



**THAÍS DE ANDRADE**

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E EXPRESSÃO DE  
PROTEÍNAS RESISTENTES AO CALOR EM  
DIFERENTES ESTÁDIOS DE  
DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE  
MILHO**

**LAVRAS - MG**

**2012**

**THAÍS DE ANDRADE**

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS  
RESISTENTES AO CALOR EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE  
DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

**LAVRAS - MG**

**2012**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Andrade, Thaís de.

Qualidade fisiológica e expressão de proteínas resistentes ao calor em diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de milho / Thaís de Andrade. – Lavras : UFLA, 2012.

66 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Bibliografia.

1. *Zea mays*. 2. Expressão gênica. 3. LEA proteínas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.521

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS  
RESISTENTES AO CALOR EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE  
DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2012.

Dr. João Almir Oliveira

UFLA

Dra. Sttela Dellyzete Franco da Rosa

EMBRAPA

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho  
Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2012**

A DEUS, por todas as oportunidades que tem me concedido.

## **OFEREÇO**

Aos meus pais Afonso e Cida; aos meus irmãos Vinícius e Vanessa.

## **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Afonso e Cida, pelo amor, incentivo, exemplo de dignidade. Por me mostrarem que obstáculos sempre existirão, mas basta ter fé para se chegar onde quer.

Aos meus irmãos Vinicius e Vanessa pelo carinho, apoio e por me ensinarem a importância de nossas escolhas.

Ao Gustavo pelo carinho, companheirismo, paciência e pela ajuda nos experimentos.

À Roseane, João Almir e Felipe, por me acolherem com tanto carinho em sua família.

A todos os amigos que perto ou distante sempre me apoiaram, pelo carinho e companheirismo.

A Professora Édila Vilela de Resende Von Pinho pela orientação, amizade, paciência, exemplo de profissionalismo e competência.

Aos professores Renato Mendes Guimarães, Maria Laene Moreira de Carvalho e João Almir Oliveira pelos esclarecimentos e auxílio na execução deste trabalho.

Aos pesquisadores Antônio Vieira Rodrigues e Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa, pelos conselhos e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Sementes, Wilder, Walbert, Elza, Dalva e Elenir, pelo auxílio na execução dos experimentos e amizade. E também à Marli secretária da pós-graduação.

Aos estagiários do Laboratório de Sementes e alunos da Iniciação Científica, por todo o auxílio e dedicação na execução do experimento, além da amizade.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de recursos para execução do projeto.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização de mais essa etapa.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

Sementes dispõem de alguns mecanismos de tolerância à dessecação a exemplo da expressão das proteínas resistentes ao calor. O entendimento da expressão dos genes dessas proteínas em sementes de milho é importante para o desenvolvimento de tecnologias que garantam a produção e a comercialização de sementes com alta qualidade. Na presente pesquisa objetivou-se quantificar e caracterizar o padrão de expressão de proteínas resistentes ao calor durante o desenvolvimento de sementes de milho de genótipos discrepantes em relação à tolerância à alta temperatura de secagem. Para tanto, em uma primeira etapa foi realizado pré-teste com sementes da linhagem 57, em dois estádios de desenvolvimento (LL3 e LL5), avaliando a presença de proteínas resistentes ao calor, por meio da técnica de eletroforese em diferentes partes da semente: eixo embrionário, endosperma, embrião e semente inteira. Maior expressão das proteínas resistentes ao calor foi observada no embrião e nas sementes colhidas no estágio LL5. Na segunda etapa, foi instalado campo para a multiplicação de sementes de linhagens, sendo duas com alta e duas com baixa resistência ao calor. A colheita das sementes foi feita nos estádios de desenvolvimento: LL1, LL2, LL3, LL4, LL5 e as sementes foram submetidas aos testes de teor de água, germinação, primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado e teste de frio. Para a análise da expressão de proteínas resistentes ao calor por meio das técnicas de *PCR* (Polimerase chain reaction) em tempo real, eletroforese e espectrofotometria as sementes foram armazenadas em *deep freezer* até a realização das análises. Foi observado que: proteínas resistentes ao calor se expressam diferencialmente nos diferentes genótipos e nos diferentes estádios de desenvolvimento; a expressão de proteínas resistentes ao calor, detectada por meio da técnica de eletroforese é mais precoce em linhagens tolerantes a altas temperaturas de secagem; maiores valores de germinação e vigor ocorrem em sementes colhidas no estágio de desenvolvimento LL5; maior expressão de proteínas resistentes ao calor foi observada em embriões de sementes de milho.

Palavras-chave: *Zea mays*. Expressão gênica. *LEA* proteínas.



## ABSTRACT

Seeds have some mechanisms of desiccation tolerance such as the expression of heat resistant proteins. The understanding of gene expression of these proteins in maize seeds is important for the technologies development which ensures the production and seeds marketing with high quality. In the present study the aim was to quantify and characterize the expression pattern of heat resistant proteins during development maize seeds of different genotypes in relation to tolerance to high drying temperature. For this purpose, in a first step was conducted pre-test with seeds from line 57, in two development stages (LL3 and LL5), evaluating the presence of heat resistant proteins, by electrophoresis technique in different parts of the seeds: embryo axis, endosperm, embryo and whole seed. Increased expression of heat resistant proteins was observed in the embryo and seeds harvested in stage LL5. In the second step was installed on field for the inbreds seeds multiplication, and two with high and two with low heat resistance. The seeds harvest was made in the development stages: LL1, LL2, LL3, LL4, LL5 and seeds were submitted to test of water content, germination, first germination count, accelerated aging and cold test. For expression analyze of heat resistant proteins using the techniques in real-time PCR, electrophoresis and spectrophotometry the seeds were stored in deep freezer until perform the analyzes. It was observed that: heat resistant proteins are expressed differentially in genotypes and development stages different; the expression of heat resistant proteins, detected by electrophoretic techniques is earlier in inbreds tolerant to high drying temperatures; higher germination values and vigor occur in seeds harvested at development stage LL5; increased expression of heat resistant proteins was observed in embryos of maize seeds.

Keywords: *Zea mays*. Gene expression. LEA proteins.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Padrão de proteínas resistentes ao calor extraídas de diferentes partes das sementes de milho da linhagem 57, colhidas no estágio LL3, com e sem embebição.....	41
Figura 2	Padrão de proteínas resistentes ao calor em diferentes partes das sementes de milho da linhagem 57, colhidas no estágio LL5, com e sem embebição .....	42
Figura 3	Padrão de proteínas resistentes ao calor de sementes de milho colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento P = padrão de proteínas. (A= 43, B= 30, C= 57 e D= 91).....	48
Figura 4	Eletroforese de proteínas resistentes ao calor durante o desenvolvimento de sementes de milho das linhagens 43, 30, 57 e 91 colhidas em diferentes estádios, utilizando o <i>pellet</i> da extração. P = padrão de proteínas.....	50
Figura 5	Proteínas resistentes ao calor, extraídas de sementes de milho das linhagens 43, 30, 57 e 91, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento.....	51
Figura 6	RNA total em gel de agarose 1,5% da linhagem 43 extraídos nos diferentes estádios de desenvolvimento .....	52
Figura 7	Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes D 34, HS e <i>LEA</i> em sementes de milho da linhagem 43, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento .....	54
Figura 8	Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes D 34, HS e <i>LEA</i> em sementes de milho da linhagem 30, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento .....	55

Figura 9	Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes D34, HS e <i>LEA</i> em sementes de milho da linhagem 57, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento .....	55
Figura 10	Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes D 34, HS e <i>LEA</i> em sementes de milho da linhagem 91, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento .....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados na análise de <i>qRT-PCR</i> .....	37
Tabela 2	Teor de água das sementes de milho das linhagens 43, 30, 57 e 91, colhidas nos diferentes estádios de desenvolvimento.....	43
Tabela 3	Valores médios (%) de plântulas normais no teste de primeira contagem de germinação de sementes de milho das linhagens 43, 30, 57 e 91 colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento ....	43
Tabela 4	Valores médios (%) de plântulas normais no teste de germinação de sementes de milho das linhagens 43, 30, 57 e 91 colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento .....	44
Tabela 5	Valores médios (%) de plântulas normais após o envelhecimento acelerado de sementes de milho das linhagens 30, 57 e 91 colhidas nos diferentes estádios de desenvolvimento .....	45
Tabela 6	Valores médios de plântulas normais pelo teste de frio sem solo de sementes de milho das linhagens 30, 57 e 91 nos diferentes estádios de desenvolvimento .....	46

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
2.1	Mercado de sementes de milho e inovações tecnológicas .....	16
2.2	Desenvolvimento de sementes .....	17
2.3	Colheita em espigas e tolerância à dessecação de sementes de milho .....	20
2.4	Expressão gênica .....	24
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
3.1	Ensaio 1: avaliação de proteínas resistentes ao calor em eixo embrionário, endosperma, escutelo e semente inteira .....	28
3.1.1	Análise eletroforética de proteínas resistentes ao calor .....	28
3.2	Ensaio 2: avaliação da qualidade fisiológica e expressão de proteínas resistentes ao calor durante o desenvolvimento de sementes de milho .....	29
3.2.1	Teor de água .....	31
3.2.2	Teste de germinação .....	31
3.2.3	Primeira contagem de germinação .....	31
3.2.4	Envelhecimento artificial .....	32
3.2.5	Teste de frio sem solo .....	32
3.2.6	Análise da expressão de proteínas resistentes ao calor por meio da técnica de eletroforese .....	32
3.2.7	Quantificação de proteínas .....	33
3.2.8	Análise da expressão de proteínas resistentes ao calor por meio da técnica de RTq PCR .....	34
3.2.8.1	Extração e Purificação do RNA .....	34
3.2.8.2	Transcrição reversa para síntese do cDNA .....	35
3.2.8.3	Desenho dos <i>primers</i> .....	36
3.2.8.4	<i>PCR</i> em tempo real .....	37
3.2.8.5	Análise dos resultados .....	38
3.2.9	Procedimento estatístico .....	39
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
4.1	Avaliação de proteínas resistentes ao calor em eixos embrionários, endospermas, embriões e sementes inteiras .....	40
4.2	Qualidade fisiológica das sementes de milho durante o desenvolvimento .....	42
4.2.1	Avaliação da expressão de proteínas resistentes ao calor durante o desenvolvimento de sementes de milho por meio da técnica de eletroforese .....	47

4.3	Quantificação de proteínas resistentes ao calor durante o desenvolvimento de sementes de milho, pelo método <i>Bradford</i> ...	50
4.4	Expressão gênica de proteínas resistentes ao calor durante o desenvolvimento de sementes de milho por meio da técnica de <i>qRT-PCR</i> .....	52
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	58
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	59
	<b>ANEXOS</b> .....	65

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem sido observado aumento da demanda de sementes híbridas de milho com alta qualidade, principalmente com a comercialização de transgênicos no Brasil, o que exige das empresas produtoras, altos padrões de qualidade, devendo ser associados a sistemas produtivos rentáveis. Ressalta-se que em 2010 foram comercializadas no País 219 mil toneladas de sementes de milho, sendo que a cultura apresenta alta taxa de utilização de sementes, 85% (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS - ABRASEM, 2009). Nesse novo cenário, investimentos em tecnologias são prioritários nas empresas, pois a produção de sementes é uma atividade especializada, e cuidados devem ser despendidos em todas as etapas do processo produtivo.

Uma das etapas importantes no processo de produção de sementes é a colheita a qual deve ser efetuada no momento adequado, com o intuito de reduzir ao máximo as possíveis perdas qualitativas e quantitativas. O atraso da colheita contribui substancialmente para a deterioração das sementes, uma vez que as mesmas estão sujeitas às condições adversas no campo. No Brasil tem sido priorizado o sistema de colheita em espiga, tendo em vista a possibilidade da colheita antecipada e menor incidência de danos mecânicos que normalmente ocorrem durante a colheita mecanizada a granel, além da otimização das estruturas de produção, de secagem e de beneficiamento (ROVERI JOSÉ, 2004). Em algumas pesquisas tem sido proposta a colheita das sementes de milho no estágio de desenvolvimento LL3, quando as mesmas apresentam 50% do endosperma duro. Nesse estágio, a maioria das sementes de diferentes cultivares encontra-se com altos teores de água, o que demanda a sua secagem artificial, operação que pode reduzir a qualidade das sementes, resultando em baixa germinação e vigor. No entanto, essa redução depende da expressão de genes

associados à característica de tolerância a altas temperaturas de secagem a qual varia com o genótipo.

