

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

**Metabolismo do Alcaloide Antioxidante Braquicerina de  
*Psychotria brachyceras* Müll. Arg. sob Estresse de Calor**

**Yve Verônica da Silva Magedans**

**Orientador: Arthur Germano Fett-Neto**

Porto Alegre

Março de 2017

Yve Verônica da Silva Magedans

Metabolismo do Alcaloide Antioxidante Braquicerina de  
*Psychotria brachyceras* Müll. Arg. sob Estresse de Calor

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da UFRGS como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Botânica.

Área de Concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Arthur Germano Fett-Neto

Porto Alegre

2017

## **LOCAL DE EXECUÇÃO E INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Vegetal, pertencente ao Departamento de Botânica do Instituto de Biociências e ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## **BANCA EXAMINADORA**

Dra. Eliane Romanato Santarém.

Faculdade de Biociências, Departamento de Biologia.

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Dr. Felipe dos Santos Maraschin.

Instituto de Biologia, Departamento de Botânica.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dr. Fernando Teixeira Nicoloso.

Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Biologia.

Universidade Federal de Santa Maria.

Dra. Lúcia Rebello Dillenburg.

Membro suplente da banca examinadora.

Instituto de Biociências, Departamento de Botânica.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

“The most important thing in science is not so much to obtain new facts as to discover new ways of thinking about them.” William Bragg.

“Enquanto o mundo existir, sempre haverá semeadura e colheita, frio e calor, verão e inverno, dia e noite.” Gênesis 8.22.

Às minhas avós Maria Madalena e Evelina.

## AGRADECIMENTOS

Voltar à academia depois de cinco anos não foi tarefa fácil. Realizar este mestrado enquanto lecionava para o ensino médio, também não. Tenho muito a agradecer e espero poder singelamente expressá-lo aqui.

Prof. Arthur, obrigada por ter aberto essa porta para mim. Uma professora de ensino médio em busca de qualificação talvez não fosse a melhor candidata para um programa de pós-graduação. Mas o senhor acredita na ciência e na capacidade transformadora do conhecimento, e foi sempre compreensivo comigo e minhas limitações. Permitiu que eu continuasse trabalhando com meus alunos e me proporcionou uma experiência formativa ímpar. Obrigada por ser este exemplo de comprometimento, ética e seriedade.

Hélio, eu preciso te agradecer por tudo. Você fez com que eu me sentisse parte do laboratório desde o primeiro dia. Sem me conhecer, você me deu uma gaveta e dividiu sua bancada comigo. Isso foi muito legal! Obrigada por me apresentar ao mundo das Psiquiatrias, por me ensinar os macetes da rotina do laboratório e a coletar, além de revisar cálculos e planejar experimentos inúmeras vezes.

Camila, obrigada por tudo, também. Você é uma amiga que eu não mereço. Obrigada pelo carinho, obrigada por ter feito discos comigo e pelos incontáveis galhos que você quebrou, e eu não sei se um dia vou poder retribuir toda ajuda.

Kelly, obrigada pelo abrigo, pelas risadas e por me deixar estorvar sua vida nessa finaleira do mestrado.

Fernanda e Anna, obrigada por toda a experiência compartilhada, vocês também me ensinaram a fazer ciência (e amigo secreto!).

Yohanna, obrigada por fazer a diferença no laboratório. Sentimos sua falta!

Aos ICs, Luana, Fabrício, Júlia e Ezequiel, pela mão sempre disposta a ajudar.

Andriele, Artur e Márcia, obrigada por toda a ajuda com as análises de tempo real. Vocês me ensinaram muito. Márcio, Janete, Guilherme e Cibele obrigada por sempre estarem dispostos a ajudar. Fran e Roberta, obrigada por compartilharem comigo as dores de morar longe de casa (ou da UFRGS!).

Aos meus amigos da USP, especialmente à Carol, ao Paulo, ao Diego e ao Ivan pelo conhecimento e coração compartilhados. Obrigada, também, Fernanda, Laís, Dani, Marcela, Juliano e Marcelo pelos momentos inesquecíveis que vivemos juntos. Vocês são pessoas maravilhosas que amam suas famílias e trabalham com seriedade em suas profissões. Sei que nos distanciamos, mas vocês moram no meu coração.

Obrigada aos novos amigos, Eliane, Bruno, Cárin e Marcos pelas risadas, pela sabedoria compartilhada e pela parceria. Eu, como bióloga (hehe), considero vocês demais!

Obrigada aos meus pais, Evelyn e Marcos, que sacrificaram muito de suas vidas para que eu pudesse estudar com tranquilidade, e literalmente fizeram tudo por mim e pela minha irmã. Obrigada à minha querida Lívia, que é um ser humano simplesmente maravilhoso. Uma verdadeira benção.

Finalmente, obrigada ao meu amigo, meu marido e meu pastor, Adilson. Nos conhecemos quando eu estava no final da graduação, e desde lá você está ao meu lado, ouvindo sobre as coisas lindas da biologia, e compartilhando comigo as alegrias e as dores que a vida traz. Obrigada querido, e que Deus continue a nos abençoar.





## LISTA DE ABREVIATURAS

ACT	Actina
ANOVA	One-Way Analysis Of Variance
APX	Ascorbato Peroxidase
CAT	Catalase
DMAPP	Dimetilalil Pirofosfato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DW	Dry Weight
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato deshidrogenase
GPV	N-β-D-glucopiranosil vincosamida
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSF	Heat Shock Transcription Factor
HSP	Heat Shock Protein
IPP	Isopentenil Pirofosfato
MDA	Malondialdeído
MEP	Metil-eritritol-fosfato
MIA	Monoterpene Indole Alkaloid
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Reactive Oxygen Species
qPCR	Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RUBISCO	Ribulose 1,5-Bifosfato Carboxilase Oxigenase
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TDC	Triptofano Descarboxilase
UV	Ultravioleta

## RESUMO

O estresse de calor prejudica o crescimento e reprodução dos organismos vegetais, ao alterar a permeabilidade de membranas biológicas e desnaturar proteínas, limitando o metabolismo primário. Dentre as respostas ao estresse abiótico, está a síntese de metabólitos secundários. Braquicerina é um alcaloide monoterpene indólico com ação antioxidante, protetora contra UV e antimutagênica sintetizado por partes aéreas de *Psychotria brachyceras*. O objetivo deste trabalho é investigar o metabolismo de braquicerina sob estresse de calor. Assim, espera-se contribuir para o conhecimento acerca do metabolismo secundário nas respostas ao estresse de calor, descrever a função *in planta* do composto, e fornecer ferramentas para obtenção do alcaloide para fins farmacêuticos. O acúmulo de braquicerina foi induzido em discos foliares mantidos a 40°C por três dias, tanto em regime de elevação abrupta como gradual da temperatura. Baixa temperatura (10°C) não afetou o acúmulo do alcaloide. Discos foliares de *Psychotria carthagenensis*, uma espécie que não sintetiza alcaloides monoterpene indólicos, foram também desafiados por estresse de calor. Clorofila total, teor de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica foram quantificados em ambas as espécies. *P. carthagenensis* foi relativamente tolerante ao calor, o que pode estar relacionado à sua elevada concentração de antocianinas, fortemente induzidas por choque térmico de 50°C por 6h. Peroxidação lipídica foi reduzida nas amostras de *P. brachyceras* sob estresse de calor agudo ou gradual em comparação à condição controle, sendo este parâmetro inalterado nas duas condições em *P. carthagenensis*. O teor de peróxido de hidrogênio foi menor em *P. brachyceras* submetida a choque de térmico em relação ao controle, enquanto o mesmo parâmetro não foi alterado em *P. carthagenensis*. Discos foliares das espécies sensíveis ao calor *Brugmansia suaveolens* e *Brassica oleracea*, pré-tratadas com braquicerina em concentrações similares às encontradas em *P. brachyceras*, adquiriram fenótipo tolerante ao choque térmico. A expressão do gene que codifica a enzima triptofano descarboxilase (TDC), envolvida na biossíntese de braquicerina em *P. brachyceras*, foi fortemente inibida em discos foliares submetidos à 40°C por 6h, 12h e 24h, sugerindo que o efeito da temperatura na estimulação de acúmulo de alcaloide ocorra em nível pós-transcricional. Em conjunto, os dados indicam que a exposição ao calor é um meio efetivo de aumentar o rendimento de braquicerina, cuja acumulação contribui para proteção contra os danos oxidativos associados.

**Palavras-chave:** braquicerina, *Psychotria*, alcaloide monoterpene indólico, triptofano descarboxilase, estresse oxidativo, tolerância a estresse, resposta ao estresse de calor.

## ABSTRACT

Heat stress impairs plant growth and reproduction by altering membrane permeability and promoting protein denaturation, which limits primary metabolism. Secondary metabolites often take part in protection against abiotic stress responses. Brachycerine is a monoterpene indole alkaloid with antioxidant, UV protectant, and antimutagenic activity synthesized by *Psychotria brachyceras* shoots. Brachycerine metabolism was analyzed under heat stress, in order to shed light on brachycerine's *in planta* function and to provide potential tools to improve alkaloid yields for pharmaceutical analysis. Accumulation was induced in leaf disks kept at 40°C for three days, both by abrupt and stepwise temperature increase. Brachycerine concentration was not affected by low temperature (10°C) exposure. Leaf disks of *Psychotria carthagenensis*, a species devoided of alkaloids, were also challenged by heat. Total chlorophyll, hydrogen peroxide and lipid peroxidation concentrations were determined in both species. *P. carthagenensis* was relatively tolerant to heat treatments which may be explained by its high anthocyanin concentration, strongly induced by heat shock of 50°C for 6h. *Brugmansia suaveolens* and *Brassica oleracea*, pre-treated with brachycerine in concentrations equivalent to those found in *P. brachyceras*, had a heat shock tolerant phenotype, based on chlorophyll content. Expression of the TRYPTOPHAN DECARBOXYLASE gene, which encodes for an enzyme involved in alkaloid biosynthesis (TDC) was strongly repressed in leaf disks exposed to 40°C for 6h, 12h e 24h, suggesting that temperature effect may occur at post-transcriptional level. Taken together, data indicate that heat exposure is an effective means to increase yields of brachycerine, whose accumulation contributes to protect against associated oxidative damage.

**Keywords:** brachycerine, *Psychotria*, monoterpene indole alkaloid, tryptophan decarboxylase, oxidative stress, stress tolerance, heat stress response.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Estresse Abiótico .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Respostas Gerais das Plantas ao Estresse Abiótico .....	2
<b>1.2. Estresse de Calor .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Tolerância ao Estresse de Calor .....	4
<b>1.3 Estresse Oxidativo .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Metabólitos Secundários .....</b>	<b>9</b>
1.4.1 Terpenos .....	9
1.4.2 Compostos Fenólicos.....	10
1.4.3 Alcaloides.....	11
<b>1.5 <i>Psychotria</i>.....</b>	<b>12</b>
1.5.1 Alcaloides de <i>Psychotria</i> .....	13
<b>1.6 Justificativa.....</b>	<b>15</b>
<b>1.7 Objetivo Geral.....</b>	<b>16</b>
1.7.1 Objetivos Específicos.....	16
<b>2. CAPITULO I: RESEARCH ARTICLE .....</b>	<b>17</b>
<b>3. DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>45</b>
<b>4. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>47</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>48</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Estresse Abiótico

Os fatores abióticos (químicos e físicos) do habitat influenciam o crescimento e a reprodução das plantas e podem variar com o tempo e a localização geográfica. São considerados fatores abióticos mais relevantes: a disponibilidade de luz e água; a variação na temperatura ambiental; a concentração atmosférica de gás carbônico e oxigênio; o conteúdo e disponibilidade de nutrientes, a presença de metais pesados e a salinidade do solo (Blumwald & Mittler, 2015; Macedo, 2012).

O estresse abiótico pode ser definido como uma situação em que as variações nos fatores abióticos comprometem o crescimento e a reprodução do organismo vegetal, impedindo-o de atingir seu potencial genético plenamente (Blumwald & Mittler, 2015). As plantas evoluíram respostas fisiológicas complexas frente às flutuações desfavoráveis dos fatores abióticos, alterando os processos metabólicos e de desenvolvimento para garantir a sobrevivência e a reprodução (Bokszczanin *et al.*, 2013).

Genericamente, o estresse abiótico pode prejudicar o desenvolvimento vegetal ao danificar estruturas celulares e interromper o metabolismo primário do organismo. Dessa forma, frequentemente é possível observar perda de biomassa e crescimento reduzido no indivíduo estressado. É possível, também, que o programa reprodutivo seja iniciado prematuramente em situações de estresse, o que pode resultar em plantas menores e, conseqüentemente, com menor capacidade fotossintética para a produção sementes, em número e tamanho (Wahid *et al.*, 2007).

Apesar de apresentarem mecanismos de ação diferentes, os estresses abióticos, em geral, promovem o desacoplamento das vias metabólicas das plantas. Isso resulta na síntese de compostos intermediários tóxicos, como as espécies reativas de oxigênio. O aumento excessivo dessas moléculas caracteriza o estresse oxidativo, que será tratado no item 1.3 desta introdução.

### 1.1.1 Respostas Gerais das Plantas ao Estresse Abiótico

Blumwald & Mittler (2015) classificam as respostas das plantas ao estresse abiótico em “aclimatação” ou “adaptação”. A aclimatação é uma mudança temporária na fisiologia ou morfologia do indivíduo, que cessa quando termina a situação de estresse. A aclimatação aumenta a tolerância do indivíduo com a exposição frequente ao estresse abiótico. Mecanismos epigenéticos podem aumentar a duração das respostas de aclimatação, em alguns casos tornando-as hereditárias. Por sua vez, a adaptação ocorre quando mudanças genéticas de uma população foram fixadas por seleção natural, ao longo de gerações. Aclimatação e adaptação podem contribuir conjuntamente para a tolerância da planta frente ao estresse abiótico.

Algumas respostas das plantas ao estresse biótico (e.g. herbivoria, ataque de patógenos) e abiótico baseiam-se em metabólitos secundários. Fitoanticipinas são aqueles metabólitos que são sintetizados constitutivamente, e fitoalexinas são metabólitos cuja síntese é induzida frente ao estresse (Nascimento & Fett-Neto, 2010). Muitas espécies apresentam um perfil intermediário entre essas duas estratégias, por exemplo, as espécies de *Psychotria* do sul do Brasil que sintetizam alcaloides monoterpênicos indólicos (Porto *et al.*, 2009).

As respostas das plantas aos diferentes tipos de estresse abiótico têm sido intensamente analisadas (Ahmad & Prasad, 2012). Há evidências que a resposta fisiológica do organismo vegetal a uma combinação de estresses abióticos é única, não sendo facilmente deduzida a partir das respostas desse organismo para os mesmos fatores de estresse, quando aplicados individualmente (Mittler, 2006; Tattini *et al.*, 2015).

A combinação entre estresse de calor e hídrico é um exemplo clássico: cultivares submetidos a esses estresses combinadamente apresentam maior prejuízo no crescimento e a na produtividade, que em situações em que o aumento da temperatura ou a seca são aplicados individualmente (Mittler, 2006). Foi observado, por exemplo, que o aumento do nível de prolina, considerado importante para tolerar o estresse hídrico, não é observado em situações de estresse hídrico combinado ao estresse de calor (Bokszczanin *et al.*, 2013).

## 1.2. Estresse de Calor

O estresse de calor (“heat stress”) pode ser definido como o aumento da temperatura ambiental em relação aos valores considerados ótimos para uma planta, por um tempo suficientemente longo para prejudicar seu crescimento e desenvolvimento (Wahid *et al.*, 2007). Já a tolerância ao calor é definida genericamente como a habilidade de uma planta em manter a homeostase quando exposta ao estresse de calor, garantindo, assim, produtividade e crescimento (Bita & Gerats, 2013). É provável, no entanto, que as respostas ao estresse de calor sejam uma complexa função da intensidade, duração e taxa de aumento da temperatura (Wahid *et al.*, 2007; Yeh *et al.*, 2012), e dos diferentes genótipos de um organismo vegetal, podendo haver diferentes graus de tolerância ao aumento da temperatura entre espécies e dentro de uma mesma espécie.

As espécies vegetais estão sujeitas a flutuações na temperatura ambiental, tanto diárias quanto sazonais, ao longo de seu ciclo de vida. Nesse sentido, é importante considerar que há evidências que o clima terrestre está mudando, e espera-se uma elevação das médias anuais de temperatura devido ao aumento do efeito estufa. Para o Brasil, por exemplo, o Intergovernmental Panel on Climate Change projeta um aumento médio de 5°C ao final do século XXI, durante o verão, em um cenário de alto risco. Nesse mesmo cenário, a previsão é que ocorra um acréscimo entre 10% e 20% nos índices pluviométricos para a região sul do Brasil (IPCC, 2013). Espera-se, portanto, que a variação na temperatura seja um fator limitante a ser considerado no manejo e na preservação das espécies vegetais no sul do Brasil.

Em geral, considera-se que um aumento entre 10°C e 15°C acima da temperatura ambiente já induz respostas ao estresse de calor (Wahid *et al.*, 2007). Resumidamente, os danos causados pelo estresse de calor são: alterações na permeabilidade das membranas celulares, desnaturação e agregação de proteínas, instabilidade do citoesqueleto e desacoplamento do metabolismo primário por inativação enzimática. Esses danos podem alterar a diferenciação, alongamento e expansão das células vegetais, reduzir o fluxo celular de íons e levar ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Bita & Gerats, 2013).



