas proteínas não apresentaram a conservação do domínio GDSL (PF00657), RcGELP11 E RcGELP66, portanto, foram excluídas. As demais sequências apresentaram apenas um único domínio, exceto RcGELP81, que também apresentava o domínio Amino oxidase (tabela 1).

Por fim, a sequência do domínio GDSL foi carregada no banco de dados phytozome, onde foram recuperadas um total de 96 sequências genômicas, peptídicas e CDS para GDSL esterase/lipase em *R. communis*. Já para a *A. thaliana* foram recuperadas as sequências genômicas, peptídicas e CDS. A família de genes RcGELP apresentou um aumento considerável no número de membros quando comparada ao organismo modelo *Physcomitrella patens* (57 genes) e milho (*Zea mays*, 53 genes) (VOLOKITA et al, 2011). Esses resultados sugerem que *R. communis* pode ter sofrido eventos específicos de expansão de genes dentro do seu processo evolutivo.

O peso molecular das proteínas variou de 14.7779,07 a 106.243,77 Da, com comprimento variando de 127 a 964 aa e ponto isoelétrico variando de 4,43 a 9,70. 83 das 96 proteínas (86,4%) foram caracterizadas como estáveis em termos de hidrofobicidade, o coeficiente médio de hidrofobicidade de 70 proteínas é negativo, indicando que a maioria da família é hidrofóbica. O número total de aminoácidos básicos codificados por 52 das 96 proteínas foi maior do que o dos aminoácidos ácidos, portanto, 54% das proteínas são caracterizadas como básicas. RcGELP9, RcGELP25, RcGELP53, RcGELP80 e RcGELP98 foram caracterizadas como proteínas neutras (apêndice 1).

Espécies vegetais que mantem um grande número de membros na família de genes durante o curso de sua evolução geralmente foram submetidas a duplicação segmentar em tandem ou em grande escala (KUO et al, 2019; CANNON et al, 2004). Até o momento, a maioria das famílias de genes de plantas examinadas se originou por duplicação. A família de genes RcGELP apresenta 56 genes originados através de eventos de duplicação em tandem (apêndice 2), a maioria dos genes estão localizados na membrana plasmática e extracelular. Os eventos de duplicação de genes ajudam na aclimação de plantas por meio do aumento e diversificação e especificidade de produtos naturais obtidos das plantas e gerando novos genes funcionais (KUO et al, 2019). A grande taxa de genes resultantes de duplicação em tandem pode estar contribuindo para a tolerância de *R. communis* frente a abióticos e bióticos.

Tabela 1. Membros da família do gene GDSL esterase/lipase em *R. communis*.

Gene	Gene ID	Domínios	Localização subcelular
RcGELP1	27585.m000146	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP2	27585.m000148	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP3	27585.m000149	Lipase_GDSL	Extracelular Membrana plasmática
RcGEPL4	27585.m000150	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP5	27585.m000151	Lipase_GDSL	Vacúolo
RcGELP6	27585.m000152	Lipase_GDSL	Membrana plasmática Vacúolo
RcGELP7	28565.m000324	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP8	28686.m000044	Lipase_GDSL	Citoplasma
RcGELP9	28686.m000045	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP10	28686.m000046	Lipase_GDSL	Extracelular Mitocôndria
RcGELP12	28885.m000107	Lipase_GDSL	Citoplasma
RcGELP13	28885.m000108	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP14	28885.m000109	Lipase_GDSL	Vacúolo
RcGELP15	28885.m000110	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP16	28885.m00112	Lipase_GDSL	Membrana plasmática

Gene	Gene ID	Domínios	Localização subcelular
RcGELP17	28885.m00113	Lipase_GDSL	Vacúolo
RcGELP18	28962.m000453	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP19	28962.m000454	Lipase_GDSL	Extracelular Membrana plasmática
RcGELP20	29005.m000259	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP21	29620.m000549	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP22	29620.m000550	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP23	29625.m000675	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP24	29634.m002166	Lipase_GDSL	Extracelular Membrana plasmática
RcGELP25	29640.m000407	Lipase_GDSL	Citoplasma
RcGELP26	29676.m001669	Lipase_GDSL	Extracelular Membrana plasmática
RcGELP27	29680.m001738	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP28	29680.m001739	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP29	29680.m001740	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP30	29680.m001741	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP31	29680.m001742	Lipase_GDSL	Mitocôndria
RcGELP32	29683.m000474	Lipase_GDSL	Extracelular membrana plasmática
RcGELP33	29703.m001547	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP34	29716.m000306	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP35	29717.m000225	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP36	29739.m003689	Lipase_GDSL	Vacúolo
RcGELP37	29790.m000852	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP38	29790.m000853	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP39	29792.m000610	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP40	29792.m000611	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP41	29792.m000612	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP42	29814.m000745	Lipase_GDSL	Extracelular Membrana plasmática
RcGELP43	29814.m000746	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP44	29815.m000492	Lipase_GDSL	Extracelular Membrana plasmática
RcGELP45	29822.m003328	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP46	29822.m003329	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP47	29830.m001404	Lipase_GDSL	Membrana plasmática

(Continuação da tabela 1)

Gene	Gene ID	Domínios	Localização subcelular
RcGELP48	29864.m001449	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP49	29889.m003304	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP50	29889.m003305	Lipase_GDSL	Mitocôndria
RcGELP51	29889.m003306	Lipase_GDSL	Extracelular Membrana plasmática
RcGELP52	29900.m001562	Lipase_GDSL	Extracelular Membrana plasmática
RcGELP53	29900.m001563	Lipase_GDSL	Extracelular Membrana plasmática
RcGELP54	29907.m000651	Lipase_GDSL	Extracelular Membrana plasmática
RcGELP55	29907.m000652	Lipase_GDSL	Extracelular Membrana plasmática Lisossomos
RcGELP56	29908.m006189	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP57	29908.m006190	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP58	29908.m006192	Lipase_GDSL	Extracelular Membrana plasmática Vacúolo
RcGELP59	29917.m002026	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP60	29929.m004523	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP61	29929.m004524	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP62	29929.m004536	Lipase_GDSL	Extracelular Membrana plasmática
RcGELP63	29929.m004758	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP64	29930.m000608	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP65	29930.m000609	Lipase_GDSL	Extracelular Núcleo
RcGELP67	29983.m003294	Lipase_GDSL	Extracelular Membrana plasmática
RcGELP68	29983.m003318	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP69	29991.m000624	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP70	30022.m000382	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP71	30026.m001502	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP72	30026.m001503	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP73	30026.m001504	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP74	30026.m001505	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP75	30026.m001506	Lipase_GDSL	Extracelular

(continuação da tabela 1)

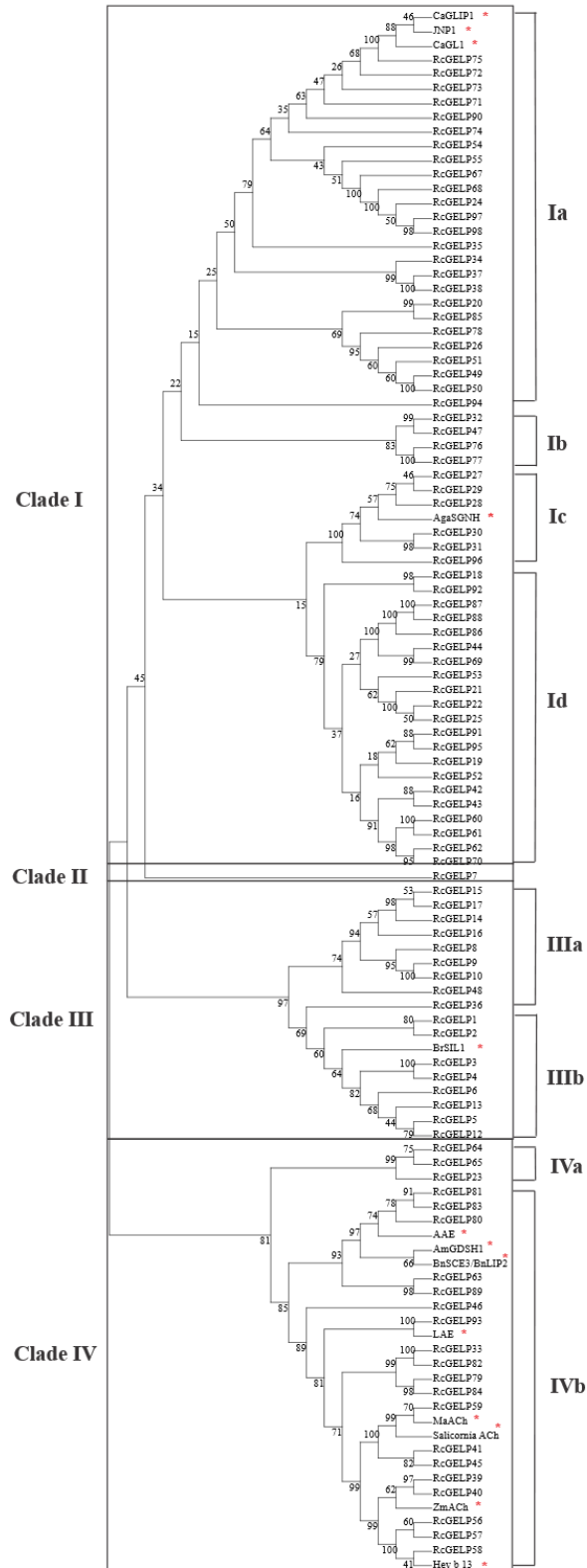
Gene	Gene ID	Domínios	Localização subcelular
RcGELP76	30064.m000487	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP77	30064.m000489	Lipase_GDSL	Vacúolo
RcGELP78	30068.m002583	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP79	30076.m004597	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP80	30114.m000518	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP81	30128.m008623	Lipase_GDSL Amino_oxidase	Extracelular Membrana plasmática
RcGELP82	30128.m008733	Lipase_GDSL	Citoplasma
RcGELP83	30128.m008843	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP84	30128.m008951	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP85	30138.m004067	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP86	30146.m003475	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP87	30146.m003477	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP88	30146.m003480	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP89	30147.m013809	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP90	30169.m006260	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP91	30170.m014261	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP92	30170.m014262	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP93	30174.m008697	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP94	30190.m010852	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP95	30190.m011297	Lipase_GDSL	Extracelular Vacúolo
RcGELP96	30204.m001822	Lipase_GDSL	Membrana plasmática
RcGELP97	44916.m000014	Lipase_GDSL	Extracelular
RcGELP98	57960.m000015	Lipase_GDSL	Extracelular

3.1.2 Análise filogenética e predição das localizações celulares

As localizações subcelulares das proteínas RcGELP foram preditas no software CELLO, onde foram identificadas sete diferentes localizações na célula (tabela 1), incluindo membrana plasmática, núcleo, citoplasma, vacúolo, mitocôndria, lisossomos e localização extracelular. Isso indica que os genes da família RcGELP são funcionalmente distribuídos em diversos compartimentos da célula, assim como foi relatado para *Oryza sativa* e outras plantas superiores (JIANG et al, 2012; VOLOKITA et al, 2011; CHEPYSHKO et al. 2012; DONG et al. 2016). A grande maioria das proteínas está localizada na membrana plasmática (49) e extracelular (53) e apenas três proteínas foram localizadas no núcleo. Conhecer a localização subcelular de uma proteína é especialmente importante, pois as funções das proteínas estão intimamente relacionadas às suas localizações nas células (PAN et al, 2021). As proteínas localizadas na membrana plasmática, por exemplo, assumem alguns papéis: transporte de nutrientes através da membrana, captação de sinais químicos de fora da célula e traduzir os sinais químicos em ação intracelular (COURNIA et al, 2015).

Para estudar as relações evolutivas e filogenéticas entre a família gênica RcGELP e outros genes GELPs de plantas, cujas funções já foram elucidadas em outros estudos, foi construída uma árvore filogenética baseada no alinhamento de 96 sequências de proteínas RcGELP e 13 sequências das GELPS com funções conhecidas, a árvore foi construída pelo método de *neighbour-joining* (agrupamentos vizinhos, NJ). Os genes RcGELP e seus homólogos ou ortólogos de espécies vegetais próximas foram divididos em quatro principais subfamílias representadas pelos clades I, II, III e IV que compreendem 60, 1, 18, 30 membros respectivamente (figura 8). As proteínas com as funções conhecidas foram distribuídas por todos os clades, exceto pelo clade II.

Figura 8. Relações filogenéticas de GELPs em *Ricinus communis* e seqüências de proteínas GELPs com funções conhecidas em outras plantas
AAE, AgaSGNH, AmGDSH1, BnSCE3/BnLIP2, BrSIL1, CaGL1, CaGLIP1, Hev b 13, JNP1, LAE, MaACh, Saliornia ACh marcado com asteriscos. Os subclados são numerados na parte direita da árvore.



Fonte: autoria própria

O clade I foi dividido em quatro subclades (Ia, Ib, Ic e Id), com *AgaSGNH* agrupada no subclade Ic, *CaGL1*, *CaGLIP1* e *JNP1* agrupadas no subclade Ia. O clade III foi dividido em dois subclados (IIIa, IIIb), com *BrSIL1* agrupada no subclade IIIb. O clade IV também foi dividido em dois subclades (IVa, IVb), com *AAE*, *AmGDSH1* e *BnSCE3/BnLIP2*, *LAE*, *MaACh*, *Saliornia ACh*, *ZmACh* e *Hev b 13* agrupadas no subclade IVb. Portanto, de acordo com as relações filogenéticas entre os 13 genes GDSL esterase/lipase de espécies vegetais que já tiveram suas funções elucidadas e os *RcGELPs*, foi demonstrado que os genes de funções conhecidas foram agrupados nos clades I, III e IV (figura 9).

Considerando que genes ortólogos na maioria das vezes compartilham funções equivalentes, é possível deduzir as informações funcionais de GDSL esterases/lipases a partir de ortólogos com funções conhecidas (VOLOKITA et al, 2011). Seguindo esta suposição é possível extrapolar as funções dos 13 genes para os *RcGELPs* através das descrições funcionais dos ortólogos (apêndice 3) e das relações filogenéticas. Os membros da família GDSL esterases/lipases de *R. communis* *RcGELP27*, *RcGELP28* e *RcGELP29*, foram agrupados no subclade Ic com *AgaSGNH* (*Agave americana*) uma proteína extracelular que desempenha um papel no metabolismo da parede celular e no metabolismo da cutícula vegetal (REINA et al. 2007), sugerindo que estes *RcGELPs* no Ic podem desempenhar um papel crucial no desenvolvimento e morfogênese das plantas.

Os genes *JNP1* (*Jacaranda mimosifolia*) que hidrolisam os lipídios do néctar de Jacarandá e podem liberar ácidos graxos que previnem o crescimento microbiano dentro do néctar (KRAM et al. 2008); *CaGLIP1* (*Capsicum annuum*) foi ativado via sinalização dependente de ácido salicílico na presença do patógeno *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) (HONG et al, 2008) e *CaGL1* (*Capsicum annuum*) foi induzido por ácido metil jasmônico (MeJA) e estímulos locais/sistêmicos em feridas (KIM et al, 2008) foram agrupados com *RcGELP75* no subclade Ia. Estas observações sugerem que os genes do clade I desempenham papéis importantes nos estresses abióticos e bióticos e no desenvolvimento e morfogênese das plantas. *RcGELP1*, *RcGELP2*, *RcGELP3* e *RcGELP4* foram agrupados no subclade IIIb, apresentando similaridade com *BrSIL1* (*Brassica rapa*), que confere à planta uma Resistência Sistêmica Adquirida na presença do patógeno não hospedeiro (LEE KA, 2003). Indicando

que os genes *RcGELPs* destacados desempenham papéis importantes frente a estresses bióticos.

No subclade IVa o *RcGELP80* foi agrupado com *AmGDSH1*(*Alopecurus myosuroides*) que apresenta atividade da acetilajmalina hidrolase e está envolvido no metabolismo de lipídeos (CUMMINS e EDWARDS 2004); AAE (*Rauvolfia serpentina*), importante nos estágios finais da formação de ajmalina, um alcaloide encontrado na raiz de *Rauvolfia serpentina* (RUPPERT et al, 2005) e *BnSCE3/BnLIP2* (*Brassica napus*) que participa da hidrólise da sinapina durante a germinação das sementes de colza (CLAUSS et al, 2008). No subclade IVb, LAE (*Digitalis lanata*) pode participar da biossíntese e transformação de cardenólídeos e também desempenha um papel hipotético combinado com a parede celular (KANDZIA et al, 1998) foi agrupado com *RcGELP93*. A parede celular é uma estrutura bastante dinâmica, sua composição e estrutura durante o desenvolvimento das plantas mudam de acordo com os estímulos externos e internos (VAAHTERA et al, 2019).

Alguns *RcGELPs* podem desempenhar papéis no metabolismo da parede celular durante o desenvolvimento das plantas. Ainda no subclade IVb, *RcGELP56*, *RcGELP57* e *RcGELP58* foram agrupados com *Hevb 13* (*Hevea brasiliensis*), hipoteticamente envolvido na formação de nódulos (ROUGE et al, 2010). Os representantes da família gênica acetilcolinesterase (AChE), *MaAChE* (*Macroptilium atropurpureum*) e *Salicornia AChE* (*Salicornia europae*), que desempenham papéis na mediação do Sistema metabólico e no acúmulo de sal nas raízes e na parte inferior do caule (YAMAMMOTO et al, 2008, 2009) foram agrupados com *RcGELP59*.

Além disso, as *GELPs* de funções conhecidas também compartilham motifs semelhantes (apêndice 3) com as *RcGELPs* com as quais foram agrupadas, reforçando a hipótese de os genes possuírem funções semelhantes (LAI et al, 2017). A análise das relações evolutivas entre os *RcGELPs* e seus ortólogos com funções conhecidas demonstrou que os GDSL esterases/lipases de *R. communis* podem desempenhar funções relacionadas aos estresses bióticos e abióticos, metabolismo secundário e desenvolvimento e morfogênese da planta, no entanto, as funções moleculares e fisiológicas reais da família gênica precisam ser estudadas posteriormente através de experimentos *in vitro*.

3.1.3 Identificação de motivos conservados das proteínas *RcGELP* e análise da estrutura gênica.

A estrutura gênica foi avaliada usando a ferramenta Gene Structure Display Server (GSDS) e os motivos conservados foram identificados usando The Multiple Expectation Maximization for Motif Elicitation (MEME). Foram encontrados seis motivos putativos entre as proteínas *RcGELP* com comprimentos em média de 21 aminoácidos. Cinco motivos foram encontrados como domínio de proteínas GDSL esterase/lipase (tabela 2). Os *GELPs* um único motivo conservado GDSXXDXG (sendo X qualquer aminoácido), aqui representado pelo motivo 4, presente em 63 (65,6%) das proteínas.