À medida que a semente se desenvolve, ocorrem mudanças na expressão de proteínas, as quais possuem características e funções distintas. O aumento da expressão de proteínas resistentes ao calor, dentre outros mecanismos, parece estar envolvido na aquisição e manutenção da tolerância à dessecação, conferindo proteção contra as consequências da perda de água, em diferentes níveis de hidratação.

O entendimento da expressão desses genes é fundamental para o desenvolvimento de tecnologias de produção que garantam a produção e a comercialização de sementes com alta qualidade. Assim, objetivou-se neste trabalho, avaliar a qualidade fisiológica, quantificar e caracterizar o padrão de expressão de proteínas resistentes ao calor durante o desenvolvimento de sementes de milho de genótipos discrepantes em relação à tolerância à alta temperatura de secagem.



## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Mercado de sementes de milho e inovações tecnológicas**

A produção brasileira de milho na safra 2010/2011 foi de cerca de 56 milhões de toneladas de grãos (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2011). Considerando uma área colhida de 13,16 milhões de hectares estima-se uma demanda potencial por sementes de mais de 260 mil toneladas (ABRASEM, 2010). A taxa de utilização de sementes, no caso do milho, corresponde a 85% (ABRASEM, 2010), valor considerado alto quando comparado ao observado em outras espécies.

A alta taxa de utilização de sementes de milho deve-se ao valor agregado em sementes híbridas que resultam em maiores produtividades. Sabe-se que o aumento na produção, em plantas da geração F1, está diretamente relacionado com o efeito da heterose, fenômeno no qual o cruzamento entre variedades produz um indivíduo superior quanto ao rendimento e ao vigor (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2000). Outro fator a ser considerado é o aumento na comercialização de sementes transgênicas de milho no Brasil, o que exige das empresas produtoras, altos padrões de qualidade, devendo ainda, ser associados a sistemas produtivos rentáveis. Ressalta-se que em 2010 foram cultivados no Brasil cerca de sete milhões de ha de milho transgênico com aumento considerável de área cultivada em relação à safra de 2009.

Atualmente, o milho possui expressiva importância no mercado de sementes, correspondendo a 45% desse mercado. Também tem sido observado aumento da utilização de sementes de híbridos simples de milho correspondendo a 60% do mercado de milho no Brasil. Essa tendência dos agricultores utilizarem maior volume de sementes de híbrido simples representa mais investimentos em alta tecnologia (ABRASEM, 2009).

Nesse novo cenário, investimentos em tecnologias de produção de sementes são prioritários nas empresas, por ser a semente o veículo de toda tecnologia gerada nos programas de melhoramento. Assim, torna-se cada vez mais importante que as empresas produtoras de sementes invistam em programas de controle de qualidade interno, por meio dos quais são controladas todas as etapas do processo de produção, visando garantir a comercialização de sementes com alta qualidade.

Dentre as inovações tecnológicas, a colheita de sementes de milho em espigas tem sido priorizada pelas empresas produtoras de sementes, com tendência de colheita das sementes em estádios mais precoces de desenvolvimento. Por meio de algumas pesquisas tem sido demonstrada a viabilidade de colheita no estágio de desenvolvimento LL3, quando as sementes apresentam 50% de endosperma duro (FARIA et al., 2004). No entanto, a colheita nesse estágio requer a adequação de técnicas especiais de secagem, além do conhecimento sobre a influência do genótipo quanto à tolerância à dessecação.

Alguns mecanismos relacionados à tolerância à dessecação, exemplo de expressão de proteínas resistentes ao calor, parecem variar durante o estágio de desenvolvimento da semente e com o genótipo. Essas proteínas estão envolvidas na tolerância à dessecação conferindo proteção contra as consequências da perda de água, em diferentes níveis de hidratação (ROVERI JOSÉ, 2004). Dessa forma, é importante conhecer o nível de expressão dessas proteínas durante o desenvolvimento de sementes.

## **2.2 Desenvolvimento de sementes**

O desenvolvimento de sementes de milho exhibe o padrão clássico de desenvolvimento de sementes ortodoxas (WU et al., 2009). A embriogênese, o

acúmulo de compostos, como carboidratos, lipídeos e proteínas, e a secagem durante a maturação, são os três estágios típicos do desenvolvimento de sementes ortodoxas na planta-mãe. O estudo do desenvolvimento de sementes visa determinar o ponto no qual a semente pode ser desligada da planta-mãe, sem prejuízo para sua qualidade fisiológica.

Na fertilização, em que uma das células espermáticas do grão de pólen funde-se à oosfera para formar o zigoto, ocorre a restauração do número diploide de cromossomos próprio das células somáticas do milho. A outra célula espermática funde-se a um tecido formado a partir da diferenciação dos dois núcleos polares, dando origem a uma estrutura triploide, que formará o endosperma. Dessa forma, o desenvolvimento de sementes é fortemente influenciado pelo saldo de genoma dos parentais. Sendo assim, o embrião possui metade da informação dos cromossomos de origem paterna e metade de origem materna. Já no endosperma, dois terços dos cromossomos são de origem materna e um terço, paterna (DUMAS; ROGOWSKY, 2008). O acúmulo de substâncias de reserva começa no estágio de diferenciação e continua durante a maturação. Assim, no final da fase de diferenciação, células da camada de aleurona e do endosperma amiláceo são formadas, sendo então, os dois principais tipos de células. Dumas e Rogowsky (2008) estudando *Arabidopsis* mutante, a qual produzia apenas um núcleo reprodutivo no pólen, observaram que há uma sinalização do embrião para que o endosperma se desenvolva, mesmo que não tenha sido fertilizado.

Meyer, Pospisil e Scholten (2007) avaliaram a expressão gênica por meio da técnica *qRT-PCR* (quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction) durante o desenvolvimento de embriões de sementes híbridas de milho, seus recíprocos e parentais, e observaram que embriões com apenas seis dias após a fertilização já apresentam traços heteróticos.

Segundo Faria et al. (2004), durante a maturação de sementes de milho, ocorre a progressiva solidificação do endosperma leitoso, no sentido do ápice para a base da semente. Nesse período, a linha de leite é uma camada externamente visível na face oposta ao embrião, que limita as matrizes sólida e líquida do endosperma e é um marcador interessante para o acompanhamento do processo de maturação de sementes de milho.

Hunter et al. (1991), criaram uma metodologia para classificar as sementes de milho quanto ao estágio de desenvolvimento. Eles consideraram LL1-linha de leite 1, as sementes com 100% do comprimento preenchido com endosperma leitoso; LL2-linha de leite 2, as sementes com 25% do comprimento preenchido com endosperma sólido ou linha de leite localizada no quarto superior do comprimento da semente; LL3-linha de leite 3, as sementes com 50% do comprimento preenchido com endosperma sólido ou linha de leite no meio do comprimento da semente; LL4-linha de leite 4, as sementes com 75% do comprimento preenchido com endosperma sólido ou linha de leite localizada no quarto inferior da semente e; LL5-linha de leite 5, as sementes com 100% de endosperma sólido e linha de leite ausente.

Golovina, Hoekstra e Van Aelst (2000) estudaram, a habilidade potencial de células do endosperma de sementes de milho não diferenciadas adquirirem tolerância à dessecação. Antes que as células do endosperma se tornassem inviáveis, elas foram submetidas à secagem. Foi observado que células do endosperma não foram tolerantes à secagem rápida, concluindo os autores que durante o desenvolvimento, tolerância à dessecação não é adquirida em células do endosperma amiláceo.

A germinabilidade de sementes de milho aumenta com a perda de água natural no campo e pode ser obtida integralmente por meio de uma secagem a temperatura inicial moderada para sementes colhidas a partir do estágio de linha de leite 3 (FARIA et al., 2004). Segundo Rosa et al. (2000), a redução do teor de

água das sementes de milho, estimula a síntese de enzimas  $\alpha$ -amilase, permitindo o início do processo germinativo, após a reidratação.

Morfologicamente e bioquimicamente, importantes mudanças no desenvolvimento de sementes ocorrem durante a maturação. Esses incluem a rápida expansão dos cotilédones e concomitante síntese e acúmulo de proteínas, lipídeos e, em alguns casos, carboidratos. A maturação também envolve significantes adaptações fisiológicas que ocorrem com a indução do embrião à dormência, incluindo a acumulação de ABA (ácido abscísico). Durante a embriogênese tardia, o ABA previne a germinação precoce, anterior à dessecação, e promove a maturação do embrião. Esses eventos da maturação requerem a expressão coordenada de vários genes em resposta ao ABA, entre eles estão as *LEA* proteínas.

Para Hughes e Galau (1991) à medida que a semente se desenvolve, ocorrem mudanças na expressão de diferentes proteínas, as quais possuem características e funções distintas. A dessecação é caracterizada pelo acúmulo de um grupo particular de mRNAs e proteínas resistentes ao calor relacionadas a estes. Os mRNA destas proteínas aparecem em tecidos embrionários quando é iniciada a perda de água, e se tornam as mais abundantes espécies de mRNA na semente. Assim, tem sido observado que as proteínas resistentes ao calor são acumuladas em estádios mais avançados de desenvolvimento de sementes. Dessa forma, o estudo do desenvolvimento de sementes de milho é importante para a determinação do momento de colheita das sementes associado à tolerância a altas temperaturas de secagem e ao genótipo.

### **2.3 Colheita em espigas e tolerância à dessecação de sementes de milho**

Dentre as tecnologias utilizadas para a produção de sementes de milho com alta qualidade destaca-se a colheita em espigas. Por meio desse método a

colheita das sementes é realizada próximo ao ponto de maturidade fisiológica (PMF), quando as mesmas se encontram com teor de água mais elevado. Uma importante vantagem dessa técnica é a possibilidade de antecipação da colheita, por permitir a obtenção de sementes de melhor qualidade fisiológica e sanitária, por evitar danos que possam ocorrer no campo devido às condições climáticas adversas, bem como ataques de pragas e de microrganismos. Além disso, a colheita antecipada permite um melhor planejamento de rotação de culturas e a otimização das estruturas de recepção, secagem e beneficiamento de sementes (VEIGA et al., 2007).

A tolerância à dessecação é bastante incomum em eucariotos, porém sementes denominadas ortodoxas, além de tolerar a dessecação podem sobreviver no estado desidratado por períodos relativamente longos de acordo com as condições de armazenamento (TOLLETER et al., 2007).

No estágio final da maturação de sementes ortodoxas o teor de água diminui consideravelmente. Uma das principais características das sementes ortodoxas é a sua capacidade de resistir à alta taxa de dessecação. Mecanismos de tolerância à dessecação de sementes têm sido estudados por vários autores e uma ampla gama de moléculas tem sido identificadas, exemplo de prolina, oligossacarídeos e *LEA* (*late embryogenesis abundant*) proteínas.

Tolerância à dessecação é uma característica complexa e, conseqüentemente, um conjunto de mecanismos está envolvido na proteção e reparação de estruturas celulares para lidar com a sobrevivência no estado seco e posteriormente a embebição. A repressão controlada do metabolismo oxidativo para evitar estresse, o acúmulo de moléculas de proteção (principalmente açúcares e proteínas) e a transição para um estado vítreo no citosol, tudo isso contribui para tolerância à dessecação. Em nível de proteína, outra forma de tolerância à dessecação é o acúmulo de proteínas de choque térmico (HSP) (MACHEREL et al., 2007).