O aumento da temperatura acelera o movimento de moléculas através das membranas, o que ocasiona o afrouxamento químico das pontes entre suas moléculas constituintes. Desta forma, a bicamada lipídica das membranas biológicas torna-se mais permeável, por desnaturação das proteínas ou alteração no conteúdo de ácidos graxos (Wahid *et al.*, 2007). As alterações nas membranas biológicas provocadas pelo estresse de calor impactam diretamente na fotossíntese e respiração das plantas.

As reações fotoquímicas no tilacoide e o metabolismo do carbono no estroma dos cloroplastos são considerados alvos importantes do estresse de calor. Por exemplo, as enzimas do ciclo de Calvin-Benson – inclusive a ribulose 1,5-bifosfato carboxilase oxigenase (Rubisco) e a rubisco ativase – podem ser muito inibidas com aumento pequeno da temperatura (Bita & Gerats, 2013). Durante o estresse de calor, a redução da fotossíntese também pode ocorrer a partir de uma mudança estrutural na organização das membranas de tilacoides. Estudos demonstraram que os efeitos das altas temperaturas nas membranas fotossintéticas resultam na perda do empacotamento dos grana (Wahid *et al.*, 2007). Por exemplo, em resposta ao estresse de calor, os cloroplastos nas células do mesofilo de uva tornam-se arredondados. Essa mudança resulta no esgotamento dos complexos antena do fotossistema dois (PSII) e, portanto, na redução das atividades respiratória e fotossintética (Karim *et al.*, 1997).

#### 1.2.1 Tolerância ao Estresse de Calor

Para as plantas, em função de sua condição séssil, parece haver uma grande importância nos mecanismos fisiológicos e celulares de adaptação e proteção ao estresse de calor. A Figura 1, extraída do artigo de Wahid *et al.* (2007), resume de maneira bastante simplificada o mecanismo geral de tolerância das plantas ao estresse de calor. As alterações na permeabilidade das membranas, a produção de ROS, a desnaturação de proteínas e mudanças no citoesqueleto são percebidas pelas plantas, desencadeando um sistema complexo de sinalização que envolve, simplificada, abertura de canais de influxo de cálcio e cascata de sinalização via MAP quinases. Estudos recentes também mostram participação de fitocromo B (PhyB) nas respostas à temperatura. O aumento de temperatura acelera expressivamente a conversão da forma ativa Pfr à forma inativa Pr, particularmente

em condições de baixa irradiância ou escuro, reduzindo o efeito da forma Pfr nas respostas de crescimento medidas por aquecimento (Delker *et al.*, 2017).

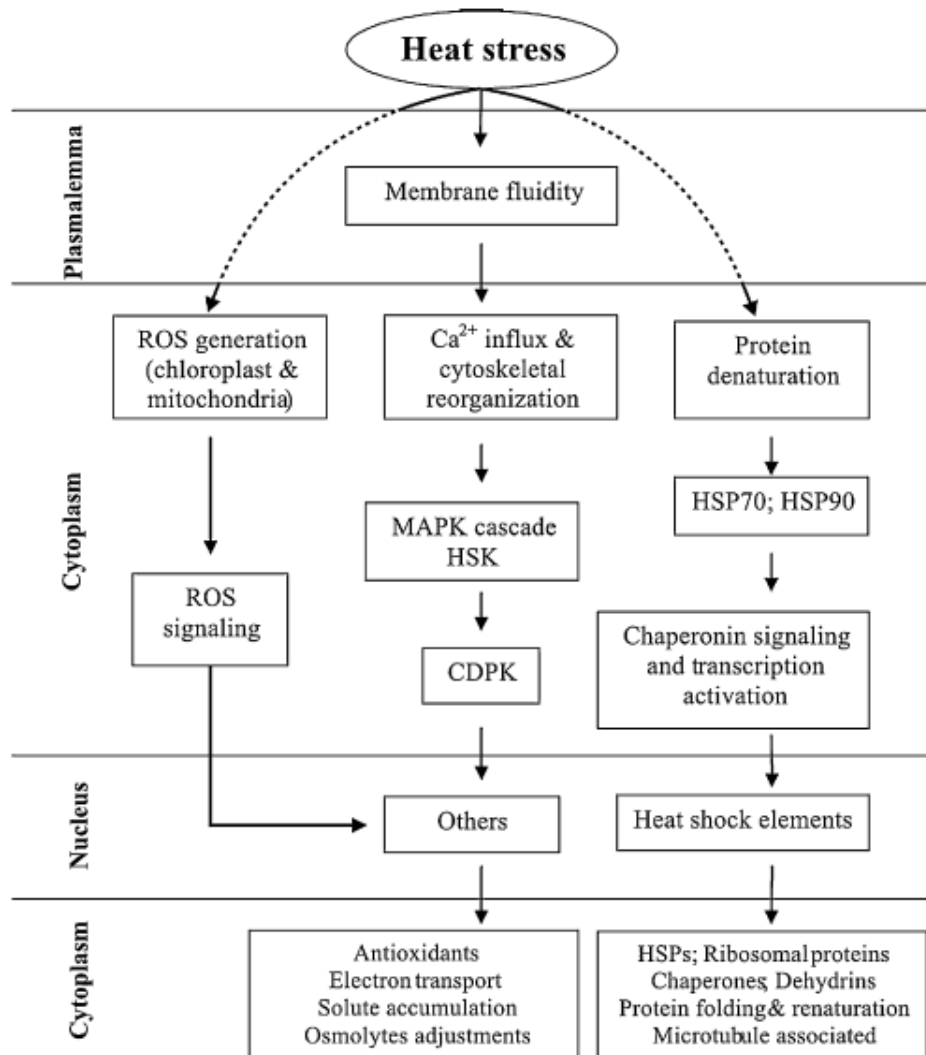


Figura 1. Modelo proposto por Wahid *et al.* (2007) para os mecanismos de tolerância ao estresse de calor em plantas. MAPK, mitogen activated protein kinases; ROS, reactive oxygen species; HAMK, heat shock activated MAPK; HSE, heat shock element; HSPs, heat shock proteins; CDPK, calcium dependent protein kinase; HSK, histidine kinase.

Entre os mecanismos de tolerância ao estresse de calor, está a síntese de Heat Shock Proteins (HSPs). As HSPs, em geral, são proteínas do tipo chaperonas que pertencem a diferentes famílias gênicas com funções específicas na manutenção da forma e função das proteínas das plantas. As proteínas HSP70 e HSP90 estão entre as mais abundantes nas células eucarióticas (Hahn *et al.*, 2011).

Os genes de HSP são expressos em condições ambientais normais, e podem ser regulados por Heat Shock Transcription Factors (HSFs). A família gênica de HSFs das plantas possui pelo menos 20 membros, estando entre as mais diversas dentre os eucariotos. Há evidências que HSFs atuam nas respostas das plantas a diferentes tipos de estresse abiótico (Koskull-Döring *et al.*, 2007).

De maneira bastante geral, a indução de HSPs está ligada à melhora na fotossíntese, no uso eficiente da água e de nutrientes, e à estabilidade das membranas celulares (Bita & Gerats, 2013; Bokszczanin *et al.*, 2013). Por exemplo, o aumento na expressão de HSPs e HSFs durante o estresse de calor foi relacionado ao aumento da tolerância em tomate, morango e *Festuca arundinacea* S. (Poaceae) (Hanh *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2016).

O acúmulo de metabólitos também pode contribuir para melhorar a tolerância das plantas ao estresse de calor. Há evidências que a síntese de osmolitos compatíveis, como açúcares, polióis e prolina, é um mecanismo adaptativo para as plantas. Também, a síntese de metabólitos secundários (e.g. compostos fenólicos, como flavonoides e fenilpropanoides) está descrita na literatura como mecanismo de tolerância durante o estresse de calor (Wahid *et al.*, 2007).

A síntese de alcaloides também pode estar relacionada às respostas das plantas ao estresse de calor. O acúmulo de camptotecina em *Camptotheca acuminata* foi observado nas folhas de plantas submetidas a 40°C, havendo um pico de produção em 2h de tratamento (Zu *et al.*, 2003). Plantas de *Catharanthus roseus* expostas a 40°C, durante 6h, apresentaram um maior teor de vindolina, catarantina e vimblastina nas folhas em relação a indivíduos mantidos a 30°C (Guo *et al.*, 2007). Exposição à temperatura de 35°C induziu aumento de cerca de 4 vezes na concentração de nicotina ativada por sinalização via jasmonato e sulfeto de hidrogênio (Chen *et al.*, 2016).

### 1.3 Estresse Oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (em inglês, reactive oxygen species: ROS) são moléculas de oxigênio atmosférico que foram parcialmente reduzidas ou

oxidadas nas organelas celulares, tornando-se muito reativas (Figura 2). Essas moléculas participam da sinalização celular, entretanto são principalmente consideradas como intermediários tóxicos oriundos do desacoplamento do metabolismo aeróbico (Mittler, 2017).

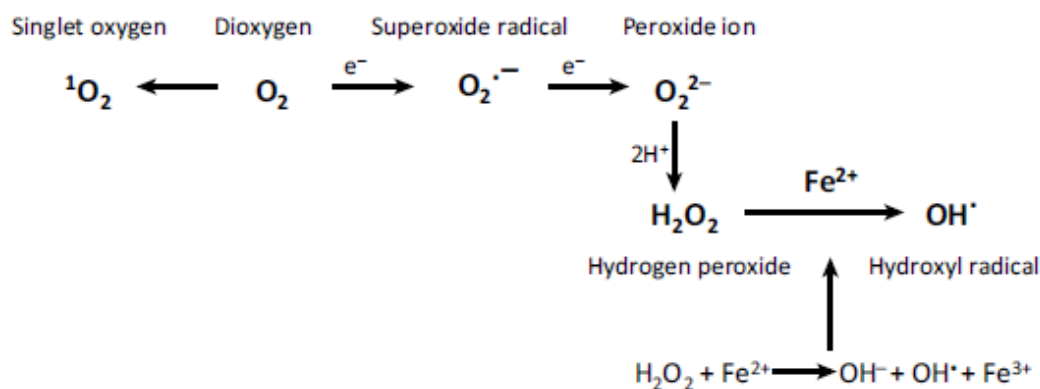


Figura 2. Reações envolvidas na formação de espécies reativas de oxigênio. Parcialmente reproduzido de Mittler (2017).

Como moléculas sinalizadoras, as espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, interagem com resíduos de cisteína das proteínas, o que altera a estrutura quaternária das mesmas e, possivelmente, sua função (Schieber & Chandel, 2014). Essas alterações, por exemplo, podem afetar processos de sinalização celular como fosforilação, ou alterar vias metabólicas ao modificar a função de enzimas (Mittler, 2017).

Por outro lado, as espécies reativas de oxigênio são capazes de oxidar proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, danificando estas macromoléculas, o que pode levar à morte celular. Desta forma, o estresse oxidativo pode ser definido como o acúmulo de ROS que sobrepõe a capacidade da célula em mitigar essas moléculas e reparar suas estruturas danificadas (Latowski *et al.*, 2011; Mittler *et al.*, 2004).

Durante o estresse abiótico, a limitação da fixação de carbono e o excesso de potencial redutor da cadeia transportadora de elétrons são a principal fonte de ROS nos cloroplastos, especialmente superóxido. O excesso de potencial redutor na cadeia respiratória também é fonte geradora de ROS nas mitocôndrias. Por sua vez, peróxido de hidrogênio pode ser gerado pela dismutação do superóxido, ou pela fotorrespiração nos peroxissomos (Suzuki & Mittler, 2006). O radical hidroxila pode

ser produzido a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela reação de Fenton ou de Haber-Weiss. Este radical é conhecido como o mais reativo e prejudicial, pois apresenta um potencial de redução muito positivo (Halliwell & Gutteridge, 2006).

A peroxidação lipídica é um marcador importante de estresse oxidativo, e pode ser definida como a deterioração de ácidos graxos insaturados das membranas biológicas (Taulavuori *et al.*, 2001). Esse processo também pode prejudicar proteínas de membrana, como as que estão nas membranas internas de cloroplastos e mitocôndrias. O dano causado aos ácidos graxos insaturados diminui a fluidez das membranas biológicas, prejudicando seu funcionamento. Resumidamente, a peroxidação lipídica inicia-se com o sequestro de hidrogênio de um metileno (-CH<sub>2</sub>) por uma ROS (e.g. radical hidroxila). Desta reação resulta um radical carbono que pode reagir com o oxigênio, formando um radical peroxil (ROO<sup>·</sup>). Dessa forma, a peroxidação lipídica é capaz de propagar-se pelas membranas ao formar novos radicais peroxil. A decomposição de peróxidos formados nestas reações produz compostos como o malondialdeído (MDA), que pode ser medido em testes com ácido tiobarbitúrico (Halliwell & Gutteridge, 2006).

Estudos com bactérias do gênero *Deinococcus* demonstraram que a tolerância a altos níveis de ROS – até 100mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para *Deinococcus radiodurans* – pode ser alcançada através de uma complexa interação entre nível intracelular de magnésio (prevenindo reação de Fenton), mecanismos eficientes de mitigação de ROS, e sistema robusto de reparo dos danos causados no DNA e nas proteínas (Mittler, 2017). Nesse sentido, para as células eucarióticas, é possível extrapolar que a ação conjunta dos mecanismos de reparo das macromoléculas biológicas e a mitigação das espécies reativas de oxigênio são fundamentais para contornar o estresse oxidativo.

O sistema de defesa de plantas para mitigação das espécies reativas de oxigênio inclui enzimas antioxidantes e metabólitos secundários. As enzimas antioxidantes, provavelmente, constituem a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo. Por exemplo, as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Ascorbato Peroxidase (APX) podem ser encontradas em quase todos os compartimentos celulares (Mittler *et al.*, 2004).

Durante o estresse de calor, é comum observar a indução da transcrição e tradução dessas enzimas antioxidantes (Suzuki & Mittler, 2006). Contudo, Tattini *et al.* (2015) descreveu uma redução expressiva na atividade das enzimas SOD, CAT e APX em *Platanus x acerifolia* durante estresse de seca e calor, em um ciclo 12 horas. Dessa forma, é importante considerar que alguns metabólitos têm o potencial antioxidante necessário para atuar na complementação da atividade enzimática na redução da concentração de ROS, contribuindo para a resistência da planta.

Brevemente, os compostos antioxidantes não enzimáticos mais conhecidos são: ascorbato, glutathiona, alfa-tocoferol e os betacarotenos. Esses compostos são capazes de receber elétrons de ROS, neutralizando-os (Blumwald & Mittler, 2015). Outros compostos, como flavonoides e alcaloides também têm sido intensivamente avaliados quanto à capacidade antioxidante (Agati *et al.*, 2012; Matsuura *et al.*, 2014).

#### 1.4 Metabólitos Secundários

Apesar de se tratar de uma definição controversa, entende-se que os metabólitos secundários podem ser definidos como substâncias derivadas do metabolismo primário das plantas, que frequentemente apresentam baixo peso molecular, e são importantes para a adaptabilidade geral do organismo. Embora não sejam essenciais ao crescimento e desenvolvimento básicos das plantas, os metabólitos secundários exercem funções ecológicas, podendo atuar, por exemplo, nas respostas às variações das condições abióticas, à competição com outros organismos, ao ataque por patógenos/herbívoros, e também na interação com polinizadores e dispersores de diásporos (Nascimento & Fett-Neto, 2010). A seguir, é apresentada uma breve descrição dos grupos de metabólitos secundários mais pertinentes ao escopo desta dissertação.

##### 1.4.1 Terpenos

Os terpenos são uma classe importante de metabólitos secundários. Estes compostos são sintetizados a partir da condensação de esqueletos de cinco carbonos, o isopentenil pirofosfato (IPP) e o dimetilalil fosfato (DMAPP). Essas duas moléculas são formadas em duas vias metabólicas possíveis: a via do Mevalonato, citosólica, que se inicia com a condensação de três moléculas de acetil-CoA; e a via

MEP (metil-eritritol-fosfato) que é plastídica e inicia-se pela condensação de uma molécula de glicerol-3-fosfato e um piruvato (Taiz *et al.*, 2015).

Há evidências que alguns terpenos atuam nas respostas ao estresse abiótico. Um exemplo interessante são as saponinas. *Quillaja brasiliensis* (A. St.-Hill. & Tul.) Mart. (Quillajaceae) tem sido estudada por produzir saponinas com ação imunoadjuvante (Silveira *et al.*, 2011). A síntese de saponinas triterpênicas de *Q. brasiliensis* pode ser induzida por estresse osmótico, dano mecânico, hormônios vegetais (jasmonato) e radiação UV (De Costa *et al.*, 2013).