Tabela 2. Sequências de aminoácidos de seis motivos putativos encontrados em 96 proteínas *RcGELP*

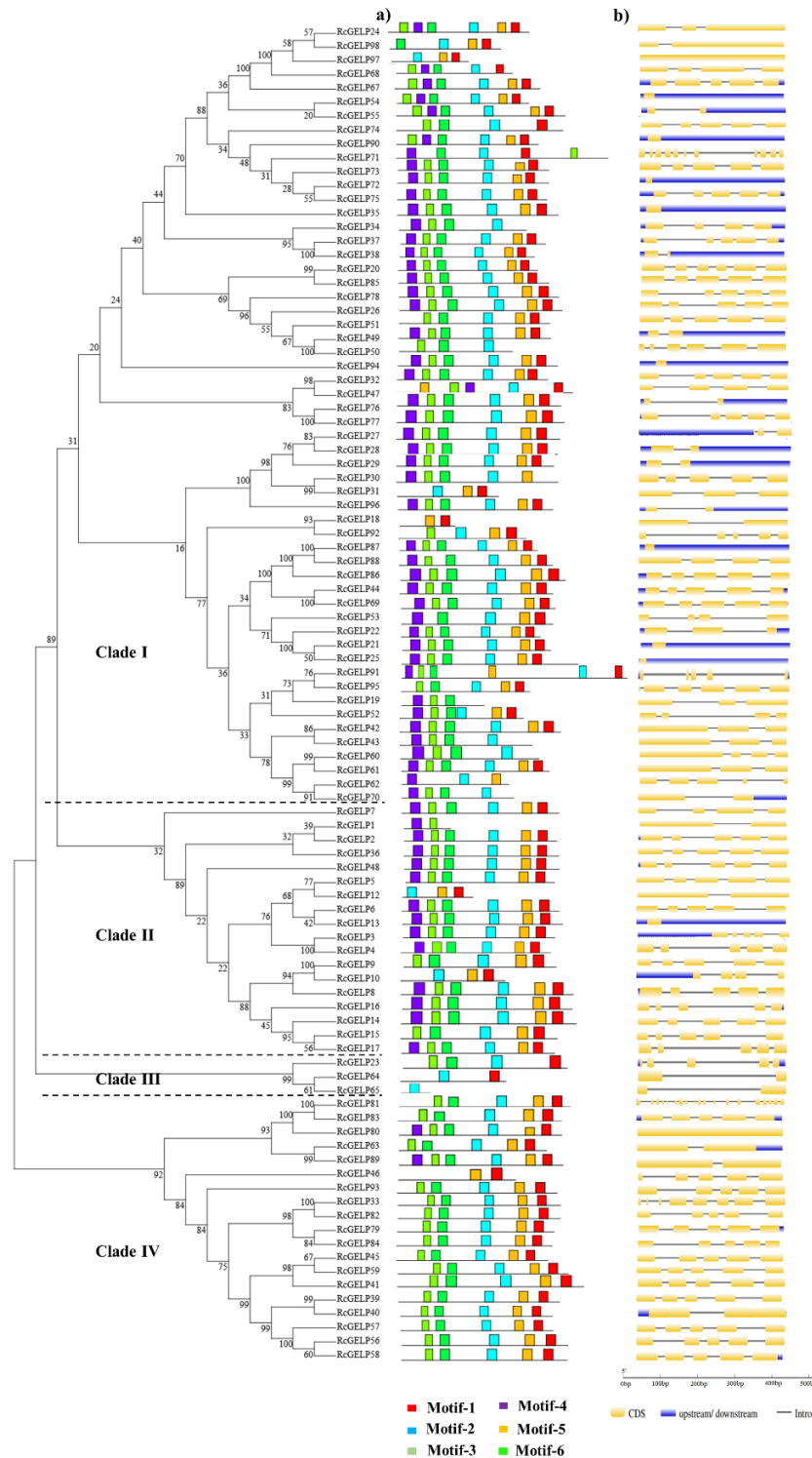
MOTIF	SEQUÊNCIA	VALOR DE E	DESCRIÇÃO
1	LCSBPSEYVFWDFHPTAAN	8.0e-977	PF00657, GDSL-like lipase/acilhidrolase
2	LYNLGARKFAVTGLGPJGCLP	5.5e-892	PF00657, GDSL-like lipase/acilhidrolase
3	PTGRFSBGRLIPDFIAESLGL	3.2e-709	PF00657, GDSL-like lipase/acilhidrolase
4	PKVPALFVFGDSLVDAGNNNYL	1.5e-633	PF00657, GDSL-like lipase/acilhidrolase
5	LINNPSKYGFKEAKKACCGTG	5.6e-602	PF00657, GDSL-like lipase/acilhidrolase
6	BFLNGVNFASAGSGILNETGQ	2.2e-563	Não encontrado

Foi identificado que 51 das 96 (53%) proteínas apresentavam todos os seis motivos, dentre as quais, 44 estavam localizadas extracelular ou na membrana plasmática. O motivo 6 foi identificado em todas as proteínas exceto em *RcGELP1*, *RcGELP12*, *RcGELP18*, *RcGELP31*, *RcGELP46*, *RcGELP64*, *RcGELP65*, *RcGELP92* e *RcGELP97*. As proteínas citoplasmáticas e mitocondriais apresentavam predominantemente os motivos 2,5 e 1, já as proteínas localizadas no vacúolo, em sua maioria, apresentavam os seis motivos putativos.

Motivos são padrões curtos conservados ao longo da evolução, estes estão relacionados diretamente com a função de uma proteína (LIU; ROST, 2003).

Tendo em vista que boa parte das proteínas RcGELP apresentam padrões de motifs muito semelhantes e, adicionalmente, a maioria delas apresentam os seis motifs identificados em suas estruturas (figura 9), isso sugere que esta família de proteínas apresenta uma boa plasticidade para responder a condições adversas, como estresses abióticos. O que significa dizer que as proteínas podem apresentar características distintas conforme as condições estressantes.

Figura 9. Motifs conservados e estrutura dos genes RcGELPs. **a)** árvore filogenética e distribuição de motivos conservados de 96 proteínas RcGELP. Os seis motivos putativos são indicados em caixas de cores diferentes. **b)** Organização exons/introns dos genes RcGELP. As caixas amarelas representam os exons, as linhas pretas representam os introns e as caixas azuis representam as regiões upstream/downstream (5' e 3' UTR).



Fonte: autoria própria

A avaliação da configuração exon-intron nas sequências dos genes *RcGELPs* revelou que os genes possuem relativa diversidade em suas estruturas (figura 9b). 32 dos 96 (33,3%) genes apresentam pelo menos uma região upstream/downstream, 12 genes (12,5%) não apresentavam introns, enquanto que apenas três genes (*RcGELP10*, *RcGELP33*, *RcGELP81*) apresentam mais de cinco introns em sua estrutura. A maioria dos genes localizados no vacúolo apresentaram 5 exons e 4 introns, sem regiões upstream/downstream, exceto por *RcGELP58* e *RcGELP77*. Na estrutura dos genes mitocondriais foram identificadas a presença de pelo menos 2 introns e não foram identificadas regiões upstream/downstream. 3 dos 4 genes localizados no citoplasma também não apresentaram regiões upstream/downstream.

Os genes *RcGELP33*, *RcGELP39*, *RcGELP40*, *RcGELP41*, *RcGELP45*, *RcGELP46*, *RcGELP56*, *RcGELP57*, *RcGELP58*, *RcGELP59*, *RcGELP79*, *RcGELP82*, *RcGELP84* e *RcGELP93*, possuem localização extracelular e são intimamente ligados, foram agrupados no clade IV (figura 9a), eles apresentam número de introns e comprimento de exons comparáveis entre si, dentre eles, apenas três genes apresentam uma região upstream/downstream. *RcGELP1*, *RcGELP80*, *RcGELP89*, *RcGELP97* e *RcGELP98* apresentam exons com comprimento mais longo que outros genes da família e os genes *RcGELP16*, *RcGELP52*, *RcGELP53*, *RcGELP64*, *RcGELP65*, *RcGELP71*, *RcGELP76*, *RcGELP91* e *RcGELP92* apresentam os introns mais longos.

A análise da estrutura gênica da família *RcGELPs* ainda demonstrou que 43 (45%) dos genes tinham cinco éxons e quatro íntrons em sua estrutura (figura 11b, apêndice 4), também foram revelados genes com menos de 4 introns em sua estrutura, sendo que, 17 (18%) deles possuíam apenas 1 intron, ou seja, houve perda de íntrons. Outros 2 membros da família *RcGELP* possuíam 10 introns ou mais, representando o ganho de íntrons. Foi relatado que as diferenças na estrutura entre genes homólogos se devem principalmente a perda de íntrons, facilitando a geração de novos genes, contribuindo para uma grande diversidade de membros dentro de uma família de genes (VOLOKITA et al, 2011).

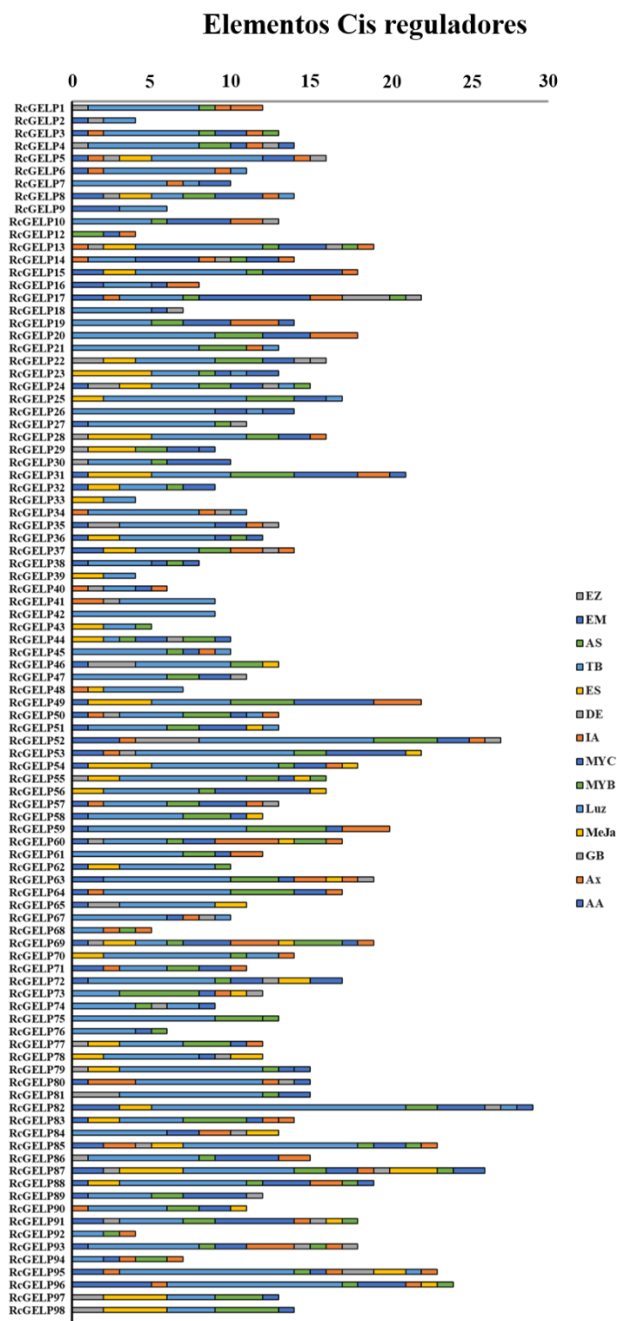
Os genes eucariotos apresentam em sua estrutura sequências codificantes (éxons) e sequências não codificantes (introns). Os íntrons são cruciais no processo de splicing alternativo, mecanismo molecular que produz proteínas com diferentes funções a partir de um único gene em uma célula eucariótica (JO; CHOI, 2015). Uma análise realizada em leveduras sugeriu que genes que possuem introns tendem a ter um nível mais alto de expressão gênica em comparação com genes sem íntrons (JUENAL et al, 2006). Todos os genes da família RcGELP apresentam pelo menos um intron na sua estrutura, exceto por *RcGELP54*, *RcGELP72*, *RcGELP80*, *RcGELP87*, *RcGELP90*, *RcGELP94*, *RcGELP97*, que não apresentavam íntrons, o que não é interessante, uma vez que existência de íntrons foi percebida como condição necessária para a origem de genes que codificam proteínas (JUENAL et al, 2006).

Além de contribuir para expressão e diversidade gênica, os íntrons protegem as sequências codificantes (éxons) de sofrerem mutações deletérias que ocorrem aleatoriamente. Tendo em vista que os mesmos ocupam cerca de 40% do comprimento total dos genes, boa parte das mutações acontecerão em regiões de íntrons e não afetarão as sequências e funções das proteínas (JO; CHOI, 2015). Grande parte dos genes com configurações éxon-ítron semelhantes denota que eles apresentam relações evolutivas semelhantes.

3.1.4 Identificação de elementos de ação *cis* em regiões promotoras de RcGELPs

Os elementos *cis* putativos nos promotores GPX foram identificados analisando as sequências de DNA de 1.000 bp na ferramenta online PlantCARE (figura 10, apêndice 5). A regulação da transcrição gênica envolve um sistema regulatório bastante complexo que envolve a associação entre fatores de transcrição e determinados elementos reguladores de ação *cis* (IBRAHEEM et al, 2010; KAUR et al, 2017). Os elementos reguladores de ação *cis* são motifs curtos de 5 a 20 bp presentes nas regiões promotoras dos genes alvo, eles são unidades regulatórias de genes transcricionais essenciais que controlam muitos processos biológicos e modulam as estratégias de defesa das plantas a estresses abióticos e bióticos resposta ao estresse (IBRAHEEM et al, 2010; PRIEST et al, 2009).

Figura 10. Representação gráfica dos elementos cis reguladores associados aos genes RcGELP. Ácido abscísico (AA), auxina (AX), giberelina (GB), jasmonato de metila (MeJa), respostas de luminosidade (Luz), MYB, MYC, indução anaeróbica (AI), resposta de defesa ou estresse (DE), expressão induzida por água crise (ES), temperaturas baixas (TB), ácido salicílico (SA), expressão de meristema (EM) e expressão de zeína (EZ).



Fonte: autoria própria

Elementos cis responsivos a luz foram os mais expressos em todos os genes, estando presente pelo menos uma vez em cada gene, exceto em

RcGELP12. Esses elementos também foram encontrados em maior quantidade em milho-zaburro (*Sorghum bicolor* L.) (MAHESHWARI et al, 2019) e laranja doce (*Citrus sinensis* L.) (MOSHARAF et al, 2020). Os elementos MYB e MYC que estão relacionados com o estresse hídrico também apresentou grande expressão na família gênica *RcGELP*. Em contrapartida, elementos relacionados a temperaturas baixas (TB), expressão de meristema (EM), resposta de defesa ou estresse (DE) expressão de zeína (EZ), expressão induzida por crise hídrica (ES), ácido salicílico (AS) e resposta de defesa ou estresse (DE) foram os menos expressos dentre os genes. Além disso, também foram identificados elementos atuantes em cis relacionados a hormônios vegetais, como ácido abscísico (AA), auxina (AX) e giberelina (GB).

Os padrões de expressão de um determinado gene são controlados por um conjunto de elementos cis que se manifestam em diferentes momentos ou em diferentes células, conferindo diferentes características a este gene (IBRAHEEM et al, 2010). A análise da região promotora dos genes *RcGELPs* revelou que a maioria dos motifs eram responsivos a luz (L), a ampla presença desse elemento cis em quase todos os genes demonstrou que a expressão dos *RcGELPs* pode ser bem regula pela luz. As plantas apresentam respostas complexas frente a luz, interferindo em vários processos de desenvolvimentos, incluindo o desenvolvimento da semente, cloroplasto e ritmos circadianos (IBRAHEEM et al, 2010).

Os hormônios vegetais ou fitohormônios são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, os elementos de ação cis responsivos a fitohormônios conferem as plantas uma maior tolerância frente a mudanças ambientais (MAHESHWARI et al, 2019; MOSHARAF et al, 2020). Foi relatado que o ácido salicílico (AS) é um importante hormônio de crescimento que desempenha funções regulatórias na resposta da planta a vários estresses abióticos e atua nas interações planta-microrganismos (SEO e PARK, 2010; GAFFNEY et al, 1993). O ácido salicílico auxilia nas condições de estresse induzindo processos fisiológicos, incluindo a indução da atividade antioxidante que minimiza os estresses oxidativos (BORSANI et al, 2001). A giberelina (GB) é um hormônio que regula vários aspectos do desenvolvimento das plantas, incluindo o alongamento do caule e expansão da folha, germinação e

desenvolvimento da semente e na taxa de crescimento (BEWLEY, 1997; RICHARDS et al, 2001; DERKX et al, 1994). Em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) uma maior tolerância aos estresses hídrico e salino foi atribuído a regulação das vias de sinalização de auxina e giberelina durante o crescimento da planta (LIU et al, 2017). O ácido abscísico (AA) regula a expressão e transcrição de genes envolvidos na resposta das plantas a alguns estresses abióticos, como estresse osmótico, salinidade e restrição hídrica. A aplicação exógena de ácido abscísico em *R. communis* aumentou os níveis de açúcar solúvel e de lipídios totais nas sementes em desenvolvimento (CHANDRASEKARAN; XU; LIU, 2014).

O metiljasmonato (MeJA) é um composto orgânico volátil com muitos efeitos fisiológicos em plantas, como a inibição da germinação de sementes, aumento da senescência foliar e crescimento de raízes (SEMBDNER e PARTHIER, 1993; WASTERNAK e PARTHIER, 1997) o MeJA também induz a expressão de proteínas ricas em prolinas que estão diretamente ligadas aos mecanismos de defesa das plantas (RUSHTON e SOMSSICH, 1998). Foi relatado que o elemento de ação cis responsivo ao metiljasmonato (MeJA) foi encontrado nas regiões promotoras de diversos genes responsivos aos patógenos e feridas em plantas (ROUSTER et al, 1997).

Os elementos cis atuantes MYB e MYB foram identificados nas regiões promotoras de um grande número de genes RcGELPs, estes elementos são necessários para a ligação de fatores de transcrição que são responsáveis pela expressão de genes induzíveis pelo estresse hídrico e ácido abscísico (IBRAHEEM et al, 2010; SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000; ABLE et al, 2003). Vários números e tipos de elementos cis foram identificados nas regiões promotoras dos genes RcGELPs (apêndice 5), indicando que os RcGELPs podem desempenhar diferentes papéis funcionais em estágios distintos de desenvolvimento da planta e podem ser regulados por vários fatores ambientais. A análise de elementos cis reguladores nos genes RcGELP evidenciam que os genes estão intimamente relacionados com as respostas a estresses abióticos e bióticos e mecanismos de defesa

3.2 Germinação de sementes de *A. thaliana* que superexpressam o gene *RcGELP* em resposta a estresses abióticos.

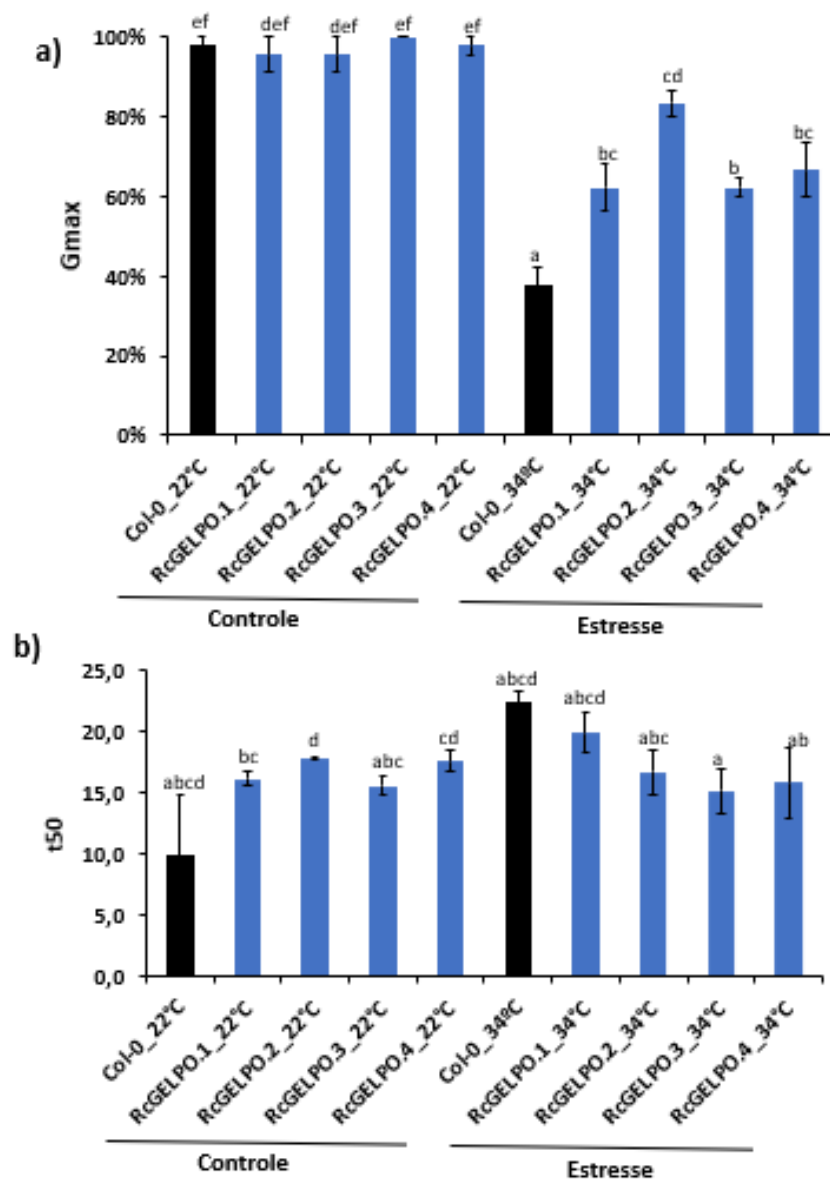
3.2.1 Estresse térmico

A temperatura de 34 °C foi escolhida como condição de estresse térmico com base no comportamento germinação de sementes de *R. communis* já relatos anteriormente (RIBEIRO et al, 2018). Ao contrário de outras espécies, as sementes de *R. communis* demonstram um excelente desempenho germinativo sob altas temperaturas, para *A. thaliana* a temperatura ótima para germinação é de 22 °C. Nas condições controle, sementes embebidas em água a 22 °C, quase 100% da germinação máxima foi observada para as sementes do tipo selvagem (col-0) e transgênicas (figura 11a).

A 34 °C as sementes de *A. thaliana* do tipo selvagem apresentaram apenas 38% de germinação máxima, enquanto que as sementes transgênicas apresentaram até 83% de germinação (figura 13^a). As linhagens de sementes que superexpressam o gene *RcGELP* (barras em azul), com as germinações variando de 62% a 83%, isto é, a germinação máxima dessas linhagens foi, pelo menos, quase que o dobro, quando comparado as sementes selvagens. As diferenças observadas na taxa de germinação máxima é um indicativo de que o gene alterou de alguma forma os mecanismos de germinação das sementes de *A. thaliana*

Figura 11a) Porcentagem de germinação máxima de sementes b) tempo médio de germinação de sementes de *A. thaliana* que superexpressam o gene RcGELP em resposta ao estresse térmico.

RcGELPO = linhagem que superexpressa o gene (O de “overexpress”). As médias e os erros padrão de três réplicas biológicas são mostrados. Letras diferentes acima das barras designam diferenças entre as amostras pelo HSD de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: autoria própria, 2022

Também foram observadas diferenças no tempo médio de germinação sob estresse térmico. As linhagens que superexpressam os genes RcGELP apresentaram t50 variando de 15 a 20 horas, enquanto que para as sementes selvagens foi necessárias 22,5 horas para que as mesmas germinarem 50% (figura 11b). Os resultados indicam que a superexpressão dos genes RcGELP pode induzir a termotolerância em *A. thaliana*, aumentando a taxa de germinação de suas sementes frente ao estresse de altas temperaturas.