As proteínas resistentes ao calor foram descobertas há quatro décadas e têm sido consistentemente associadas com a tolerância à dessecação devido ao seu perfil de expressão e sua hidrofiliidade (CUMING, 1999). Segundo Wise e Tunnacliffe (2004), essas proteínas possuem baixa complexidade de sequência e aparente falta de estrutura definida. Uma série de mecanismos tem sido proposta para justificar o seu papel na tolerância à dessecação: a substituição da água; o sequestro de íons; a estabilização da membrana e, macromoléculas.

Uma grande diversidade de características estruturais e bioquímicas tem sido relatada para as proteínas resistentes ao calor. Segundo Boucher et al. (2010) uma característica importante da sobrevivência no estado seco é a capacidade de proteger as membranas em fase de transição, impedindo a perda de integridade. Esse papel tem sido atribuído a deidrinases, proteínas *heat shocks* e proteínas *LEA*.

As *LEA* proteínas foram inicialmente descritas a partir de sementes de algodão maduro e parecem ter função de osmoproteção. Após a remoção da água citoplasmática, as estruturas dessas proteínas podem sofrer desidratação induzida. Essas características biofísicas sugerem que as proteínas *LEA* podem realizar uma função dupla em estados diferentes da água (SHIH, 2008). Essas proteínas são capazes de proteger estruturas celulares ou amenizar o efeito do estresse causado pela dessecação. Isso é possível devido à sua característica altamente hidrofílica que parece estar ligada a sua ocorrência em estruturas celulares específicas. A composição de aminoácidos das *LEA* proteínas e sua alta concentração nas células sugerem que elas não possuem função enzimática. As proteínas *LEA* possuem motivos repetidos que podem ser classificados em vários grupos, de acordo com as características de sua estrutura primária e que desempenham um papel importante na tolerância à dessecação, sendo que a sua expressão geralmente coincide com a tolerância à dessecação (MACHEREL et al., 2007).

Após a dessecação, as sementes denominadas ortodoxas podem atingir níveis de até 5-10% de teor de água com pouca ou nenhuma perda de viabilidade. Quando a desidratação ocorre, o citoplasma condensa e componentes intracelulares tornam-se mais densos. Essas condições podem proporcionar um ambiente propício para várias interações indesejáveis que podem levar à agregação de proteínas e desnaturação.

A expressão de *LEA* proteínas é induzida pelo fitohormônio ABA, ácido abscísico, relacionado com o estresse, podendo então ser ativado por ABA endógeno ou aplicação exógena. Enquanto as proteínas *LEA* são principalmente ativas durante o desenvolvimento das sementes, seus respectivos genes são também induzidos em resposta ao estresse hídrico em fase vegetativa e estruturas reprodutivas (BIES et al., 1998).

Por meio da análise proteômica de mitocôndrias de sementes tem sido observada, segundo Macherel et al. (2007), a presença abundante de *LEA* proteínas e *heatshocks*. Essas proteínas protegem as enzimas que atuam na respiração, contra danos causados pela dessecação no estado vítreo. Segundo Manfre et al. (2009), essas proteínas e seus RNAm desaparecem logo após a embebição. Assim, é possível que algumas *LEA* proteínas tenham duplo papel durante o ciclo da vida vegetal, e funcionam como uma proteína de armazenamento durante a germinação, bem como na tolerância à dessecação durante desenvolvimento da semente.

Em função das vantagens que a colheita de sementes de milho em espiga apresenta e do interesse das empresas em realizar a colheita em estádios precoces de desenvolvimento torna-se importante estudar a tolerância das sementes, assim como a expressão de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho.



## 2.4 Expressão gênica

Muitos eventos relacionados ao crescimento, desenvolvimento de plantas ou até mesmo em resposta a vários estímulos são resultantes da alteração da expressão gênica. A determinação qualitativa e quantitativa dos níveis de transcritos de células vegetais permite que genes, diferencialmente expressos possam ser identificados, e conseqüentemente, sua função metabólica pode ser investigada (KUHN et al., 2001). A expressão gênica pode ser estudada em nível proteico ou de transcritos das células. A maximização da sensibilidade dos métodos de quantificação tem levado ao desenvolvimento de técnicas cada vez mais complexas, dentre elas o *PCR* Quantitativo em Tempo Real (*qRT-PCR*), que já é usado há bastante tempo na área médica, e mais recentemente como ferramenta nos estudos de expressão gênica e quantificação de sequências específicas em plantas.

O *qRT-PCR* difere do *PCR* clássico pela mensuração do produto de *PCR* amplificado em cada ciclo da reação da *PCR*. Na prática, uma câmera de vídeo grava a luz emitida por um fluoróforo que é incorporado dentro dos novos produtos amplificados. Assim, o *qRT-PCR* permite que a amplificação seja acompanhada em tempo real, durante a fase exponencial da corrida, fazendo com que a quantidade de material inicial seja determinada precisamente. Comparado com outras técnicas de avaliação existentes, essa permite uma detecção de um dado ácido nucleico de maneira rápida, específica e muito sensível (GACHON; SAINDRENAN, 2004).

Um dos agentes que tem a capacidade de intercalar às fitas duplas de DNA gerando fluorescência é o *SYBRGreen*, permitindo assim a quantificação de cDNA em tempo real. Esse agente possui tecnologia simples e custo relativamente baixo quando comparado aos demais. Também permite gerar a

curva de dissociação do DNA e por meio de *softwares* calcula-se a temperatura de fusão ( $T_m$ ) do fragmento após a *PCR* (FAJARDO et al., 2008).

A quantificação é a característica mais importante do *qRT-PCR*. A quantificação absoluta é calculada com auxílio de uma curva padrão. A quantificação relativa pode ser deduzida considerando diferenças de  $C_t$  (ciclo *threshold*), que é o número de ciclos no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha de base (*threshold*), entre as amostras e padrões de expressão constitutiva (BUSTIN, 2000). Para esses padrões são necessários genes de referência endógenos, os quais irão fornecer um valor estimado da quantidade de DNA ou cDNA total da amostra, sendo que a quantificação relativa será baseada nesses genes. É importante que o gene de referência endógeno atenda a três requisitos: ser específico para a espécie a ser estudada, exibir baixo número de cópias e baixa heterogeneidade entre cultivares (DING et al., 2004).

Comparada com o *PCR* clássico, uma das principais vantagens do *qRT-PCR* é a rapidez em fornecer dados confiáveis. É altamente sensível na detecção de DNA ou RNA devido à combinação de amplificação e o sistema de detecção. Em qualquer caso a especificidade do processo pode ser checada depois da completa corrida de *PCR*, por gel de eletroforese, curva de dissociação e dados de sequenciamento.

Essa técnica tem sido utilizada em estudos com plantas para a determinação do número de inserções de T-DNA em plantas transgênicas (INGHAN et al., 2001; YANG et al., 2005), quantificar o nível de transcritos em órgãos vegetais (HERNANDEZ et al., 2001; WANG et al., 2012), estudar famílias de genes (JANG et al., 2004), estudar o perfil de expressão de genes envolvidos na transdução de sinais (ADAMS-PHILLIPS et al., 2004), e quantificar a presença de transgênicos em grãos e sementes (NASCIMENTO, 2010).

Na cultura do milho, a expressão gênica utilizando *qRT-PCR* em tempo real, foi utilizada por Luo et al. (2008), no intuito de estudar as características da expressão gênica durante o desenvolvimento das sementes. Foi observado que os genes que conferem atividade de defesa antifúngica nas sementes apresentam-se de maneira mais significativa 40 dias após a polinização. Já Uzarowska (2009), empregou essa técnica para analisar genes de resistência a vírus. Pôde-se observar um padrão na expressão de genes relacionados com a resistência ao mosaico da cana-de-açúcar (SCMV) em milho. Além disso, foram identificados possíveis marcadores para a manipulação de resistência ao SCMV.

Segundo Thomas (1993), a expressão de proteínas em sementes é rigorosamente tecido-específica. A expressão ocorre principalmente no eixo embrionário e cotilédone e, em alguns casos, no endosperma em desenvolvimento. Os padrões de expressão gênica de proteínas em sementes são altamente regulados espacialmente e temporalmente durante o desenvolvimento de sementes e as proteínas podem ser armazenadas. Essa especificidade tem sido útil, especialmente, em estudos de expressão gênica da embriogênese.

Outra técnica importante para a análise de expressão de proteínas resistentes ao calor é a eletroforese, sendo essa uma técnica qualitativa e semiquantitativa, devido à separação de acordo com o peso das moléculas. Menezes et al. (2008), utilizaram a técnica da eletroforese para a identificação de cultivares de milho por meio de proteínas resistentes ao calor, e puderam observar diferentes padrões eletroforéticos dessas proteínas para todas as linhagens e híbridos estudados.

A quantificação de proteínas totais pode ser realizada ainda pela técnica de espectrofotometria, pelo método *Bradford*, por meio do qual podem ser quantificadas proteínas específicas se houver um procedimento anterior de isolamento. Binotti et al. (2008), utilizaram o método *Bradford* para quantificar proteínas presentes na solução de embebição do teste de condutividade elétrica

em sementes de feijão submetidas a diferentes tempos no teste de envelhecimento artificial. Foi possível observar que as quantidades de proteínas nas soluções foram próximas até 144 horas de envelhecimento e foi máxima em 168 horas.

Diante do exposto as técnicas de *PCR* em tempo real, eletroforese e espectrofotometria podem ser alternativas em estudos de expressão de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho, as quais estão relacionadas à tolerância à dessecação.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

A pesquisa foi conduzida na área experimental e no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, cujas coordenadas são latitude 21°14'S, longitude 40°17'W e altitude de 918,80m. Essa região apresenta clima tipo Cwb da classificação de Koppen. A temperatura média anual é de 19,4°C e a pluviosidade se distribuem, principalmente de outubro a abril, com valores anuais de 1529,7 mm.

#### **3.1 Ensaio 1: avaliação de proteínas resistentes ao calor em eixo embrionário, endosperma, escutelo e semente inteira**

Em uma primeira etapa da pesquisa foi avaliada a presença de proteínas resistentes ao calor (*LEA*) em eixo embrionário, endosperma, embrião e semente inteira, por meio da técnica de eletroforese de proteínas. Para isso, as sementes de milho da linhagem 57 foram colhidas manualmente em dois estádios de linha de leite: LL3 (50% do endosperma sólido) e LL5 (endosperma completamente sólido, linha de leite ausente). A debulha das sementes foi manual e as análises foram realizadas em sementes não submetidas à secagem. Foram utilizadas apenas as sementes do terço central da espiga. Após a colheita as sementes foram armazenadas a -84°C até a realização das análises.

##### **3.1.1 Análise eletroforética de proteínas resistentes ao calor**

Para a análise eletroforética de proteínas resistentes ao calor, parte das sementes foi embebida por período de cinco horas e a outra parte não foi embebida. Em seguida, foram utilizados 11 eixos embrionários, 11 endospermas,

11 embriões e 11 sementes inteiras colhidas nos dois estádios de desenvolvimento. Os materiais correspondentes a cada tratamento foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-84^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração proteica.

As amostras foram moídas por um minuto e quinze segundos em mortar sobre gelo, na presença de solução tampão (50mM tris-HCL-7,5; 500mM NaCL; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 1mM PMSF) na proporção de 1:10 (peso do material: volume tampão de extração), e transferidos para microtubos de capacidade de 1500 $\mu\text{L}$ . Os homogeneizados foram centrifugados a 14000rpm por 30 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ , e o sobrenadante foi incubado em banho-maria a  $85^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos e novamente centrifugado. O sobrenadante foi vertido em microtubos e o *pellet*, descartado. Antes da aplicação no gel, os tubos de amostras contendo 70 $\mu\text{L}$  de extrato + 40 $\mu\text{L}$  de solução tampão da amostra (2,5mL de glicerol; 0,46g de SDS; 20mg de azul Bromofenol e completado o volume para 20 ml de tampão de extração Tris pH 7,5) foram colocados em banho-maria com água em ebulição por 5 minutos (BLACKMAN et al., 1991). Foram aplicados 50 $\mu\text{L}$  do extrato com proteínas LEA + tampão da amostra por canaleta, em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi realizada a 150 v e os géis corados em Coomassie Blue a 0,05%, durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10% (ALFENAS, 2006).