#### 1.4.2 Compostos Fenólicos

A lignina é o derivado fenólico mais abundante na Terra, e pode ser causa de discussão sobre a arbitrariedade da diferenciação entre metabólitos primários e secundários. A lignina foi essencial para o processo de colonização do ambiente terrestre, por seu papel de sustentação dos tecidos vegetais (Taiz *et al.*, 2015). Os compostos fenólicos também são conhecidos por sua capacidade antioxidante, como é o caso de flavonoides e antocianinas (Agati *et al.*, 2012). A enzima PAL (phenylalanine ammonia-lyase) é considerada chave no controle de fluxo metabólico para a síntese de alguns flavonoides. Por exemplo, foi observado um aumento da atividade desta enzima, e o acúmulo de flavonoides, durante estresse de calor em melão (Bita & Gerats, 2013).

As antocianinas, conhecidas por conferirem proteção contra radiação UV, também podem estar relacionadas às respostas ao estresse de calor. Contudo, há uma variação bastante importante entre as espécies, e os órgãos vegetais analisados. Estudos com estruturas reprodutivas de maçã e crisântemos mostraram uma diminuição da síntese de antocianinas com o aumento da temperatura (Shibata *et al.*, 1988 *apud* Wahid *et al.*, 2007). Por outro lado, as folhas de roseira e cana-de-açúcar acumulam antocianinas durante o estresse de calor (Wahid & Ghazanfar, 2006).

### 1.4.3 Alcaloides

Os alcaloides são metabólitos caracterizados pela presença de um anel heterocíclico contendo um átomo de nitrogênio, cuja rota biossintética é geralmente derivada de um aminoácido. Na literatura, estão descritas diferentes funções para estes compostos: proteção contra radiação UV (Mayser *et al.*, 2002), deterrência frente à herbivoria (Siciliano *et al.*, 2005), ação antimicrobiana (Mabhiza *et al.*, 2016), ação antioxidante e antimutagênica (Fragoso *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*, 2007).

Muitos alcaloides são conhecidos por seu potencial farmacológico. A quinina, isolada de *Cinchona* sp. (Rubiaceae) tem ação antimalárica. Morfina e codeína de *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae) apresentam ação analgésica e antitussígena, respectivamente (Kutchan, 1995). A camptotecina, sintetizada por *Camptotheca acuminata* Decne. (Nyssaceae), bem como os alcaloides vincristina e vimblastina, de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. (Apocynaceae) são importantes moléculas no tratamento de neoplasias (Brandão *et al.*, 2010).

Alguns estudos relacionam diretamente a síntese de alcaloides ao estresse oxidativo (Matsuura *et al.*, 2014). Por exemplo, plantas de *C. roseus* expostas a estresse hídrico apresentaram incremento na atividade enzimática antioxidante e no conteúdo de ácido ascórbico e tocoferol. Além disso, o conteúdo de ajmalcina aumentou nas raízes das plantas analisadas (Jaleel *et al.*, 2007). Ainda em *C. roseus*, há evidências de que peroxidases podem participar da biossíntese e degradação de fenólicos, hormônios e alcaloides, na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A aplicação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em plantas jovens de *C. roseus* duplicou o conteúdo de vindolina, catarantina e vimblastina, também promovendo a atividade da peroxidase (Tang *et al.*, 2009).

É possível que alcaloides apresentem ação antioxidante, atuando na frente não-enzimática de resposta ao estresse oxidativo. Alguns alcaloides monoterpênicos indólicos (MIA, monoterpene indole alkaloid), como vindolina e catharantina, podem servir de substrato para peroxidases (Tang *et al.*, 2009). MIAs sintetizados por espécies de *Psychotria* do sul do Brasil, como braquicerina, psicolatina e N-β-D-glicopiranosil vincosamida (GPV) possuem atividade contra as principais ROS (Matsuura *et al.*, 2014).



### 1.5 *Psychotria*

*Psychotria* é o maior gênero da família Rubiaceae, e contém mais de 1800 espécies descritas (Davis *et al.*, 2009). A maioria das espécies são arbustos de sub-bosque; possuem flores esbranquiçadas que podem ser polinizadas por abelhas e moscas, embora inflorescências vistosas, e polinização por aves, também possam ocorrer (Nepkroeff *et al.*, 1999). Na região Sul do Brasil, é possível encontrar 27 espécies de *Psychotria* (REFLORA).

*Psychotria brachyceras* Müll. Arg. é uma espécie brasileira (WCSP, 2017) que apresenta hábito arbustivo, podendo atingir até 3m de altura, distribuída do Rio de Janeiro ao Rio Grande do Sul. A floração ocorre entre os meses de outubro a dezembro, e a frutificação ocorre entre abril e julho. As folhas apresentam lâmina elíptica de base cuneada e ápice acuminado de 5-9cm de comprimento por 2-5cm de largura. A nervura principal é conspícua, especialmente na face adaxial. Estípulas interpeciolares estão reduzidas a duas cerdas, presentes em ambas as faces do ramo (Dillenburg & Porto, 1985). *P. brachyceras* sintetiza a braquicerina, um alcaloide monoterpeneo indólico (Kerber *et al.*, 2001).

*Psychotria carthagenensis* Jacq. é uma planta de hábito arbustivo, que ocorre desde o México até o sul do Brasil (WCSP, 2017). A floração pode ser observada entre os meses de outubro a dezembro, e a frutificação, entre maio e julho. As lâminas foliares são elípticas de base cuneada e ápice agudo, medindo 4-10cm de comprimento por 2-5cm de largura. Possui estípulas interpeciolares decíduas, visíveis nos ápices dos ramos (Dillenburg & Porto, 1985). Esta é uma espécie atípica que não sintetiza MIA (Leal & Elisabetsky, 1996), ao menos nas populações da região de distribuição avaliada.

### 1.5.1 Alcaloides de *Psychotria*

As espécies de *Psychotria* sintetizam uma diversidade de metabólitos secundários, entre eles, pigmentos, peptídeos, naftoquininas, benzoquinonas e alcaloides (Matsuura *et al.*, 2013). As pesquisas com alcaloides em espécies de *Psychotria* do sul do Brasil iniciaram a partir de resultados promissores com a espécie sul americana *Psychotria colorata* Mull. Arg., que produz alcaloides com potencial analgésico (Porto *et al.*, 2009). A figura 3 apresenta algumas espécies que ocorrem no Rio Grande do Sul, que sintetizam um grupo específico de metabólitos, os alcaloides monoterpêno indólicos.

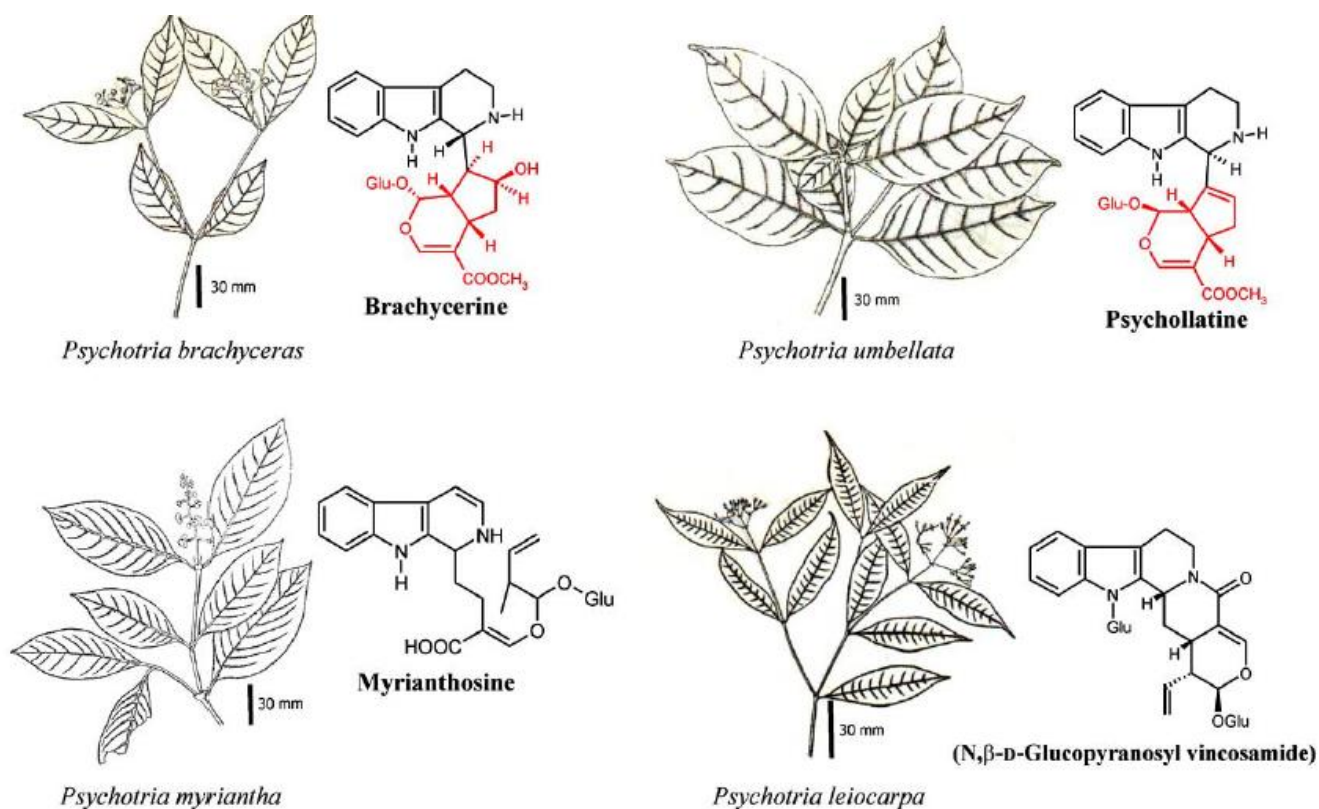


Figura 3. Alguns alcaloides monoterpêno indólicos de *Psychotria* sp. do sul do Brasil. Em vermelho, estão destacadas porções terpênicas atípicas não derivadas de secologanina. Parcialmente reproduzido de Porto *et al.* (2009).

Os MIAs são metabólitos de origem mista, geralmente originados pela condensação de triptamina (via do chiquimato) à secologanina (via MEP), pela ação da strictosidina sintase nos vacúolos (Connor & Maresh, 2006). A triptamina é

formada a partir da descarboxilação do aminoácido triptofano, pela ação da enzima citosólica triptofano descarboxilase (TDC) (Pan *et al.*, 2016). De modo geral, as evidências sugerem que as vias biossintéticas de MIAs são complexas e compartimentalizadas em diferentes organelas, tipos celulares e tecidos (Nascimento & Fett-Neto, 2010; Pasquali *et al.*, 2006).

A braquicerina é um MIA singular, pois sua unidade terpênica deriva-se, provavelmente, de uma epiloganina. Além disso, conserva um resíduo de glicose em sua estrutura (Kerber *et al.*, 2001). Em plantas coletadas a campo, foi possível observar que braquicerina concentra-se, em ordem decrescente, nas inflorescências (0,3% da massa seca), folhas totalmente expandidas e caules (0,2%), folhas jovens (0,12%) e nos frutos (0,04%). A braquicerina não é detectada nos tecidos da raiz e sua indução independe da presença de raízes em estacas (Gregianini *et al.*, 2003, Gregianini *et al.*, 2004 e Kerber *et al.*, 2001). O conteúdo basal de braquicerina nas folhas pode variar sazonalmente, apresentando maiores concentrações na primavera. Ainda, parece haver variação intraespecífica no conteúdo basal de braquicerina, havendo indivíduos que acumulam altos níveis de braquicerina (e.g.  $0.74 \pm 0.25\%$  DW) ou baixos (e.g.  $0.25 \pm 0.02\%$  DW), independentemente da época do ano (Gregianini *et al.*, 2004). A síntese de braquicerina pode ser estimulada por vários fatores ambientais: radiação UV-B e UV-C, dano mecânico, metais pesados e estresse osmótico; e por hormônios relacionados à sinalização de estresse nas plantas, jasmonato e ácido abscísico (Nascimento *et al.*, 2013a; Porto *et al.*, 2009).

A exposição à radiação UV-B, durante 24h, em estacas de *P. brachyceras* aumentou a expressão do gene de TDC nas folhas. Também, houve a indução da expressão do gene de uma UDP-glicose glicosiltransferase, o que pode estar relacionado ao resíduo de glicose presente na braquicerina. Esses dados sugerem que a indução da síntese de braquicerina, em plantas submetidas ao estresse por radiação UV, é parcialmente regulada em nível transcricional (Nascimento *et al.*, 2013b).

Foi possível observar, *in vitro*, ação antioxidante e antimutagênica de braquicerina em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e paraquat. A ação antioxidante de braquicerina foi mais efetiva contra paraquat.

Comparativamente, o extrato foliar de *P. brachyceras* teve um desempenho antioxidante eficaz contra paraquat e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nascimento *et al.*, 2007). Além disso, foi observada a atividade mitigadora deste alcaloide contra oxigênio singlete, radical hidroxila e superóxido (Gregianini *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2007; Porto *et al.*, 2009). Gregianini *et al.* (2003) propôs que a atividade mitigadora frente a oxigênio singlete pode ser explicada a partir da estrutura da braquicerina: presença de amina secundária, ligações duplas, grupo –OH e o resíduo de glicose.

## 1.6 Justificativa

Os alcaloides são substâncias com ação adaptativa em situações de estresse abiótico, além de apresentarem importantes atividades de interesse farmacêutico. Tendo em vista o panorama previsto pelos modelos climáticos, a região de distribuição de espécies vegetais do sul da América do Sul em geral, e de *Psychotria brachyceras* em particular, estará sujeita a aumento das temperaturas anuais e dos índices pluviométricos, de tal forma que o calor será um fator limitante relevante nas próximas décadas. Sendo assim, o presente estudo fundamentou-se em dois pilares principais: 1) analisar a dinâmica de acúmulo de braquicerina frente ao estresse por aumento da temperatura e sua possível aplicação para aumentar o teor deste alcaloide bioativo com fins de uso farmacêutico; 2) analisar possíveis mecanismos de sinalização para biossíntese e acúmulo do alcaloide. Com estes dados, esperamos poder contribuir para estabelecer as funções *in planta* de braquicerina, definir procedimentos para aumentar o rendimento do alcaloide para aplicações farmacêuticas, bem como identificar potenciais ferramentas para aprimorar a resposta de plantas em geral frente ao estresse de calor.

## 1.7 Objetivo Geral

- Analisar o metabolismo de braquicerina frente ao estresse por aumento da temperatura e os mecanismos associados.

### 1.7.1 Objetivos Específicos

- Monitorar marcadores de estresse oxidativo em discos foliares de *P. brachyceras* e *P. carthagenensis* e verificar a concentração de braquicerina na primeira, durante uma variação de temperatura de 25°C a 40°C, em incrementos de 5°C a cada dia (graduais ou 'stepwise') e uma variação abrupta de 25°C para 40°C ('acute').
- Determinar temperaturas limiares para indução da síntese de braquicerina.
- Determinar a variação de braquicerina no estresse oxidativo provocado por choque térmico a 50°C.
- Avaliar o desempenho de espécies sensíveis ao aumento da temperatura tratadas com braquicerina em níveis similares aos encontrados em *P. brachyceras* frente ao estresse de calor.
- Investigar se o acúmulo de braquicerina envolve controle em nível transcricional, analisando o padrão de expressão do gene de biossíntese alcaloidal *TRIPTOFANO DESCARBOXILASE (TDC)* durante o estresse de calor.

## 2. CAPITULO I: RESEARCH ARTICLE

Artigo a ser submetido ao periódico Environmental and Experimental Botany (Qualis A1 na área de Biodiversidade da CAPES 2016).

### **Accumulation of the antioxidant alkaloid brachycerine from *Psychotria brachyceras* Müll. Arg. is increased by heat and contributes to oxidative damage mitigation**

Yve Verônica da Silva Magedans<sup>a</sup>, Hélio Nitta Matsuura<sup>a</sup>, Ramsés Assul Jessé Cantelli Tasca<sup>a</sup>, and Arthur Germano Fett-Neto<sup>a\*</sup>

\*Corresponding author. Email: [fettneto@cbiot.ufrgs.br](mailto:fettneto@cbiot.ufrgs.br)

<sup>a</sup> Plant Physiology Laboratory, Center for Biotechnology and Department of Botany, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). CP 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil.

## Abstract

Brachycerine is a shoot monoterpene indole alkaloid with antioxidant, UV protectant, and antimutagenic activities present in *Psychotria brachyceras*. Brachycerine metabolism was analyzed under heat stress. Accumulation was increased in leaf disks kept at 40°C for three days, both by abrupt and stepwise temperature increase, approximately by 4.5 and 2 fold, respectively (up to 2.0% of the dry weight). Concentration was not affected by 10°C exposure. Leaf disks of *Psychotria carthagenensis*, a species devoid of alkaloids, were also challenged by heat. Total chlorophyll, hydrogen peroxide concentration and level of lipid peroxidation were determined. *P. carthagenensis* was tolerant to heat, possibly due to high anthocyanin accumulation, which was clearly induced by heat shock at 50°C for 6h. Lipid peroxidation was reduced in *P. brachyceras* under acute and stepwise heat stress compared to control condition, remaining unaltered in *P. carthagenensis*. Hydrogen peroxide concentration was lower in *P. brachyceras* leaf disks exposed to heat shock compared to control, the same parameter being unaltered in *P. carthagenensis*. Leaf disks of the heat-sensitive species *Brugmansia suaveolens* and *Brassica oleracea*, pre-treated with brachycerine in concentrations equivalent to those found in *P. brachyceras*, showed heat shock tolerant phenotypes. Expression of *TRYPTOPHAN DECARBOXYLASE*, encoding an enzyme involved in alkaloid biosynthesis, was repressed in leaf disks exposed to 40°C for 6, 12 and 24h, suggesting that temperature effect may involve post-transcriptional changes. Taken together, data indicate that heat exposure is an effective means to increase yields of the bioactive alkaloid brachycerine, whose accumulation contributes to protect against associated oxidative damage.