Em estudos preliminares foi demonstrado que a enzima acetilcolinesterase (*AChE*) do tipo GDSL esterase/lipase contribuiu positivamente para a tolerância ao calor do milho (YAMAMOTO; SAKAMOTO; MOMONOKI, 2011). O tratamento térmico de 45 °C aumentou a atividade de *AChE* em cerca de 15% no coleóptilo (primeiras folhas), além disso, a superexpressão de *AChE* de milho em plantas de tabaco resultou na sobrevivência de pelo menos 61% das plantas transgênicas enquanto que as plantas selvagens não sobreviveram a exposição ao estresse térmico. Duas variedades de uvas cultivadas em região árida expostas a altas temperaturas também apresentaram correlação positiva entre a expressão de membros da família GDSL esterase/lipase e o estresse térmico (SALEH et al, 2018). Estes estudos indicaram que tais resultados pode ser o resultado de níveis de transcrição aumentados ou modificações pós traducionais.

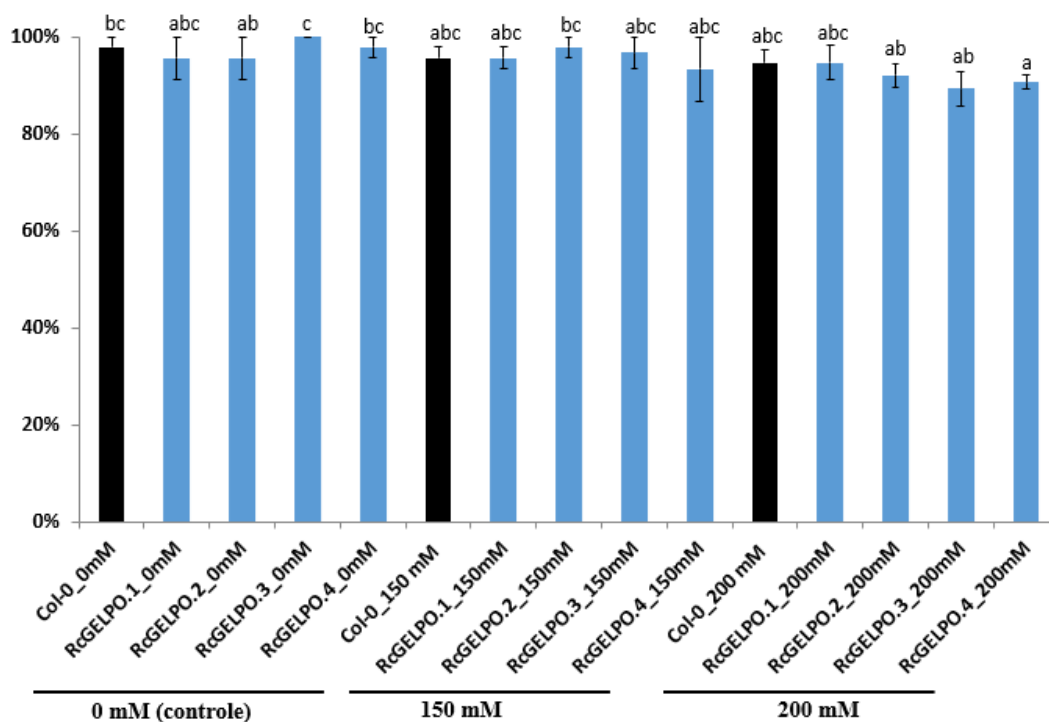
A principal fonte de energia para o processo de germinação de uma semente são os lipídios, mas especificamente os ácidos graxos. Os lipídios são armazenados em forma de triglicerídeo (tri-éster oriundo da combinação do glicerol com ácidos graxos) no citoplasma da célula (MAYER; POLJAKOFF-MAYBER, 1982). É razoável supor que o gene RcGELP esteja contribuindo para a germinação melhorada das sementes frente o estresse térmico, alterando seu metabolismo lipídico, visto que, genes esterase/lipase desempenham um papel importante no metabolismo lipídico das plantas, hidrolisando as ligações de ésteres em acilgliceróis (BHARDWAJ; RAJU; RAJASEKHARAN et al, 2001). Portanto, o gene pode cumprir o papel aumentar os níveis de ácidos graxos nas células para que o processo de germinação ocorra sem grandes danos, principalmente sob altas temperaturas, condição onde a semente requer ainda mais energia durante o processo germinativo.

3.2.2 Estresse hídrico simulado por manitol

O estresse hídrico foi simulado embebendo as sementes em soluções de diversas concentrações de manitol (0, 150, 200, 250 e 300 mM). Nenhuma diferença significativa foi encontrada na taxa de germinação entre as sementes selvagens e as sementes transgênicas em 150 mM, o mesmo aconteceu em 200 mM (figura 12). As taxas de germinação máxima das sementes no estresse se mantiveram muito parecidas com a taxas do controle.

Figura 12. Germinação máxima de sementes de *A. thaliana* que superexpressam o gene RcGELP em resposta ao estresse hídrico simulado com manitol nas concentrações 150 e 200 mM.

RcGELPO = linhagem que superexpressa o gene (O de “overexpress”). As médias e os erros padrão de três réplicas biológicas são mostrados. Letras diferentes acima das barras designam diferenças entre as amostras pelo HSD de Tukey ($p < 0,05$).

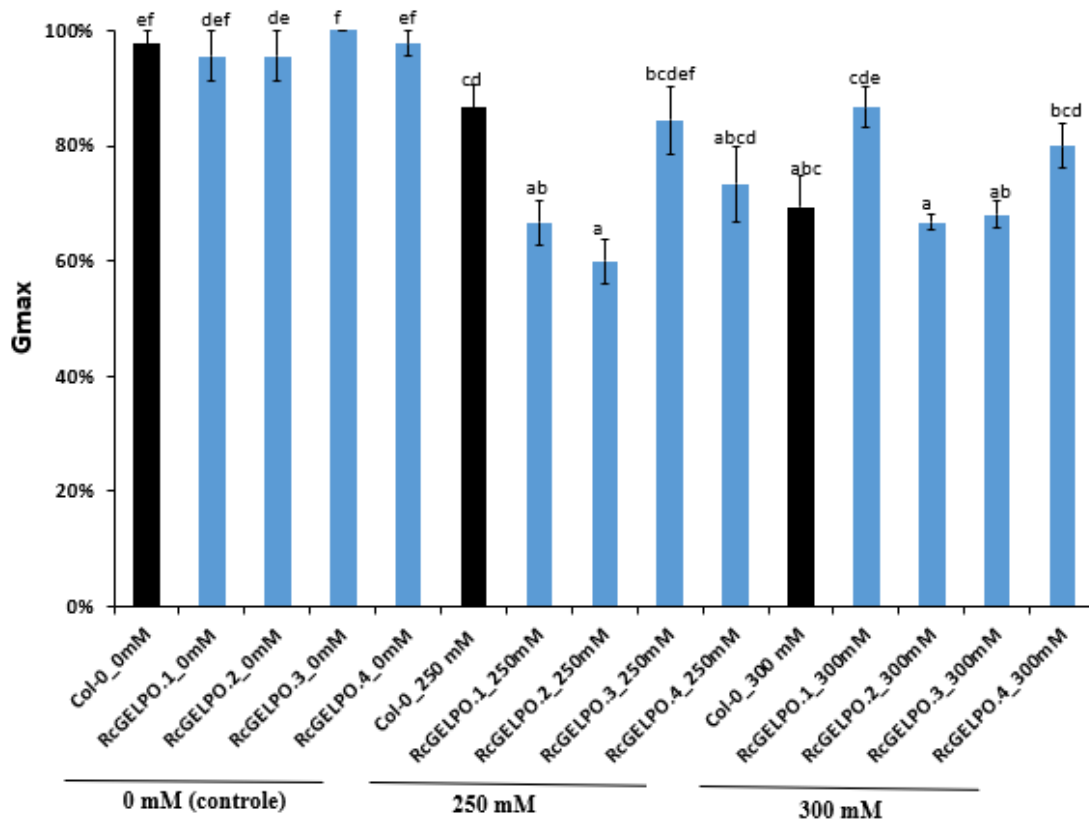


Fonte: autoria própria

Na concentração de 250 mM a germinação máxima das sementes selvagens caiu para 87%, no entanto, as sementes transgênicas também tiveram sua germinação reduzida (figura 13). As linhagens que superexpressam os genes apresentaram 66% de germinação máxima. Por fim, na concentração de 300 mM de manitol a germinação máxima das sementes selvagens caiu para 69%, as sementes transgênicas apresentaram germinações máximas ligeiramente maiores, com média de 75,5%, no entanto, sem nenhuma diferença significativa (figura 13).

Figura 13. Germinação máxima de sementes de *A. thaliana* que superexpressam o gene RcGELP em resposta ao estresse hídrico simulado com manitol nas concentrações 250 e 300 mM.

RcGELPO = linhagem que superexpressa o gene (O de “overexpress”). As médias e os erros padrão de três réplicas biológicas são mostrados. Letras diferentes acima das barras designam diferenças entre as amostras pelo HSD de Tukey ($p < 0,05$).

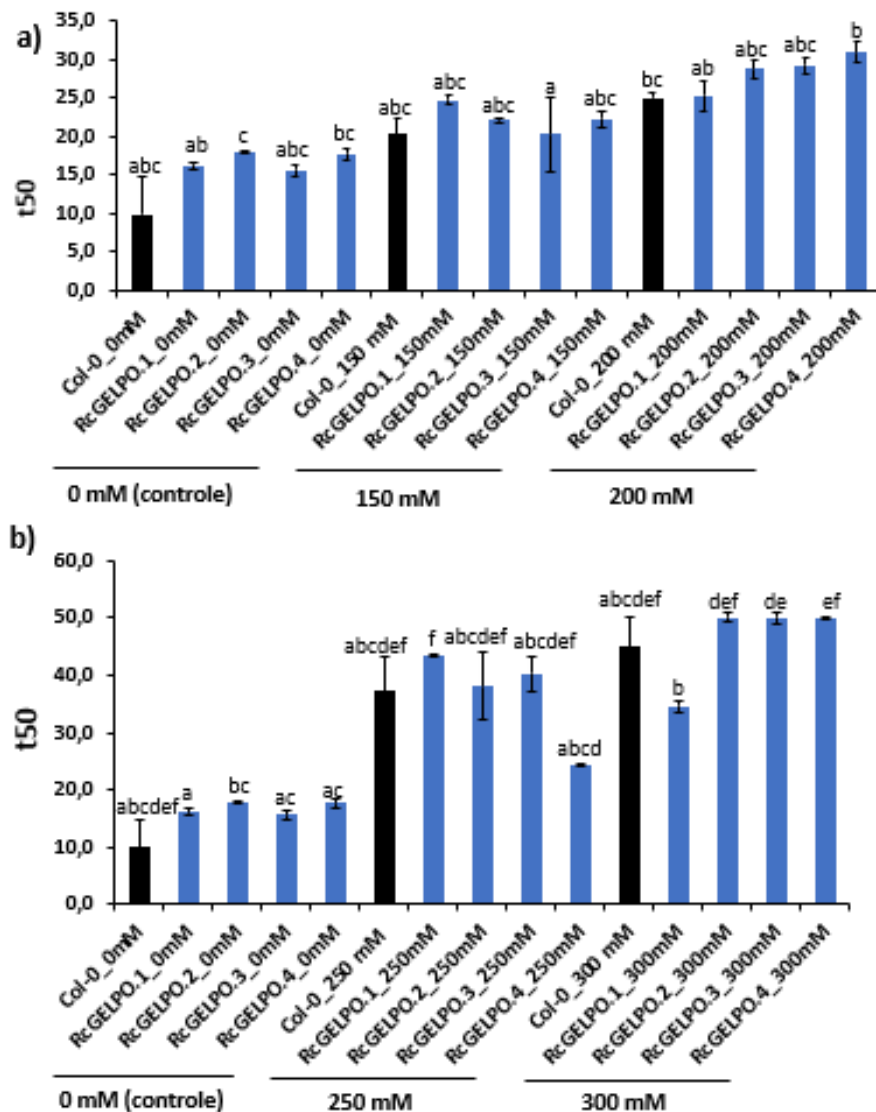


Fonte: autoria própria, 2022

Ainda que não significativas, também foram observadas diferenças no tempo médio de germinação (figura 14). Conforme as concentrações de manitol aumentavam, o tempo médio de germinação também aumentou, isto é, o estresse hídrico atrasou os processos germinativos. As sementes embebidas apenas em água (controle) apresentaram menor tempo médio de germinação, 15,4 horas, quando comparado com as sementes que germinaram sob estresse. Em 150, 200, 250 mM de manitol o t₅₀ foi de 22, 28 e 38,5 horas respectivamente. Em 300 mM, a média de tempo foi de 46 horas, quase três vezes maior que o controle. Os resultados demonstraram que a germinação máxima das sementes selvagens caiu conforme a restrição hídrica ficava mais proeminente. Entretanto esta queda não foi expressiva, assim como as diferenças entre a germinação das sementes transgênicas e selvagens. Portanto, não se pode afirmar se, ou de que forma o gene *RcGELP* é responsivo ao estresse hídrico simulado com manitol.

Figura 14. Tempo médio de germinação de sementes de *A. thaliana* ou superexpressam o gene RcGELP em resposta ao estresse hídrico simulado com manitol. a) nas concentrações 150 e 200 mM. b) 250 e 300 mM.

As médias e os erros padrão de três réplicas biológicas são mostrados. Letras diferentes acima das barras designam diferenças entre as amostras pelo HSD de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: autoria própria

O estudo de Hong et al (2008), avaliou se plantas transgênicas de *A. thaliana* superexpressando uma lipase GDSL de *Capsicum annuum* (pimenta) exibiriam resistência ao estresse hídrico, sementes de três linhagens transgênicas de *A. thaliana* foram germinadas em meio MS contendo 600 mM

de manitol. O tratamento com manitol diminuiu em 85% a taxa de germinação das sementes selvagens, porém as sementes transgênicas superexpressando o gene *CaGLIP1* apresentaram germinação máxima entre 75% e 100%, indicando que o gene conferiu as sementes tolerância frente ao estresse hídrico. Nas concentrações de manitol utilizadas neste trabalho não foi possível observar a mesma tendência, nem mesmo para o tratamento com concentração de 400 mM (dados não mostrados), onde a maioria das linhagens transgênicas não germinaram ou apresentaram taxas de germinação extremamente baixas.

Por outro lado, outros estudos apontam a não responsividade do gene frente ao estresse hídrico simulado por manitol. Sementes transgênicas de *A. thaliana* superexpressando uma esterase/lipase do tipo GDSL também de *A. thaliana* não demonstraram diferenças nas taxas de germinação quando comparado com sementes do tipo selvagem frente ao tratamento com manitol (Lai et al, 2017). Os genes *SFARs* (redutores de ácidos graxos) pertencente a família GELP de *A. thaliana* foram superexpressos em plantas de *A. thaliana*, entretanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre as plantas transgênicas e de tipo Col-0 durante a germinação e expansão de cotilédones ou esverdeamento sob tratamento com manitol (HUANG et al, 2015). Os trabalhos citados indicam que a responsividade do gene GDSL esterase/lipase ao estresse hídrico simulado por manitol pode está intimamente ligada ao tipo de espécie que o gene pertence.

Tendo em vista que, não foi possível indicar a responsividade do gene RcGELP frente ao estresse hídrico simulado por manitol, todas as análises posteriores foram feitas apenas para as sementes submetidas ao estresse térmico.

3.3 Quantificação de proteínas totais

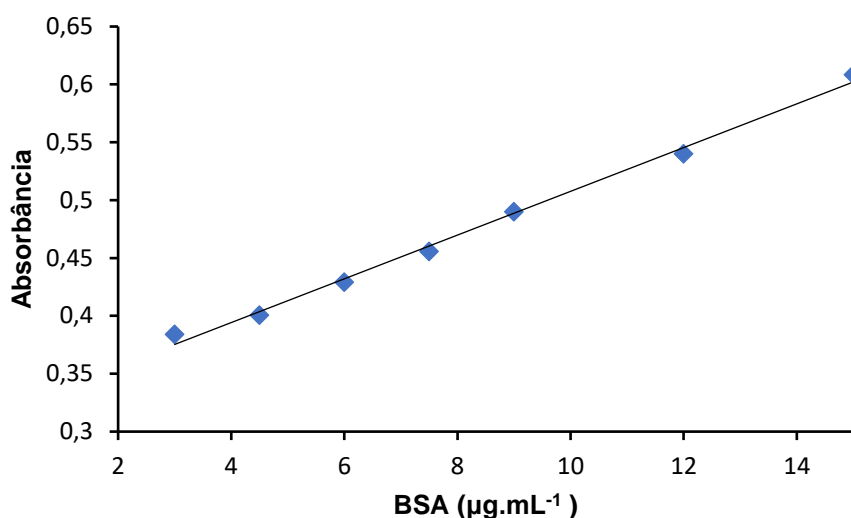
O método de Bradford é baseado na interação entre resíduos de aminoácidos das proteínas presentes na amostra com o corante e Coomassie® Brilliant Blue G-250 em uma solução ácida (REDMILE-GORDON et al, 2013). A adição do corante a uma solução de proteína resulta em uma mudança de cor marrom avermelhado para azul, indicando a formação do complexo corante-proteína, com a formação desse complexo o pico de absorvância da solução do corante se desloca de 465 para 595 nm, portanto a quantificação de proteínas totais é analisada no comprimento de onda de 595 nm (ZAIA; ZAIA; LICHTIG et al, 1998). O Ensaio de espectrofotométrico Bradford é um dos mais utilizados para a análise de teores de proteínas, muitos autores recomendam o método por conta de suas várias vantagens quando comparado a outros métodos (BONJOCH; TAMAYO, 2001).

As vantagens mais evidentes do método incluem o uso de poucos reagentes, para a realização do experimento é necessário apenas o reagente de Bradford juntamente com a Proteína de Soro Bovino (BSA); a alta estabilidade do complexo entre a proteína e o corante, os complexos formados podem permanecer em solução por até uma hora, essa estabilidade fornece uma janela de tempo grande o suficiente para a leitura de diversas amostras; reação rápida, a ligação entre o corante e a proteína é completada em aproximadamente dois minutos; alta reprodutibilidade e números bem menores de interferentes (BONJOCH; TAMAYO, 2001; SEEVARATNAM; PETEL; HAMADEH, 2009; REDMILE-GORDON et al, 2013; SAPAN; LUNDBLAD; PRICE, 1999). Estas vantagens sugerem que o ensaio de Bradford fornece resultados mais fidedignos de concentração de proteínas em comparação com outros ensaios (SEEVARATNAM; PETEL; HAMADEH, 2009).

Para a quantificação de proteínas totais nas amostras de soja foi necessário a construção de uma curva analítica de calibração utilizando uma solução estoque de BSA ($1440 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), a concentração de BSA na curva variou de 3 a $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (figura 15).

Figura 15. Curva de calibração para a quantificação de proteínas totais

$$R^2= 0,9951; \text{Equação da reta: } y= 0,0189x + 0,3186$$



Fonte: autoria própria

O valor satisfatório do coeficiente de determinação sugere que o ensaio apresentou uma boa linearidade, sendo assim, a concentração das proteínas nas amostras (tabela 4) foi calculada através da equação obtida no cálculo de regressão linear da curva. É necessário quantificar as proteínas para posterior normalização das amostras na análise da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

Tabela 4. Quantificação de proteínas totais das amostras de sementes de *A. thaliana* superexpressando o gene RcGELP

Linhagem	Proteínas totais (mg. g ⁻¹)	
	22°C	34°C
RcGELPO.1	0,3367	0,110 ± 0,013
RcGELPO.2	0,2874	0,085 ± 0,005
RcGELPO.3	0,4060	0,12 ± 0,017
Col-0	0,4259	0,100 ± 0,012

3.4 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

Sob condições de estresse a germinação é um período crucial para o desenvolvimento das plantas, onde a atividade metabólica está acelerada e há produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas células, podendo trazer impactos negativos para o estabelecimento da cultura e seu rendimento final. As espécies reativas de oxigênio são produzidas por organismos aeróbicos e estão, em condições normais, em equilíbrio com moléculas antioxidantes. Essas espécies apresentam um papel importante na quebra de dormência das sementes e contra estresses abióticos e bióticos (APEL; HIRT, 2004).

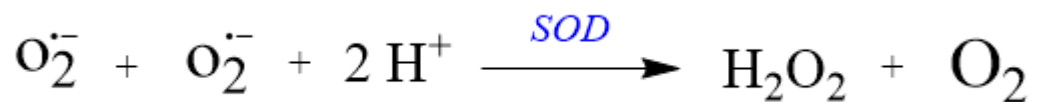
O estresse oxidativo acontece quando há um desequilíbrio entre a produção de ERO e a defesa antioxidante. Durante a germinação das sementes, a respiração celular produz grandes quantidades de ERO e estresses abióticos aceleram seu acúmulo (GAO et al, 2019). O acúmulo de ERO causa peroxidação de lipídios e pigmentos da membrana acarretando na perda da sua semipermeabilidade (XU et al, 2006; DEL RIO et al, 2018), podendo contribuir para o enfraquecimento do endosperma além do ideal, resultando na degradação da semente e o retardo na germinação (WANG et al, 2023).