### **3.2 Ensaio 2: avaliação da qualidade fisiológica e expressão de proteínas resistentes ao calor durante o desenvolvimento de sementes de milho**

Foi instalado um campo para a multiplicação de sementes de quatro linhagens cedidas pela empresa Genes Seeds Ltda. Entre as linhagens utilizadas, duas eram classificadas de alta tolerância à alta temperatura de secagem

(linhagem 30 e 91) e duas de baixa tolerância (linhagem 43 e 57), de acordo com seleção anterior realizada por Roveri José et al. (2004).

Para cada linhagem foram utilizadas 10 linhas de 10 metros com o espaçamento entre linhas de 0,8 m e 7 plantas por metro, em quatro blocos. O solo foi preparado convencionalmente e as correções de acidez foram realizadas de acordo com a análise química do mesmo. A adubação de cobertura, assim como, os demais tratamentos culturais foram realizados de acordo com os recomendados para a cultura.

Para prevenir cruzamentos indesejados, no florescimento, as espigas foram protegidas com sacos plásticos, antes da emissão dos estilo-estigmas. Quando os estilo-estigmas se apresentaram receptivos foram realizadas manualmente as autofecundações.

Durante o desenvolvimento das sementes foi feito o acompanhamento da solidificação do endosperma por meio da linha de leite, sendo que a colheita das sementes foi realizada nos estádios de desenvolvimento, de acordo com a classificação de Hunter et al. (1991), LL1 (100% do endosperma leitoso) sendo esse estágio alcançado aos 19 dias após a polinização para as linhagens 30, 57, 91, e aos 21 dias para a linhagem 43, LL2 (25% do endosperma sólido), LL3 (50% do endosperma sólido), LL4 (75% do endosperma sólido) e LL5 (100% do endosperma sólido). As sementes foram submetidas à avaliação da qualidade física e fisiológica e à análise da expressão de proteínas resistentes ao calor por meio da técnica de eletroforese e pela técnica qRT-PCR. Foi realizada ainda, a quantificação dessas proteínas pela técnica de espectrofotometria. Para essas análises, as sementes foram armazenadas em *Deep freezer* até o momento da extração. A colheita das sementes foi realizada aleatoriamente nos campos de produção e em quantidade que atendia a demanda para a realização das análises.

### **3.2.1 Teor de água**

O teor de água das sementes foi determinado pelo método de estufa a 105°C durante 24 horas, utilizando-se duas subamostras de cada tratamento, conforme as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em percentagem média (base úmida).

### **3.2.2 Teste de germinação**

O teste de germinação foi conduzido, com quatro repetições de 50 sementes, com a semeadura entre papel toalha tipo Germitest umedecido com água destilada na proporção de 2,5 ml.g-1 de papel. As sementes permaneceram no germinador regulado para 25°C e as avaliações das plântulas normais foram efetuadas em duas contagens, sendo a primeira no quarto dia e a última no sétimo dia após a semeadura segundo recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em percentagem média de plântulas normais das quatro repetições.

### **3.2.3 Primeira contagem de germinação**

Efetuada em conjunto com o teste de germinação, a primeira contagem foi realizado no quarto dia após a semeadura, computando-se a porcentagem de plântulas que apresentaram, pelo menos, duas raízes seminais e parte aérea com dois centímetros de comprimento.



#### **3.2.4 Envelhecimento artificial**

O método utilizado foi o de minicâmara do tipo "gerbox" onde as sementes foram distribuídas sobre uma tela suspensa no interior da caixa contendo 40 mL de água. As sementes permaneceram incubadas durante 96 horas, à temperatura de 41°C. Em seguida foi efetuado o teste de germinação como descrito anteriormente. Aos cinco dias após a semeadura foram computadas as plântulas normais que apresentaram pelo menos dois centímetros de parte aérea e duas raízes seminais.

#### **3.2.5 Teste de frio sem solo**

Quatro repetições de cinquenta sementes, por repetição, foram distribuídas em papel toalha tipo Germitest umedecido com água em quantidade igual a três vezes o peso do papel seco. Os rolos foram confeccionados como no teste de germinação e após a semeadura foram acondicionados no interior de sacos plásticos e mantidos em câmara regulada a 10°C durante sete dias. Decorrido esse prazo, os rolos foram transferidos para o germinador regulado para 25°C e aos sete dias, as plântulas, apresentando pelo menos 2 cm de parte aérea e duas raízes seminais, foram computadas como plântulas normais (DIAS; BARROS, 1995).

#### **3.2.6 Análise da expressão de proteínas resistentes ao calor por meio da técnica de eletroforese**

Para a análise eletroforética de proteínas resistentes ao calor, foram extraídos 11 embriões de sementes colhidas nos diferentes estádios de desenvolvimento. As sementes foram embebidas por período de cinco horas para

facilitar a extração dos embriões, os quais foram colocados em microtubos e mantidos a  $-81^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração proteica. Esses procedimentos foram definidos a partir dos resultados obtidos no Ensaio 1. O procedimento para a eletroforese foi o mesmo descrito no Ensaio 1.

Ao *pellet* obtido, foi adicionado à solução tampão, na proporção 1:1 (solução tampão: material), com o objetivo de verificar se ainda havia proteínas resistentes ao calor nesse material, segundo procedimentos prescritos no protocolo. Os procedimentos seguintes foram os mesmos do item 3.1.1.

### **3.2.7 Quantificação de proteínas**

Os embriões foram moídos por um minuto e quinze segundos em mortar sobre gelo, na presença de solução tampão (50mM tris-HCL-7,5; 500mM NaCL; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 1mM PMSF) na proporção de 1:10 (peso do material: volume tampão de extração), e transferidos para microtubos de capacidade de 1500 $\mu\text{L}$ . Os homogeneizados foram centrifugados a 14000 rpm por 30 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ , e o sobrenadante foi incubado em banho-maria a  $85^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos e novamente centrifugado. O sobrenadante foi vertido em microtubos e o *pellet*, descartado. Os microtubos com o sobrenadante foram colocados em banho-maria em ebulição por cinco minutos. Em seguida foi realizada a determinação de proteínas segundo o método *Bradford* (BRADFORD, 1976) utilizando-se albumina de soro bovino para a construção de curva de calibração. Foram utilizados 5 mL de solução corante e 100  $\mu\text{L}$  da amostra preparada. O resultado da quantificação foi expresso em  $\mu\text{g/g}$  de semente.

### **3.2.8 Análise da expressão de proteínas resistentes ao calor por meio da técnica de qRT-PCR**

A expressão de proteínas resistentes ao calor por meio da técnica de qRT-PCR foi dividida em quatro etapas: Extração e Purificação do RNA, Transcrição reversa para síntese do cDNA, PCR em tempo real, e Análise dos resultados.

#### **3.2.8.1 Extração e Purificação do RNA**

Para a extração do RNA as sementes colhidas nos diferentes estádios de desenvolvimento foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e com a adição do reagente *Pure Link RNA Plant*<sup>®</sup> (*Invitrogen*), seguindo as especificações do manual do fabricante.

Foram maceradas cinco sementes em nitrogênio líquido, das quais 100 mg foram transferidos para o microtubo, juntamente com 500 µL do reagente *Concert* gelado (4°C) e homogeneizados em vórtex. Em seguida, os tubos foram deixados à temperatura ambiente por cinco minutos. Após esse período, o material foi submetido à centrifugação por dois minutos, à temperatura ambiente, com velocidade de 14.000xg, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Em seguida, foram adicionados 100 µL de NaCl 5 M e as amostras homogeneizadas em vórtex, por cinco segundos. Na sequência, foram adicionados 300 µL de clorofórmio e os tubos foram submetidos à inversão por 5 X. Para separar as fases, as amostras foram submetidas à centrifugação de 14.000, durante dez minutos, à temperatura de 4° C, e a fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo. Em seguida, foi adicionado um volume equivalente à fase aquosa de isopropanol gelado e homogeneizados em vórtex, durante cinco segundos. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente

por dez minutos e posteriormente foram submetidas à centrifugação também por dez minutos a 4° C e 14.000. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado e os tubos foram submetidos à centrifugação por 1 minuto, à temperatura ambiente (14.000). O líquido residual foi removido do tubo utilizando pipeta e o RNA foi ressuspensionado em 20 µL de água Milli-Q autoclavada. As amostras foram armazenadas a -20° C.

A integridade e pureza do RNA foram avaliadas em todas as etapas com a utilização da eletroforese em gel de agarose desnaturante (corados com SYBR® *Green II*, *Applied Biosystems*) e em espectrofotômetro (*NanoVue*). Foram separadas alíquotas para evitar o descongelamento diário do RNA estoque, evitando a sua degradação e contaminação.

Após as extrações dos ácidos nucleicos, as amostras foram tratadas com DNase *Free* para evitar qualquer contaminação com DNA. Para isso foi utilizado o *Kit DNase Turbo Free*® AMBIOM de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante.

Para comprovar a eficiência do tratamento com DNase foi realizada uma reação de *PCR* convencional. Como controle positivo foi utilizado uma amostra de DNA genômico de milho. O *primer* utilizado foi o correspondente ao gene constitutivo Zeína. Foi preparado um gel de agarose 1,5% e corado com brometo de etideo para visualização das possíveis ampliações.

### **3.2.8.2 Transcrição reversa para síntese do cDNA**

Após o processo de extração e purificação, os RNAm foram utilizados como molde para a síntese de cDNA. Foi utilizado *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription cDNA*® da *Applied Biosystems*, segundo protocolo recomendado pelo fabricante. Primeiramente, o RNA foi preparado a uma concentração de 1 µg em um volume final de 10 µL. Após essa etapa, foi

preparado um *mix* contendo 2 µL do tampão da enzima, 2 µL do primer RT *Random Primers*, 0,8 µL do mix dNTP (100 mM), 1 µL *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*, e água para um volume final de 10 µL/amostra. Para cada solução preparada de 10 µL de RNA a 1 µg, foram acrescentados 10 µL desse mix. Os tubos foram submetidos ao termociclador *Multigene Gradient Labnet*, programado em três etapas: 10 min a 25°C para o anelamento dos *primers*; 2 h a 37°C para ação da enzima e 5 min a 85°C para inativá-la. As amostras foram armazenadas em *freezer* a -20°C.

A eficiência da síntese de cDNA foi comprovada por meio de *PCR* convencional. Como controle positivo foi utilizada uma amostra de DNA genômico de milho, e utilizado o *primer* correspondente ao gene constitutivo Zeína. Foi preparado um gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo para visualização das ampliações.

### 3.2.8.3 Desenho dos *primers*

Os genes-alvo foram baseados em diferentes proteínas resistentes ao calor, *LEA* proteína, *dehidrinas* e *heat shocs*, escolhidos por sua importância conhecida na tolerância à dessecação em sementes, após revisão bibliográfica.

As sequências dos genes-alvo escolhidos foram encontradas por meio de busca no banco de dados do genoma milho sequenciado no *GenBank*. Com base nessas sequências foram desenhados os *primers* utilizando-se o *software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems)*. As sequências dos *primers* estão apresentadas na Tabela 1. Foram utilizados como controle endógeno os genes da Ubequitina e ADH (SCHOLDBERG, 2009).