**Keywords:** heat stress, brachycerine, *Psychotria*, monoterpene indole alkaloid, tryptophan decarboxylase, oxidative stress.

## 1. Introduction

Plants are subject to fluctuations in environment temperature, both daily and seasonal, throughout their life cycle. Heat stress is defined as the increase in temperature relative to the values considered optimal for a plant, lasting long enough to impair its growth and development (Wahid *et al.*, 2007). Briefly, the damages caused by heat stress are: changes in permeability of cell membranes, denaturation and aggregation of proteins, cytoskeletal instability, and decoupling of primary metabolism by enzymatic inactivation. These damages can alter the differentiation, elongation and expansion of plant cells, reduce the cellular ion flow and lead to increased reactive oxygen species production (Bita & Gerats, 2013).

Brachycerine is the major monoterpene indole alkaloid (MIA) synthesized by *Psychotria brachyceras* Müll. Arg. (Rubiaceae). This alkaloid is constitutively accumulated in leaves and is induced by several stimuli: UV light, mechanical damage, heavy metals and osmotic stress. Also, hormones related to stress signaling in plants, jasmonate and abscisic acid, induce brachycerine accumulation (Nascimento *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2013a; Porto, *et al.*, 2009). Brachycerine has antioxidant, antimutagenic and UV protectant activity (Nascimento *et al.*, 2007), but showed no herbivore deterrent effects in different assays (Porto *et al.*, 2014). The main role of MIAs in *Psychotria* species is not clear, but it appears to involve the metabolic redox balance in response to several environmental stresses (Matsuura *et al.*, 2014).

Monoterpene indole alkaloids are derived from tryptophan and the iridoid terpene secologanin (Connor & Maresh, 2006). However brachycerine's terpene moiety may be derived from epiloganin (Kerber *et al.*, 2001). Tryptophan decarboxylase converts tryptophan into tryptamine, which is used by strictosidine synthase in the first committed step in MIA biosynthesis (Pan *et al.*, 2016). Acute exposure to UV in *P. brachyceras* tip cuttings induced expression of tryptophan decarboxylase gene (Nascimento *et al.*, 2013b). Also, there was increased expression of a *UDP-GLUCOSE GLUCOSYLTRANSFERASE*, which may be related to the residue of glucose present in brachycerine (supplementary fig. S1). These data suggest brachycerine synthesis in plants under acute UV light stress can be partially regulated at the transcriptional level.



In order to understand brachycerine metabolism under temperature stress, we analyzed the dynamics of brachycerine accumulation in response to acute and stepwise temperature increase, acute cold stress and severe heat shock. *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae) is an unusual species lacking MIAs (Leal & Elisabetsky, 1996), which can be found co-existing with *P. brachyceras*. Oxidative stress parameters were analyzed and compared between *P. brachyceras* and *P. carthagenensis* under heat stress. The *in vivo* protective effect of brachycerine was indirectly examined by application of the alkaloid on leaves of two heat sensitive species (*Brugmansia suaveolens* and *Brassica oleracea* var *acephala*) under severe heat stress. Potential implications of brachycerine dynamics upon heat exposure for its *in planta* functions and for attaining improved alkaloid yields for pharmaceutical applications are discussed.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 – Plant material and foliar disk preparation

*Psychotria brachyceras* and *Psychotria carthagenensis* tip cuttings were harvested at Morro Santana, Porto Alegre, RS, Brazil (30°03'56.5"S 51°07'19.5"W) and used in the experiments for leaf disk preparation. The tip cuttings were acclimated in 10% (v/v) MS (Murashige & Skoog, 1962) nutrient solution (pH adjusted to 5.8) for a week, in a growth chamber under white fluorescent tubes (Osram Universal 40W, KOB8A 6, São Paulo, Brazil), with a 16/8h day/night regime (photosynthetically active radiation of  $60\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) at  $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Voucher specimens are deposited at the ICN herbarium of the Federal University of Rio Grande do Sul (*P. brachyceras* 7899 and *P. carthagenensis* 7901).

Healthy and fully expanded leaves from tip cuttings were detached and sterilized by immersion in 1.5% (v/v) sodium hypochlorite for 15min. Then, leaves were washed at least three times with sterile distilled water. Leaf disks with 1cm of diameter were prepared with a cork borer. The leaf disks were mixed, in order to evenly distribute the inherent individual variability of plants throughout the treatments. In all experiments, leaf disks were placed in Petri dishes (40 disks/dish) containing filter paper moistened with 20mL of 10% (v/v) MS nutrient solution. The solution pH was adjusted to 5.8 before autoclaving at  $121^{\circ}\text{C}$  for 20 min.

## 2.2 – Temperature stress experiments

*P. brachyceras* and *P. carthagenensis* leaf disks were maintained two days under control conditions ( $25^{\circ}\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ) in a growth chamber (white fluorescent lights,  $40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $16\text{h}\cdot\text{day}^{-1}$  photoperiod) and then exposed to treatments. For acute heat stress experiment, disks were transferred from  $25^{\circ}\text{C}$  to  $40^{\circ}\text{C}$  for three days, while control samples remained at  $25^{\circ}\text{C}$ . A similar assay was done to evaluate brachycerine content in leaf disks under cold stress. After acclimation, samples were transferred to  $10^{\circ}\text{C}$  for three days, while control samples remained at  $25^{\circ}\text{C}$ .

A third assay was performed with stepwise heat increase from  $25^{\circ}\text{C}$  up to  $40^{\circ}\text{C}$ . After two days at  $25^{\circ}\text{C}$ , leaf disks were gradually exposed to higher temperatures, increased by  $5^{\circ}\text{C}$  per day, reaching  $40^{\circ}\text{C}$  after three days. Leaf disks remained for two more days at  $40^{\circ}\text{C}$  and were then collected. Control samples were maintained at  $25^{\circ}\text{C}$  and, after 7 days, disks were collected. All samples were immersed in liquid nitrogen and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analyses.

### 2.2.1 Threshold temperature for triggering brachycerine accumulation

Threshold temperature for increasing brachycerine concentration was evaluated in heat stress experiments. Leaf disks were collected after 1 and 2 days of acute heat stress exposure at  $40^{\circ}\text{C}$ , and 3 days at  $37^{\circ}\text{C}$ . Control samples remained at  $25^{\circ}\text{C}$  for three days. Leaf disks were also collected during stepwise heat stress experiments after sequential one day exposure to each of the following temperatures:  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $35^{\circ}\text{C}$  and  $40^{\circ}\text{C}$ , and then two days at  $40^{\circ}\text{C}$ . Control samples remained at  $25^{\circ}\text{C}$ . All samples were immersed in liquid nitrogen and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analyses.

## 2.3 Heat shock experiment

*P. brachyceras* and *P. carthagenensis* leaf disks responses to extreme acute temperature increase (heat shock), from  $25^{\circ}\text{C}$  to  $50^{\circ}\text{C}$  for 6h, were compared. Total chlorophyll concentrations of heat sensitive species *Brugmansia suaveolens* Bercht. & J.Presl (Solanaceae) and *Brassica oleracea* L. var *acephala* D. (Brassicaceae) under heat shock were also measured as preparation to experiments described in section 2.3.1.

*P. brachyceras* and *P. carthagenensis* plant material preparation was summarized in section 2.1. *Brugmansia suaveolens* leaves were harvested at

UFRGS campus in Morro Santana, Porto Alegre, RS, Brazil. A voucher specimen is deposited at the ICN herbarium of the Federal University of Rio Grande do Sul (ICN 188190). *Brassica oleracea* var *acephala* leaves were obtained from local market. Leaves were acclimated in 10% (v/v) MS nutrient solution (pH=5.8) for one day, in a growth chamber under white fluorescent tubes (Osram Universal 40W, KOB8A 6, São Paulo, Brazil), with a 16/8 h day/night regime (photosynthetically active radiation of  $60\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) at  $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

After leaf disk preparation (see section 2.1), all disks were acclimated at  $25^{\circ}\text{C} (\pm 0.3^{\circ}\text{C})$  for 1 day in a growth chamber ( $40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $16\text{h}\cdot\text{day}^{-1}$  photoperiod). Then, disks were exposed to heat shock. Control samples remained at  $25^{\circ}\text{C}$ . All samples were immersed in liquid nitrogen and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analyses.

### 2.3.1 Evaluation of brachycerine application on heat shock sensitive species

After 1 day acclimation, as described in section 2.3, leaf disks were transferred to a new Petri dish containing two layers of cheesecloth and filter paper moistened with 15mL MS nutrient solution at 10% (v/v). Adaxial surface of leaf disks were treated with 10 $\mu\text{L}$  (per disk) methanol solution containing brachycerine at 4mg/mL. This concentration was estimated based on that found in *P. brachyceras* leaves at induced levels (approximately 1.5% leaf dry weight). Control samples, lacking alkaloid, were treated with 10 $\mu\text{L}$  methanol. All samples were maintained in a growth chamber ( $40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $16\text{h}\cdot\text{day}^{-1}$  photoperiod) at  $25^{\circ}\text{C}$  during 4h in order to promote brachycerine internalization. Then, samples were exposed to heat shock at  $50^{\circ}\text{C}$  for 6h. All samples were immersed in liquid nitrogen and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analyses.

### 2.4 Brachycerine analysis

For brachycerine analysis, methanolic extracts from samples were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), as previously described (Gregianini *et al.*, 2003). Shortly, fresh tissue samples (150mg each) were ground in liquid nitrogen and 1mL of methanol (HPLC grade, Merck) was added; then, extracts were sonicated for 30min, and centrifuged at 18,000g at  $4^{\circ}\text{C}$  for 20min. Methanolic supernatant was recovered for HPLC analysis. Extracted dry weights (DW) were obtained after drying pellets at  $60^{\circ}\text{C}$  until reaching constant weight. Samples were analyzed in a HPLC (Thermo Scientific Surveyor) with a C8 column equipped with

respective guard column (Shimadzu), using linear gradient (1mL.min<sup>-1</sup> flow), starting with water:methanol (81:19), and ending with 100% methanol. Both eluents contained trifluoroacetic acid (Sigma) at 0.05% (v/v). An external standard curve was prepared with authentic brachycerine.

## 2.5 Chlorophyll analysis

Total chlorophyll was estimated as previously described (Ross, 1974), with minor modifications. Fresh tissue (100mg) was ground with liquid nitrogen and 1.5mL 85% (v/v) cold acetone was added; the extract was then sonicated for 30 min. After centrifugation (16,000g for 5min, at 4°C), pellets were re-extracted three times and combined supernatants were brought to a final volume of 10mL. Absorbance was recorded at 645nm and 663nm; pellet was dried at 60°C until constant weight for extracted dry weight determination.

## 2.6 Lipid peroxidation analysis

Lipid peroxidation was determined with thiobarbituric acid (TBA) test, which evaluates malondialdehyde (MDA) as an end product of lipid peroxidation (Velikova *et al.*, 2000). Fresh leaf tissue (150mg) was ground with liquid nitrogen and homogenized with 1mL 0.1% trichloroacetic acid (TCA). The homogenate was centrifuged for 20min at 11,000g and 4°C. The supernatant (0.5mL) was added to 1mL TBA 0.5% (w+v) in TCA 20% (w/v) solution. The reaction was incubated at 100°C for 30min and then was stopped by immediate chilling. The absorbance was taken at 532nm and non-specific absorption values at 600nm were subtracted. The blank probe consisted of reaction mixture in the absence of leaf extract. MDA contents were calculated using an extinction coefficient of 155mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

## 2.7 Hydrogen peroxide analysis

This assay was performed with the same leaf extract obtained for lipid peroxidation analysis. Shortly, the 0.1% TCA extract (0.3mL) was added to 0.3mL 10mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 1.2ml 1M KI, and then incubated in darkness for 1h. Absorbance was read at 390nm; the blank probe consisted of reaction mixture in the absence of leaf extract. The content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was determined based on a standard curve (Alexiava *et al.*, 2001).

## 2.8 Anthocyanin analysis

Anthocyanin was estimated as previously described (Chatterjee *et al.*, 2006). Fresh tissue (75mg) was ground with liquid nitrogen and 1.5mL of 0.1M methanolic HCl was added. The extract was then sonicated for 30min. After centrifugation (16,060g for 15min), 1mL of supernatant was transferred to test tubes and 1mL chloroform was added. After vortexing, 500µL of Milli-Q water were added. After 15min, absorbance was recorded at 530nm for the upper aqueous phase.

## 2.9 TRYPTOPHAN DECARBOXYLASE expression analysis

### 2.9.1 Plant material and experiment design

*P. brachyceras* leaf disks were maintained two days under  $25^{\circ} \pm 0.3^{\circ}\text{C}$  in a growth chamber ( $40\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ,  $16\text{h.day}^{-1}$  photoperiod), and then exposed to  $40^{\circ}\text{C}$  for 6h, 12h and 24h. Control samples remained at  $25^{\circ}\text{C}$ .

### 2.9.2 Total RNA extraction and first strand cDNA synthesis

Total RNA was prepared using NucleoSpin RNA Plant Kit (Macherey–Nagel) including DNase I treatment, according to the manufacturer recommendations. Total RNA (500ng) was treated with 1U DNase I and DNase I reaction buffer (Life Technologies) before cDNA synthesis. Total RNA concentration was determined using UV spectrophotometer (Nanodrop, ThermoScientific) and nucleic acid quality was checked by 0.8% agarose gel electrophoresis (data not shown). All treated RNA was reverse transcribed using oligo-dT primers and M-MLV reverse transcriptase (LifeTechnologies) in a final volume of 20µl.

### 2.9.3 PCR Primer Design

Primers for TRYPTOPHAN DECARBOXYLASE (TDC) and reference genes (supplementary data, Table S1), as described by Nascimento *et al.* (2013b), were used in this study. Shortly, primers were designed with Oligo Perfect™ Designer software (Invitrogen) for each gene. The primer specification ranges included: melting temperatures ( $T_m$ ) of  $59\text{--}61^{\circ}\text{C}$ , primer lengths of 20–22 nucleotides, guanine–cytosine contents of 45–55 %, and polymerase chain reaction (PCR) product lengths of 100–150 base pairs. *ACTIN* (*ACT*) and *GLYCERALDEHYDE 3-*

*PHOSPHATE DEHYDROGENASE (GAPDH)* were used as reference genes (Nascimento *et al.*, 2013b).

#### 2.9.4 Quantitative RT-PCR and Data Analyses

The synthesized cDNA was diluted 1:50 with RNase-free distilled water, and 10µl of the diluted cDNA was used as a template for qPCR analysis. PCR reactions were carried out in a technical quadruplicate for each sample and performed in a total volume of 20µl, as described previously (Almeida *et al.*, 2010). Reactions were performed in fast optical 48-well reaction plates 0.1mL (MicroAmp™–Applied Biosystems) using a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), according to the manufacturer instructions. PCR amplifications included an initial denaturation step of 5 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15s at 95°C, 10s at 60°C, and 15s at 72°C, after which samples were held for 2min at 40°C for annealing and then heated from 55 to 99°C with a ramp of 0.1°C/s to produce the melting curve of the amplified products. Melting curves were used to validate product specificity.

All data were analyzed by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Livak & Schmittgen, 2001). We calculated the mean Ct value (*i.e.* number of cycles needed for the amplification-related fluorescence to reach a specific threshold level of detection) from reference genes. Therefore, gene expression is presented as the fold change in relation to this mean, and relative to the 6h control expression data (calibrator).