Para prevenir os danos oxidativos as plantas apresentam um mecanismo de desintoxicação, que pode ser enzimático, mediado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peroxidase (POD), glutathione redutase (GR) e monodesidroascorbato redutase (MDAR) e não enzimático, mediado por metabólitos secundários, como antocianinas, carotenóides, flavononas e ácido ascórbico (ISMAIL et al, 2021; POSMYK et al, 2005).

A superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) é uma enzima antioxidante presente nos organismos aeróbicos, ela cumpre um papel especial nos organismos vegetais, pois atua na primeira linha de defesa contra os efeitos que as ERO causam nas plantas (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). A SOD catalisa a dismutação dos radicais superóxidos, radicais extremamente reativos e instáveis, em peróxido de hidrogênio, uma espécie molecular mais estável (figura 16) (SHAFI et al, 2015). O aumento da atividade de enzimas antioxidantes tem sido associado a tolerância ao estresse abiótico em plantas (DUAN et al,

2012), portanto, a atividade de SOD foi avaliada para investigar como a enzima se comporta em sementes de *A. thaliana* superexpressando o gene RcGELP frente ao estresse térmico.

Figura 16. Reação enzimática catalisada pela superóxido dismutase



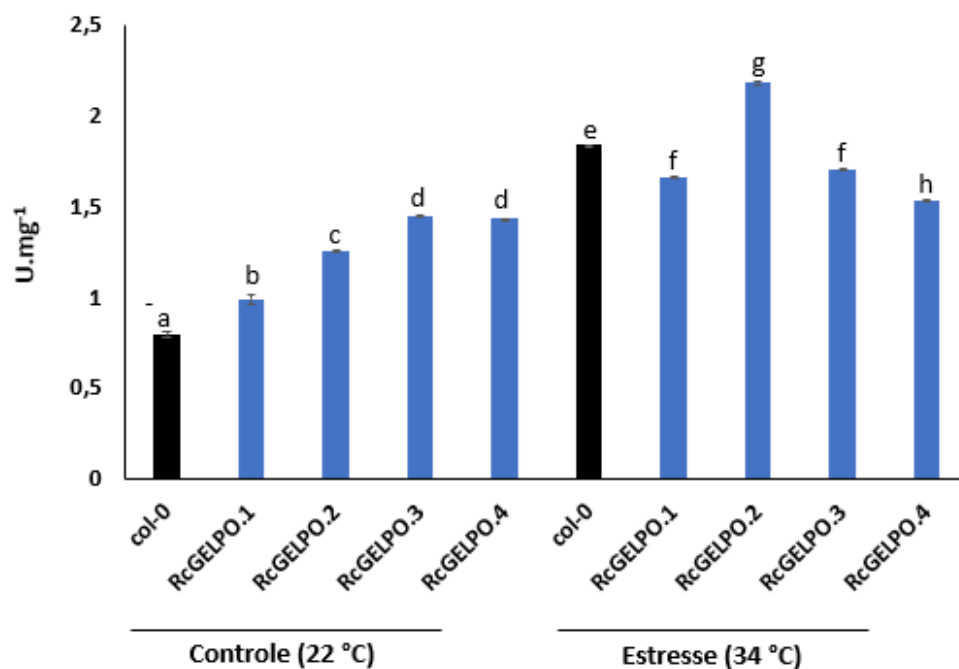
Fonte: autoria própria.

Fazendo uma comparação geral entre as condições controle e estresse, foi percebido um aumento para a atividade de SOD conforme as sementes foram estressadas. Aqui se destaca as sementes selvagens e a linhagem RcGELP.2 sob estresse, que apresentaram atividade aumentada em 2,3 e 1,5 vezes, respectivamente. Já está bem estabelecido na literatura que temperaturas elevadas podem levar ao aumento na atividade de SOD (TSANG et al, 1991; SEN RAYCHAUDHURI; DENG, 2000). Em plantas de Soja (*Glycine max*), a atividade média de SOD aumentou em até 96% com o aumento da temperatura (JUMRANI; BHATIA, 2019).

Na condição controle foi observado um aumento na atividade de SOD das linhagens transgênicas quando comparadas a linhagem selvagem. A Col-0 apresentou uma atividade de 0,79 U SOD.µg⁻¹ de proteína, enquanto que as sementes que superexpressam os genes apresentaram atividade de até 1,45 U SOD.µg⁻¹ de proteína, quase que o dobro da Col-0 (figura 17).

Figura 17. Atividade da Superóxido dismutase (SOD) em sementes de *A. thaliana* superexpressando o gene RcGELP em resposta ao estresse térmico.

As médias e os erros padrão de três réplicas biológicas são mostrados. Letras diferentes acima das barras designam diferenças entre as amostras pelo HSD de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: autoria própria.

Na condição de estresse térmico não foi percebido o mesmo padrão, apenas na linhagem RcGELP.2 a atividade de SOD foi maior (2,17 U SOD. μg^{-1} de proteína) quando comparada com a linhagem selvagem (1,83 U SOD. μg^{-1} de proteína). A linhagem RcGELP.2 também foi a que demonstrou uma maior taxa de germinação máxima (figura 11a). As espécies reativas de oxigênio desempenham um papel significativo na germinação de sementes, como, por exemplo, no enfraquecimento do endosperma para que haja a protusão da radícula, e mobilização de reservas (FAROOQ et al, 2021; MHAMDI; VAN BREUSEGEM, 2018). O êxito da germinação pode está intimamente ligado ao conteúdo de EROs e as atividades dos sistemas antioxidantes (GOMES; GARCIA, 2013).

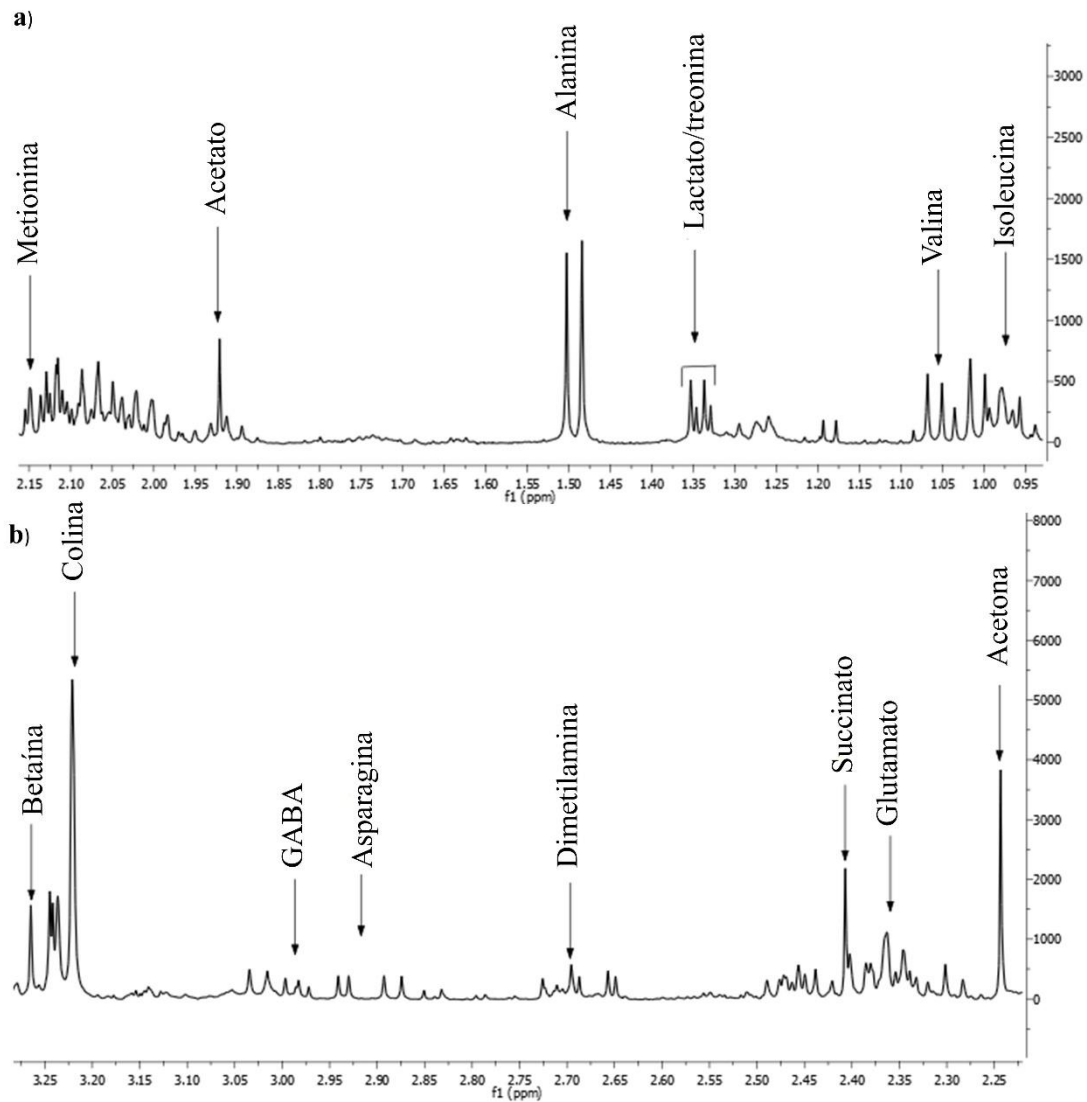
É possível que o aumento da atividade de SOD sob estresse térmico da linhagem RcGELP.2 quando comparado com as sementes selvagens seja apenas consequência da taxa de germinação da mesma. O acréscimo na taxa de germinação pode significar níveis maiores de EROS e consequentemente de SOD, para que seja mantida a homeostase celular. Portanto, os resultados apontam para uma não influência do gene no sistema antioxidante enzimático das sementes de *A. thaliana* sob estresse térmico. Por outro lado, podemos notar que em condições controle (22 °C), existe um aumento significativo da atividade de SOD, indicando que a superexpressão do gene nessas condições contribuiu para o aumento da atividade de SOD, vale ressaltar que a 22°C a germinação máxima foi praticamente a mesma para sementes transgênicas e selvagens.

3.5 Quantificação dos metabólitos nas amostras de *A. thaliana* superexpressando o gene RcGELP

Os processamentos dos espectros unidimensionais de ^1H foram desenvolvidos através do software Chenomix, onde é feito um ajuste manual da biblioteca de referência espectral aos sinais apropriados dentro do espectro. Para a quantificação dos metabólitos, os sinais foram identificados com a ajuda de dados já bem estabelecidos na literatura, onde procurou-se escolher regiões sem sobreposições (figuras 18 e 19), de modo que as análises feitas fossem fidedignas a realidade.

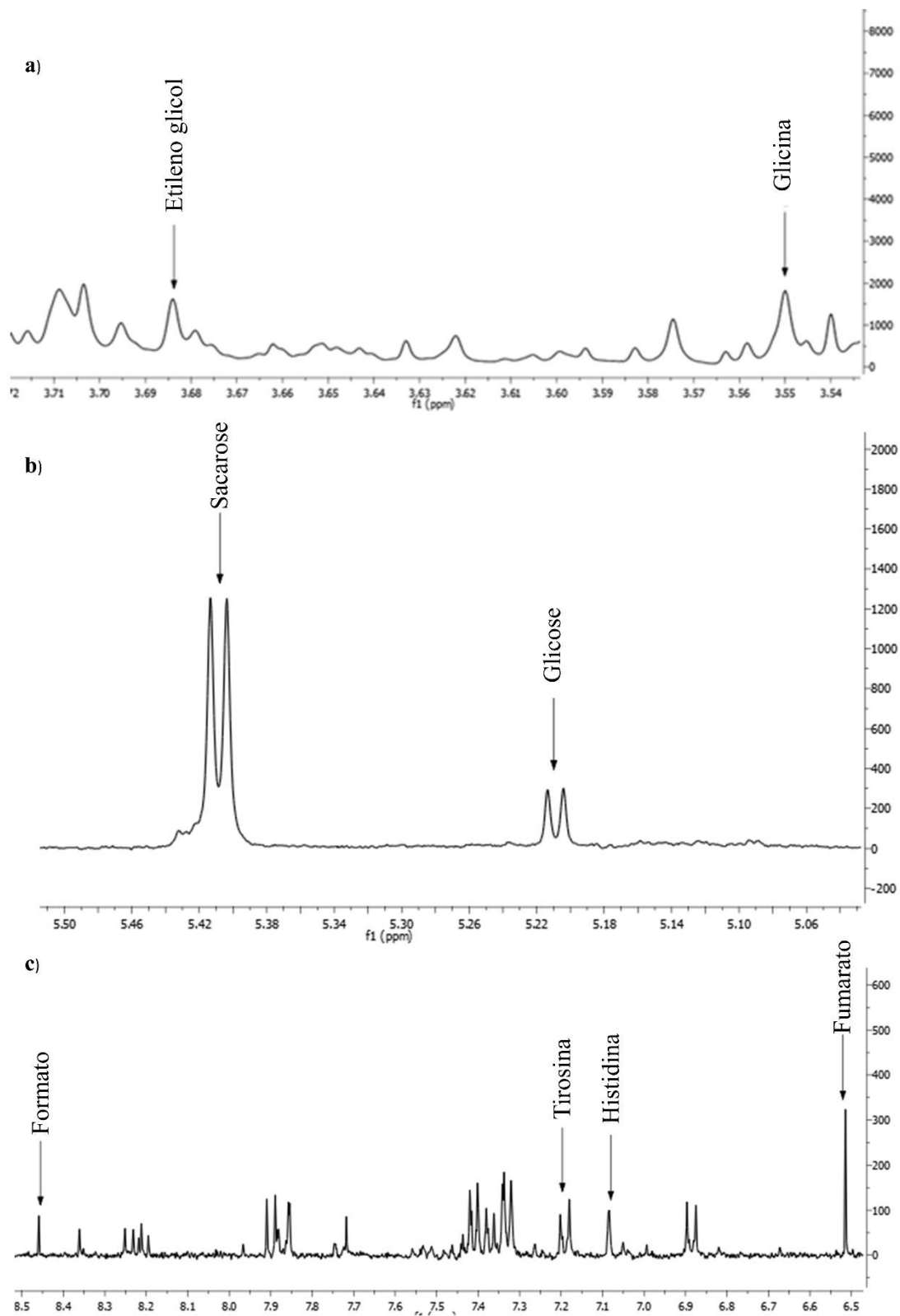
Além da identificação dos metabólitos no espectro de ^1H , também foram obtidos os espectros bidimensionais cosy (do inglês, COrrrelation SpectroscopY, apêndice 6) e HSQC (do inglês, Heteronuclear Single Quantum Correlation, apêndice 7), com o objetivo de obter informações adicionais que comprovem a identidade dos metabólitos identificados. Para a aquisição desses espectros foi feito um pool com todas as amostras, sementes de *A. thaliana* na condição controle e estresse térmico, os espectros do pool foram processados no software MestReNova.

Figura 18. ampliações do espectro ^1H do pool das amostras de *A. thaliana* **a)** isoleucina, valina, lactato, treonina, alanina, acetato, metionina **b)** acetona, glutamato, succinato, dimetilamina, asparagina, GABA, colina e betaína



Fonte: autoria própria.

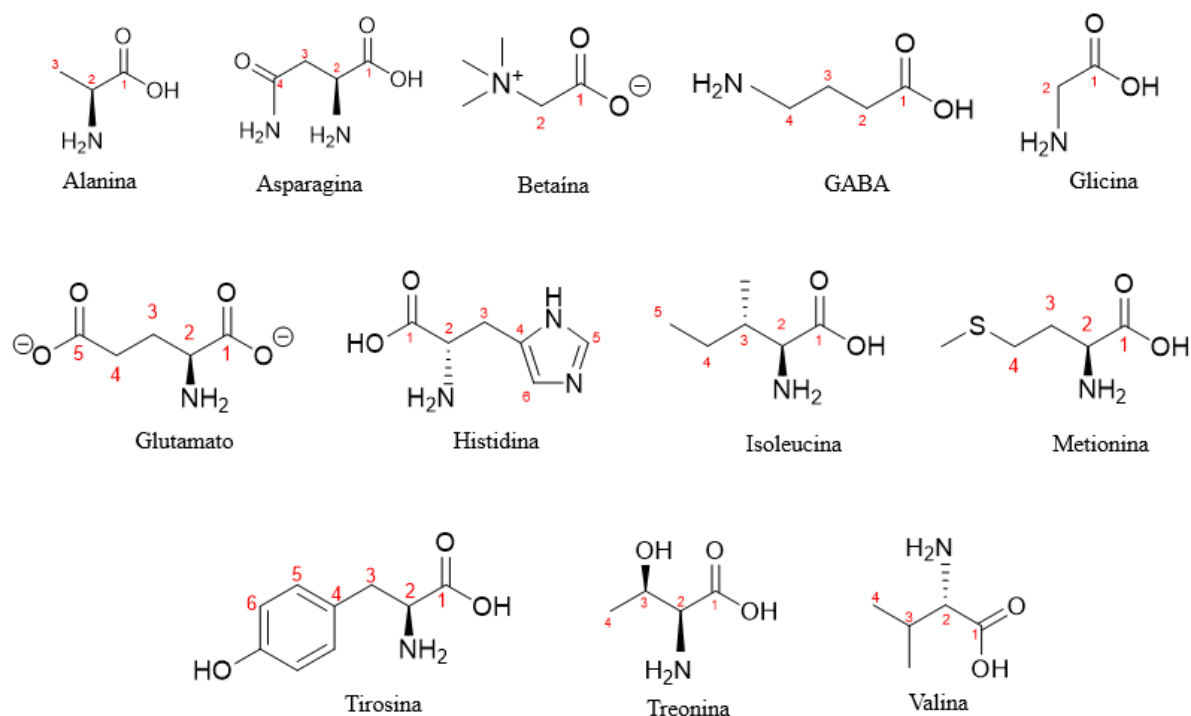
Figura 19. ampliações do espectro ^1H do pool das amostras de *A. thaliana* **a)** glicina e etileno glicol; **b)** Glicose e sacarose; **c)** Fumarato, histidina, tirosina e formato.



Fonte: autoria própria.

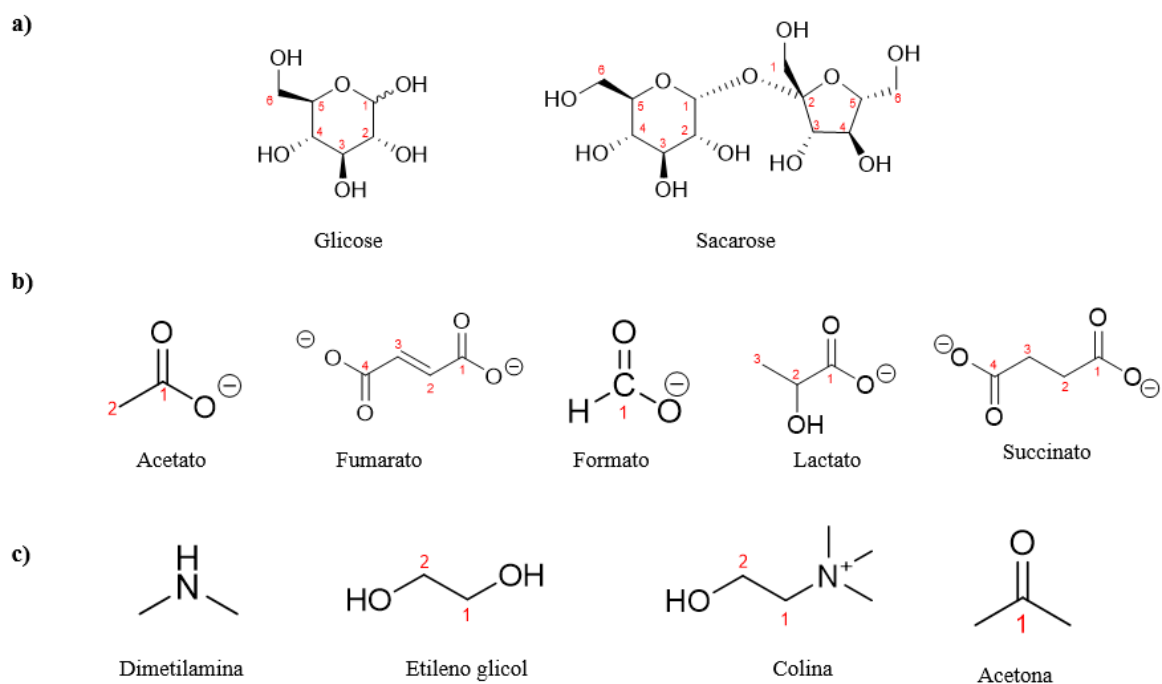
No total, foram identificados e quantificados vinte e três metabólitos nas amostras, incluindo doze aminoácidos (figura 20), dois carboidratos, cinco ácidos orgânicos, uma amina, um diálcool, uma vitamina e uma cetona (figura 21a, b e c). Os sinais utilizados para identificar tais metabólitos estão descritos em termos de deslocamento químico, multiplicidade e valores de constante de acoplamento (J) na tabela 4.

Figura 20. Estrutura química dos aminoácidos encontrados nas amostras de sementes de *A. thaliana*



Fonte: autoria própria.