Tabela 1 Primers utilizados na análise de *qRT-PCR*

Gene		Sequência 5'-----3'
<i>late embryogenesis abundant protein D-34</i>	F	CCGGCTCCACGCAGAAC
	R	TATAGGCGTAGCCCTGCATGA
<i>late embryogenesis abundant protein</i>	F	TGCAGCCTCCTAGTGCTTGTAC
	R	TGGAAGAGGACCTGGGATTG
<i>heat shock protein1</i>	F	CATGAAGGACGAAACCAAAGG
	R	TCTGGAAGCCCAACAACCA
Ubiquitina	F	AAGGCCAAGATCCAGGACAA
	R	TTGCTTTCCAGCGAAGATGA
Desidrogenase Alcoólica ADH	F	AGGACGCTGAGTTAAGACC
	R	CACATTTGGCAGATCAGTGC

(F) sequência do primer *forward* e (R) sequência do primer *reverse*

#### 3.2.8.4 PCR em tempo real

Para as análises foi utilizado o aparelho de *real-time PCR Sistem 7500* (*Applied Biosystems*). A *qRT-PCR* foi realizada utilizando o SYBR® *Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*) e as amostras de cDNA sintetizadas a partir do RNA extraído. As condições térmicas da reação foram 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, e finalizando com 15 segundos a 95°C. Os dados foram coletados e armazenados no programa *7500 Fast Software* (Versão 2.1). Para cada reação, foram utilizados 1,0 µL de cDNA, 0,2 µL de cada *primer* e 5,0 µL de *Master Mix SYBR green* UDG com ROX (*Invitrogen*) para um volume final 10,0 µL/amostra. Controles negativos, compostos por água, e controles endógenos foram incluídos em todas as análises. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

A coleta de dados foi realizada por meio do *software* v. 2.0.1, do sistema 7500 de *PCR* em tempo real (*Applied Biosystems*). Foi utilizado o método *Ct* comparativo para quantificação relativa, onde os *Ct*'s (*Ciclo threshold*) das amostras foram normalizados usando os *Ct*'s dos controles endógenos. Para isso, previamente foi realizado um experimento de validação, a fim de verificar que as eficiências de amplificação dos genes-alvo e endógenos são similares e próximas de 100%. As curvas padrão, para o teste de eficiência, para os genes em estudo foram geradas a partir das seguintes diluições: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 e 1:3125. Esse procedimento também permitiu a definição da melhor diluição do cDNA para ser utilizada em cada reação, que foi de 1:5.

#### 3.2.8.5 Análise dos resultados

As amostras correspondentes às sementes colhidas no estágio LL1 foram consideradas como sendo amostras calibradoras, por se esperar menor expressão dos genes estudados nas mesmas. Para a quantificação da expressão gênica pela técnica de *PCR* em tempo real, os valores obtidos correspondentes aos níveis de mRNA's das amostras foram comparados relativamente aos valores dos níveis de mRNA's dos controles. Após a obtenção dos dados brutos, estes foram analisados por meio do programa 7500 *Software* SDS (Versão 2.0.1). Para calcular o nível de expressão dos genes de interesse foram considerados: *Ct* (aumento exponencial do produto de *PCR*) do gene-alvo e controle endógeno,  $\Delta Ct = Ct \text{ (amostra)} - Ct \text{ (controle endógeno)}$  e o  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (amostra)} - \Delta Ct \text{ (calibrador)}$ . Em seguida o nível de expressão foi calculado pela fórmula:  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### **3.2.9 Procedimento estatístico**

Nos testes realizados para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes foi utilizado o delineamento experimental de blocos casualizados, em esquema fatorial 4 X 5 (quatro linhagens e cinco estádio de desenvolvimento) com quatro repetições para os testes de germinação e primeira contagem de germinação, e esquema fatorial 3 X 5 (três linhagens e cinco estádios de desenvolvimento) com quatro repetições para os testes de envelhecimento artificial e teste de frio. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de agrupamento Scott Knott ao nível de 5%. As análises foram realizadas no programa estatístico R 2.14.1 (2011).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação de proteínas resistentes ao calor em eixos embrionários, endospermas, embriões e sementes inteiras

Maior expressão das proteínas resistentes ao calor foi observada no embrião das sementes em ambos os estádios de desenvolvimento (FIGURA 1 e FIGURA 2), sendo que, a maior expressão foi observada no estádio LL5 (FIGURA 2). Esses resultados estão de acordo com *Wise e Tunnacliffe (2004)*, segundo os quais a maior parte das proteínas resistentes ao calor se forma na fase final de desenvolvimento do embrião.

Nos protocolos de extração de proteínas resistentes ao calor observados na literatura, geralmente recomendam-se a utilização do eixo embrionário das sementes de milho embebidas por cinco horas (MENEZES et al., 2008; ROVERI JOSÉ et al., 2004), porém nos estádios de desenvolvimento menos avançados se torna difícil a sua separação da semente inteira.

Quanto ao tratamento de embebição foi observada em sementes inteiras e não embebidas, colhidas no estádio de desenvolvimento LL3, maior expressão das proteínas resistentes ao calor (Figura 1). Da mesma forma, em sementes colhidas no estádio de desenvolvimento LL5 (Figura 2), foi observada maior expressão em sementes não embebidas quando da avaliação no endosperma e eixo embrionário. Ressalta-se que no embrião, tecido no qual foi observada maior expressão de proteínas resistentes ao calor, não houve diferença nos padrões de expressão, quando da utilização ou não da embebição.

Albuquerque et al. (2009) observaram uma redução na expressão de proteínas resistentes ao calor em sementes de sucupira-preta a medida que se avança nos estádios de embebição. Essa redução pode estar relacionada à lixiviação das proteínas resistentes ao calor que são hidrofílicas. Porém, conforme Manfre et al. (2009), a redução da expressão de LEAs proteínas

quando da embebição de sementes pode ser uma evidência de que algumas dessas proteínas tenham duplo papel durante o ciclo da vida vegetal, funcionando como uma proteína de armazenamento durante a germinação e como uma proteína de proteção à dessecação durante desenvolvimento da semente.

O procedimento de embebição facilita a retirada dos embriões de sementes para posterior análise de proteínas resistentes ao calor. Assim é interessante adotar a extração de proteínas resistentes ao calor em embriões de sementes de milho pela maior expressão das proteínas e pela não alteração no padrão de expressão quando da embebição.

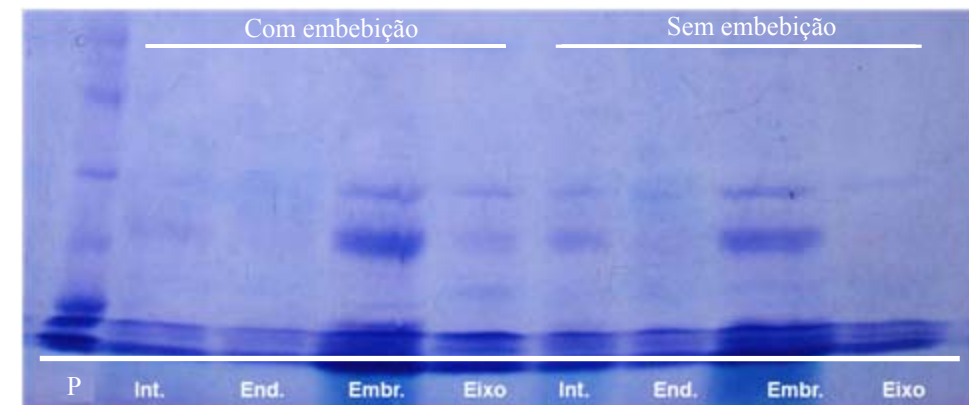


Figura 1 Padrão de proteínas resistentes ao calor extraídas de diferentes partes das sementes de milho da linhagem 57, colhidas no estágio LL3, com e sem embebição

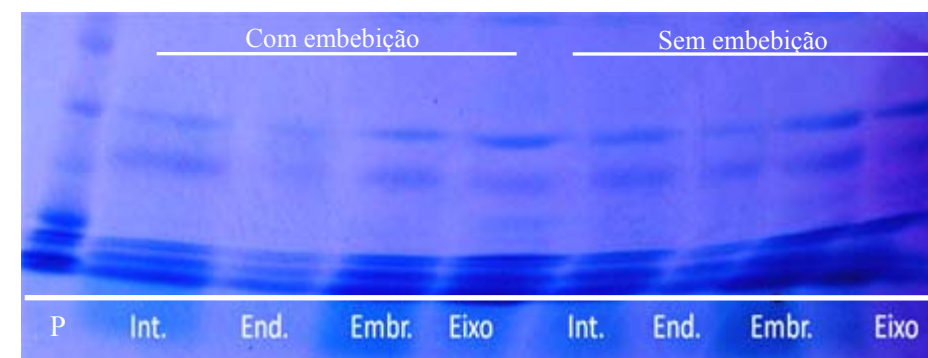


Figura 2 Padrão de proteínas resistentes ao calor em diferentes partes das sementes de milho da linhagem 57, colhidas no estágio LL5, com e sem embebição

#### 4.2 Qualidade fisiológica das sementes de milho durante o desenvolvimento

Pelos resultados da análise de variância, houve diferenças significativas para a interação entre linhagens e estádios de desenvolvimento para todas as variáveis analisadas (Anexo A).

Pelos resultados do teste de primeira contagem de germinação, a qualidade das sementes colhidas no estágio de desenvolvimento LL5 foi superior a das sementes colhidas nos demais estádios, para todas as linhagens (Tabela 3). Nos estágios LL1 e LL2 não foram observadas plântulas normais para nenhuma das linhagens, resultado também observado no teste de germinação. É possível que, nesses estádios, o aparato necessário ao processo de germinação ainda não se apresentava ativado. Houve um pequeno percentual de germinação em sementes colhidas no estágio LL3. Observa-se também que no estágio LL5 as sementes das linhagens 30 e 43 foram mais vigorosas que as demais. No entanto, no estágio LL4 maior vigor foi observado em sementes da linhagem 91. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Gomes et al. (2000), os quais relatam que a qualidade fisiológica é influenciada pelo genótipo. Ao

associar esses resultados com os observados para teor de água não há, a princípio, evidências de diferenças de teores de água das sementes que possam ter interferido nos resultados.

Tabela 2 Teor de água das sementes de milho das linhagens 43, 30, 57 e 91, colhidas nos diferentes estádios de desenvolvimento

Estádios	Linhagem			
	43	30	57	91
LL1	60,97	63,72	68,29	66,34
LL2	54,27	51,53	50,75	52,91
LL3	45,60	43,99	42,95	46,52
LL4	39,45	36,28	35,95	37,74
LL5	26,04	22,30	28,35	26,32

Tabela 3 Valores médios (%) de plântulas normais no teste de primeira contagem de germinação de sementes de milho das linhagens 43, 30, 57 e 91 colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento

Linhagem	Estádios				
	LL1	LL2	LL3	LL4	LL5
<b>43</b>	0 Ac	0 Ac	10 Ab	28 Bb	91 Aa
<b>30</b>	0 Ac	0 Ac	3 Bc	35 Bb	96 Aa
<b>57</b>	0 Ac	0 Ac	1 Bc	12 Cb	70 Ca
<b>91</b>	0 Ac	0 Ac	1 Bc	58 Ab	79 Ba

\*Médias com mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste Skott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade.

Os percentuais de germinação (Tabela 4) das sementes colhidas no estádio LL5 foram superiores aos das colhidas nos demais estádios de desenvolvimento, exceto para aquelas colhidas no estádio LL4 das linhagens 30 e 91.

Roveri José et al. (2004), ao trabalharem com essas mesmas linhagens, observaram altos valores de germinação para as linhagens 30 e 91 e menores valores para as linhagens 43 e 57, colhidas com aproximadamente 35% de teor de água e secadas artificialmente a 45°C até atingirem 11% de teor de água.

Tabela 4 Valores médios (%) de plântulas normais no teste de germinação de sementes de milho das linhagens 43, 30, 57 e 91 colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento

Linhagem	Estádios				
	LL1	LL2	LL3	LL4	LL5
<b>43</b>	0 Ad	0 Ad	42 Ac	68 Bb	99 Aa
<b>30</b>	1 Ac	0 Ac	13 Cb	98 Aa	99 Aa
<b>57</b>	2 Ac	2 Ac	1 Dc	22 Cb	93 Ba
<b>91</b>	0 Ac	3 Ac	31 Bb	97 Aa	100 Aa

\*Médias com mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste Skott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade.