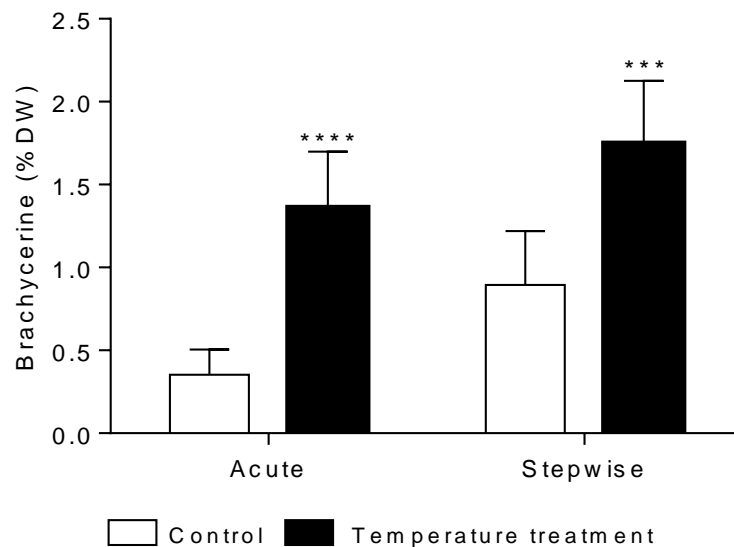
#### 2.10 Experimental layout and statistics

All experiments were carried out in totally randomized design. Treatments of all experiments were performed at least in biological triplicates. A Petri dish with 40 disks was considered a single replicate, and was analyzed with technical duplicates, whenever possible. Experiments were independently repeated at least twice. All data were checked for normality and submitted to t-test, Dunnet's multiple comparison test, or one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey test. Statistical significance level was set at  $p \leq 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1 Temperature increase induces brachycerine accumulation

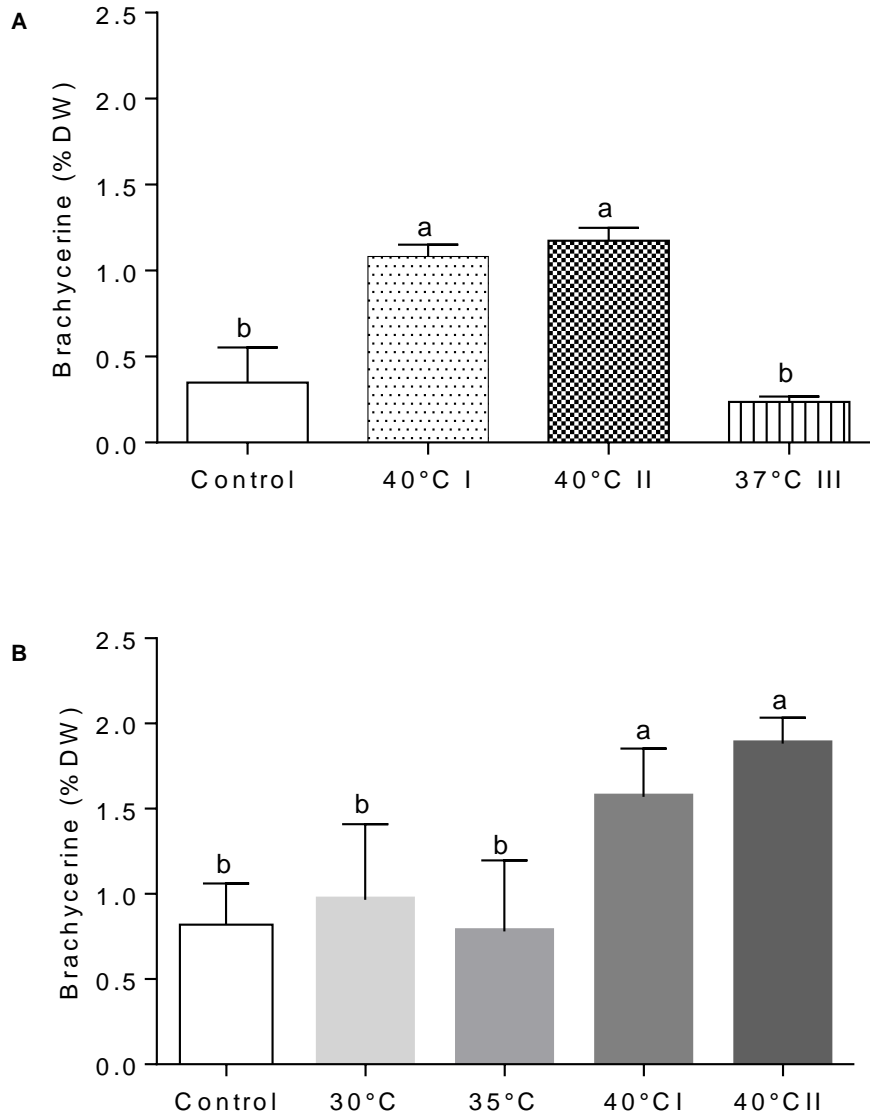
Brachycerine metabolism was evaluated under different temperature stress conditions. Brachycerine content increased after heat stress treatments, reaching around 1.4%-1.7% of leaf DW for acute and stepwise treatments, respectively (Fig. 1). Cold stress did not change brachycerine accumulation (data not shown).



**Fig.1 Brachycerine content in leaf disks of *Psychotria brachyceras* under temperature stress.** After acclimation, acute heat stress samples were abruptly transferred from 25°C to 40°C, and collected after 3 days. Control samples were kept at 25°C. Also, stepwise heat stress samples were gradually transferred from 25°C up to 40°C, with 5°C increment per day. Samples were collected after 3 days under 40°C. Control samples remained at 25°C for 7 days. All experiments were performed 3 times, independently (n=9). Error lines represent standard deviation. T-test was taken for each temperature treatment: \*\*\*\*p<0.0001; \*\*\*p=0.0002.

In order to evaluate the threshold temperature for brachycerine induction, leaf disks were collected at different time points and temperatures, during heat stress experiments. The abrupt transfer from 25°C to 37°C during 3 days did not induce brachycerine accumulation (Fig. 2A). However, there was an increase in brachycerine concentration in samples abruptly transferred to 40°C after 1 or 2 days (Fig. 2A). Similar results were observed with leaf disks under stepwise temperature increase. There was no induction on brachycerine levels of leaf disks exposed for 24h to 30°C and 35°C. Leaf disks exposed to 40°C, after a stepwise temperature increase, accumulated brachycerine at 1.5% of leaf DW after 1 day exposure, and

1.8% leaf DW when exposed for 2 days (Fig. 2B). Taken together, the data suggest that the threshold temperature for brachycerine induction it is 40°C.



**Fig.2 Threshold temperature for triggering brachycerine accumulation.** A) Acute heat stress samples were abruptly transferred from 25°C to 37°C or 40°C, and collected after 1 day (40°C I), 2 days (40°C II) or 3 days (37°C). Control samples were collected after 3 days under 25°C. B) Stepwise heat stress was a gradual transition from 25°C up to 40°C, with 5°C increment per day. Samples were collected after 1 day at 30°C, 1 day at 35°C, and 1 day (I) or 2 days (II) at 40°C. Control samples were collected after 7 days under 25°C. Error lines represent standard deviation. Bars sharing a letter do not differ significantly by ANOVA followed by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

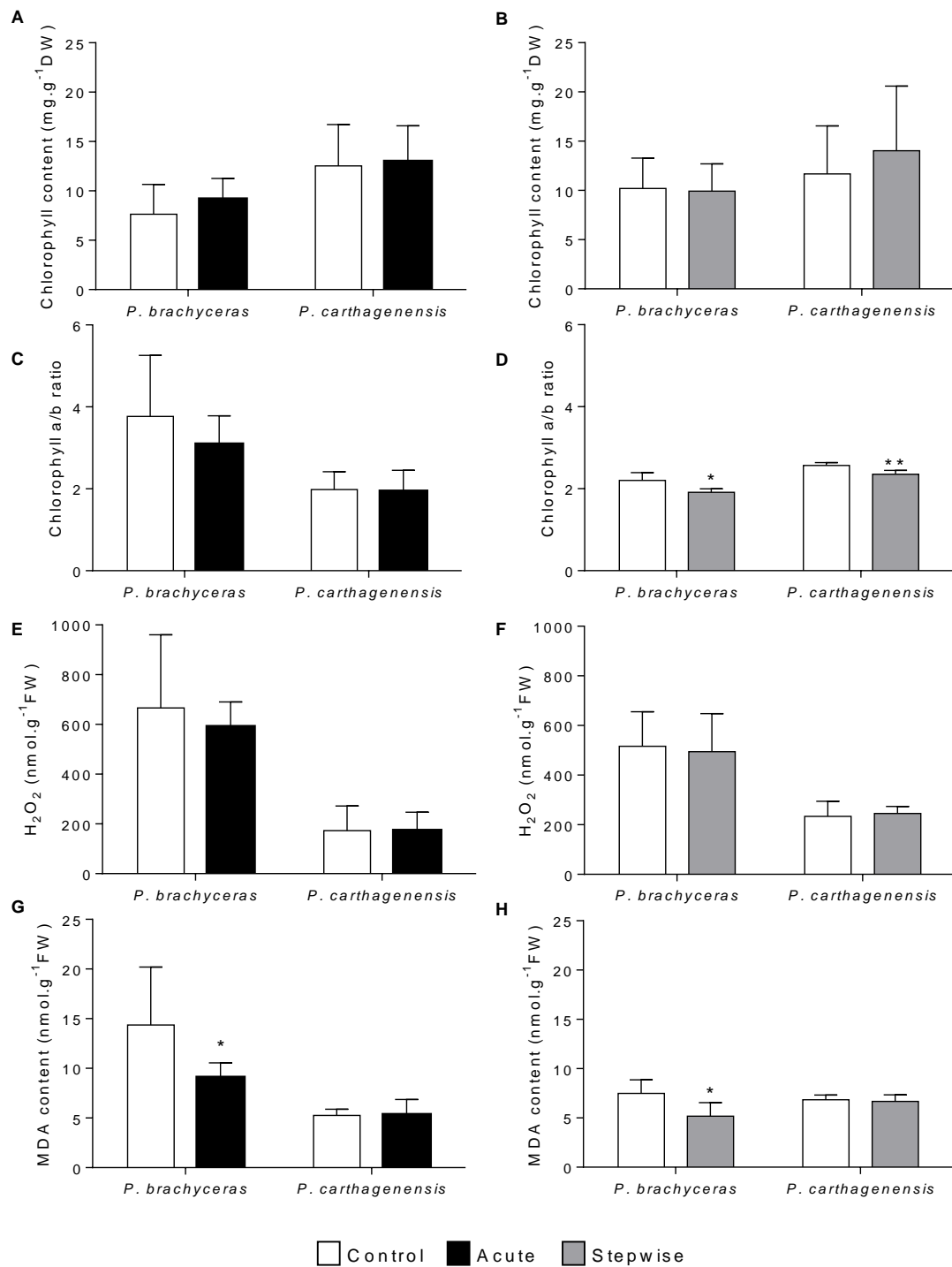
### 3.2 Oxidative stress parameters during acute and stepwise heat stress



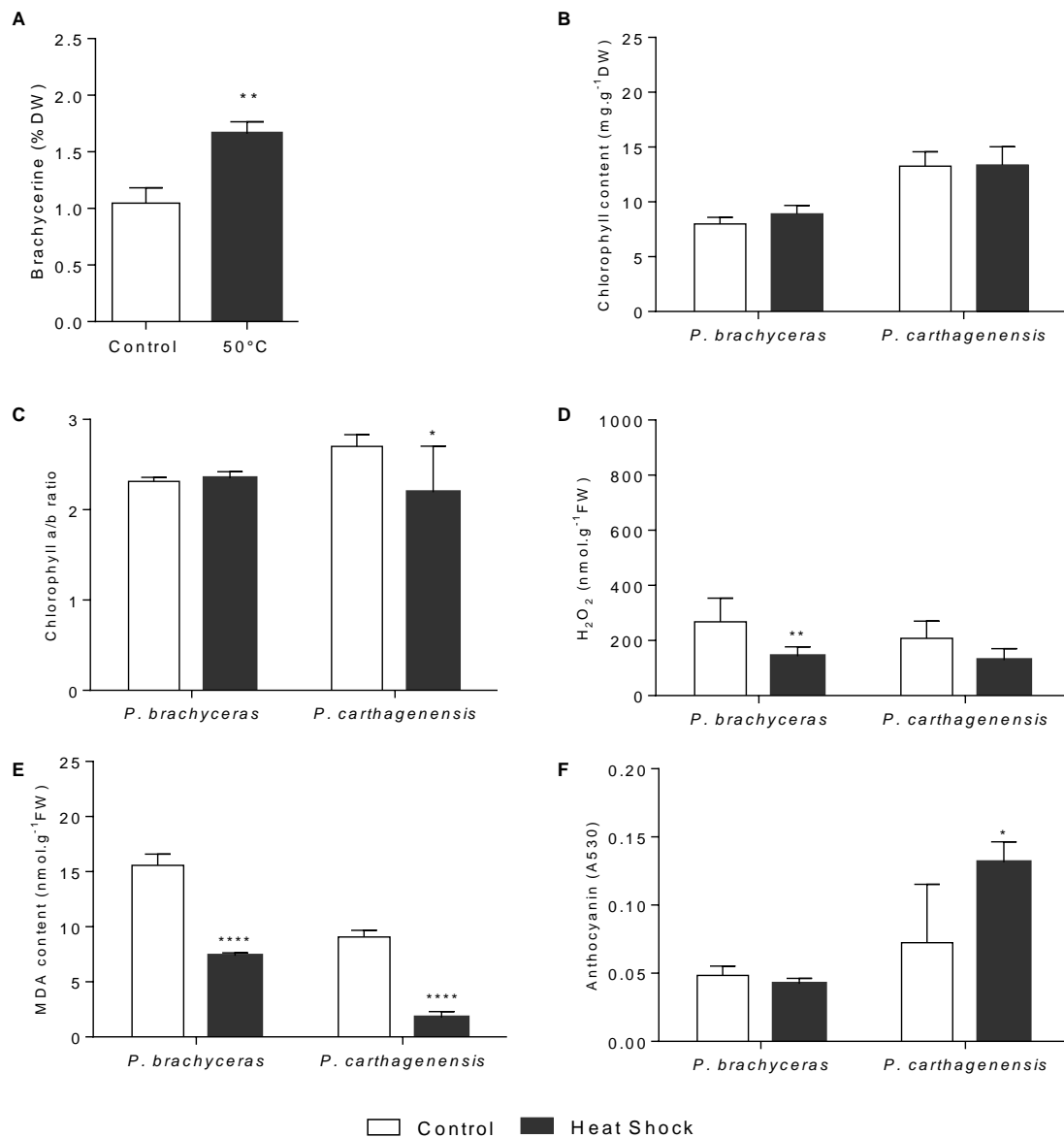
In order to evaluate a possible relation of ROS and brachycerine biosynthesis, some oxidative stress parameters were analyzed in samples from heat stress experiments. For comparison, *P. carthagenensis*, a species related to *P. brachyceras* but lacking MIAs, was analyzed for the same oxidative stress parameters upon heat exposure. Total chlorophyll concentration did not differ between control and heat treatments for both species (Fig. 3A and B). There was a decrease in chlorophyll a/b ratio for both species after 3 days under 40°C for the stepwise temperature increase experiments (Fig. 3D). However, hydrogen peroxide concentration did not differ between control and heat treatment for both species (Fig. 3E and F). Lipid peroxidation was estimated by MDA concentration. Acute and stepwise increase in temperature correlated with reduced MDA concentration in *P. brachyceras* (Fig. 3G and H), but this was not observed for *P. carthagenensis*.

### 3.2.1 Oxidative stress parameters during heat shock

After heat stress analyses, *P. brachyceras* and *P. carthagenensis* responses were examined under short term severe heat shock. In heat shock assays, leaf disks were submitted to 50°C for 6h. Even within a few hours of heat stress exposure, brachycerine content raised to 1.7% leaf DW (Fig. 4A). Total chlorophyll concentration did not differ between control and heat shock treatment for both species (Fig. 4B). However, a decrease in chlorophyll a/b ratio was observed in *P. carthagenensis* (Fig. 4C), but not in *P. brachyceras*. A reduction of hydrogen peroxide concentration was observed in *P. brachyceras* samples, but this was not observed in *P. carthagenensis* (Fig. 4D). A decrease on MDA concentration was verified for both species under heat shock (fig. 4E). Since several leaf disks got visibly darker throughout the experiment (data not shown), anthocyanin concentration was estimated. Anthocyanin concentration significantly increased in *P. carthagenensis* leaf disks (Fig. 4F), which was not observed in *P. brachyceras*.



**Fig.3 Oxidative stress parameters in heat stress assays with *Psychotria brachyceras* and *Psychotria carthagenensis*.** In acute heat stress assay (black bars), leaf disks were abruptly transferred from 25°C to 40°C, and collected after 3 days. Control samples were kept at 25°C (white bars). During stepwise heat stress assay (gray bars) there was a gradual transition from 25°C up to 40°C, with 5°C increment per day. Samples were collected after 3 days at 40°C. Control samples remained at 25°C for 7 days (white bars). Error lines represent standard deviation. Total chlorophyll (A and B), chlorophyll a/b ratio (D and E), hydrogen peroxide level (E and F) and MDA concentration (G and H). T-test was run between control and treatment within each species: \* p<0.05; \*\*p=0.0014.