Figura 21. Estrutura química dos metabólitos encontrados nas amostras de soja.
a) carboidratos; **b)** ácidos orgânicos; **c)** amina, vitamina, álcool, vitamina e cetona



Fonte: autoria própria.

Tabela 5. Deslocamento químico, multiplicidade e valores de constante de acoplamento (J) dos metabólitos encontrados nas amostras de sementes de *A. thaliana* superexpressando o gene RcGELP em condições normais e de estresse.

s= singleto; d= dubleto; dd= duplo dubleto; t=tripleto.

Metabólitos	Nº do carbono	Deslocamento químico (ppm)	multiplicidade e constante de acoplamento (J Hz)
Ácido γ -aminobutírico (GABA)	4	3,01	t (7,2)
Acetato	2	1,91	s
Acetona	CH ₃	2,23	s
Ácido láctico	3	1,34	d (6,8)
Alanina	3	1,48	d (7,2)
Asparagina	3	2,90	dd (8,0/8,8)
Betaína	N(CH ₃)	3,26	s
Colina	N(CH ₃)	3,21	s
Dimetilamina	N(CH ₃)	2,71	s
Etileno glicol	1 e 2	3,66	s
Formato	1	8,45	s
Fumarato	2 e 3	6,51	s
Glicina	2	3,55	s
Glicose	1	5,2	d (3,6)
Glutamato	4	2,35	t (7,2)
Histidina	6	7,05	s
Isoleucina	5	0,98	t (7,2)
Metionina	S(CH ₃)	2,13	s
Sacarose	1	5,4	d (4,2)
Succinato	2 e 3	2,39	s
Tirosina	5 e 9	7,18	d (8,4)
Treonina	4	1,32	d (6,8)
Valina	4	1,04	d (6,8)

Para que fosse possível propor as contribuições e mecanismos nos quais estes metabólitos estariam envolvidos quando sementes de *A. thaliana*

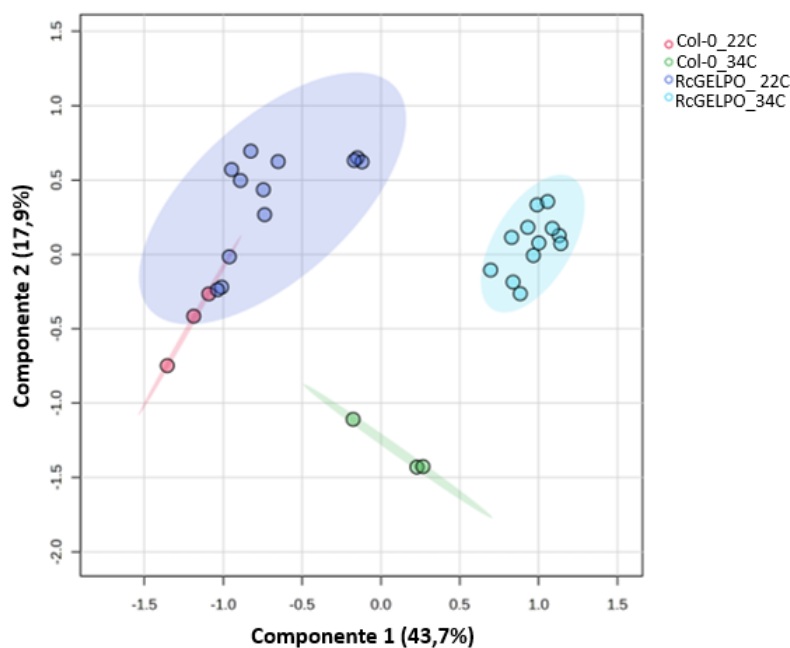
superexpressando o gene RcGELP tem sua germinação melhorada sob estresse térmico, foi utilizada uma abordagem apoiada no perfil de metabólitos apresentado por cada conjunto de amostra de interesse, onde foram usadas ferramentas da estatística multivariada.

3.6 Características metabólicas da resposta de sementes de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o gene RcGELP frente ao estresse térmico

Inicialmente foi feita uma análise discriminante dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para avaliar e comparar o comportamento metabólico das sementes de *A. thaliana* transgênicas e selvagens nas condições controle e estresse (figura 22). Nota-se uma separação clara em três grupos. Ao longo do eixo x temos uma maior separação em termos da temperatura e no eixo y a separação se dá em termos da superexpressão do gene, com o componente principal 1 explicando 43,7% da variação total dos dados (autovalor 4,37) e o componente principal 2 explicando 17,9% da variação total dos dados (autovalor 1,79)

Figura 22. Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) do conjunto de metabólitos identificados em sementes de *A. thaliana* transgênicas e selvagens (col-0)

RcGELPO = linhagem que superexpressa o gene (O de “overexpress”)

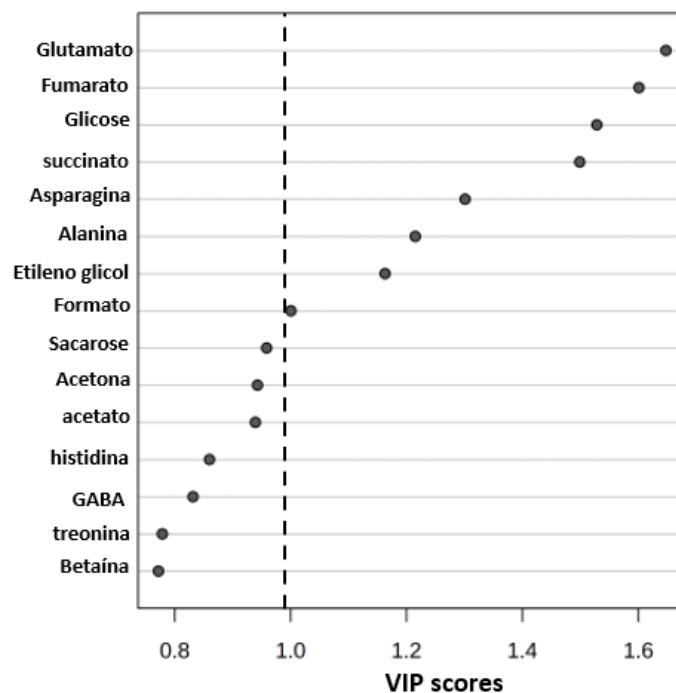


Fonte: autoria própria

Analisando a distribuição das amostras no gráfico PLSDA, fica claro que as sementes transgênicas e selvagens em condições de estresse apresentam metabolômas muito distintos entre si. Para além disso, é possível notar que a 22 °C a superexpressão do gene não acarreta em uma diferença significativa entre os metabolômas das sementes transgênicas e selvagem, porém, a medida que a temperatura aumenta, essa diferença se torna bastante proeminente. Essas diferenças podem ser explicadas pelo desempenho de alguns metabólitos, através da Importância variável na projeção (VIP, figura 23) que resume a contribuição de cada variável dentro do modelo PLS-DA.

Foi utilizado o critério maior que 1 para selecionar os metabólitos. No entanto, visando enriquecer as discussões propostas, sacarose, acetona e acetato também foram adicionadas a essa seleção, pois se apresentam próximo ao 1. Sendo assim o VIP scores demonstrou a contribuição de 9 metabólitos: glutamato, fumarato, glicose, succinato, asparagina, alanina, etileno glicol, formato e sacarose.

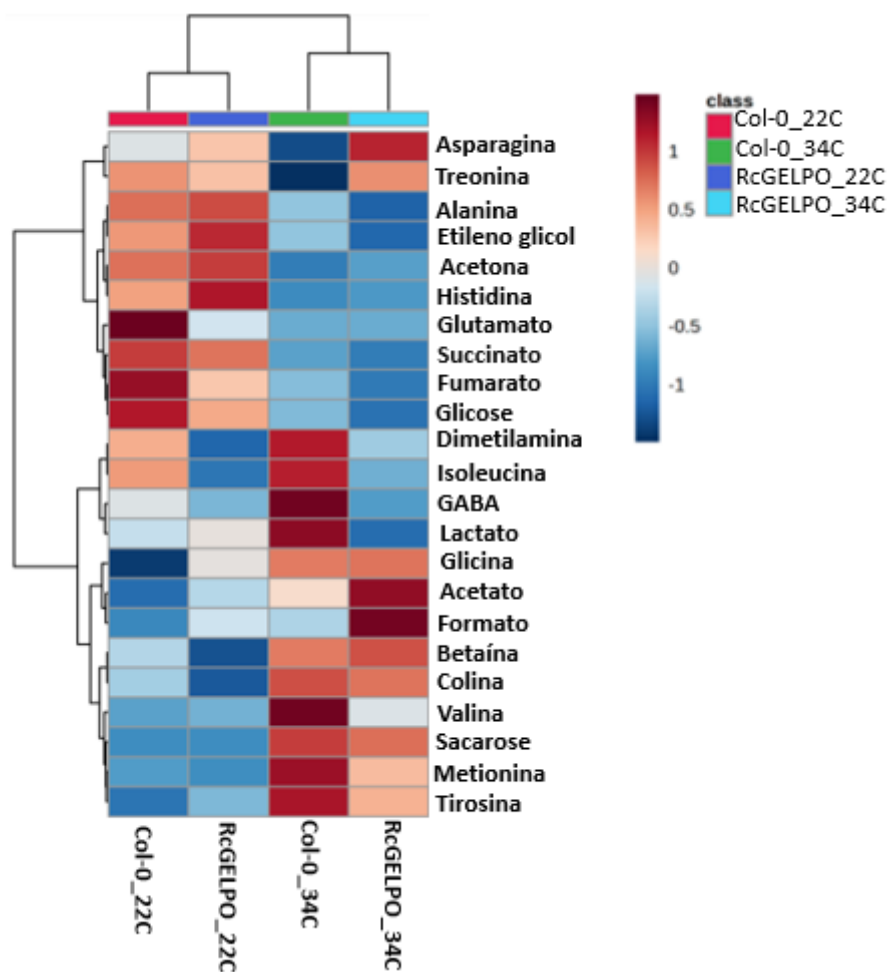
Figura 23. Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados em sementes de *A. thaliana* transgênicas e selvagens (col-0).



Fonte: autoria própria

Acoplado ao mapa de calor foi aplicada uma análise de agrupamento hierárquico, que agrupou as amostras de acordo com suas semelhanças dentro do perfil metabólico (figura 24). Analisando o cladograma posicionado no topo do mapa de calor é possível notar a presença de dois grupos, onde as amostras foram separadas de acordo com a temperatura, corroborando as informações obtidas no PLS-DA, proporcionando mais evidências sobre as mudanças no metaboloma das sementes transgênicas relacionadas com o estresse térmico, visto que, os grupos são formados com base nos níveis de metabólitos específicos.

Figura 24. Mapa de calor baseado no conjunto de metabólitos identificados em sementes de *A. thaliana* transgênicas e selvagens (col-0).



Fonte: autoria própria

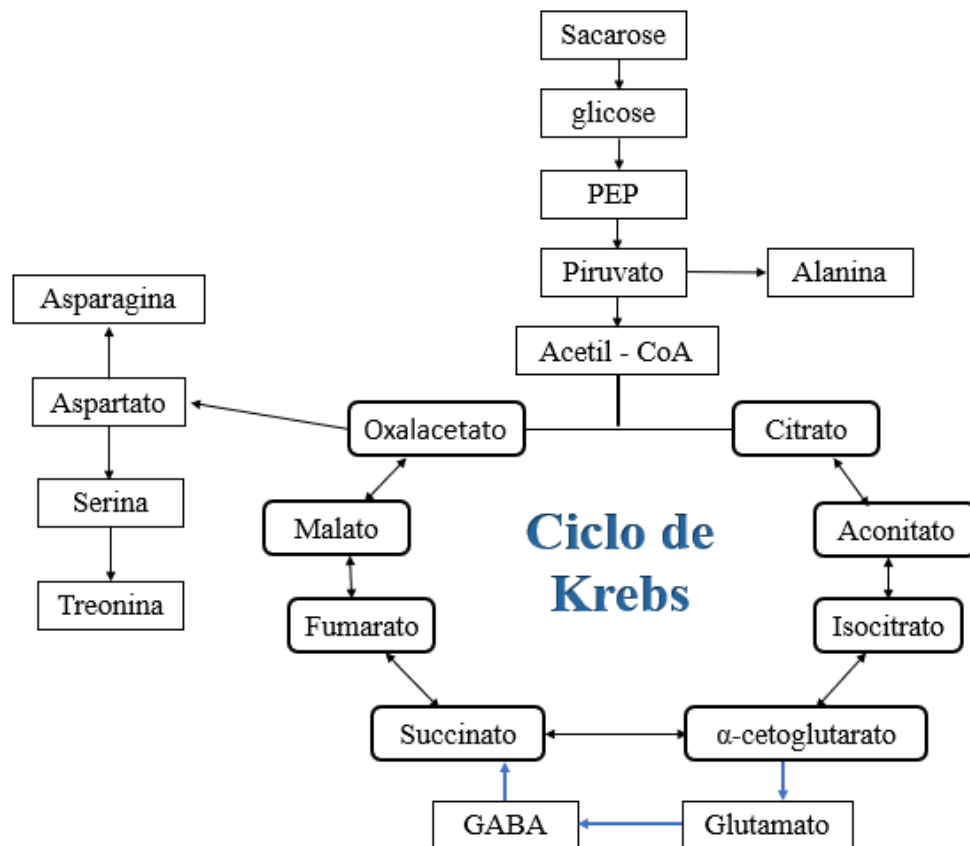
Sob estresse térmico a superexpressão do gene RcGELP em sementes de *A. thaliana* provocou a redução de alguns metabólitos quando comparado com as sementes selvagens (col-0). Foi demonstrado a redução de fumarato, succinato, alanina, sacarose e glicose. Por outro lado, a superexpressão do gene provocou acúmulo de asparagina.

A redução nos níveis de glicose e sacarose indica que o catabolismo de carboidratos foi desencadeado, estes metabólitos desempenham um papel central no metabolismo vegetal, principalmente como precursores para diversos outros metabólitos importantes para o crescimento e desenvolvimento de plantas (RIBEIRO et al, 2014). Níveis mais baixos de sacarose podem indicar seu uso na construção de parede celular durante a germinação, assim como também sua conversão a glicose. A glicólise é via de produção de energia muito importante, onde uma molécula de glicose é oxidada a duas moléculas de piruvato. O piruvato é oxidado, gerando o grupo acetil da acetil-coenzima A, que alimenta o ciclo de Krebs (figura 25), portanto a redução da glicose pode regular reações que acontecem no seu entorno.

A superexpressão do gene provocou a redução de dois intermediários do ciclo de Krebs. Uma vez que a produção de acetil-coA foi aumentada nas sementes transgênicas, mais dessa enzima está sendo oxidada no ciclo para alimenta-lo (figura 25). Ou seja, o catabolismo dos intermediários sugere que o ciclo de Krebs está sendo regulado positivamente, aumentando as reações de oxidação e a produção de elétrons, que alimentam a cadeia de transporte de elétrons e a respiração celular, gerando energia (PLAXTON, 1996). O que mostra ser uma das alternativas que explica a maior porcentagem de germinação máxima das sementes transgênicas frente as selvagens.

Figura 25. Vias metabólicas demonstrando a relação entre os metabólitos

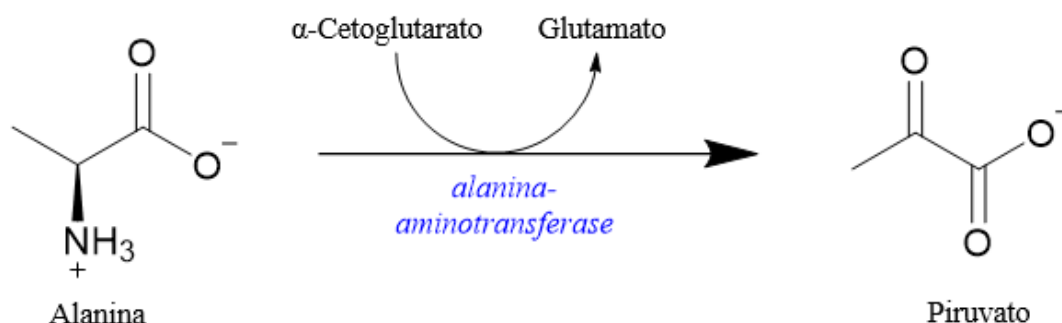
Uma parte dos metabólitos foram incluídos para fim de integridade da informação, nem todos foram determinados neste trabalho.



Fonte: adaptado de (LEHMANN et al, 2012)

A alanina é um aminoácido derivado do piruvato, nas sementes transgênicas sob estresse térmico foi demonstrada a sua redução (figura 25). Parece bastante plausível que a superexpressão do gene esteja regulando o nível de piruvato através da alanina, uma vez que a mesma pode ser desaminada por meio da alanina-aminotransferase para produzir piruvato (figura 26). Assim sendo, níveis reduzidos de alanina podem melhorar a taxa de respiração celular e a produção de ATP.

Figura 26. Reação de desaminação da alanina para produzir piruvato

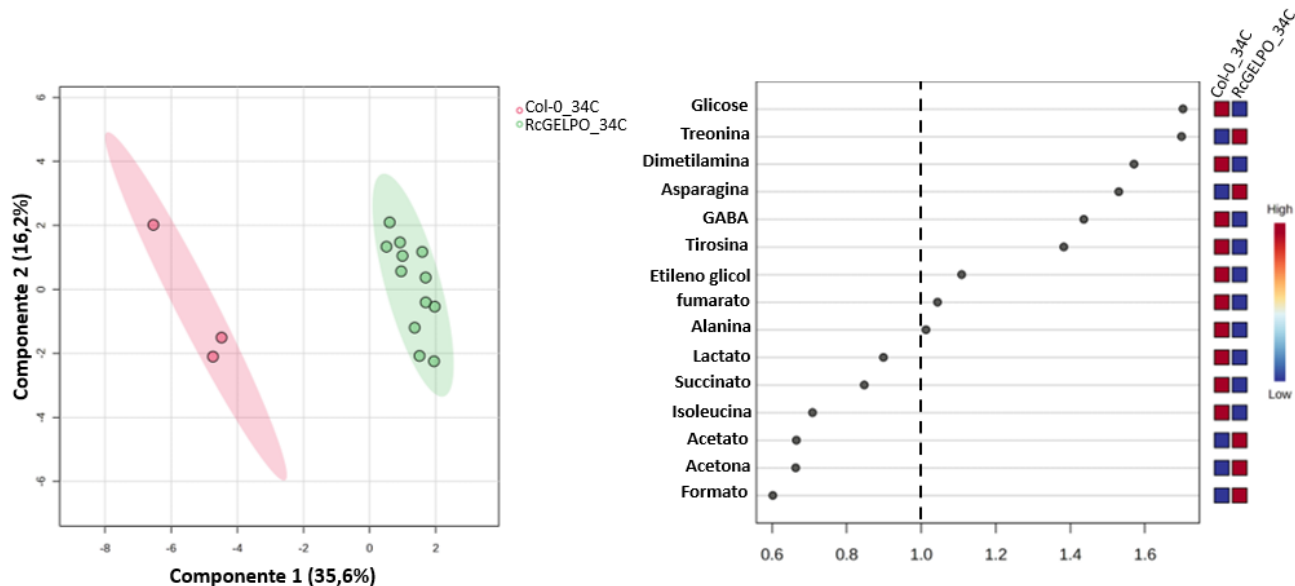


Fonte: autoria própria

Como visto na análise discriminante dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA, figura 22) e na análise de agrupamento hierárquico (figura 24) as diferenças de metaboloma entre as amostras foram atribuídas em maior parte ao estresse térmico. Portanto, para ampliar a discussão dos efeitos que a superexpressão do gene RcGELP causam nas sementes de *A. thaliana* frente ao estresse térmico, as amostras de sementes a 34°C foram analisadas separadamente. O componente principal 1 explicou 35,6 da variação total dos dados (autovalor 3,56) e o componente principal 2 explicou 16,2% da variação total dos dados (autovalor 1,62). O VIP scores sinalizou a contribuição de 12 metabólitos: treonina, glicose, dimetilamina, asparagina, GABA, tirosina, alanina, fumarato, etileno glicol, também foram selecionados isoleucina, lactato e succinato (figura 27b).

Figura 27a) Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) **b)** Importância variável na projeção (VIP) no conjunto de metabólitos identificados em sementes de *A. thaliana* transgênicas superexpressando o gene RcGELP e selvagens (col-0) frente ao estresse térmico.

RcGELPO = linhagem que superexpressa o gene (O de “overexpress”)



Fonte: autoria própria.

A análise feita apenas com as sementes selvagens e transgênicas embebidas a 34 °C, indicou o aumento de treonina e asparagina, e a redução de lactato e GABA nas sementes transgênicas (figura 28b). A treonina é um aminoácido central na síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada Isoleucina, leucina e valina, que são metabólitos importantes dentro do metabolismo vegetal por serem doadores alternativos para cadeia de transporte de elétrons. Assim como a asparagina (seu aumento foi demonstrado, figura 25), a treonina tem como precursor o aspartato, que é derivado do ciclo de Krebs. O que sugere que os genes RcGELP estejam ativando mecanismos de proteção frente a temperatura elevada, uma vez que aminoácidos são moléculas osmoprotetoras (YOU et al, 2019).