Observa-se pela Tabela 1 que o teor de água das sementes da linhagem 30 e 57, no estágio de desenvolvimento LL5, era menor (22,30%) e maior (28,35%), respectivamente, em relação às demais linhagens. Roveri José et al. (2005), observaram que a secagem mais rápida das sementes está relacionada à estrutura do pericarpo, o que também pode acontecer no campo.

De uma maneira geral, a porcentagem de germinação tende a aumentar à medida que o teor de água diminui. O mesmo foi observado por Faria et al. (2004), os quais concluíram que a perda de água natural ocorrida no campo prepara as sementes para a germinação quando as mesmas são reidratadas.

Os testes de envelhecimento artificial (Tabela 5) e de frio (Tabela 6) foram realizados apenas em sementes das linhagens 30, 57 e 91, devido à pequena quantidade de sementes produzidas da linhagem 43 resultante da baixa produção da mesma.

Pelos resultados do teste de envelhecimento artificial (Tabela 5), observa-se que as sementes colhidas no estágio LL5 foram mais vigorosas que as dos demais estádios, resultado também verificado por Faria et al. (2004), em sementes de outros genótipos, não submetidas à secagem. As sementes colhidas no estágio LL1 também não germinaram após o envelhecimento acelerado.

Observou-se também nas sementes colhidas no estágio LL3 maior porcentual de plântulas normais após o envelhecimento das sementes em relação ao verificado no teste germinação. Segundo Faria et al. (2004), as condições em que é realizado o teste de envelhecimento artificial (temperatura de 42°C e alta umidade) pode favorecer a lixiviação e reduzir o conteúdo de ácido abscísico, tendo um efeito semelhante à secagem natural sobre as sementes, promovendo a germinação. Outra hipótese, segundo o mesmo autor, é que o estresse provoque um efeito de ativação de enzimas, aumentando a mobilização de reservas durante a germinação.

Tabela 5 Valores médios (%) de plântulas normais após o envelhecimento acelerado de sementes de milho das linhagens 30, 57 e 91 colhidas nos diferentes estádios de desenvolvimento

Linhagem	Estádios				
	LL1	LL2	LL3	LL4	LL5
<b>30</b>	0 Ad	0 Bd	21 Cc	71 Bb	98 Aa
<b>57</b>	0 Ad	7 Bc	31 Bc	86 Ab	97 Aa
<b>91</b>	0 Ad	27 Ad	51 Ac	69 Bb	98 Aa

\*Médias com mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste Skott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade.

Nos resultados obtidos no teste de frio (Tabela 6), o vigor das sementes colhidas no estágio LL5 foi superior aquelas colhidas nos demais estádios para a

linhagem 57. Já para a linhagem 30 o vigor das sementes colhidas no estágio LL5 não diferiu daquelas colhidas no estágio LL4, enquanto que para a linhagem 91, não houve diferença de vigor entre as sementes colhidas nos estágios de desenvolvimento LL3, LL4 e LL5. Observa-se também nas sementes da linhagem 91 colhidas no estágio LL2 vigor de 83% pelo teste de frio. Com base nesse resultado é provável que durante o período que as sementes permaneceram embebidas em temperatura baixa tenha favorecido a produção de giberelinas e lixiviação de ABA, fatores que estão envolvidos diretamente na germinação das sementes, pois no teste de germinação houve apenas 3% de sementes que germinaram (Tabela 4).

Tabela 6 Valores médios de plântulas normais pelo teste de frio sem solo de sementes de milho das linhagens 30, 57 e 91 nos diferentes estágios de desenvolvimento

Linhagem	Estádios				
	LL1	LL2	LL3	LL4	LL5
<b>30</b>	0 Ad	23 Cc	89 Bb	95 Aa	97 Aa
<b>57</b>	0 Ad	36 Bc	34 Cc	76 Bb	99 Aa
<b>91</b>	0 Ad	83 Ab	94 Aa	97 Aa	100 Aa

\*Médias com mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste Skott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade.

De uma maneira geral, maiores valores de germinação e vigor foram observados em sementes colhidas no estágio de desenvolvimento LL5. Em sementes da linhagem 91 foram observados maiores valores de germinação e vigor em estágios mais precoces de desenvolvimento (LL2 e LL3).

#### **4.2.1 Avaliação da expressão de proteínas resistentes ao calor durante o desenvolvimento de sementes de milho por meio da técnica de eletroforese**

Para a linhagem 43, classificada anteriormente como de baixa tolerância à dessecação, maior expressão de proteínas resistentes ao calor ocorreu no estágio de desenvolvimento LL5 (Figura 3-A). Em sementes colhidas nos estádios anteriores houve menor expressão dessas proteínas resistentes ao calor.

Já para a linhagem 57, também classificada como de baixa tolerância à dessecação, maior expressão de proteínas resistentes ao calor pode ser observada nos estágios LL4 e LL5, sendo ainda maior no estágio LL5 (Figura 3-B).

Para as linhagens 91 e 30, consideradas de alta tolerância à dessecação, foi observada expressão das proteínas resistentes ao calor já a partir do estágio LL2 (Figura 3-C e 3-D).



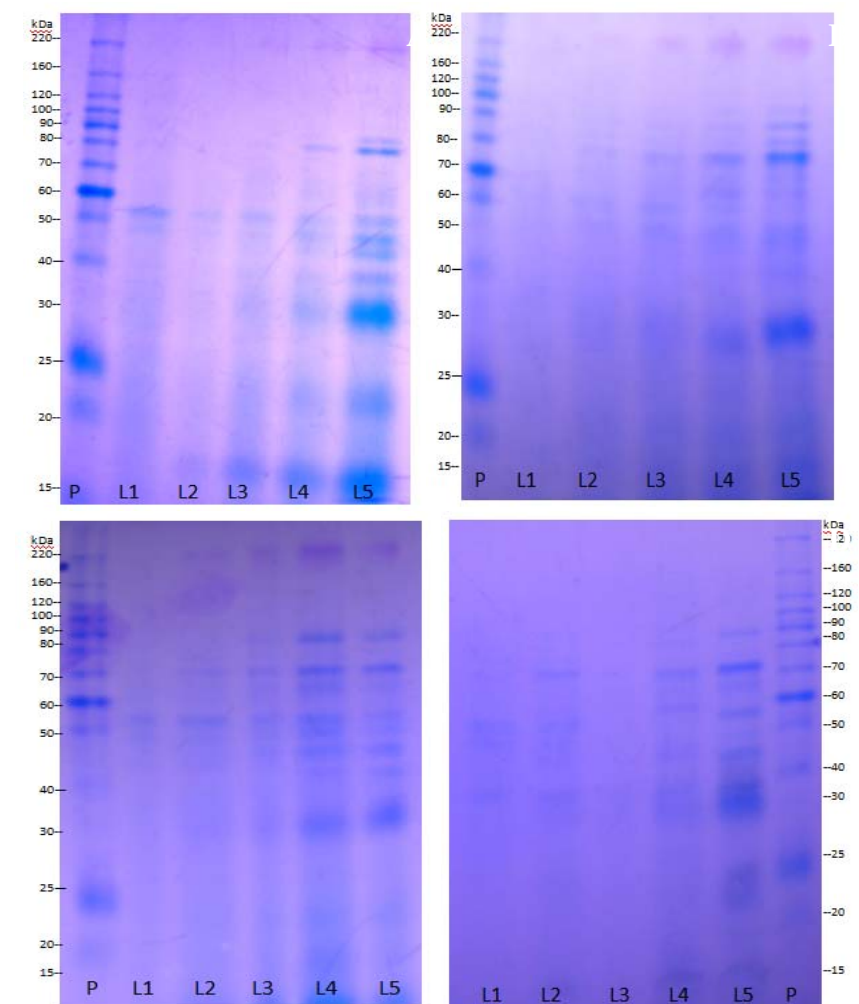


Figura 3 Padrão de proteínas resistentes ao calor de sementes de milho colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento P = padrão de proteínas. (A= 43, B= 30, C= 57 e D= 91)

Pode-se observar ainda pela Figura representada, que para as linhagens 91 e 30, classificadas como de alta tolerância a altas temperaturas de secagem ocorreu maior expressão em sementes colhidas nos estádios mais precoces de desenvolvimento. Em sementes colhidas no estágio de desenvolvimento LL5 a

diferença de expressão reduz. Assim, infere-se que em sementes de linhagens tolerantes à dessecação a expressão de proteínas resistentes ao calor é mais precoce. Roveri José et al. (2005), ao avaliarem as mudanças no padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em milho submetidas à alta temperatura de secagem, concluíram que não é possível determinar uma banda específica da fração das proteínas resistentes ao calor que possa servir como marcador de tolerância à alta temperatura de secagem.

Para a linhagem 91 (Figura 3-C) foi observada porcentagem de germinação superior em sementes colhidas em estádios de desenvolvimento mais precoces. No entanto, para correlacionar a expressão de proteínas resistentes ao calor com a qualidade fisiológica há a necessidade de isolar essa variável e inibir a expressão de outros genes associados à qualidade fisiológica.

Ao utilizar o *pellet* gerado durante a extração, o qual segundo o protocolo utilizado deve ser descartado por conter proteínas que se tornam insolúveis, devido ao tratamento à alta temperatura juntamente com outros resíduos, foi observado um padrão de proteínas resistentes ao calor diferente daquele observado no sobrenadante.

Para a linhagem 43 foi possível observar a expressão das proteínas em sementes colhidas no estágio LL2 (Figura 4). Para as demais houve expressão em sementes colhidas a partir do LL1. Observa-se que nas sementes colhidas no estágio de desenvolvimento LL1, o teor de água no momento da colheita foi semelhante, o que descarta a interferência nos resultados.

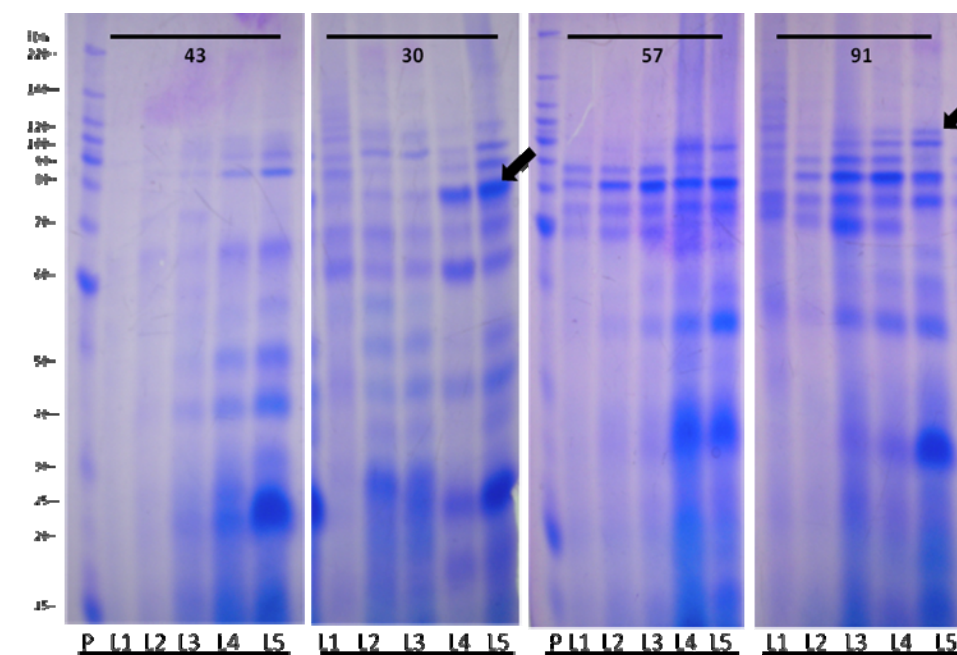


Figura 4 Eletroforese de proteínas resistentes ao calor durante o desenvolvimento de sementes de milho das linhagens 43, 30, 57 e 91 colhidas em diferentes estádios, utilizando o *pellet* da extração. P = padrão de proteínas

Observa-se de uma maneira geral que as proteínas presentes no *pellet* apresentam-se com maiores pesos moleculares, entre 200 e 60 KDa. Ao comparar os padrões de proteínas resistentes ao calor das linhagens com resistência à alta temperatura de secagem (91 e 30) com as de baixa (43 e 57), parece ocorrer a expressão de proteínas com pesos moleculares específicos.