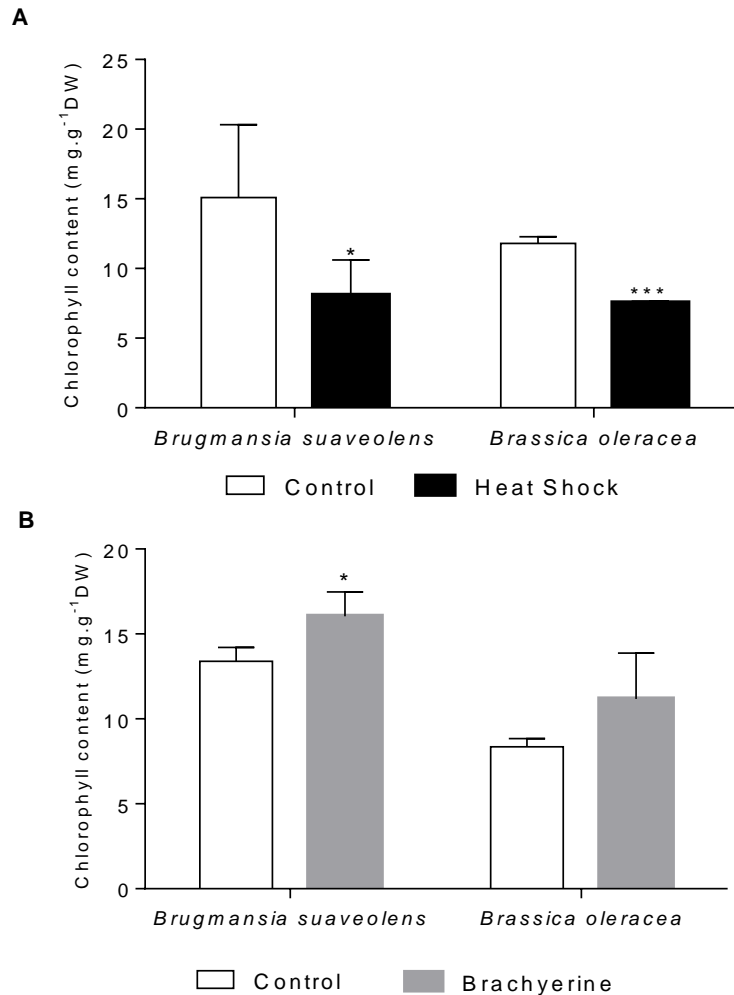


**Fig.4 Heat shock effects on oxidative stress parameters for *Psychotria brachyceras* and *Psychotria carthagenensis* leaf disks.** Values of Brachycerine (A), total chlorophyll (B), chlorophyll a/b ratio (C), hydrogen peroxide (D), MDA (lipid peroxidation) (E), anthocyanin (F) under control and heat shock exposure. During heat shock, leaf disks were exposed to 50°C for 6h (dark bars), while control samples remained at 25°C (white bars). Error lines represent standard deviations. T-test was run between control and treatment replicates for each species: \*p<0.05; \*\*p<0.0089; \*\*\*\*p<0.0001.

### 3.3 Heat tolerance and brachycerine

To test whether brachycerine antioxidant properties could operate *in vivo* in heterologous species, a heat shock exposure assay was performed with or without prior application of brachycerine on leaf disks of two heat sensitive plants, *Brugmansia suaveolens* and *Brassica oleracea* var *acephala*. First, we tested

chlorophyll content of both species under heat shock treatment (50°C for 6h). A significant drop in chlorophyll concentration was observed for both species (Fig. 5A). Brachycerine application prevented chlorophyll loss in both species (Fig. 5B).

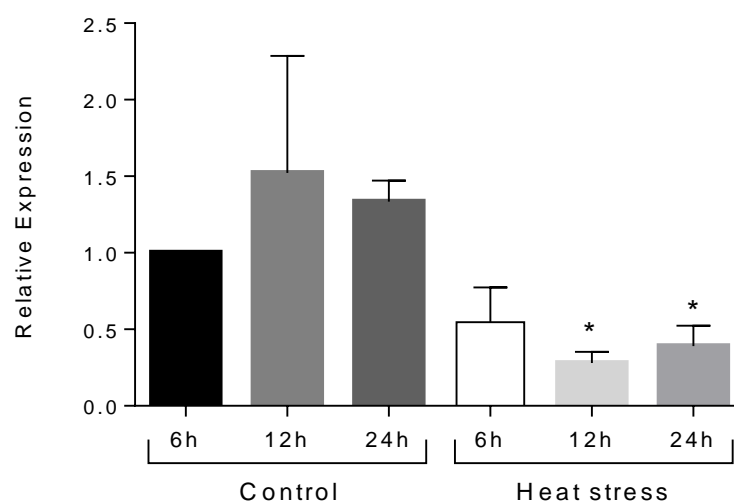


**Fig. 5. Brachycerine application on leaf disks of heat sensitive species.** A) Total chlorophyll in leaf disks of *Brugmansia suaveolens* and *Brassica oleracea* var *acephala* kept at 25°C (control, white bars) and exposed to 50°C for 6h (black bars). B) Brachycerine application on adaxial surface of leaf disks was done 4h before heat shock (gray bars). Control samples received methanol application alone (white bars). All samples were collected after 6h under 50°C. Error lines are standard deviations. T-test was run between control and treatment replicates for each species: \*p<0.05; \*\*\*p=0.0005.

### 3.4 TRYPTOPHAN DECARBOXYLASE expression under acute heat stress

Since brachycerine accumulation is induced within 24h exposure to 40°C (Fig. 2), TDC expression was evaluated in leaf disks treated at 40°C for 6, 12 and 24h. Control samples were maintained at 25°C during the same period. Repression in

TDC expression was noted after 12 and 24h at 40°C compared to control conditions (Fig. 6).



**Fig.6 TRYPTOPHAN DECARBOXYLASE relative expression.** *Psychotria brachyceras* leaf disks were maintained for two days at 25°C in a growth chamber and then exposed to 40°C for 6, 12 and 24 hours. Control samples remained at 25°C. All data were analyzed by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Mean Ct value was calculated from reference genes *ACTIN* and *GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (GAPDH)*. Gene expression is presented as the fold change to this mean, and relative to the 6h control gene expression (calibrator). Error lines represent standard error. Bars with asterisk differ significantly from 6h control values (Dunnet's test,  $p=0.0013$ ).

#### 4. Discussion

Heat stress affects membrane stability and inactivates primary metabolism enzymes, impairing photosynthesis and respiratory electron chain. Also, heat stress can cause protein denaturation and aggregation (Bita & Gerats, 2013). Those changes are associated with increased production of reactive oxygen species (ROS), unbalanced cellular redox potential and damage to cellular components (Suzuki & Mittler, 2006; Wahid *et al.* 2007).

Brachycerine accumulation was induced in *Psychotria brachyceras* leaf disks under heat stress (Fig. 1 and 2). As previously described, brachycerine is induced by several abiotic stimuli, such as UV light, heavy metals and salinity (Gregianini *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2013a). These results suggest brachycerine has a role in abiotic stress response. There is evidence that alkaloid induction is part of heat stress response in plants. Ten-hydroxycamptothecin, an alkaloid synthesized by *Camptotheca acuminata* Decaisne, was induced in young and old leaves under heat

stress (Zu *et al.*, 2003). An increase in alkaloid concentration was also reported for maize shoots in heat sensitive cultivar 'S-2002', and for roots in heat tolerant cultivar 'Sultan' (Mahmood *et al.*, 2014). Barley seedlings grown for 14 days under 30°C/25°C day/night regime showed an expressive increase in gramine content, an indole alkaloid that is toxic to animals (Hanson *et al.*, 1983). Studies with poppy (*Papaver sp.*) showed differential induction pattern for morphine, codeine and thebaine under heat stress associated with high light treatments (Bernáth, 1998).

Monoterpene indole alkaloids from *Psychotria* have broad antioxidant activity (Matsuura *et al.*, 2014). Brachycerine and psychollatine (major alkaloid in *Psychotria umbellata* Vell) have shown antioxidant and antimutagenic activities in *Saccharomyces cerevisiae* strains defective in enzymatic antioxidant defense system components treated with ROS (Fragoso *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*, 2007). In vitro mitigating activity of brachycerine against singlet oxygen, hydroxyl radical and superoxide was also observed (Gregianini *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2007). Similar results were reported for N, $\beta$ -D-glucopyranosyl vincosamide (GPV), the major alkaloid from *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltdl. (Matsuura & Fett-Neto, 2012). Antioxidant activity was also reported for other *Psychotria* species extracts (Iniyavan *et al.*, 2012; Moraes *et al.*, 2011). Brachycerine, psychollatine and GPV share structural features (supplementary fig. S1) that confer ROS quenching activity, including double bonds, secondary or tertiary amines, hydroxyl radicals and glucose residues (Porto *et al.*, 2009).

Some MIAs protective role relies on serving as a substrate for peroxidases, for example vindoline and catharantine (Tang *et al.*, 2009). Other alkaloids can induce expression of heat shock proteins (HSP), which are key players in plant heat tolerance (Bita & Gerats, 2013; Wahid *et al.*, 2007). *Arabidopsis thaliana* treated with sanguinarine, an isoquinoline alkaloid, had increased expression of heat shock protein genes, such as *HSP17.6C-CI*, *HSP70*, and *HSP90.1*. However, treatments with other isoquinoline alkaloids, such as berberine and papaverine, did not significantly promote the expression of the same heat shock protein genes (Hara & Kurita 2014; Matsuoka *et al.*, 2016).

Brachycerine was capable of protecting heat sensitive species under severe heat stress (Fig. 5). Application of brachycerine on leaf adaxial surface and its likely epidermis infiltration could mitigate chlorophyll loss in *Brugmansia suaveolens* and

*Brassica oleracea* var *acephala*. A similar result was reported for GPV application on UV sensitive species subjected to this type of stress (Matsuura *et al.*, 2016). This protective role may be a result of alkaloid ROS quenching capacity, as discussed above.

Brachycerine accumulation was not induced by cold stress. Depending on the time frame, cold stress may increase transcription, protein levels and activity of different ROS-scavenging enzymes, as well as promote hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) accumulation in cells (Suzuki & Mittler, 2006). However, cold can also reduce enzymatic activity and metabolic activity. In *Catharanthus roseus*, MIA biosynthetic pathway has been shown to be down-regulated by cold (Dutta *et al.*, 2007). Our data for low temperature showed no change in the concentrations of brachycerine. This may be a result of brachycerine stability within the experimental time.

Chlorophyll concentration (Fig. 3A, B and 4B) was similar between control and heat stressed samples of *P. brachyceras* and *P. carthagenensis*. Heat sensitive species display losses in chlorophyll content under heat stress due to oxidative damage (Yeh *et al.*, 2012). Also, heat stress increases chlorophyllase activity, thereby reducing photosynthetic and respiratory activity (Bita & Gerats, 2013). In this sense, at least for this parameter, *P. brachyceras* and *P. carthagenensis* can be considered heat tolerant.

Chlorophyll a/b ratio was reduced in both species only in stepwise heat stress assay (Fig. 3C), and in *P. carthagenensis* leaf disks during heat shock assay (Fig. 4C). Heat tolerance is generally related to an increase in chlorophyll a/b ratio, as shown for tomato and sugarcane heat tolerant genotypes, which display increased chlorophyll a/b ratio under elevated temperatures (Bita & Gerats, 2013). However, heat resistant wheat cultivars showed lower chlorophyll a/b ratio under temperature increase (Feng *et al.*, 2014). Overall, our results suggest some level of heat stress tolerance for both species of *Psychotria* examined.

Hydrogen peroxide concentrations did not differ between control and heat stressed leaf disks for both species (Fig. 3E and F). Perhaps *P. brachyceras* could have already acclimated to the stress condition, since brachycerine is induced earlier, within 24h exposure to temperature increase (Fig. 2). Although H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was not induced by heat stress assays, there was a significant decrease at 6h in *P. brachyceras* leaf disks exposed to 50°C (Fig. 4D). It is known that hydrogen peroxide

and superoxide anion could mediate secondary metabolite accumulation, such as indole alkaloids in *C. roseus*, and phytoalexins in *Petroselinum crispum* cell cultures (Jaleel *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2009). The application of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 100mM in young plants of *C. roseus* doubled the contents of vindoline, catharanthine and vinblastine, promoting peroxidase activity (Tang *et al.*, 2009). Heat stress brachycerine accumulation could be at least partly mediated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidative unbalance, as reported for indole alkaloid accumulation in *C. roseus* (Zhao *et al.*, 2001).

Interestingly, lipid peroxidation was lower in heat stressed leaf disks of *P. brachyceras* in all assays (Fig. 3G, H and fig. 4E). In cucumber, increase in lipid peroxidation was positively correlated to UV-B sensitivity (Kramer *et al.*, 1991). Heat stress increased lipid peroxidation in tall fescue (*Lolium arundinaceum* S.), and citric acid application could reduce MDA concentration in a dose dependent manner (Hu *et al.*, 2016). *Populus simonii* Carrière (Salicaceae) is a tree that tolerates high environmental temperatures. Individuals exposed to 42°C showed increase in MDA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels after 12h and 24h. Those increases may be correlated with decreased antioxidant enzyme activity (Song *et al.*, 2014). Brachycerine ROS quenching capacity could contribute to maintaining membrane integrity. Reduction in lipid peroxidation was also shown for *P. carthagenensis* under heat shock treatment (Fig. 4E), which could be a function of its high accumulation of anthocyanins (Fig. 4F), since these flavonoids also have antioxidant capacity and are increased in vegetative tissues under high temperatures (Wahid *et al.*, 2007). Rose and sugarcane leaves accumulated anthocyanin during heat stress (Wahid & Ghazanfar, 2006).

Curiously, in spite of its relatively heat tolerant phenotype and anthocyanin accumulation, *P. carthagenensis* is very sensitive to acute UV exposure (Matsuura *et al.*, 2016), unlike *P. brachyceras* (Gregianini *et al.*, 2003). This fact is probably a result of specificities of each type of stress, particularly in the early stages of perception and transduction. However, some of the light sensing apparatus (PhyB equilibrium) has been shown to be also involved in temperature perception. Warm temperatures exponentially increase the reversion of PhyB-Pfr to PhyB-Pr, thereby decreasing PhyB output growth responses (Legris *et al.*, 2016). This is particularly true for dark or low irradiance conditions, both found in some of our experimental



conditions. It is possible that such signaling may be at play in temperature stress exposure, perhaps also contributing to explain specific differences between *P. brachyceras* and *P. carthagenensis*.

Although *P. carthagenensis* proved to be not sensitive to heat stress, presumably because of its elevated anthocyanin accumulation in high temperature, the biochemical heat stress markers suggest that the presence of heat inducible brachycerine in *P. brachyceras* may be comparatively advantageous. In acute and stepwise heat stress experiments, *P. brachyceras* displayed significantly less accumulation of MDA compared to its control, which was not observed in *P. carthagenensis* (Fig. 3G and H). Moreover, in the heat shock experiments, *P. brachyceras* displayed significantly less accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compared to its control, unlike *P. carthagenensis* (Fig. 4D). Since these are relatively short term experiments, limited by the fact that leaf disks are used as plant material, it is possible that these significant biochemical differences detected in favor of *P. brachyceras* heat tolerance may become relevant or even critical for this phenotype in longer term, whole plant tests.

Tryptophan decarboxylase (TDC) converts tryptophan into tryptamine, providing the indole moiety to monoterpene indole alkaloids. However, heat stress inhibited TDC expression in *P. brachyceras* (Fig. 6). In aerial tissues of *C. roseus*, maximum expression of TDC was reported in leaf epidermis (Pan *et al.*, 2016). In *C. roseus* suspension cultures TDC expression was found to be higher in exponential growth phase, and progressively reduced by temperature increase, whereas ajmalicine accumulation was also reduced at higher temperatures (Hoopen *et al.*, 2002). Assuming steady state transcripts of TDC are linked to enzyme activity, and that this protein is a relevant point of metabolic flux control in our experimental conditions, results suggest that the control of brachycerine accumulation by heat is predominantly at post transcriptional level, differing from what has been reported for acute UV stress (Nascimento *et al.*, 2013b). Among the possible post transcriptional control mechanisms involved, increased enzyme activity by temperature and HSP mediated activation are potential candidates. Also, it has been reported that *Psychotria brachyceras* genome has multiple copies of TDC gene, which could be differentially expressed under abiotic stress (Maraschin, 2004). HSPs play important roles in heat tolerance, act as molecular chaperones, preventing protein aggregates,

regulating folding and accumulation of proteins, as well as localization and degradation (Asthir, 2015). Future detailed investigations on TDC accumulation, activity and its correlation with particular *HSP* expression should be conducted to shed light on these aspects.

## **5. Conclusion**

Brachycerine accumulation is clearly responsive to heat, as acute, stepwise or severe heat shock, within a wide time window, ranging from hours to days. The presence of the antioxidant alkaloid seems to explain at least part of its heat tolerant phenotype, based on the correlation of alkaloid accumulation and ameliorated oxidative stress markers. The protective effect of brachycerine against heat is further corroborated by its capacity to confer heat tolerance to sensitive plants. These data may provide paths to be pursued on plant secondary metabolism studies as part of the efforts to minimize the impact of global warming on plants. Taken together, these results add to the accumulating evidence of brachycerine being a 'general adaptogen' to protect against different types of stresses involving oxidative unbalance.

## **6. Contributions**

Yve Magedans collected the plant material, conducted the experiments and drafted the paper. Hélio Matsuura helped in harvesting plant material, planning experiments and analyzing data. Ramsés Tasca participated in brachycerine heat induction experiments. Arthur Fett-Neto finalized the article and supervised the work.

## **7. Acknowledgements**

This work was supported by grants from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq-Brazil) to AGFN. The authors are grateful to Dr. Fernanda de Costa and M.Sc. Andriele Wairich for assistance with qPCR analyses.

## Supplementary data

Table S1. Primer sequences for qPCR amplification and product sizes reference and target genes of *Psychotria brachyceras*.