A regulação positiva do ciclo de Krebs indicada pelo aumento nas reações de oxidação, consequência do catabolismo de seus intermediários fumarato e succinato, pode sugerir que além de ajudar na regulação da respiração e

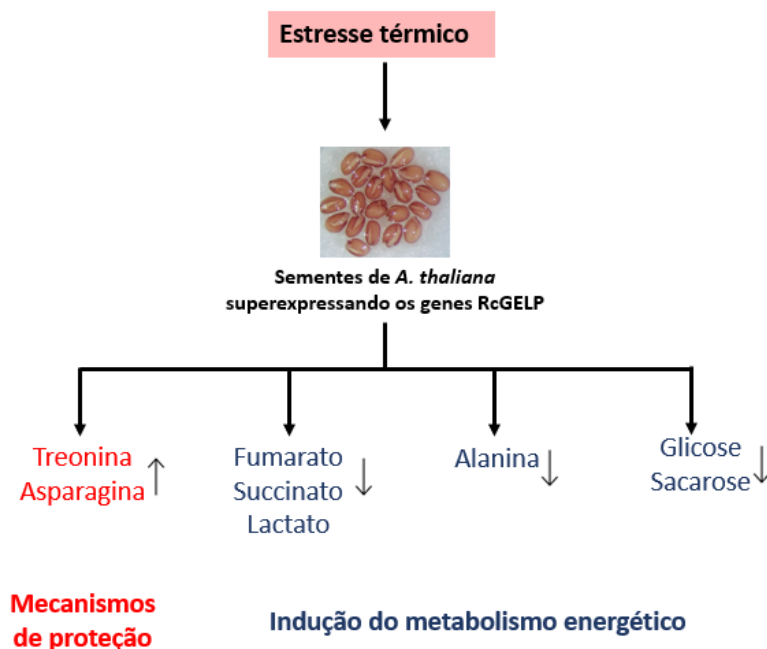
produção de ATP, esses ácidos orgânicos estariam contribuindo para a biossíntese de treonina e asparagina.

O lactato assim como outros dois ácidos orgânicos, fumarato e succinato, apresentaram níveis reduzidos nas sementes que superexpressam o gene *RcGELP*. As cadeias carbônicas necessárias para a construção de aminoácidos nas plantas são provenientes de ácidos orgânicos produzidos na glicólise, nos ciclos de Krebs e Calvin e na via da pentose fosfato oxidativa (RIBEIRO et al, 2014). Portanto, é possível que a superexpressão do gene esteja acarretando em uma mudança no metabolismo de carbono e nitrogênio para sustentar a germinação das sementes, onde aminoácidos proteicos estejam se acumulando as custas do catabolismo de ácidos orgânicos.

O GABA é um aminoácido não proteico amplamente associado ao estresse térmico, atuando principalmente como molécula osmoprotetora e sinalizadora, a sua redução nas sementes transgênicas frente as selvagens sob estresse térmico, pode ser indicativo de que o gene pode ter alterado o mecanismo pelo qual o GABA lida com o estresse e sua redução pode estar protegendo as sementes de alguma forma ou que sementes de *A. thaliana* ativem outros mecanismos de proteção.

Sementes de *A. thaliana* superexpressando os genes *RcGELP* apresentam uma assinatura metabólica específica em resposta ao estresse térmico com o propósito de manter a homeostase celular durante a germinação (figura 28). Nas sementes transgênicas foram demonstrados maiores níveis de treonina e asparagina em relação as sementes selvagens. Este acúmulo está associado a redução de lactato, fumarato e succinato.

Figura 28. Representação esquemática da assinatura metabólica de sementes de *A. thaliana* superexpressando os genes RcGELP durante a germinação sob estresse térmico



Fonte: autoria própria.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizado um amplo estudo sobre o gene GDSL esterase/lipase de *Ricinus communis* (RcGELP). Ferramentas da bioinformática foi utilizada para uma análise sistematizada da família gênica RcGELP, possibilitando a elucidação de características físicas e químicas, e relações evolutivas. Foram identificados 96 genes que apresentaram estruturas gênicas diversas, por meio da análise filogenética entre os RcGELPs e genes ortólogos com funções já elucidadas foi possível prever informações funcionais da família gênica de interesse.

Sementes de *Arabidopsis thaliana* que superexpressam o gene RcGELP demonstraram uma germinação aprimorada sob estresse térmico quando comparado com sementes selvagens. A análise metabolômica das sementes revelou respostas dinâmicas relacionadas com alguns metabólitos

importantes no metabolismo vegetal. Houve uma mudança no metabolismo de carbono e nitrogênio em direção de metabólitos contendo nitrogênio, além disso, o catabolismo de carboidratos foi ativado para gerar energia necessária para germinação frente ao estresse térmico. Os resultados mostram que o gene RcGELP regula de forma positiva as respostas de sementes frente a condições adversas de crescimento, o que é útil dentro da engenharia genética, aspirando o desenvolvimento de plantas tolerantes ao calor.

5. REFERÊNCIAS

AKOH, Casimir C. et al. Enzymatic approach to biodiesel production. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 22, p. 8995-9005, 2007.

ALSCHER, Ruth Grene; ERTURK, Neval; HEATH, Lenwood S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.

AN, Xueli et al. ZmMs30 encoding a novel GDSL lipase is essential for male fertility and valuable for hybrid breeding in maize. **Molecular Plant**, v. 12, n. 3, p. 343-359, 2019.

APEL, Klaus; HIRT, Heribert. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 55, p. 373-399, 2004.

BEISSON, F. et al. An esterase neosynthesized in post-germinated sunflower seeds is related to a new family of lipolytic enzymes. **Plant physiology and biochemistry (Paris)**, v. 35, n. 10, p. 761-765, 1997.

BEWLEY, J. Derek. Seed germination and dormancy. **The plant cell**, v. 9, n. 7, p. 1055, 199.

BHARDWAJ, Kanchan; RAJU, Aruna; RAJASEKHARAN, Ram. Identification, purification, and characterization of a thermally stable lipase from rice bran. A new member of the (phospho) lipase family. **Plant Physiology**, v. 127, n. 4, p. 1728-1738, 2001.

BONJOCH, Nuria Pedrol; TAMAYO, Pilar Ramos. Protein content quantification by Bradford method. **Handbook of plant ecophysiology techniques**, p. 283-295, 2001.

BORSANI, Omar; VALPUESTA, Victoriano; BOTELLA, Miguel A. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in Arabidopsis seedlings. **Plant physiology**, v. 126, n. 3, p. 1024-1030, 2001.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRITO, Valdinei Carvalho et al. Overexpression of Ricinus communis L. malate synthase enhances seed tolerance to abiotic stress during germination. **Industrial Crops and Products**, v. 145, p. 112110, 2020.

CANGEMI, José Marcelo; SANTOS, A. M.; CLARO NETO, S. A revolução verde da mamona. **Química Nova na Escola**, v. 32, n. 1, p. 3-8, 2010.

CANNON, Steven B. et al. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. **BMC plant biology**, v. 4, n. 1, p. 1-21, 2004.

CARINATO, Maria E. et al. The *apeE* gene of *Salmonella typhimurium* encodes an outer membrane esterase not present in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 14, p. 3517-3521, 1998.

CHANDRASEKARAN, Umashankar; XU, Wei; LIU, Aizhong. Transcriptome profiling identifies ABA mediated regulatory changes towards storage filling in developing seeds of castor bean (*Ricinus communis* L.). **Cell & bioscience**, v. 4, n. 1, p. 1-12, 2014.

CHEPYSHKO, Hanna et al. Multifunctionality and diversity of GDSL esterase/lipase gene family in rice (*Oryza sativa* L. japonica) genome: new insights from bioinformatics analysis. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 1-19, 2012.

CLAUß, Kathleen et al. Role of a GDSL lipase-like protein as sinapine esterase in Brassicaceae. *The Plant Journal*, v. 53, n. 5, p. 802-813, 2008.

COQUE, Laurent et al. Transcription of *ENOD8* in *Medicago truncatula* nodules directs *ENOD8* esterase to developing and mature symbiosomes. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 21, n. 4, p. 404-410, 2008.

COURNIA, Zoe et al. Membrane protein structure, function, and dynamics: a perspective from experiments and theory. **The Journal of membrane biology**, v. 248, p. 611-640, 2015.

CUMMINS, Ian; EDWARDS, Robert. Purification and cloning of an esterase from the weed black-grass (*Alopecurus myosuroides*), which bioactivates aryloxyphenoxypropionate herbicides. **The Plant Journal**, v. 39, n. 6, p. 894-904, 2004.

DALLA-VECCHIA, Roberto; NASCIMENTO, Maria da Graça; SOLDI, Valdir. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DEL RÍO, Luis A. et al. Plant superoxide dismutases: Function under abiotic stress conditions. **Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants**, p. 1-26, 2018.

DERKX, M. P. M.; VERMEER, E.; KARSSSEN, C. M. Gibberellins in seeds of *Arabidopsis thaliana*: biological activities, identification and effects of light and chilling on endogenous levels. **Plant Growth Regulation**, v. 15, n. 3, p. 223-234, 1994.

DING, Li-Na et al. Advances in plant GDSL lipases: from sequences to functional mechanisms. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 41, n. 9, p. 1-11, 2019.

DING, Li-Na et al. Arabidopsis GDSL1 overexpression enhances rapeseed *Sclerotinia sclerotiorum* resistance and the functional identification of its homolog in *Brassica napus*. **Plant biotechnology journal**, v. 18, n. 5, p. 1255-1270, 2020.

DONG, Xiangshu et al. GDSL esterase/lipase genes in *Brassica rapa* L.: genome-wide identification and expression analysis. **Molecular genetics and genomics**, v. 291, n. 2, p. 531-542, 2016.

DUAN, Ming et al. Overexpression of thylakoidal ascorbate peroxidase shows enhanced resistance to chilling stress in tomato. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 9, p. 867-877, 2012.

FAROOQ, Muhammad Awais et al. Roles of reactive oxygen species and mitochondria in seed germination. **Frontiers in plant science**, p. 2911, 2021.

GAFFNEY, Thomas et al. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science**, v. 261, n. 5122, p. 754-756, 1993.

GAO, Yanli et al. Salt-stress induced proteomic changes of two contrasting alfalfa cultivars during germination stage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 3, p. 1384-1396, 2019.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M. C. A. et al. Crude oil and bioproducts of castor bean (*Ricinus communis* L.) plants established naturally on metal mine tailings. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 7, p. 2263-2272, 2015.

GOMES, Marcelo Pedrosa; GARCIA, Queila Souza. Reactive oxygen species and seed germination. **Biologia**, v. 68, p. 351-357, 2013.

GUJJAR, Ranjit Singh et al. Expression analysis of drought-induced genes in wild tomato line (*Solanum habrochaites*). **Current Science**, p. 496-502, 2014.

GURUPRASAD, Kunchur; REDDY, BV Bhasker; PANDIT, Madhusudan W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 4, n. 2, p. 155-161, 1990.

GIANNOPOLITIS, Constantine N.; RIES, Stanley K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

HONDA, Michael DH et al. Identification of drought-induced genes in giant leucaena (*Leucaena leucocephala* subsp. *glabrata*). **Trees**, v. 32, n. 2, p. 571-585, 2018.

HONG, Jeum Kyu et al. Function of a novel GDSL-type pepper lipase gene, CaGLIP1, in disease susceptibility and abiotic stress tolerance. **Planta**, v. 227, n. 3, p. 539-558, 2008.

HUANG, Li-Min et al. Arabidopsis SFAR4 is a novel GDSL-type esterase involved in fatty acid degradation and glucose tolerance. **Botanical studies**, v. 56, n. 1, p. 1-12, 2015.

IBRAHEEM, Omodele; BOTHA, Christiaan EJ; BRADLEY, Graeme. In silico analysis of cis-acting regulatory elements in 5' regulatory regions of sucrose transporter gene families in rice (*Oryza sativa* Japonica) and Arabidopsis thaliana. **Computational biology and chemistry**, v. 34, n. 5-6, p. 268-283, 2010.

ISMAIL et al. Aspergillus foetidus regulated the biochemical characteristics of soybean and sunflower under heat stress condition: role in sustainability. **Sustainability**, v. 13, n. 13, p. 7159, 2021.

JI, R. et al. BrEXL6, a GDSL lipase gene of Brassica rapa, functions in pollen development. **Biologia plantarum**, v. 61, n. 4, p. 685-692, 2017.

JIANG, Yunyun et al. Analysis of GDSL lipase (GLIP) family genes in rice (*Oryza sativa*). **Plant omics**, v. 5, n. 4, p. 351-358, 2012.

JO, Bong-Seok; CHOI, Sun Shim. Introns: the functional benefits of introns in genomes. **Genomics & informatics**, v. 13, n. 4, p. 112, 2015.

JUMRANI, Kanchan; BHATIA, Virender Singh. Interactive effect of temperature and water stress on physiological and biochemical processes in soybean. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 25, n. 3, p. 667-681, 2019.

JUNEAU, Kara et al. Introns regulate RNA and protein abundance in yeast. **Genetics**, v. 174, n. 1, p. 511-518, 2006.

KAUR, Amritpreet et al. In-silico analysis of cis-acting regulatory elements of pathogenesis-related proteins of Arabidopsis thaliana and Oryza sativa. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0184523, 2017.

KIM, Hyo Jung et al. Gene regulatory cascade of senescence-associated NAC transcription factors activated by ETHYLENE-INSENSITIVE2-mediated leaf senescence signalling in Arabidopsis. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 14, p. 4023-4036, 2014.

KIM, Hye Gi et al. GDSL lipase 1 regulates ethylene signaling and ethylene-associated systemic immunity in Arabidopsis. **FEBS letters**, v. 588, n. 9, p. 1652-1658, 2014.

KRAM, Brian W. et al. Identification, cloning and characterization of a GDSL lipase secreted into the nectar of *Jacaranda mimosifolia*. **Plant Molecular Biology**, v. 68, n. 1-2, p. 173, 2008.

KUMAR, P. Vijaya et al. Influence of moisture, thermal and photoperiodic regimes on the productivity of castor beans (*Ricinus communis* L.). **Agricultural and forest meteorology**, v. 88, n. 1-4, p. 279-289, 1997.

KUO, Yi-Tzu et al. Segmental and tandem chromosome duplications led to divergent evolution of the chalcone synthase gene family in *Phalaenopsis* orchids. **Annals of botany**, v. 123, n. 1, p. 69-77, 2019.

KWON, Sun Jae et al. GDSL lipase-like 1 regulates systemic resistance associated with ethylene signaling in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 58, n. 2, p. 235-245, 2009.

LAI, Chia-Ping et al. Genome-wide analysis of GDSL-type esterases/lipases in Arabidopsis. **Plant molecular biology**, v. 95, n. 1, p. 181-197, 2017.

LEE, Kyung-Ah; CHO, Tae-Ju. Characterization of a salicylic acid-and pathogen-induced lipase-like gene in Chinese cabbage. **BMB Reports**, v. 36, n. 5, p. 433-441, 2003.

LEE, Ya-Lin; CHEN, Jack Chien; SHAW, Jei-Fu. The Thioesterase I of *Escherichia coli* Has Arylesterase Activity and Shows Stereospecificity for Protease Substrates. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 231, n. 2, p. 452-456, 1997.

LEE, Dong Sook et al. Arabidopsis GDSL lipase 2 plays a role in pathogen defense via negative regulation of auxin signaling. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 379, n. 4, p. 1038-1042, 2009.

LEHMANN, Martin et al. Metabolic recovery of *Arabidopsis thaliana* roots following cessation of oxidative stress. **Metabolomics**, v. 8, p. 143-153, 2012.

LI, Mu et al. Cloning and characterization of a novel lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* GS11: the first member of a new bacterial lipase family XVI. **Journal of biotechnology**, v. 228, p. 30-36, 2016.

LI, He et al. Identification and expression analysis of the GDSL esterase/lipase family genes, and the characterization of SaGLIP8 in *Sedum alfredii* Hance under cadmium stress. **PeerJ**, v. 7, p. e6741, 2019.

LING, Hua et al. Isolation and expression analysis of a GDSL-like lipase gene from *Brassica napus* L. **BMB Reports**, v. 39, n. 3, p. 297-303, 2006.

LING, Hua. Sequence analysis of GDSL lipase gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**, v. 11, n. 5, p. 763-767, 2008.

LIU, Jinfeng; ROST, Burkhard. Domains, motifs and clusters in the protein universe. **Current opinion in chemical biology**, v. 7, n. 1, p. 5-11, 2003.

LIU, Yudong et al. Overexpression of SIGRAS40 in tomato enhances tolerance to abiotic stresses and influences auxin and gibberellin signaling. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1659, 2017.

LO, Yu-Chih et al. Crystal structure of *Escherichia coli* thioesterase I/protease I/lysophospholipase L1: consensus sequence blocks constitute the catalytic center of SGNH-hydrolases through a conserved hydrogen bond network. **Journal of molecular biology**, v. 330, n. 3, p. 539-551, 2003.

MA, Rendi et al. A *Gossypium hirsutum* GDSL lipase/hydrolase gene (GhGLIP) appears to be involved in promoting seed growth in *Arabidopsis*. **PloS one**, v. 13, n. 4, p. e0195556, 2018.

MAHESHWARI, P. et al. Genome-wide identification and expression profile analysis of nuclear factor Y family genes in *Sorghum bicolor* L.(Moench). **PloS one**, v. 14, n. 9, p. e0222203, 2019.

MAYER, Alfred Max; POLJAKOFF-MAYBER, Alexandra. **The germination of seeds: pergamon international library of science, technology, engineering and social studies**. Elsevier, 1982

MHAMDI, Amna; VAN BREUSEGEM, Frank. Reactive oxygen species in plant development. **Development**, v. 145, n. 15, p. dev164376, 2018.

MENDES, Rita de Cássia et al. Testes de vigor para avaliação do potencial fisiológico de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 114-120, 2010.

MESSAOUDI, Abdelmonaem et al. LIPABASE: a database for 'true'lipase family enzymes. **International journal of bioinformatics research and applications**, v. 7, n. 4, p. 390-401, 2011.

MILANI, M.; MIGUEL JUNIOR, S. R.; SOUSA, R. de L. Sub-espécies de mamona. **Embrapa Algodão-Documentos (INFOTECA-E)**, 2009.

MOREIRA, J. et al. Melhoramento da mamoneira (*Ricinus communis* L.). **Embrapa Algodão-Documentos (INFOTECA-E)**, 1996.

MOSHARAF, Md Parvez et al. In silico identification and characterization of AGO, DCL and RDR gene families and their associated regulatory elements in sweet orange (*Citrus sinensis* L.). **PloS one**, v. 15, n. 12, p. e0228233, 2020.

NARANJO, Miguel Angel et al. Overexpression of *Arabidopsis thaliana* LTL1, a salt-induced gene encoding a GDSL-motif lipase, increases salt tolerance in yeast and transgenic plants. **Plant, cell & environment**, v. 29, n. 10, p. 1890-1900, 2006.

NI, Pei-Yi; JI, Xiao-Ru; GUO, Da-Long. Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of GDSL-type esterases/lipases gene family in relation to grape berry ripening. **Scientia Horticulturae**, v. 264, p. 109162, 2020.

OKAMURA, Yoshiko et al. Isolation and characterization of a GDSL esterase from the metagenome of a marine sponge-associated bacteria. **Marine biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 395-402, 2010.

PAN, Xiaoyong et al. Identification of protein subcellular localization with network and functional embeddings. **Frontiers in Genetics**, v. 11, p. 626500, 2021.

PARK, Jong-Jin et al. Mutation in Wilted Dwarf and Lethal 1 (WDL1) causes abnormal cuticle formation and rapid water loss in rice. **Plant molecular biology**, v. 74, n. 1, p. 91-103, 2010.

PATEL, Vinay R. et al. Castor oil: properties, uses, and optimization of processing parameters in commercial production. **Lipid insights**, v. 9, p. LPI. S40233, 2016.

POSMYK, Małgorzata M. et al. Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 4, p. 403-412, 2005.

PLAXTON, William C. The organization and regulation of plant glycolysis. **Annual review of plant biology**, v. 47, n. 1, p. 185-214, 1996.

PRIEST, Henry D.; FILICHKIN, Sergei A.; MOCKLER, Todd C. Cis-regulatory elements in plant cell signaling. **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 5, p. 643-649, 2009.

REDMILE-GORDON, M. A. et al. A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 67, p. 166-173, 2013.

REINA, José J.; GUERRERO, Consuelo; HEREDIA, Antonio. Isolation, characterization, and localization of AgaSGNH cDNA: a new SGNH-motif plant hydrolase specific to *Agave americana* L. leaf epidermis. **Journal of experimental botany**, v. 58, n. 11, p. 2717-2731, 2007.

RIBEIRO, Paulo Roberto et al. Physiological and biochemical responses of *Ricinus communis* seedlings to different temperatures: a metabolomics approach. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2014.

RIBEIRO, Paulo Roberto. Biochemical, physiological and molecular responses of *Ricinus communis* seeds and seedlings to different temperatures: a multi-omics approach. 2015.

RIBEIRO, Paulo R. et al. Transcriptome profiling of *Ricinus communis* L. provides new insights underlying the mechanisms towards thermotolerance during seed imbibition and germination. **Industrial Crops and Products**, v. 126, p. 380-393, 2018.

RICHARDS, Donald E. et al. How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signaling. **Annual review of plant biology**, v. 52, n. 1, p. 67-88, 2001.