#### 4.3 Quantificação de proteínas resistentes ao calor durante o desenvolvimento de sementes de milho, pelo método *Bradford*

Em relação à quantificação de proteínas resistentes ao calor por meio de espectrofotometria, de uma maneira geral, maiores quantidades dessas proteínas

foram observadas no estágio LL5, para todas as cultivares analisadas (Figura 5). Observa-se, também, uma quantidade crescente das proteínas medidas por meio dessa técnica, à medida que se avança nos estádios de desenvolvimento das sementes.

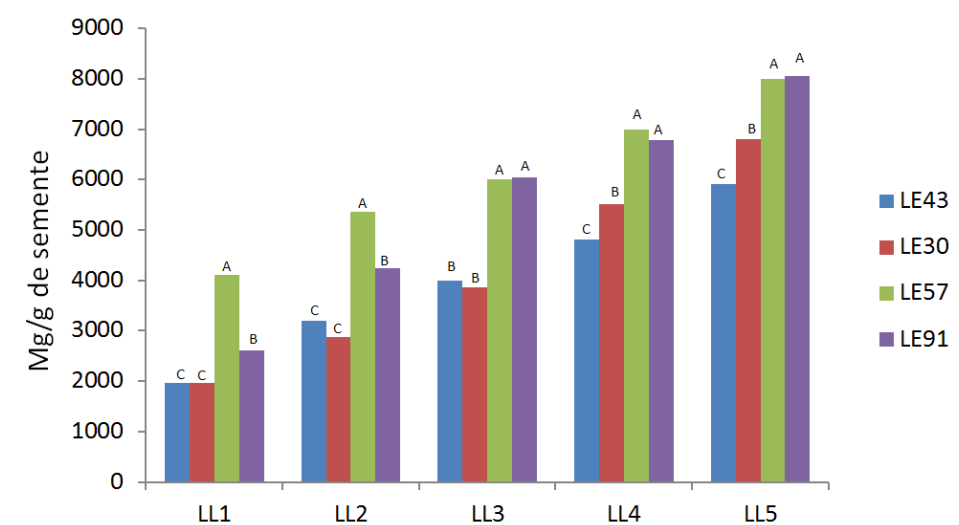


Figura 5 Proteínas resistentes ao calor, extraídas de sementes de milho das linhagens 43, 30, 57 e 91, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento

A menor expressão de proteínas resistentes ao calor foi observada em sementes das linhagens 43 e 30, de baixa e alta tolerância, respectivamente. Nos estádios iniciais de desenvolvimento (LL1 e LL2), as sementes da linhagem 57, classificadas como intolerantes à dessecação, apresentaram os maiores valores de proteínas resistentes ao calor.

Porém, é importante lembrar que outros fatores, além das proteínas resistentes ao calor, também influenciam na tolerância à dessecação. Roveri José et al. (2004), mostraram que a maior tolerância a dessecação depende do pericarpo da semente, um tecido de origem materna.

#### 4.4 Expressão gênica de proteínas resistentes ao calor durante o desenvolvimento de sementes de milho por meio da técnica de *qRT-PCR*

A extração utilizando o reagente *PureLink Plant RNA* gerou RNA's totais com alta qualidade, íntegros e livres de impurezas, como pode ser observado na Figura 6, a qual apresenta os RNA's totais em gel de agarose 1,5% por meio da técnica de eletroforese das sementes da linhagem 43 nos diferentes estádios de desenvolvimento.

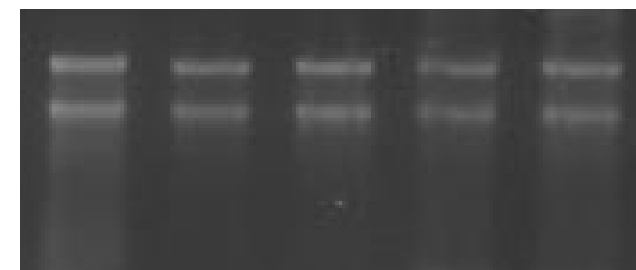


Figura 6 RNA total em gel de agarose 1,5% da linhagem 43 extraídos nos diferentes estádios de desenvolvimento

Após amplificação utilizando os *primers* do gene constitutivo foi observada alta viabilidade dos cDNA's contruídos. Não foram observadas bandas inespecíficas ou dímeros de *primers* por meio da curva de dissociação realizada para cada tratamento.

Pelos resultados da análise da expressão gênica, de uma maneira geral, observa-se grande variação na expressão dos genes analisados para as sementes das diferentes linhagens.

Para a linhagem 43 (Figura 7), classificada como de baixa tolerância à altas temperaturas de secagem, a expressão do gene HS aumenta gradativamente nas sementes colhidas até o estágio LL3, decresce naquelas colhidas no estágio LL4 e volta a aumentar no estágio LL5, onde ocorre a máxima expressão. O

mesmo ocorreu para as sementes da linhagem 91 (Figura 10), classificada como de alta tolerância à dessecação. Já para as sementes da linhagem 30 (Figura 8), a maior expressão desse gene ocorre no estágio LL4. Para as sementes da linhagem 57 (Figura 9), classificadas como de baixa tolerância foram observados os maiores valores de quantificação relativa para este gene em relação às outras linhagens e a maior expressão ocorreu nos dois últimos estágios de desenvolvimento.

A expressão do gene HS na linhagem 57 (Figura 9) parece estar relacionada à proteína de peso molecular 70 kDa (figura 3-C), a qual também apresentou maior expressão nos estágios de desenvolvimento LL4 e LL5.

Em relação ao gene D 34, a maior expressão ocorreu nas sementes colhidas no estágio LL4 para a maioria das linhagens, sendo que a maior expressão relativa ocorreu nas sementes da linhagem 91 (Figura 10) e a menor expressão nas sementes da linhagem 57 (Figura 9). Para as sementes da linhagem 91, a expressão do gene D 34 parece estar relacionada a proteína de peso molecular de aproximadamente 70 kDa (Figura 3-D), a qual apresenta maior expressão no estágio de desenvolvimento LL4.

A expressão do gene *LEA* foi superior no estágio LL3 para as sementes das linhagens 43, 57 e 91 (Figuras 7, 9 e 10). No entanto, para a linhagem 30 (Figura 8), a qual apresenta expressão relativa superior às demais, maior expressão ocorreu nas sementes colhidas no estágio LL5.

Nos resultados da expressão gênica avaliadas pelas técnicas de eletroforese e espectrofotometria, maior expressão dessas proteínas foi observada nas sementes colhidas no estágio final de desenvolvimento. No entanto, ressalta-se que pela técnica de *qRT-PCR* foram avaliados e quantificados apenas 3 genes e que pelas técnicas de eletroforese e espectrofotometria analisa-se a expressão de mais genes. Provavelmente, os genes que se expressam em estágios mais avançados de desenvolvimento não

tenham sido estudados nesta pesquisa. Deve-se considerar ainda que existem diferentes genes que codificam para proteínas *LEA*. É importante ressaltar a diferença de expressão dos genes estudados nos diferentes genótipos. Em sementes da linhagem 91, nas quais foi observada maior expressão de proteínas resistentes ao calor, em estádios mais precoces de desenvolvimento, pelas técnicas de eletroforese e espectrofotometria, foi verificada maior expressão do gene D 34, principalmente nos estádios de desenvolvimento LL4 e LL5. O padrão de expressão desse gene foi similar ao observado em sementes da linhagem 43, classificada como de baixa tolerância às altas temperaturas de secagem.

Luo et al. (2008) ao avaliarem o perfil de expressão gênica no desenvolvimento de sementes de milho por meio da técnica de *qRT-PCR*, observou que o número total de transcritos decresce a medida que as sementes amadurecem, no entanto algumas proteínas e enzimas ainda podem permanecer ativas.

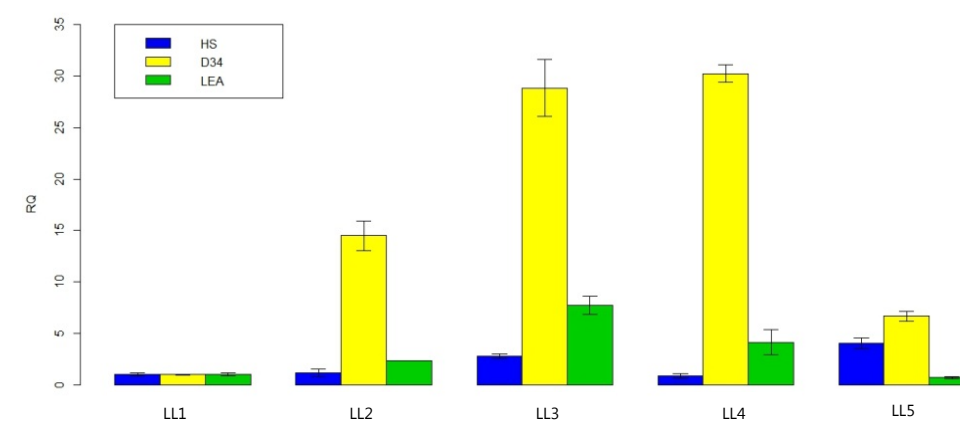


Figura 7 Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes D 34, HS e *LEA* em sementes de milho da linhagem 43, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento

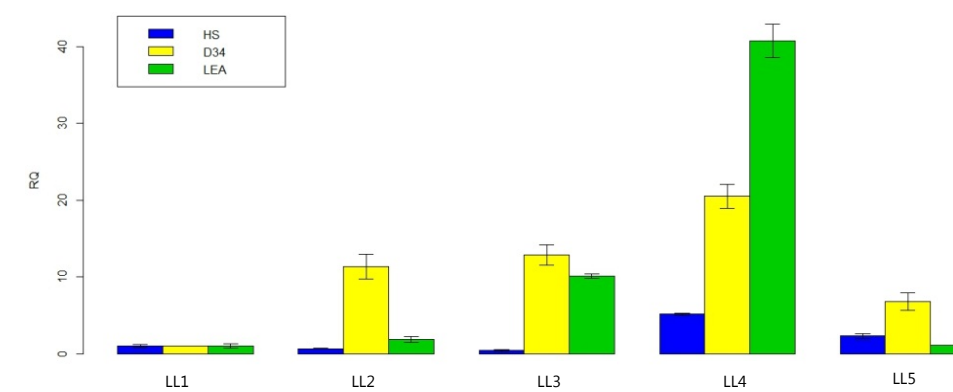


Figura 8 Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes D 34, HS e *LEA* em sementes de milho da linhagem 30, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento

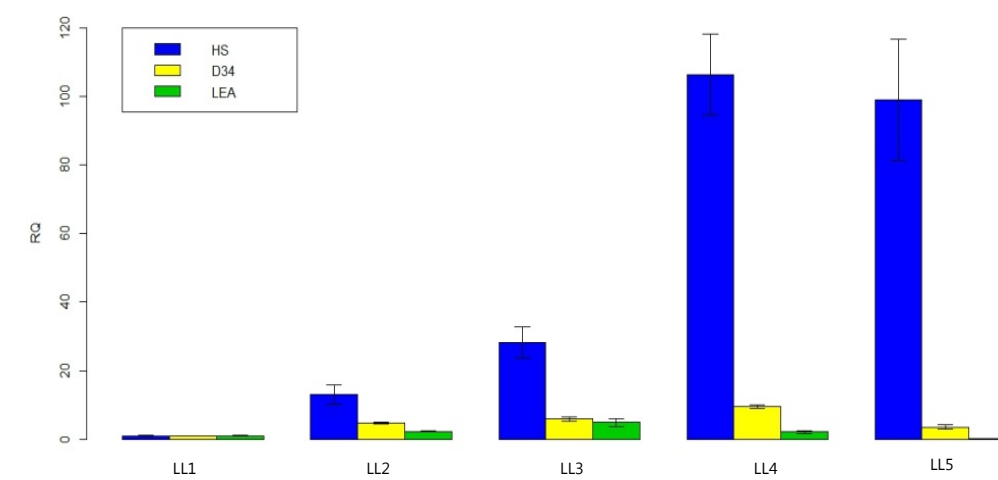


Figura 9 Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes D34, HS e *LEA* em sementes de milho da linhagem 57, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento



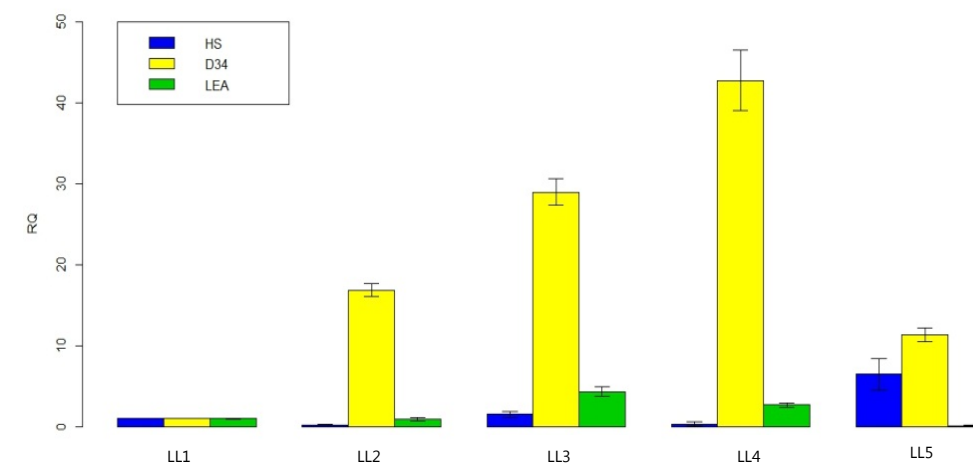


Figura 10 Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes D 34, HS e *LEA* em sementes de milho da linhagem 91, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento

No estudo de expressão de resistentes ao calor, nesta pesquisa, por meio das técnicas de eletroforese e espectrofotometria, foi observado que essa expressão é maior em estádios mais avançados de desenvolvimento, embora tenha ocorrido a expressão diferenciada dos genes estudados nos diferentes estádios, pela técnica de *qRT-PCR*. Como discutido anteriormente por meio da técnica de eletroforese é possível avaliar ao mesmo tempo a expressão de vários genes, diferentemente do que ocorre na técnica de *qRT-PCR*.

Pelos resultados obtidos, observou-se que até o estágio de desenvolvimento das sementes LL3 a expressão das proteínas resistentes ao calor é menor. Dessa forma, infere-se que nesse estágio de desenvolvimento as sementes não apresentam a expressão dessas proteínas que confira tolerância a altas temperaturas de secagem, Nas pesquisas, nas quais tem sido proposta a colheita de sementes de milho no estágio de desenvolvimento LL3, recomenda-

se a secagem das sementes à 35°C até as mesmas atingirem cerca de 25% de teor de água, seguida de secagem a 45°C. Faria et al. (2004) observaram mudanças na expressão de proteínas resistentes ao calor em sementes submetidas à secagem quando comparada a das sementes não submetidas à secagem.

Assim, sementes colhidas em estádios menos avançados de desenvolvimento parecem não tolerarem altas temperaturas de secagem, por não apresentarem os mecanismos responsáveis pela tolerância à dessecação.

## **5 CONCLUSÕES**

Proteínas resistentes ao calor se expressam diferencialmente nos diferentes genótipos e nos diferentes estádios de desenvolvimento.

A expressão de proteínas resistentes ao calor, detectada por meio da técnica de eletroforese é mais precoce em linhagens tolerantes a altas temperaturas de secagem.

Maior germinação e vigor ocorrem em sementes colhidas no estágio de desenvolvimento LL5.

Maior expressão de proteínas resistentes ao calor é observada em embriões de sementes de milho.

**REFERÊNCIAS**

ADAMS- PHILLIPS, L. et al. Evidence that CTR1- mediated ethylene signal transduction in tomato is encoded by a multigene family whose numbers display distinct regulatory features. **Plant Molecular Biology**, Netherland, v. 54, p. 387-404, 2004.

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

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa, MG: UFV, 2006. 574 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS. **Anuário 2009**. Brasília, 2009. p. 25-32.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS. **Anuário 2010**. Brasília, 2010. p. 34.

BIES, N. et al. Accumulation and degradation of Em proteins in *Arabidopsis thaliana*: evidence for post-transcriptional controls. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, p. 1925–1933, 1998.

BINOTTI, F. F. S. et al. Efeito do período de envelhecimento acelerado no teste de condutividade elétrica e na qualidade fisiológica de sementes de feijão. **Acta Scientia Agronomica**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 247-254, 2008.

BLACKMAN, S. A. et al. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n. 3, p. 868-874, July 1991.

BOUCHER, V. et al. MtPM25 is an atypical hydrophobic late embryogenesis-abundant protein that dissociates cold and desiccation-aggregated proteins. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 418-430, Mar. 2010.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 399 p.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of m RNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 25, n. 2, p. 169-193, Oct. 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sexto levantamento, março/2011**. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/8\\_levantamento\\_mai2009.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/8_levantamento_mai2009.pdf)>. Acesso em: 28 mar. 2011.

CUMING, A. LEA protein. In: SHEWRY, P. R.; CASEY, R. (Ed.). **Seeds proteins**. Dordrecht Kluwer: Academic, 1999. p. 753-780.

DIAS, M. C. L.; BARROS, A. S. R. **Avaliação da qualidade sementes de milho**. Londrina: IAPAR, 1995. 41 p. (Circular, 88).

DING, J. The genetics of maize evolution. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 52, p. 3371-3377, 2004.

DUMAS, C.; ROGOWSKY, P. Fertilization and early seed formation. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 331, p. 715-725, 2008.

FAJARDO, V. et al. Real time PCR for quantitative detection of Chamois (*Rupicapra rupicapra*) e Pyrenean Ibex (*Capra pyrenaica*) in meat mixtures. **Journal of the American Organization of Analytical Chemistry International**, Madrid, v. 91, n. 1, p. 103-111, 2008.

FARIA, M. A. V. R. et al. Germinabilidade e tolerância à dessecação em sementes de milho colhidas em diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 2, p. 276-289, 2004.

GACHON, C.; SAINDRENAN, P. Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicola* and *Botrytis cinerea*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 5, p. 367-371, May 2004.

GOLOVINA, E. A.; HOEKSTRA, F. A.; VAN AELST, A. C. Programmed cell death or desiccation tolerance: two possible routes for wheat endosperm cells. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 10, n. 3, p. 365-379, Sept. 2000.

GOMES, M. S. et al. Efeito da heterose na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 7-17, 2000.

HERNANDEZ, M. et al. A rapessed-specific gene, Acetyl-CoA carboxylase, can be used as a reference for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes from mixed food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, California, v. 49, p. 3622-3627, 2001.

HUGHES, D. W.; GALAU, G. A. Developmental and environmental induction of leaf and leaf messenger-RNAs and the postabscission program during embryo culture. **Plant Cell**, Rockville, v. 3, n. 6, p. 605-618, June 1991.

HUNTER, J. L. et al. Corn seed maturity indicators and their relationship to uptake of carbon-14 assimilate. **Crop Science**, Madison, v. 31, n. 5, p. 1309-1313, 1991.

INGHAM, D. J. et al. Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants, **Biotech**, Rockville, v. 31, p. 132-141, 2001.

JANG, J. Y. et al. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v. 54, p. 713-725, 2004.

KUHN, H. et al. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 27, n. 6, p. 503-528, 2001.

LUO, M. et al. Characterization of gene expression profiles in developing kernels of maize (*Zea mays*) inbred Tex6. **Plant Breeding**, Berlin, v. 127, p. 569-578, 2008.

MACHEREL, D. et al. Function and stress tolerance of seed mitochondria. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 129, p. 233-241, 2007.

MANFRE, A. J. et al. Seed Dehydration and the Establishment of Desiccation Tolerance During Seed Maturation is Altered in the *Arabidopsis thaliana* Mutant *atm6-1*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 50, n. 2, p. 243-253, Feb. 2009.

MENEZES, M. et al. Identificação de cultivares de milho, feijão, algodão e soja por meio de enzimas e proteínas resistentes ao calor. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 111-122, 2008.

MEYER, S.; POSPISIL, H.; SCHOLTEN, S. Heterosis associated gene expression in maize embryos 6 days after pollination exhibits additive, dominant as overdominant pattern. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 63, p. 381-391, 2007.

NASCIMENTO, V. E. **Fluxo gênico e métodos de detecção e quantificação de milho geneticamente modificado**. 2010. 117 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. Lavras: UFLA, 2000. 404 p.

ROSA, S. D. V. F. et al. Qualidade fisiológica e atividade enzimática em sementes de milho submetidas à secagem artificial. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 177-184, 2000.

ROVERI JOSÉ, S. C. B. et al. Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40 n. 2, p.115-121, 2005.

ROVERI JOSÉ, S. C. B. et al. Tolerância de sementes de linhagens de milho à alta temperatura de secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1107-1114, set./out. 2004.

SCHOLDBERG, T. A. et al. Evaluating precision and accuracy when quantifying different endogenous control reference genes in maize using real-time PCR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 2903-2911, 2009.

SHIH, M. D. et al. Late embryogenesis abundant proteins. **Advances in Botanical Research**, London, v. 48, p. 211-255, 2008.

TOLLETER, D. et al. Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 5, p. 1580-1589, May 2007.

THOMAS, T. L. Gene Expression during Plant Embryogenesis and Germination: An Overview. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 1401-1410, 1993.



UZAROWSKA, A. et al. Validation of candidate genes putatively associated with resistance to SCMV and MDMV in maize (*Zea mays* L.) by expression profiling. **BMC Plant Biology**, California, v. 15, n. 9, Feb. 2009.

VEIGA, A. D. et al. Tolerância de sementes de soja à dessecação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, May/June 2007.

WANG, J. et al. Analysis of differential transcriptional profiling in wheat infected by *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici* using GeneChip. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, p. 381-387, 2012.

WISE, M. J.; TUNNACLIFFE, A. POPP the question: what do LEA proteins do? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 13-17, Jan. 2004.

WU, J. et al. Reactive oxygen species scavenging enzymes and down-adjustment of metabolism level in mitochondria associated with desiccation-tolerance acquisition of maize embryo. **Journal of Integrative Plant Biology**, Hoboken, v. 51, n. 7, p. 638-645, 2009.

YANG, L. T. et al. Estimating the copy number of transgenes in transformed rice by real-time quantitative PCR. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, p. 759-763, 2005.

**ANEXOS**

**ANEXO A - Tabela de resumo da análise de variância dos dados obtidos em avaliações de qualidade fisiológica**

Tabela 1 Resumo do Quadro de Análise de Variância para os resultados obtidos nos testes de primeira contagem (PCG) e contagem final do teste de germinação (TG), envelhecimento artificial (EA), teste frio (TF) de sementes de linhagens de milho colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento

Fonte de Variação	PCG		GE		EA		TF	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Linhagem	3	578,9**	3	1925,045**	2	680,866**	2	3658,066**
LL	4	20621,206**	4	30275,668**	4	20750,441**	4	18826,75**
Linhagem*LL	12	432,389**	12	1161,535**	8	331,741**	8	1427,15**
Bloco	3	26,733	3	7,679	3	165,066	3	36,061
Erro	57	39,259	57	20,1	42	104,53	42	21,239
Média Geral		24,65		38,01		41,66		61,083
CV (%)		25,42		11,79		24,66		7,54

\*\* Teste de F significativo ao nível de 5% de probabilidade