Gene symbol	Gene name	Primer sequence (5'-3') forward/reverse	Amplicon length (bp)
ACT	Actin	CTTAATCCCAAGGCCAACAG/AAAGGACAGAACGGCCTGA	120
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	TCAAGGTCTTCGGAGTCAGG/GCAGCCTTGTCTTGTTCAGT	106
TDC	Tryptophan decarboxylase	AGATGTTCGAAGGGTTCGTG/TCCACCAACAATTCCTGGA	118

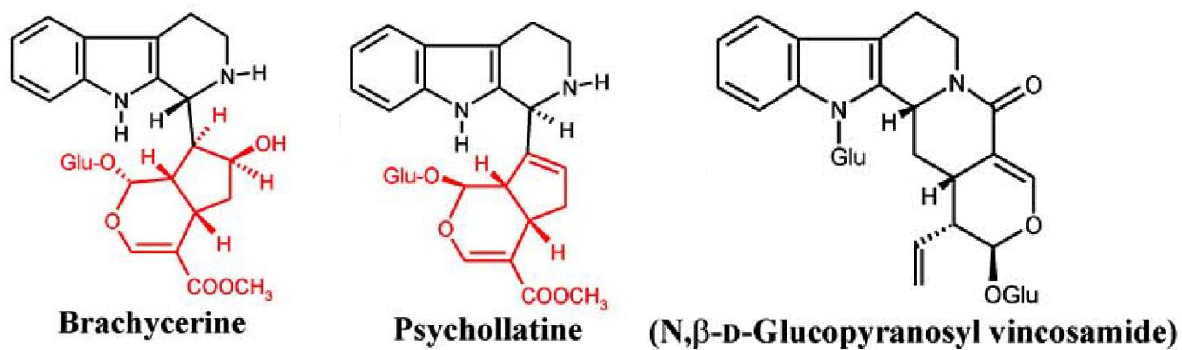


Fig. S1. Monoterpene indole alkaloids from *Psychotria* species. Red moieties in brachycerine and psychollatine are residues from unusual terpenoid precursors, which may derive from epiloganine and geniposide, respectively. Adapted from Porto *et al.* 2009.

## 8. References

- ALEXIAVA, V., SERGIEV, I., MAPELLI, S. & KARANOV, E. 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**. 24, 1337-1344.
- ALMEIDA, M. R., RUEDELL, C.M., RICACHENEVSKY, F. K., SPEROTTO, R. A., PASQUALI, G. & FETT-NETO, A. G. 2010. Reference gene selection for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction normalization during *in vitro* adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* Labill. **BMC Molecular Biology**. 11, 1–12.
- ASTHIR, B. 2015. Protective mechanisms of heat tolerance in crop plants. **Journal of Plant Interactions**. 10 (1), 202-210.
- BERNÁTH, J. 1998. **Poppy. The genus Papaver**. Switzerland: Hardwood academic publishers. 366p.
- BITA, C. E. & GERATS, T. 2013. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress - tolerant crops. **Frontiers in Plant Science**. 4, 1-18.
- CHATERJEE, M., SHARMA, P. & KHURANA, J. P. 2006. Cryptochrome 1 from *Brassica napus* is up-regulated by blue light and controls hypocotyl/stem growth and anthocyanin accumulation. **Plant Physiology**. 141, 61-74.
- CONNOR, S. E. & MARESH, J. J. 2006. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. **Natural Products Report**. 23, 532-547.
- DUTTA, A., SEN, J., & DESWAL, R. 2007. Downregulation of terpenoid indole alkaloid biosynthetic pathway by low temperature and cloning of an AP2 type C-repeat binding factor (CBF) from *Catharanthus roseus* (L). G. Don. **Plant Cell Reports**. 26, 1869-1878.
- FENG, B., LIU, P., LI, G., DONG, S. T., WANG, F. H., KONG, L. A. & ZHANG, J. W. 2014. Effect of heat stress on the photosynthetic characteristics in flag leaves at the grain-filling stage of different heat-resistant winter wheat varieties. **Journal of Agronomy and Crop Science**. 200, 143-155.
- FRAGOSO, V., NASCIMENTO, N. C., MOURA, D. J., SILVA, A. C. R., RICHTER, M. F., SAFFI, J. & FETT-NETO, A. G. 2008. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. **Toxicology in Vitro**. 22, 559-566.
- GREGIANINI, T. S., SILVEIRA, V. C., PORTO, D. D., KERBER, V. A., HENRIQUES, A. T. & FETT-NETO, A. G. 2003. The alkaloid brachycerine is induced by ultraviolet radiation and is a singlet oxygen quencher. **Photochemistry and Photobiology**. 78, 470-474.

HANSON, A. D. DITZ, K. M., SINGLETARY, G. W. & LELAND, T. J. 1983. Gramine accumulation in leaves of barley grown under high-temperature stress. **Plant Physiology**. 71, 896-904.

HARA, M. & KURITA, I. 2014. The natural alkaloid sanguinarine promotes the expression of heat shock protein genes in *Arabidopsis*. **Acta Physiologiae Plantarum**. 36, 3337–3343.

HOOPEN, H. J. G., VINKE, J. L., MORENO, P. R. H., VERPOORTE, R. & HEIJNEN, J. J. 2002. Influence of temperature on growth and ajmalicine production by *Catharantus roseus* suspension cultures. **Enzyme and Microbial Technology**. 30, 56-65.

HU, L., ZHANG, Z., XIANG, Z. & YANG, Z. 2016. Exogenous Application of Citric Acid Ameliorates the Adverse Effect of Heat Stress in Tall Fescue (*Lolium arundinaceum*). **Frontiers in Plant Science**. 7 (179), 1-11.

INIYAVAN, M., SANGEETHA, D., SARAVANAN, S. & PARIMELAZHAGAN, T. 2012. Evaluation of antioxidant and pharmacological properties of *Psychotria nilgiriensis* Deb Gang. **Food Science and Biotechnology**. 21, 1421–1431.

JALEEL, C. A., MANIVANNAN, P., SANKAR, B., KISHOREKUMAR, A., GOPI, R., SOMASUNDARAM, R. & PANNEERSELVAM, R. 2007. Induction of drought stress tolerance by ketoconazole in *Catharanthus roseus* is mediated by enhanced antioxidant potentials and secondary metabolite accumulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 60, 201–206.

KERBER, V. A., GREGIANINI, T. S., PARANHOS, J. T., SCHWAMBACH, J., FARIAS, F., FETT, J. P., FETT-NETO, A. G., ZUANAZZI, J. A. S., QUIRION, J. C., ELIZABETSKY, E. & HENRIQUES, A. T. 2001. Brachycerine, a novel monoterpene indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. **Journal of Natural Products**. 64, 677-679.

KRAMER, G., NORMAN, H. A., KRIZEK, D. T. & MIRECKI, R. M. 1991. Influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. **Phytochemistry**. 30 (7), 2101-2108.

LEAL, M. B. & ELISABETSKY, E. 1996. Absence of alkaloids in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. 54, 37-40.

LEGRIS, M., KLOSE, C., BURGIE, E.S., COSTIGLIOLO, C., NEME, M., HILTBRUNNER, A., WIGGE, P. A., SCHAFER, E, VIERSTRA, R., CASAL, J.J. 2016. Phytochrome B integrates light and temperature signals in *Arabidopsis*. **Science**. 354, 897-900.

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**. 25, 402–408.

MAHMOOD, S., PARVEEN, A., HUSSAIN, I., JAVED, S. & IQBAL, M. 2014. Possible involvement of secondary metabolites in the thermotolerance of maize seedlings. **International Journal of Agriculture and Biology**. 16 (6), 1075–1082.

MARASCHIN, F. S. 2004. Micropropagação, transformação genética e análise de genes envolvidos na síntese de alcaloides de *Psychotria brachyceras* Müell. Arg. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MATSUOKA, E., MATSUBARA, T., TAKAHASHI, I., MURANO, H. & HARA, M. 2016. The isoquinoline alkaloid sanguinarine which inhibits chaperone activity enhances the production of heat shock proteins in Arabidopsis **Plant Biotechnology**. 33, 1-5.

MATSUURA, H. N. & FETT-NETO, A. G. 2012. The major indole alkaloid N,  $\beta$ -D-glucopyranosyl vincosamide from leaves of *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schldl. is not an antifeedant but shows broad antioxidant activity. **Natural Product Research**. 27, 402–411.

MATSUURA, H. N.; RAU, M. R.; FETT-NETO, A. G. 2014. Oxidative stress and production of bioactive monoterpene indole alkaloids: biotechnological implications. **Biotechnology Letters**. 36(2), 191-200.

MATSUURA, H. N., FRAGOSO, V., PARANHOS, J. T., RAU, M. R. & FETT-NETO, A. G. 2016. The bioactive monoterpene indole alkaloid N,  $\beta$ -D-glucopyranosylvincosamide is regulated by irradiance quality and development in *Psychotria leiocarpa*. **Industrial Crops and Products**. 86, 210-218.

MORAES, T. M. S., DE ARAÚJO, M. H., BERNARDES, N. R., DE OLIVEIRA, D. B., LASUNSKAIA, E. B., MUZITANO, M. F. & DA CUNHA, M. 2011. Antimycobacterial activity and alkaloid prospection of *Psychotria* species (Rubiaceae) from the Brazilian Atlantic rain forest. **Planta Medica**. 77, 964–970.

MURASHIGE T.; SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. 15, 709-714.

NASCIMENTO, N. C., FRAGOSO, V., MOURA, D. J., SILVA, A. C. R., FETT-NETO, A. G. & SAFFI, J. 2007. Antioxidant and antimutagenic effects of the crude foliar extract and the alkaloid brachycerine of *Psychotria brachyceras*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 48, 728-734.

NASCIMENTO, N. C., MENGUER, P. K. HENRIQUES, A. T. & FETT-NETO, A. G. 2013a. Accumulation of brachycerine, an antioxidant glucosidic indole alkaloid, is induced by abscisic acid, heavy metal, and osmotic stress in leaves of *Psychotria brachyceras*. **Plant Physiology**. 73, 33-40.

NASCIMENTO, N. C., MENGUER, P. K., SPEROTTO, R. A., ALMEIDA, M. R. & FETT-NETO, A. G. 2013b. Early changes in gene expression induced by acute UV exposure in leaves of *Psychotria brachyceras*, a bioactive alkaloid accumulating plant. **Molecular Biotechnology**. 54, 79–91.

- PAN, Q., MUSTAFA, N. R., TANG, K., CHOI, Y. H. & VERPOORTE, R. 2016. Monoterpenoid indole alkaloids biosynthesis and its regulation in *Catharanthus roseus*: a literature review from genes to metabolites. **Phytochemistry Reviews**. 15, 221–250.
- PORTO, D. D., HENRIQUES, A. T. & FETT-NETO, A. G. 2009. Bioactive alkaloids from south american *Psychotria* and related species. **The Open Bioactive Compounds Journal**. 2, 29-36.
- PORTO, D. D., MATSUURA, H. N., VARGAS, L. R., HENRIQUES, A. T. & FETT-NETO, A. G. 2014. Shoot accumulation kinetics and effects on herbivores of wound-induced antioxidant indole alkaloid brachycerine of *Psychotria brachyceras*. **Natural Product Communications**. 9 (5), 629-632.
- ROSS; W. C. 1974. **Plant Physiology Laboratory Manual**. Belmont, CA, USA: Wadsworth Publishing Company.
- SONG, Y., CHEN, Q., CI, D., SHAO, X. & ZHANG, D. 2014. Effects of high temperature on photosynthesis and related gene expression in poplar. **BMC Plant Biology**. 14 (111), 1-20.
- SUZUKI, N. & MITTLER, R. 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. **Physiologia Plantarum**. 126, 45-51.
- TANG, Z., YANG, L., ZU, Y. & GUO, X. 2009. Variations of vinblastine accumulation and redox state affected by exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Plant Growth Regulation**. 57, 15–20.
- VELIKOVA, V., YORDANOV, I. & EDREVA, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant system in acid rain treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**. 151, 59-66.
- WAHID, A. & GHAZANFAR, A. 2006. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. **Journal of Plant Physiology**. 163, 723-730.
- WAHID, A., GELANI, S., ASHRAF, M. & FOOLAD, M. R. 2007. Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany**. 61, 199–223.
- YEH, C., KAPLINSKY, N. J., HU, C. & CHARNG, Y. Y. 2012. Some like it hot, some like it warm: Phenotyping to explore thermotolerance diversity. **Plant Science**. 195, 10-23.
- ZHAO, J., HU, Q., GUO, Y. & ZHU, W. 2001. Elicitor-induced indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cell cultures is related to Carbon influx and the oxidative burst. **Plant Science**. 161, 423-431.



ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**. 23(4), 283-333.

ZHOU, M., SHAO, J. R. & TANG, Y. X. 2009. Production and metabolic engineering of terpenoid indole alkaloids in cell cultures of the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Madagascar periwinkle). **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 52, 313–323.

ZU, Y.-G., TANG, Z., YU, J., LIU, S., WANG, W. & GUO, X. 2003. Different responses of camptothecin and 10-hydroxycamptothecin to heat shock in *Camptotheca acuminata* seedlings. **Acta Botanica Sinica**. 45 (7), 809-814.

### 3. DISCUSSÃO GERAL

O estresse de calor é prejudicial ao crescimento e desenvolvimento celular ao desestabilizar as membranas celulares, desnaturar e agregar proteínas e inibir a atividade enzimática (Bita & Gerats, 2013). O aumento da temperatura está relacionado à diminuição da atividade fotossintética devido à limitação dos estômatos, fotoinibição e redução da atividade da Rubisco (Cui *et al.* 2006; Feng *et al.*, 2014). Um efeito importante relacionado ao estresse de calor é o aumento da produção de ROS, causando desequilíbrio no status redox celular e, portanto, danificando estruturas celulares (Suzuki & Mittler, 2006).

As plantas sintetizam uma imensa variedade de metabólitos secundários que podem atuar nas respostas ao estresse de calor. Os alcaloides foram pouco estudados na literatura em relação ao aumento da temperatura (Zu *et al.*, 2003; Mahmood *et al.*, 2014; Hanson *et al.*, 1983; Bernáth, 1998). Este relato é o primeiro versando sobre metabolismo de MIAs de *Psychotria* sp. frente ao estresse térmico.

O aumento da temperatura induziu o acúmulo de braquicerina, tanto na forma gradual como aguda. Por sua vez, o estresse gerado pelo frio não alterou o nível foliar de braquicerina (fig. 1). A indução de braquicerina foi observada mesmo durante choque térmico severo (fig. 4A). Esses resultados sugerem que braquicerina é parte das respostas de *P. brachyceras* ao estresse de calor. Embora diferentes estresses abióticos promovam respostas fisiológicas similares nas plantas, essas respostas podem não ser idênticas.

De maneira geral, os experimentos de estresse de calor não alteraram de maneira expressiva os marcadores de estresse oxidativo para *P. brachyceras* e *P. carthagenensis* (fig. 3 e 4). O conteúdo de MDA, marcador de peroxidação lipídica, é notadamente aumentado em experimentos de estresse de calor (Wahid *et al.*, 2007). Contudo, houve redução nos discos foliares de *P. brachyceras* (fig. 3D e 4E), o que pode estar relacionado ao metabolismo e capacidade antioxidante de braquicerina. O mesmo pode ser dito sobre a redução no conteúdo de peróxido de hidrogênio nos discos foliares submetidos ao choque térmico severo (50°C por 6h) (fig. 4D). A alteração no balanço redox pode ser um sinal para a síntese de braquicerina, que se

acumula a partir de 24h de exposição à 40°C (fig.2). Estes dados indicam uma cinética de acumulação temperatura dependente.

*Psychotria carthagenensis*, que não sintetiza MIAs, foi avaliada durante os experimentos para efeitos de comparação com as respostas de *Psychotria brachyceras*. Ao contrário do esperado, *P. carthagenensis* mostrou-se tolerante ao calor e apresentou resultados parecidos aos de *P. brachyceras* na avaliação do estresse oxidativo (fig. 3 e 4). Interessante notar que a síntese de antocianinas foi induzida nas folhas de *P. carthagenensis* sob choque térmico. As antocianinas, conhecidas por conferirem proteção contra radiação UV e possuírem atividade antioxidante, também podem estar relacionadas às respostas ao estresse de calor (Wahid *et al.*, 2007). Além disso, ampla distribuição de *P. carthagenensis* pode ter contribuído para a aquisição de plasticidade de resposta às diferentes condições ambientais. Os exemplares utilizados neste estudo foram preferencialmente coletados nas bordas da mata do Morro Santana, e poderiam estar mais expostos às variações do ambiente que os indivíduos de *Psychotria brachyceras*, que foram coletados mais ao fundo da mata. No entanto, embora *P. carthagenensis* não tenha se mostrado sensível ao estresse de calor, talvez principalmente em função de sua capacidade de acumular antocianinas rapidamente, o panorama observado quanto aos marcadores de estresse oxidativo sugere que a presença de braquicerina induzível em *P. brachyceras* é comparativamente mais vantajosa para proteção contra estresse.