RIEMANN, Michael et al. GER1, a GDSL motif-encoding gene from rice is a novel early light-and jasmonate-induced gene. **Plant Biology**, v. 9, n. 01, p. 32-40, 2007.

RIVAROLA, Maximo et al. Castor bean organelle genome sequencing and worldwide genetic diversity analysis. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e21743, 2011.

ROUGÉ, Pierre et al. Allergenicity of Hev b 13, a major esterase allergen in natural rubber latex (*Hevea brasiliensis*) allergy, does not only depend on its carbohydrate moiety. **Molecular immunology**, v. 47, n. 4, p. 871-877, 2010.

ROUSTER, Jacques et al. Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain. **The Plant Journal**, v. 11, n. 3, p. 513-523, 1997.

Ruppert, M., Ma, X., & Stockigt, J. (2005). Alkaloid biosynthesis in *Rauvolfia*-cDNA cloning of major enzymes of the ajmaline pathway. *Current Organic Chemistry*, 9(15), 1431-1444. Doi: 0.2174/138527205774370540.

RUSHTON, Paul J.; SOMSSICH, Imre E. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. **Current opinion in plant biology**, v. 1, n. 4, p. 311-315, 1998.

SALEH, Omar et al. Identification of differentially expressed genes in two grape varieties cultivated in semi-arid and temperate regions from West-Bank, Palestine. **Agri Gene**, v. 7, p. 34-42, 2018.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989.

SAPAN, Christine V.; LUNDBLAD, Roger L.; PRICE, Nicholas C. Colorimetric protein assay techniques. **Biotechnology and applied Biochemistry**, v. 29, n. 2, p. 99-108, 1999.

SCARPA, Antonio; GUERCI, Antonio. Various uses of the castor oil plant (*Ricinus communis* L.) a review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 5, n. 2, p. 117-137, 1982.

SEEVARATNAM, Rajini; PATEL, Barkha P.; HAMADEH, Mazen J. Comparison of total protein concentration in skeletal muscle as measured by the Bradford and Lowry assays. **Journal of biochemistry**, v. 145, n. 6, p. 791-797, 2009.

SEN RAYCHAUDHURI, Sarmistha; DENG, Xing Wang. The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. **The Botanical Review**, v. 66, p. 89-98, 2000.

SEMBDNER, G. A. P. B.; PARTHIER, Benno. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. **Annual review of plant biology**, v. 44, n. 1, p. 569-589, 1993.

SEO, Pil Joon; PARK, Chung-Mo. MYB96-mediated abscisic acid signals induce pathogen resistance response by promoting salicylic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. **New Phytologist**, v. 186, n. 2, p. 471-483, 2010.

SHAFI, Amrina et al. Expression of SOD and APX genes positively regulates secondary cell wall biosynthesis and promotes plant growth and yield in *Arabidopsis* under salt stress. **Plant Molecular Biology**, v. 87, p. 615-631, 2015.

SHAKIBA, Mehrnoush Hadaddzadeh et al. Cloning, expression and characterization of a novel cold-adapted GDSL family esterase from *Photobacterium* sp. strain J15. **Extremophiles**, v. 20, n. 1, p. 45-55, 2016.

SHINOZAKI, Kazuo; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko. **Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants**. Austin, TX: RG Landes Company, 1999.

SU, Hong-Gang et al. Genome-wide identification, evolution, and expression of GDSL-type esterase/lipase gene family in soybean. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 726, 2020.

SULLIVAN, Elise R.; LEAHY, Joseph G.; COLWELL, Rita R. Cloning and sequence analysis of the lipase and lipase chaperone-encoding genes from *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, and redefinition of a proteobacterial lipase family and an analogous lipase chaperone family. **Gene**, v. 230, n. 2, p. 277-285, 1999.

TIAN, Hui Qiao et al. Calcium distribution in fertile and sterile anthers of a photoperiod-sensitive genic male-sterile rice. **Planta**, v. 204, n. 2, p. 183-192, 1998.

TSANG, E. W. et al. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. **The Plant Cell**, v. 3, n. 8, p. 783-792, 1991.

VAAHTERA, Lauri; SCHULZ, Julia; HAMANN, Thorsten. Cell wall integrity maintenance during plant development and interaction with the environment. **Nature plants**, v. 5, n. 9, p. 924-932, 2019.

VASCONCELOS, Paulo de Carvalho Teixeira et al. New insights into the mechanism underlying *Ricinus communis* L. tolerance to drought stress during germination. **Industrial Crops and Products**, v. 103, p. 99-106, 2017.

VUJAKLIJA, Dušica et al. A novel streptomycete lipase: cloning, sequencing and high-level expression of the *Streptomyces rimosus* GDS (L)-lipase gene. **Archives of microbiology**, v. 178, n. 2, p. 124-130, 2002.

VOLOKITA, Micha et al. Combining comparative sequence and genomic data to ascertain phylogenetic relationships and explore the evolution of the large GDLS-lipase family in land plants. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 1, p. 551-565, 2011.

XIAOHAI, L. I. U. et al. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on contaminated sites and their potential accumulation capacity in Heqing, Yunnan. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 12, p. 1469-1474, 2008.

XU, Sheng et al. Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, n. 3, p. 274-285, 2006.

ZHANG, Huihui et al. GDLS esterase/lipases OsGELP34 and OsGELP110/OsGELP115 are essential for rice pollen development. **Journal of integrative plant biology**, v. 62, n. 10, p. 1574-1593, 2020.

ZAIA, Dimas AM; ZAIA, Cássia Thaïs BV; LICHTIG, Jaim. Determination of total protein by spectrophotometry: advantages and disadvantages of proposed methods. **Química Nova**, v. 21, p. 787-793, 1998.

ZHANG, Xu et al. Physiological responses of *Suaeda glauca* and *Arabidopsis thaliana* in phytoremediation of heavy metals. **Journal of environmental management**, v. 223, p. 132-139, 2018.

ZHAO, Ming et al. Mobilization and role of starch, protein, and fat reserves during seed germination of six wild grassland species. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 234, 2018.

YAMAMOTO, Kosuke; MOMONOKI, Yoshie S. Subcellular localization of overexpressed maize AChE gene in rice plant. **Plant signaling & behavior**, v. 3, n. 8, p. 576-577, 2008.

YAMAMOTO, Kosuke et al. Molecular cloning of acetylcholinesterase gene from *Salicornia europaea* L. **Plant signaling & behavior**, v. 4, n. 5, p. 361-366, 2009.

YU, Dan et al. Comparative transcriptome combined with morpho-physiological analyses revealed candidate genes potentially for differential cold tolerance in two contrasting apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars. **Trees**, v. 34, p. 1205-1217, 2020.

WANG, Yi et al. Physiological and Proteomic Analysis of Seed Germination under Salt Stress in Mulberry. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 28, n. 3, p. 49, 2023.

WASTERACK, Claus; PARTHIER, Benno. Jasmonate-signalled plant gene expression. **Trends in plant science**, v. 2, n. 8, p. 302-307.

APÊNDICE 1- Parâmetros físico químicos das proteínas RcGELPs

Gene	Nº de amino-ácidos	Peso molecular	Pi teórico	Índice de instabilidade	Índice alifático	GRAAVY	Resíduos carregados negativamente (Asp + Glu)	Resíduos carregados positivamente (Arg + Lys)
RcGELP1	127	14779,07	9	35,56	95,28	0,052	10	12
RcGELP2	374	42002,41	9,48	34,17	81,66	-0,15	28	43
RcGELP3	363	40773,93	7,57	25,42	90,44	-0,071	36	37
RcGEPL4	347	38926,38	6,7	35,61	84,58	-0,186	37	35
RcGELP5	368	40853,25	8,26	23,45	76,39	-0,303	34	37
RcGELP6	365	40700,21	5,34	40,94	83,42	-0,050	29	30
RcGELP7	355	39494,31	7,57	28,72	83,46	-0,032	29	30
RcGELP8	372	40785,8	5,85	32,61	70,32	-0,292	37	32
RcGELP9	327	36171,08	7,18	27,77	75,17	-0,232	25	25
RcGELP10	234	26086,21	9,61	26,94	77,09	-0,285	11	27
RcGELP12	172	19237,22	9,02	31,01	80,52	-0,271	16	22
RcGELP13	374	42045,33	8,71	28,48	81,34	-0,179	35	42
RcGELP14	381	42290,66	4,65	41,12	82,15	-0,194	49	26
RcGELP15	350	39615,74	5,39	33,43	83,91	-0,321	41	33
RcGELP16	376	41647,13	4,43	39,13	91,57	0,03	46	
RcGELP17	377	42431,21	6,51	25,22	72,76	-0,284	37	35
RcGELP18	136	14917,05	8,26	37,32	88,82	-0,091	11	13
RcGELP19	242	26381,32	9,23	33,51	94,3	0,06	16	23
RcGELP20	368	40377,75	8,36	25,77	87,77	-0,138	31	34
RcGELP21	352	39423,85	5,33	28,45	83,69	-0,039	37	29
RcGELP22	353	39333,95	8,37	36,50	83,74	-0,114	31	34
RcGELP23	356	39842,34	8,76	29,6	76,4	-0,215	26	31
RcGELP24	368	40425,95	7,52	35,39	85,84	-0,007	24	25
RcGELP25	577	64677,04	7,09	36,78	85,53	-0,223	65	65
RcGELP26	385	42214,23	8,39	26,08	95,32	-0,051	33	36
RcGELP27	364	40155,94	5,81	34,66	94,84	0,031	29	27
RcGELP28	368	40085,59	5,28	34,89	88,10	0,060	28	24
RcGELP29	369	40489,68	9,39	32,29	91,76	0,041	22	34
RcGELP30	374	41269,96	6,70	35,22	89,97	-0,154	32	31
RcGELP31	249	27748,04	8,47	36,21	88,11	-0,098	20	23
RcGELP32	356	38717,43	8,76	24,77	83,93	0,068	26	32
RcGELP33	425	46566,64	6,1	40,95	75,29	-0,125	37	31
RcGELP34	300	34280,47	8,92	30,62	89,73	-0,067	28	34
RcGELP35	369	39595,33	7,97	26,82	91,71	-0,018	31	33
RcGELP36	393	42853,78	5,29	24,14	85,70	-0,031	38	31
RcGELP37	352	37970,34	8,24	36,96	82,07	-0,011	23	26
RcGELP38	354	39386,39	8,82	30,37	84,60	-0,038	24	32
RcGELP39	390	42952,69	8,65	37,65	80,54	-0,122	28	33
RcGELP40	388	43072,75	8,55	42,79	74,66	-0,238	30	35
RcGELP41	397	44112,77	7,58	32,18	78,41	-0,306	36	37
RcGELP42	365	40331,00	5,04	30,03	87,37	-0,001	34	26
RcGELP43	344	38647,17	9,6	37,93	90,26	-0,168	27	38

(Continuação do apêndice 1)

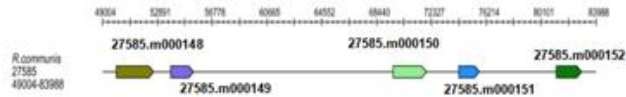
Gene	Nº de amino-ácidos	Peso molecular	Pi teórico	Índice de instabilidade de	Índice alifático	GRAAVY	Resíduos carregados negativamente (Asp + Glu)	Resíduos carregados positivamente (Arg + Lys)
RcGELP44	352	38044.13	5.60	25.95	91.76	0.133	25	22
RcGELP45	368	40809,79	8,02	33,37	70,79	-0,317	29	31
RcGELP46	268	30023,45	8,52	41,95	86,9	-0,087	22	26
RcGELP47	531	59696,65	7,81	32,97	90,56	-0,1	48	50
RcGELP48	372	41017,42	4,96	28,35	69,81	-0,099	39	24
RcGELP49	358	40047.16	8.91	36.14	92.88	-0.023	28	35
RcGELP50	284	31591.69	9.70	31.52	89.68	-0.182	23	40
RcGELP51	368	39896.61	6.09	27.03	101.14	0.168	30	28
RcGELP52	297	32299,91	5,47	27,86	91,58	0,091	25	19
RcGELP53	335	37208.03	7.03	37.36	90.54	0.024	31	31
RcGELP54	351	39335.33	9.19	25.38	72.56	-0.338	22	32
RcGELP55	422	46670.62	5.98	32.26	89.88	0.038	31	28
RcGELP56	379	41932,83	8,48	43,58	77,55	-0,023	26	30
RcGELP57	381	42025,81	5,41	38,72	80,39	0,07	29	20
RcGELP58	381	42272,01	6,44	28,6	82,47	-0,036	33	31
RcGELP59	411	45710,12	6,6	29,93	83,58	-0,177	41	39
RcGELP60	317	35396,06	9,34	28,45	96,62	0,093	21	29
RcGELP61	359	40135.92	4.90	36.11	89.92	0.019	35	27
RcGELP62	273	30581,22	8,97	43,83	86,81	-0,141	21	28
RcGELP63	331	35940,06	8,38	29,73	72,87	-0,055	26	30
RcGELP64	242	27475,01	8,78	28,95	75,29	-0,449	19	24
RcGELP65	164	18418,1	8,5	44,61	94,57	-0,122	13	15
RcGELP67	373	40833.61	5.41	24.01	94.42	0.056	29	22
RcGELP68	330	36319.37	7.55	36.66	85.97	-0.001	21	22
RcGELP69	359	39177.56	6.59	28.55	88.91	0.040	28	27
RcGELP70	292	32566,01	5	41,15	94,83	-0,03	30	21
RcGELP72	381	42009.67	4.66	24.18	94.93	0.090	35	20
RcGELP73	379	41939.28	6.44	32.40	81.64	-0.232	33	31
RcGELP74	368	41024,8	8,98	35,54	84,86	-0,234	30	40
RcGELP75	365	40548.59	8.89	30.97	81.53	-0.247	25	32
RcGELP76	358	38582.02	8.72	34.74	85.00	0.044	23	28
RcGELP77	363	40322.30	8.95	28.77	83.28	-0.107	28	36
RcGELP78	372	41148.07	5.49	37.38	89.06	0.024	35	30
RcGELP79	362	40428,73	5,13	40,18	82,76	-0,102	40	27
RcGELP80	379	41569,78	7,06	37,53	92,4	0,052	29	29
RcGELP81	964	106243,77	6,29	41,32	88,69	-0,065	104	96
RcGELP82	380	42012,87	6,08	34,13	82,95	-0,08	35	32
RcGELP83	367	39775,79	5,98	29,32	89,29	0,11	32	28
RcGELP84	366	40330,1	8,76	45,72	84,51	-0,03	25	32
RcGELP85	366	40327.79	5.54	30.03	89.29	-0.105	35	32
RcGELP86	353	38040.19	8.34	28.53	85.75	0.013	25	28
RcGELP87	354	38707.95	8.91	33.65	82.77	-0.071	28	35
RcGELP88	369	40574.47	8.88	34.14	81.82	-0.055	29	37

continuação do apêndice 1

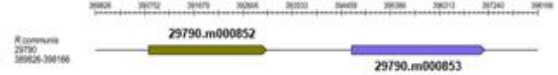
Gene	Nº de amino-ácidos	Peso molecular	Pi teórico	Índice de instabilidade	Índice alifático	GRAAVY	Resíduos carregados negativamente (Asp + Glu)	Resíduos carregados positivamente (Arg + Lys)
RcGELP89	387	42302,65	6,38	33,98	72,64	-0,108	28	26
RcGELP90	367	40711.33	9.58	38.10	78.72	-0.286	25	44
RcGELP91	707	77125.60	5.50	30.68	103.15	0.150	63	56
RcGELP92	289	31950,59	8,04	34,63	86,75	-0,057	26	28
RcGELP93	390	42643,96	8,47	34,69	84,56	0,06	25	29
RcGELP94	407	45905.51	5.66	46.07	87.47	0.012	34	26
RcGELP95	336	36365.91	5.84	34.83	80.42	-0.163	32	29
RcGELP96	369	40724.68	5.33	37.32	88.02	0.027	28	24
RcGELP97	218	23984,39	8,08	31,28	81,38	0,013	11	13
RcGELP98	281	30686.78	6.87	36.14	80.53	-0.044	17	17

APÊNDICE 2 – Análise de duplicação em tandem

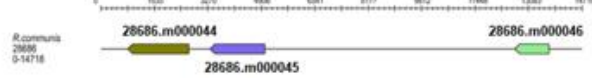
RcGELP2(27585.m000148)



RcGELP37(29790.m000852)



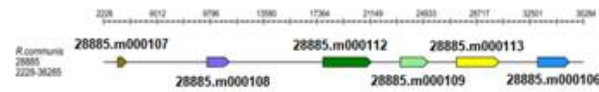
RcGELP10(28686.m00004)



RcGELP40(29792.m000611)



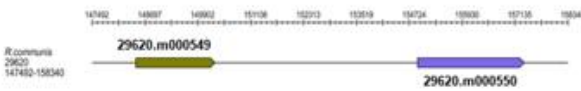
RcGELP11(28885.m000106)



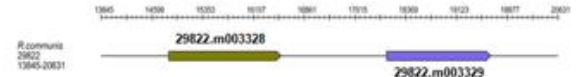
RcGELP42(29814.m000745)



RcGELP21(29620.m000549)



RcGELP45(29822.m003328)



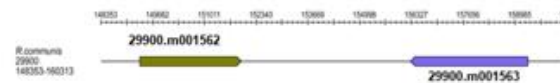
RcGELP31(29680.m001742)



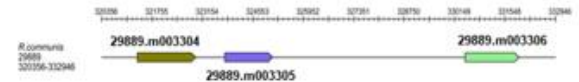
RcGELP47(29830.m001404)



RcGELP52(29900.m001562)



RcGELP51(29889.m003306)



Continuação do apêndice 2

RcGELP54(29907.m000651)



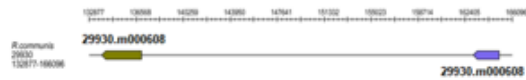
RcGELP57(29908.m006190)



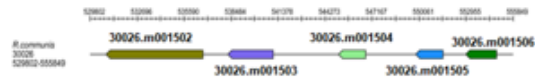
RcGELP60(29929.m004523)



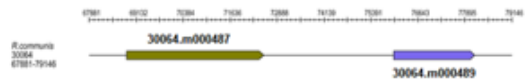
RcGELP64(29930.m000608)



RcGELP74(30026.m001505)



RcGELP76(30064.m000487)



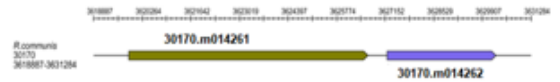
RcGELP81(30128.m008623)



RcGELP83(30128.m008843)



RcGELP91(30170.m014261)



APÊNDICE 3- Papel fisiológico, propriedades e funções moleculares de GDSL esterase/lipases de plantas.