A ação antioxidante dos MIAs tem sido intensivamente estudada por nosso grupo. Braquicerina, psicolatina e GPV possuem ação antioxidante contra as ROS mais conhecidas (Nascimento *et al.*, 2013a; Gregianini *et al.*, 2003; Fragoso *et al.*, 2008; Matsuura & Fett-Neto, 2013). No teste de recuperação de fenótipo com *Brassica oleracea* var *acephala* e *Brugmansia suaveolens*, duas espécies sensíveis ao aumento da temperatura, a aplicação de braquicerina foi capaz de reduzir as perdas no conteúdo de clorofila (fig. 5). Provavelmente, a ação antioxidante de braquicerina foi importante para a proteção desses organismos quando submetidos ao choque térmico. De maneira geral, as estruturas moleculares de braquicerina, psicolatina e GPV (fig. 2 da introdução) apresentam características que podem ser

capazes de mitigar ROS: ligações duplas, aminas secundárias e terciárias, hidroxilas e resíduos de glicose (Porto *et al.*, 2009; Gregianini *et al.*, 2003).

A ausência de aumento de expressão de *TDC* sugere que o mecanismo de resposta do metabolismo de braquicerina à temperatura ocorra em nível pós-transcricional. Claramente, estes dados devem ser contextualizados em relação aos diversos outros pontos possíveis de controle da via biossintética. O efeito da temperatura em *TDC* pode estar ligado ao aumento de atividade enzimática e/ou ao papel protetor de HSPs sobre a enzima.

Os resultados sugerem que o acúmulo de braquicerina é uma resposta ao aumento da temperatura, que pode ser uma ferramenta para aumentar o rendimento do alcaloide para aplicação farmacêutica. Além disso, a ação antioxidante de braquicerina parece explicar, ainda que parcialmente, o fenótipo tolerante de *P. brachyceras* sob estresse de calor.

#### 4. PERSPECTIVAS

Ampliar estudos de indução do metabolismo de alcaloides monoterpênicos indólicos frente ao aumento da temperatura avaliando novos parâmetros de estresse oxidativo, além de investigar a atividade da enzima triptofano descarboxilase.

Da mesma forma, investigar alterações de expressão de HSPs em discos foliares de *P. brachyceras* e sua possível relação com o metabolismo de braquicerina. Nós tentamos, sem sucesso, amplificar genes codificadores de HSP90 e HSFA2 durante a realização deste trabalho. Contudo, uma elaboração mais cuidadosa dos primers, a partir de mais sequências gênicas conhecidas, poderá tornar possível essa análise para *P. brachyceras* sob estresse de calor.

Caso se confirme a repressão do gene *TDC*, com o aumento da temperatura, pode-se investigar a expressão gênica para outras enzimas do metabolismo de MIA, especialmente uma strictosidina sintase-like em *P. brachyceras* sob estresse de calor.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGATI, G., AZZARELLO, E., POLLASTRI, S. & TATTINI, M. 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. **Plant Science**. 196, 67-76.

AHMAD, P. & PRASAD, M. N. V. 2012. **Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability**. New York: Springer. 473p.

BERNÁTH, J. 1998. **Poppy. The genus Papaver**. Switzerland: Hardwood academic publishers. 366p.

BITA, C. E. & GERATS, T. 2013. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress - tolerant crops. **Frontiers in Plant Science**. 4, 1-18.

BLUMWALD, E. & MITTLER, R. 2015. Responses and Adaptations to Abiotic Stress. In: TAIZ, L., ZIEGER, E., MOLLER, I. M. & MURPHY, A. (Eds). **Plant Physiology**. 6<sup>th</sup> edition. USA: Sinauer Associates Inc. 755-777.

BOKSZCZANIN, K. L.; CONSORTIUM, S. P. T. I. T. N. S.-I. & FRAGKOSTEFANAKIS, S. 2013. Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance. **Frontiers in Plant Science**. 4, 1-20.

BRANDÃO, H. N., DAVID, J. P., COUTO, R. D. NASCIMENTO, J. A. P. & DAVID, J. M. 2010. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**. 33 (6), 1359-1369.

CHEN, X.; CHEN, Q.; ZHANG, X.; LI, R.; JIA, Y.; EF, A. A.; JIA, A.; HU, L.; HU, X. 2016. Hydrogen sulfide mediates nicotine biosynthesis in tobacco (*Nicotiana tabacum*) under high temperature conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**. 104, 174-179.

CONNOR, S. E. & MARESH, J. J. 2006. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. **Natural Products Report**. 23, 532-547.

CUI, L., LI, J., FAN, Y., XU, S. & ZHANG, Z. 2006. High temperature effects on photosynthesis, PSII functionality and antioxidant activity of two *Festuca arundinacea* cultivars with different heat susceptibility. **Botanical Studies**. 47, 61-69.

DAVIS, A. P., GOVAERTS, R., BRIDSON, D. M., RUHSAM, M., MOAT, J. & BRUMMITT, N. A. 2009. A global assessment of distribution, diversity, endemism, and taxonomic effort in the Rubiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 96, 68–78.

DE COSTA, F., YENDO, A. C., FLECK, J. D., GOSMANN, G. & FETT-NETO, A. G. 2013. Accumulation of a bioactive triterpene saponin fraction of *Quillaja brasiliensis* leaves is associated with abiotic and biotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**. 66, 56-62.

DELKER, C., VAN ZANTEN, M., QUINT, M. 2017. Thermosensing enlightened. **Trends Plant Science**. 22, 185-187.

DILLENBURG, C. R. & PORTO, M. L. 1985. **Rubiaceae – tribo Psychotrieae**. Porto Alegre: UFRGS. 82p.

FENG, B., LIU, P., LI, G., DONG, S. T., WANG, F. H., KONG, L. A. & ZHANG, J. W. 2014. Effect of heat stress on the photosynthetic characteristics in flag leaves at the grain-filling stage of different heat-resistant winter wheat varieties. **Journal of Agronomy and Crop Science**. 200, 143-155.

FRAGOSO, V., NASCIMENTO, N. C., MOURA, D. J., SILVA, A. C. R., RICHTER, M. F., SAFFI, J. & FETT-NETO, A. G. 2008. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. **Toxicology in Vitro**. 22, 559-566.

GREGIANINI, T. S., SILVEIRA, V. C., PORTO, D. D., KERBER, V. A., HENRIQUES, A. T. & FETT-NETO, A. G. 2003. The alkaloid brachycerine is induced by ultraviolet radiation and is a singlet oxygen quencher. **Photochemistry and Photobiology**. 78, 470-474.

GREGIANINI, T. S., PORTO, D. D., NASCIMENTO, N. C., FETT, J. P., HENRIQUES, A. T. & FETT-NETO, A. G. 2004. Environmental and ontogenetic control of accumulation of brachycerine, a bioactive indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. **Journal of Chemical Ecology**. 30 (10), 2023-2036.

GUO, X.-R., LEI, Y., JING-HUA, Y. ZHONG-HUA, T. & YUAN-GANG, ZU. 2007. Alkaloid variations in *Catharanthus roseus* seedlings treated by different temperatures in short term and long term. **Journal of Forestry Research**. 18 (4), 313-315.

HAHN, A., BUBLAK, D., SCHLEIFF, E. & SCHARF, K.D. 2011. Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 chaperones and heat stress transcription factors in tomato. **The Plant Cell Online**. 1-15.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. 2006. **Free Radicals in Biology and Medicine**. USA: Oxford University Press. 851p.

HANSON, A. D. DITZ, K. M., SINGLETARY, G. W. & LELAND, T. J. 1983. Gramine accumulation in leaves of barley grown under high-temperature stress. **Plant Physiology**. 71, 896-904.

HU, Y., HAN, Y. T., WEI, W., LI, Y. J., ZHANG, K., GAO, Y.R., ZHAO, F. L. & FENG, J. Y. 2015. Identification, isolation, and expression analysis of heat shock transcription factors in the diploid woodland strawberry *Fragaria vesca*. **Frontiers in Plant Science**. 6, 1-15.

HU, L., ZHANG, Z., XIANG, Z. & YANG, Z. 2016. Exogenous Application of Citric Acid Ameliorates the Adverse Effect of Heat Stress in Tall Fescue (*Lolium arundinaceum*). **Frontiers in Plant Science**. 7 (179), 1-11.

IPCC. 2013. Climate Projections for Brazil. In: STOCKER;T.F., et al. (Ed.). **Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.: Cambridge University Press. 1535p.

JALEEL, C. A., MANIVANNAN, P., SANKAR, B., KISHOREKUMAR, A., GOPI, R., SOMASUNDARAM, R. & PANNEERSELVAM, R. 2007. Induction of drought stress tolerance by ketoconazole in *Catharanthus roseus* is mediated by enhanced antioxidant potentials and secondary metabolite accumulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 60, 201–206.

KARIM, M. A.; FRACHEBOUD, Y. & STAMP, P. 1997. Heat tolerance of maize with reference of some physiological characteristics. **The Annals of Bangladesh Agriculture**. 7, 27-33.

KERBER, V. A., GREGIANINI, T. S., PARANHOS, J. T., SCHWAMBACH, J., FARIAS, F., FETT, J. P., FETT-NETO, A. G., ZUANAZZI, J. A. S., QUIRION, J. C., ELIZABETSKY, E. & HENRIQUES, A. T. 2001. Brachycerine, a novel monoterpeno indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. **Journal of Natural Products**. 64, 677-679.

KOSKULL-DÖRING, P. V.; SCHARF, K.-D. & NOVER, L. 2007. The diversity of plant heat stress transcription factors. **Trends in Plant Science**. 12 (10), 452-457.

KUTCHAN, T.M. 1995. Alkaloid biosynthesis—the basis for metabolic engineering of medicinal plants. **Plant Cell**. v. 7, p. 1059-1070, 1995.

LATOWSKI, D.; KUCZYNSKA, P. & STRZALKA, K. 2011. Xanthophyll cycle – a mechanism protecting plants against oxidative stress. **Redox Report**. 16(2), 78-90.

LEAL, M. B. & ELISABETSKY, E. 1996. Absence of alkaloids in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. 54, 37-40.

MABHIZA, D., CHITEMERERE, T. & MUKANGANYAMA, S. 2016. Antibacterial Properties of Alkaloid Extracts from *Callistemon citrinus* and *Vernonia adoensis* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Medicinal Chemistry**. 2016, 1-7.

MACEDO, A. F. 2012. Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism to Productivity. In: AHMAD, P. & PRASAD, M. N. V. (Eds). **Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability**. New York: Springer. p. 41-62.

MAHMOOD, S., PARVEEN, A., HUSSAIN, I., JAVED, S. & IQBAL, M. 2014. Possible involvement of secondary metabolites in the thermotolerance of maize seedlings. **International Journal of Agriculture and Biology**. 16 (6), 1075–1082.

MATSUURA, H. N., PORTO, D. D. & FETT-NETO, A. G. 2013. Bioactive Alkaloids from South American *Psychotria* and Related Rubiaceae. In: RAMAWAT, K. G. e MÉRILLON, J. M. (Ed.). **Natural Products**. 1. Berlin: Springer Berlin Heidelberg. p.119-147.

MATSUURA, H. N.; RAU, M. R.; FETT-NETO, A. G. 2014. Oxidative stress and production of bioactive monoterpene indole alkaloids: biotechnological implications. **Biotechnology Letters**. 36(2), 191-200.

MAYSER, P., SCHÄFER, U., KRÄMER, H. J., IRLINGER, B. & STEGLICH, W. 2002. Pityriacitrin – an ultraviolet-absorbing indole alkaloid from the yeast *Malassezia furfur*. **Archives of Dermatological Research**. 294, 131-134.

MITTLER, R. 2017. ROS Are Good. **Trends in Plant Science**. 22 (1), 11-19.



MITTLER, R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**. 11(1), 15-19.

MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., GOLLERY, M. & VAN BREUSEGEM, F. 2004. Reactive Oxygen Network of Plants. **Trends in Plant Science**. 9, 490-498.

NASCIMENTO, N. C. & FETT-NETO, A. G. 2010. Plant Secondary Metabolism and Challenges in Modifying its Operation: an Overview. In: FETT-NETO, A. G. (Ed.). **Plant Secondary Metabolism Engineering: Methods and Applications**. 1<sup>a</sup>. New York: Humana Press/Springer. 339p.

NASCIMENTO, N. C., MENGUER, P. K. HENRIQUES, A. T. & FETT-NETO, A. G. 2013a. Accumulation of brachycerine, an antioxidant glucosidic indole alkaloid, is induced by abscisic acid, heavy metal, and osmotic stress in leaves of *Psychotria brachyceras*. **Plant Physiology**. 73, 33-40.

NASCIMENTO, N. C., MENGUER, P. K., SPEROTTO, R. A., ALMEIDA, M. R. & FETT-NETO, A. G. 2013b. Early changes in gene expression induced by acute UV exposure in leaves of *Psychotria brachyceras*, a bioactive alkaloid accumulating plant. **Molecular Biotechnology**. 54, 79–91.

NASCIMENTO, N. C., FRAGOSO, V., MOURA, D. J., SILVA, A. C. R., FETT-NETO, A. G. & SAFFI, J. 2007. Antioxidant and antimutagenic effects of the crude foliar extract and the alkaloid brachycerine of *Psychotria brachyceras*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 48, 728-734

NEPKROEFF, M., BREMER, B. & SYSTMA, K. J. 1999. Reorganization of the genus *Psychotria* and tribe Psychotrieae (Rubiaceae) inferred from ITS and *rbcL* sequence data. **Systematic Botany**. 24, 5-27.

PAN, Q., MUSTAFA, N. R., TANG, K., CHOI, Y. H. & VERPOORTE, R. 2016. Monoterpenoid indole alkaloids biosynthesis and its regulation in *Catharanthus roseus*: a literature review from genes to metabolites. **Phytochemistry Reviews**. 15, 221–250.

PASQUALI, G. PORTO, D. D., FETT-NETO, A. G. 2006. Metabolic engineering of cell cultures versus whole plant complexity in production of bioactive monoterpene indole alkaloids: recent progress related to old dilemma. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 101 (4), 287-296.

PORTO, D. D., HENRIQUES, A. T. & FETT-NETO, A. G. 2009. Bioactive alkaloids from south american *Psychotria* and related species. **The Open Bioactive Compounds Journal**. 2, 29-36.

REFLORA/CNPQ. 2017. Instituto e Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro – Lista de Espécies da Flora do Brasil. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/ConsultaPublicaUC.do> Acesso em: 16/01/2017.

SCHIEBER, M. & CHANDEL, N. S. 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current Biology**. 24, 453-462.

SHIBATA, M., AMANO, B., KAWATA, J. & UDA, M. 1988. Breeding process and characteristics of 'Summer Queen', a spray-type chrysanthemum. **Bulletin of the National Research Institute of Vegetables Ornamental Plants and Tea Series A**. 2, 245-255.

SICILIANO, T., LEO, M. D., BADER, A. TOMMASI, N. D., VRIELLING, K., BRACA, A. & MORELLI, I. 2005. Pyrrolizidine alkaloids from *Anchusa strigosa* and their antifeedant activity. **Phytochemistry**. 66, 1593-1600.

SILVEIRA, F., CIBULSKI, S. P., VARELA, A. P., MARQUÉS, J. M., CHABALGOITY, A., DE COSTA, F., YENDO, A. C., GOSMANN, G., ROEHE, P. M., FERNÁNDEZ, C. & FERREIRA, F. 2011. *Quillaja brasiliensis* saponins are less toxic than Quill A and have similar properties when used as adjuvant for a viral antigen preparation. **Vaccine**. 29, 9177-9182.

SUZUKI, N. & MITTLER, R. 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. **Physiologia Plantarum**. 126, 45-51.

TAIZ, L., ZIEGER, E., MOLLER, I. M. & MURPHY, A. 2015. **Plant Physiology**. 6<sup>th</sup> edition. USA: Sinauer Associates Inc. 761p.

TANG, Z., YANG, L., ZU, Y. & GUO, X. 2009. Variations of vinblastine accumulation and redox state affected by exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Plant Growth Regulation**. 57, 15–20.

TATTINI, M., LORETO, F., FIN, A., GUIDI, L., BRUNETTI, C. VELIKOVA, V., GORI, A. & FERRINI, F. 2015. Isoprenoids and phenylpropanoids are part of the antioxidant

defense orchestrated daily by drought-stressed *Platanus x acerifolia* plants during Mediterranean summers. **New Phytologist**. 207, 613–626.

TAULAVUORI, E., HELLSTRÖM, E., TAULAVUORI, K. & LAINE, K. 2001. Comparison of two methods used to analyze lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. **Journal of Experimental Botany**. 52 (365), 2375-2380.

WAHID, A. & GHAZANFAR, A. 2006. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. **Journal of Plant Physiology**. 163, 723-730.

WAHID, A., GELANI, S., ASHRAF, M. & FOOLAD, M. R. 2007. Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany**. 61, 199–223.

WCSP. 2017. World checklist of selected plant families. Disponível em: [http://apps.kew.org/wcsp/prepareChecklist.do?checklist=selected\\_families%40%40031310120171953225](http://apps.kew.org/wcsp/prepareChecklist.do?checklist=selected_families%40%40031310120171953225). Acesso em 05/01/2017.

YEH, C., KAPLINSKY, N. J., HU, C. & CHARNG, Y. Y. 2012. Some like it hot, some like it warm: Phenotyping to explore thermotolerance diversity. **Plant Science**. 195, 10-23.

ZU, Y.-G., TANG, Z., YU, J., LIU, S., WANG, W. & GUO, X. 2003. Different Responses of Camptothecin and 10-Hydroxycamptothecin to Heat Shock in *Camptotheca acuminata* Seedlings. **Acta Botanica Sinica**. 45 (7), 809-814.