Gene	Espécies de plantas	Número de acesso da proteína	Funções fisiológicas	Funções moleculares	Clade específico	Motifs	Referências
<i>AgaSGNH</i>	<i>Agave americana</i>	AAS75127Q5J7N0	Papel hipotético de uma proteína extracelular AgaSGNH no metabolismo da parede celular da epiderme e no metabolismo da cutícula vegetal.	Atividade de hidrolase, atuando nas ligações éster.	Ic	1, 2,3, 4, 5 e 6	Reina et al. (2007)
<i>JNP1</i>	<i>Jacaranda mimosifolia</i>	ABY59947 (BOFTZ8_JACMI)	Desempenham um papel putativo na hidrólise de lipídios no néctar com a liberação simultânea de ácidos graxos livres.	Atividade de hidrolase, atuando nas ligações éster.	Id	1, 2,3, 4, 5 e 6	Kram et al. (2008)
<i>BrSIL1</i>	<i>Brassica rapa</i>	AAM47031	Confere na planta uma Resistência Sistêmica Adquirida (SAR), onde o gene é ativado pela via de sinalização dependente de SA, na presença do patógeno não hospedeiro.	Atividade de hidrolase, atuando nas ligações éster.	IIIb	1, 2,3, 4, 5 e 6	Lee KA (2003)
<i>CaGLIP1</i>	<i>Capsicum annuum</i>	AAX20033	O gene é ativado por meio de uma via de sinalização dependente do ácido salicílico na presença do patógeno <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (Xcv). defesa contra estresses bióticos	Atividade de hidrolase, atuando nas ligações éster.	Id	1, 2,3, 4, 5 e 6	Hong et al. (2008)
<i>CaGL1</i>	<i>Capsicum annuum</i>	AAZ23955Q0R4F7	O gene é induzido por ácido metil jasmônico (MeJA) e estímulos locais / sistêmicos em feridas. Defesa contra estresses abióticos.	Atividade de hidrolase, atuando nas ligações éster.	Id	1, 2,3, 4, 5 e 6	Kim et al. (2008)
<i>AmGDSH1</i>	<i>Alopecurus myosuroides</i>	CAG27610	A ativação de graminicidas AOPP para ácidos herbicidas bioativos ocorre em plantações e ervas daninhas por meio da hidrólise dos precursores de ésteres de herbicida ariloxifenoxipropionato (AOPP) por AmGDSH1. Metabolismo endógeno e bioativação de herbicidas em lavouras e ervas daninhas.	Atividade de hidrolase, atuando nas ligações éster.	Va	1, 2,3, 4, 5 e 6	Cummins and Edwards (2004)

Continuação do apêndice 3

Gene	Espécies de plantas	Número de acesso da proteína	Funções fisiológicas	Funções moleculares	Clade específico	Motifs	Referências
<i>AAE</i>	<i>Rauvolfia serpentina</i>	AAW88320	Deacetylation of acetylnorajmaline leading to the formation of ajmaline. Possible role in late stages of ajmalina formation	Acetylajmaline esterase activity.	Va	1, 2,3, 4 e 6	Ruppert et al. (2005)
<i>BnSCE3/BnLIP2</i>	<i>Brassica napus</i>	AAX59709AY866419	Hidrólise da sinapina durante a germinação das sementes. A hidrólise da sinapina é usada para aumentar o valor nutricional da colza.	Atividade de hidrolase, atuando nas ligações éster.	Va	1, 2,3, 4 e 6	Clauss et al. (2008)
<i>LAE</i>	<i>Digitalis lanata</i>	CAA09694	A desacetilação de lanatosídeos. Papel hipotético da proteína LAE ligada à parede celular na biossíntese e transformação de cardenólídeos.	Atividade de hidrolase, atuando nas ligações éster. Hidrólise de carboidratos	Vb	1, 2,3, 4, 5 e 6	Kandzia et al. (1998)
<i>Hev b 13</i>	<i>Hevea brasiliensis</i>	Q7Y1X1	Hipoteticamente envolvido na nodulação	Atividades de lipase e esterase	Vb	1, 2,3. 4, 5 e 6	Arif et al. (2004); Rouge et al. (2010)
<i>MaAChE</i>	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	BAG09557	Mediação do sistema metabólico em plantas	Hidrólise de acetilcolina	Vb	1, 2,3. 4, 5 e 6	Yamamoto et al. (2008)
<i>Salicornia AChE</i>	<i>Salicornia europae</i>	AB489863 BA123204	Aumento da atividade da acetilcolinesterase na raiz e parte inferior do caule após o acúmulo de sal durante o crescimento	Atividade da acetilcolinesterase	Vb	1, 2,3. 4, 5 e 6	Yamamoto et al. (2009)
<i>ZmAChE</i>	<i>Sweet corn (Zea mays L. cv. Honey-Bantam)</i>	BAD89850	Conduzir o tráfego de célula a célula por meio de um regulamento de passagem de canal	Atividade da acetilcolinesterase	Vb	1, 2,3. 4, 5 e 6	Sagane et al. (2005)

APÊNDICE 4 – Número de éxons e íntrons nos genes RcGELPs

Gene	Gene ID	éxons	íntrons	Regiões upstream/downstream
RcGELP1	27585.m000146	2	1	0
RcGELP2	27585.m000148	5	4	1
RcGELP3	27585.m000149	10	4	1
RcGEPL4	27585.m000150	5	4	0
RcGELP5	27585.m000151	5	4	0
RcGELP6	27585.m000152	5	4	0
RcGELP7	28565.m000324	4	3	0
RcGELP8	28686.m000044	5	4	0
RcGELP9	28686.m000045	5	4	0
RcGELP10	28686.m000046	8	3	1
RcGELP12	28885.m000107	2	1	0
RcGELP13	28885.m000108	1	0	2
RcGELP14	28885.m000109	5	4	0
RcGELP15	28885.m000110	5	4	0
RcGELP16	28885.m00112	5	4	0
RcGELP17	28885.m00113	5	4	0
RcGELP18	28962.m000453	2	1	0
RcGELP19	28962.m000454	3	2	0
RcGELP20	29005.m000259	6	5	0
RcGELP21	29620.m000549	1	0	2
RcGELP22	29620.m000550	3	2	2
RcGELP23	29625.m000675	5	4	2
RcGELP24	29634.m002166	3	2	0
RcGELP25	29640.m000407	1	0	2
RcGELP26	29676.m001669	5	4	0
RcGELP27	29680.m001738	5	2	1
RcGELP28	29680.m001739	2	1	2
RcGELP29	29680.m001740	2	1	2
RcGELP30	29680.m001741	5	4	0
RcGELP31	29680.m001742	3	2	0
RcGELP32	29683.m000474	5	4	0
RcGELP33	29703.m001547	8	7	0
RcGELP34	29716.m000306	4	3	2
RcGELP35	29717.m000225	1	0	2
RcGELP36	29739.m003689	5	4	0
RcGELP37	29790.m000852	5	4	2
RcGELP38	29790.m000853	2	1	2

Continuação do apêndice 4

Gene	Gene ID	éxons	íntrons	Regiões upstream/downstream
RcGELP39	29792.m000610	5	4	0
RcGELP40	29792.m000611	4	1	1
RcGELP41	29792.m000612	5	4	0
RcGELP42	29814.m000745	3	2	0
RcGELP43	29814.m000746	3	2	0
RcGELP44	29815.m000492	5	4	2
RcGELP45	29822.m003328	5	4	0
RcGELP46	29822.m003329	6	5	0
RcGELP47	29830.m001404	4	3	0
RcGELP48	29864.m001449	5	4	1
RcGELP49	29889.m003304	2	1	2
RcGELP50	29889.m003305	6	5	0
RcGELP51	29889.m003306	5	4	0
RcGELP52	29900.m001562	4	3	0
RcGELP53	29900.m001563	4	3	0
RcGELP54	29907.m000651	1	0	2
RcGELP55	29907.m000652	2	1	2
RcGELP56	29908.m006189	5	4	0
RcGELP57	29908.m006190	5	4	0
RcGELP58	29908.m006192	5	4	1
RcGELP59	29917.m002026	5	4	0
RcGELP60	29929.m004523	4	3	0
RcGELP61	29929.m004524	3	2	0
RcGELP62	29929.m004536	5	4	0
RcGELP63	29929.m004758	2	1	1
RcGELP64	29930.m000608	2	1	0
RcGELP65	29930.m000609	2	1	0
RcGELP67	29983.m003294	5	4	2
RcGELP68	29983.m003318	4	3	0
RcGELP69	29991.m000624	5	4	1
RcGELP70	30022.m000382	2	1	1
RcGELP71	30026.m001502	11	10	0
RcGELP72	30026.m001503	1	0	2
RcGELP73	30026.m001504	5	4	0
RcGELP74	30026.m001505	5	4	0
RcGELP75	30026.m001506	5	4	2
RcGELP76	30064.m000487	2	1	2
RcGELP77	30064.m000489	5	4	1
RcGELP78	30068.m002583	5	4	0

Continuação do apêndice 4

Gene	Gene ID	éxons	íntrons	Regiões upstream/downstream
RcGELP79	30076.m004597	5	4	1
RcGELP80	30114.m000518	1	0	0
RcGELP81	30128.m008623	19	18	0
RcGELP82	30128.m008733	5	4	0
RcGELP83	30128.m008843	5	4	2
RcGELP84	30128.m008951	5	4	0
RcGELP85	30138.m004067	5	4	0
RcGELP86	30146.m003475	5	4	1
RcGELP87	30146.m003477	1	0	2
RcGELP88	30146.m003480	4	3	0
RcGELP89	30147.m013809	2	1	0
RcGELP90	30169.m006260	1	0	2
RcGELP91	30170.m014261	5	4	2
RcGELP92	30170.m014262	5	4	0
RcGELP93	30174.m008697	5	4	0
RcGELP94	30190.m010852	1	0	2
RcGELP95	30190.m011297	6	5	0
RcGELP96	30204.m001822	2	1	2
RcGELP97	44916.m000014	1	0	0
RcGELP98	44916.m000014	2	1	0

APENDICE 5- Lista de elementos cis-reguladores associados aos genes RcGELP e seus respectivos quantitativos. Ácido abscísico (AA), auxina (AX), giberelina (GB), jasmonato de metila (MeJa), respostas de luminosidade (L), MYB, MYC, indução anaeróbica (AI), resposta de defesa ou estresse (DE), expressão induzida por água crise (ES), baixas temperaturas (LT), ácido salicílico (SA), expressão de meristema (EM) e expressão de zeína (EZ).

Gene	Gene ID	AA	AX	GB	MeJa	Luz	MYB	MYC	IA	DE	ES	LT	AS	EM	EZ
RcGELP1	27585.m000146	0	0	1	0	7	1	0	1	0	0	0	0	0	2
RcGELP2	27585.m000148	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RcGELP3	27585.m000149	1	1	0	0	6	1	2	1	0	0	0	1	0	0
RcGELP4	27585.m000150	0	0	1	0	7	2	1	1	1	0	0	0	1	0
RcGELP5	27585.m000151	1	1	1	2	7	0	2	1	0	0	0	0	0	0
RcGELP6	27585.m000152	1	1	0	0	7	0	0	1	0	0	1	0	0	0
RcGELP7	28565.m000324	0	0	0	0	6	0	0	1	0	0	1	0	2	0
RcGELP8	28686.m000044	2	0	1	2	2	2	3	1	0	0	1	0	0	0
RcGELP9	28686.m000045	3	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RcGELP10	28686.m000046	0	0	0	0	5	1	4	2	1	0	0	0	0	0
RcGELP12	28885.m000107	0	0	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0
RcGELP13	28885.m000108	0	1	1	2	8	1	3	0	1	0	0	1	0	1
RcGELP14	28885.m000109	0	1	0	0	3	0	4	1	1	0	0	1	2	1
RcGELP15	28885.m000110	2	0	0	2	7	1	5	0	0	0	0	0	0	1
RcGELP16	28885.m00112	2	0	0	0	3	0	1	2	0	0	0	0	0	0
RcGELP17	28885.m00113	2	1	0	0	4	1	7	2	3	0	0	1	0	0

Continuação do apêndice 5

Gene	Gene ID	AA	AX	GB	MeJa	Luz	MYB	MYC	IA	DE	ES	LT	AS	EM	EZ
RcGELP18	28962.m000453	0	0	0	0	5	0	1	0	1	0	0	0	0	0
RcGELP19	28962.m000454	0	0	0	0	5	2	3	3	0	0	0	0	1	0
RcGELP20	29005.m000259	0	0	0	0	9	3	3	3	0	0	0	0	0	0
RcGELP21	29620.m000549	0	0	0	0	8	3	0	1	0	0	1	0	0	0
RcGELP22	29620.m000550	0	0	2	2	5	3	2	0	1	0	0	0	0	0
RcGELP23	29625.m000675	0	0	0	5	3	1	1	0	0	0	1	0	2	0
RcGELP24	29634.m002166	1	0	2	2	3	2	2	0	1		1	1	0	0
RcGELP25	29640.m000407	0	0	0	2	9	3	2	0	0	0	1	0	0	0
RcGELP26	29676.m001669	0	0	0	0	9	0	2	0	0	0	1	0	2	0
RcGELP27	29680.m001738	1	0	0	0	8	1	0	0	1	0	0	0	0	0
RcGELP28	29680.m001739	0	0	1	4	6	2	2	1	0	0	0	0	0	0
RcGELP29	29680.m001740	0	0	1	3	0	2	2	0	0	0	0	0	1	0
RcGELP30	29680.m001741	0	0	1	0	4	1	4	0	0	0	0	0	0	0
RcGELP31	29680.m001742	1	0	0	4	5	4	4	2	0	0	0	0	1	0
RcGELP32	29683.m000474	1	0	0	2	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0
RcGELP33	29703.m001547	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RcGELP34	29716.m000306	0	1	0	0	7	0	0	1	1	0	1	0	0	0
RcGELP35	29717.m000225	1	0	2	0	6	0	2	1	1	0	0	0	0	0

Continuação do apêndice 5

Gene	Gene ID	AA	AX	GB	MeJa	Luz	MYB	MYC	IA	DE	ES	LT	AS	EM	EZ
RcGELP36	29739.m003689	1	0	0	2	6	0	1	0	0	0	0	1	1	0
RcGELP37	29790.m000852	2	0	0	2	4	2	0	2	1	0	0	0	0	1
RcGELP38	29790.m000853	1	0	0	0	4	0	1	0	0	0	0	1	1	0
RcGELP39	29792.m000610	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RcGELP40	29792.m000611	0	1	1	0	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0
RcGELP41	29792.m000612	0	2	1	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RcGELP42	29814.m000745	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RcGELP43	29814.m000746	0	0	0	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
RcGELP44	29815.m000492	0	0	0	2	1	1	2	0	1	0	0	2	1	0
RcGELP45	29822.m003328	0	0	0	0	6	1	1	1	0	0	1	0	0	0
RcGELP46	29822.m003329	1	0	3	0	6	2	0	0	0	1	0	0	0	0
RcGELP47	29830.m001404	0	0	0	0	6	2	2	0	0	0	0	0	0	0
RcGELP48	29864.m001449	0	1	0	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RcGELP49	29889.m003304	1	0	0	4	5	4	5	3	0	0	0	0	0	0
RcGELP50	29889.m003305	1	1	1	0	4	3	1	0	0	0	1	0	0	1
RcGELP51	29889.m003306	1	0	0	0	5	2	3	0	0	1	1	0	0	0
RcGELP52	29900.m001562	3	1	4	0	11	4	2	1	0	0	0	0	0	0
RcGELP53	29900.m001563	2	1	1	0	10	2	5	0	0	1	0	0	0	0

Continuação do apêndice 5

Gene	Gene ID	AA	AX	GB	MeJa	Luz	MYB	MYC	IA	DE	ES	LT	AS	EM	EZ
RcGELP54	29907.m000651	1	0	0	4	8	1	2	1	0	1	0	0	0	0
RcGELP55	29907.m000652	0	0	1	2	8	2	1	0	0	1	0	1	0	0
RcGELP56	29908.m006189	0	0	0	2	6	1	6	0	0	1	0	0	0	0
RcGELP57	29908.m006190	1	1	0	0	4	2	3	0	0	0	0	0	0	1
RcGELP58	29908.m006192	1	0	0	0	6	3	1	0	0	1	0	0	0	0
RcGELP59	29917.m002026	1	0	0	0	10	5	1	3	0	0	0	0	0	0
RcGELP60	29929.m004523	1	0	1	0	4	1	2	4	0	1	0	2	0	1
RcGELP61	29929.m004524	0	0	0	0	7	2	1	2	0	0	0	0	0	0
RcGELP62	29929.m004536	1	0	0	2	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0
RcGELP63	29929.m004758	2	0	0	0	8	3	1	2	0	1	0	0	0	1
RcGELP64	29930.m000608	1	1	0	0	8	4	2	1	0	0	0	0	0	0
RcGELP65	29930.m000609	1	0	2	0	6	0	0	0	0	2	0	0	0	0
RcGELP67	29983.m003294	0	0	0	0	6	0	1	1	1	0	1	0	0	0
RcGELP68	29983.m003318	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	1	0	1
RcGELP69	29991.m000624	1	0	1	2	2	1	3	3	0	1	0	3	1	1
RcGELP70	30022.m000382	0	0	0	2	8	1	0	0	0	0	2	0	0	1
RcGELP71	30026.m001502	2	1	0	0	3	2	2	1	0	0	0	0	0	0
RcGELP72	30026.m001503	1	0	0	0	8	1	2	0	1	2	0	0	2	0

Continuação do apêndice 5

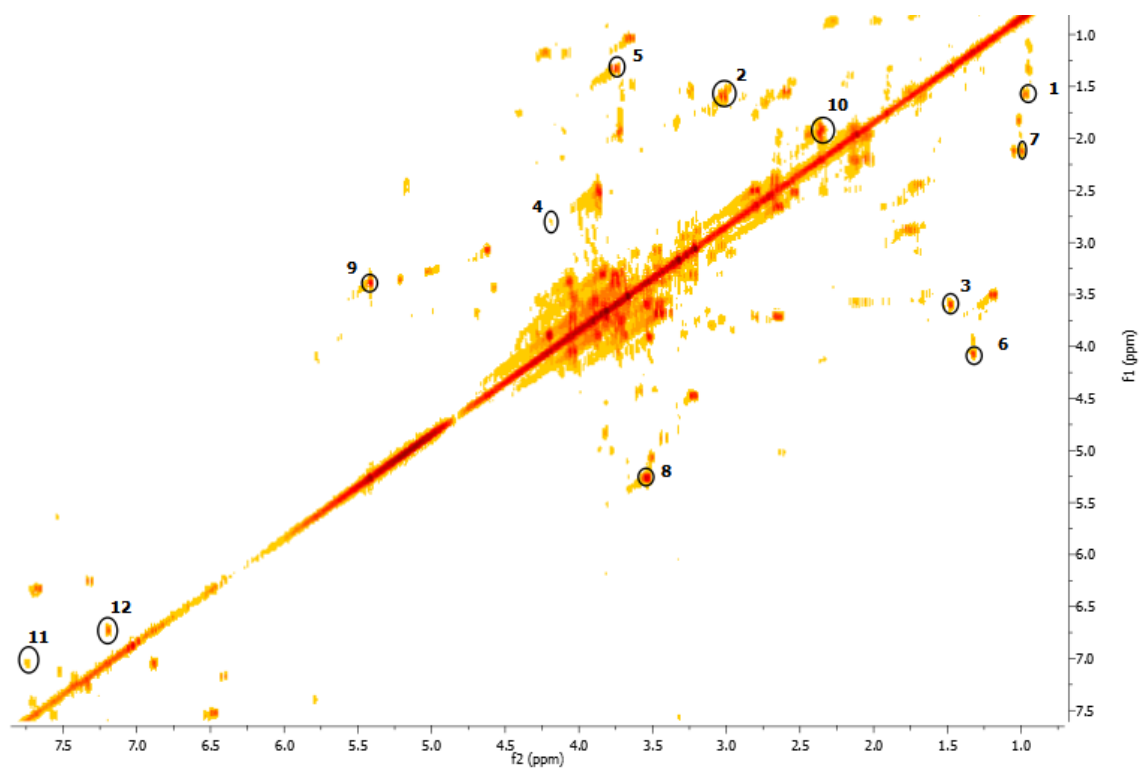
Gene	Gene ID	AA	AX	GB	MeJa	Luz	MYB	MYC	IA	DE	ES	LT	AS	EM	EZ
RcGELP73	30026.m001504	0	0	0	0	3	5	1	1	0	1	0	0	0	0
RcGELP74	30026.m001505	0	0	0	0	4	1	0	0	1	0	2	0	1	0
RcGELP75	30026.m001506	0	0	0	0	9	3	0	0	0	0	0	1	0	0
RcGELP76	30064.m000487	0	0	0	0	4	0	1	0	0	0	0	1	0	0
RcGELP77	30064.m000489	0	0	1	2	4	3	1	1	0	0	0	0	0	0
RcGELP78	30068.m002583	0	0	0	2	6	0	1	0	1	2	0	0	0	0
RcGELP79	30076.m004597	0	0	1	2	9	1	1	0	0	0	0	0	1	0
RcGELP80	30114.m000518	1	3	0	0	8	0	0	1	1	0	0	0	1	0
RcGELP81	30128.m008623	0	0	3	0	9	1	2	0	0	0	0	0	0	0
RcGELP82	30128.m008733	3	0	0	2	16	2	3	0	1	0	1	0	1	0
RcGELP83	30128.m008843	1	0	0	2	4	4	1	1	0	0	0	0	0	1
RcGELP84	30128.m008951	0	0	0	0	6	0	2	2	1	2	0	0	0	0
RcGELP85	30138.m004067	2	2	1	2	11	1	2	0	0	0	0	1	0	1
RcGELP86	30146.m003475	0	0	1	0	7	1	4	2	0	0	0	0	0	0
RcGELP87	30146.m003477	2	0	1	4	7	2	2	1	1	3	0	1	2	0
RcGELP88	30146.m003480	1	0	0	2	8	1	3	2	0	0	0	1	1	0
RcGELP89	30147.m013809	1	0	0	0	4	2	4	0	1	0	0	0	0	0
RcGELP90	30169.m006260	0	1	0	0	5	2	2	0	0	1	0	0	0	0

Continuação do apêndice 5

Gene	Gene ID	AA	AX	GB	MeJa	Luz	MYB	MYC	IA	DE	ES	LT	AS	EM	EZ
RcGELP91	30170.m014261	2	0	1	0	4	2	5	1	1	1	0	1	0	0
RcGELP92	30170.m014262	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1
RcGELP93	30174.m008697	1	0	0	0	7	1	2	3	1	0	0	1	0	1
RcGELP94	30190.m010852	0	0	0	0	2	0	1	1	0	0	0	2	0	1
RcGELP95	30190.m011297	2	1	0	0	11	1	1	1	2	2	1	0	0	1
RcGELP96	30204.m001822	5	1	0	0	11	1	3	1	0	1	0	1	0	0
RcGELP97	44916.m000014	0	0	2	4	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0
RcGELP98	44916.m000014	0	0	2	4	3	4	1	0	0	0	0	0	0	0

APÊNDICE 6- Mapa de correlação Cozy do pool das amostras de sementes de *A. thaliana* superexpressando o gene RcGELP.

1-Isoleucina, 2- GABA, 3- alanina, 4- asparagina, 5- lactato, 6- treonina, 7- valina, 8- glucose, 9- sacarose, 10- glutamato, 11- histidina, 12- tirosina.



Fonte: autoria própria.

APÊNDICE 7- Mapa de correlação HSQC do pool das amostras de sementes de *A. thaliana* superexpressando o gene RcGELP. **a)** 1-Alanina, 2-acetato, 3-glutamato, 4-succinato, 5-GABA, 6-colina, 7-betaína **b)** 8-glicina, 9-etileno glicol, 10-isoleucina, 11-tirosina, 12-lactato, 13-treonina **c)** 14-glicose, 15-sacarose, 16-histidina

