



**KILIANY ANDREA ARCIA MORENO**

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS  
COM A QUALIDADE FISIOLÓGICA DE  
SEMENTES DE SOJA**

**LAVRAS – MG**

**2016**

**KILIANY ANDREA ARCIA MORENO**

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM A QUALIDADE  
FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

**LAVRAS – MG**

**2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados  
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Moreno, Kiliany Andrea Arcia.

Expressão de genes relacionados com a qualidade fisiológica de  
sementes de soja / Kiliany Andrea Arcia Moreno. – Lavras: UFLA, 2016.  
67 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Bibliografia.

1. *Glycine max*. 2. Isoenzymes. 3. Transcriptômica. 4. Proteômica. 5.  
Germinação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**KILIANY ANDREA ARCIA MORENO**

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM A QUALIDADE  
FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 16 de março de 2016.

Dr. Elcio Perpetuo Guimarães	EMBRAPA
Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho	UFLA
Dr. Renato Mendes Guimarães	UFLA
Dr. José Marcio Rocha Faria	UFLA

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho  
Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2016**

A DIOS, por ser mi guía y protector y concederme una segunda oportunidad de poder cumplir mis sueños.

## **OFEREÇO**

A mis padres Francisco Arcia y Maria Inés Moreno, y a mi Hermano Mario Fernando Arcia Moreno.

## **DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família por me apoiarem em todas as minhas escolhas incondicionalmente.

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, compreensão, exemplo de profissionalismo e competência.

A Heloisa Oliveira dos Santos pelo seu apoio, orientação e ajuda em cada etapa deste trabalho.

A todos os amigos de sementes amizade, companheirismo e ajuda essencial na execução dos experimentos.

Aos funcionários do Laboratório de Sementes, pelo auxílio na execução dos experimentos.

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

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), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de bolsa de estudos e recursos para execução do projeto.

Ao Brasil por acolher-me e ser meu segundo lar durante estes três anos.

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

**Muito Obrigada!**

## RESUMO

A produção de sementes de soja com alta qualidade fisiológica é importante para garantir a produtividade de populações de plantas melhoradas. Sabe-se ainda que existe variabilidade genética para essa característica entre as cultivares de soja. Objetivou-se então selecionar genótipos de soja para a característica de qualidade fisiológica de sementes, por meio de testes de germinação e vigor, além de estudar a expressão de genes por meio de transcritos e de proteínas relacionadas a qualidade fisiológica de sementes. Em um primeiro ensaio foram produzidas e avaliadas sementes de 12 cultivares de soja para a seleção de seis cultivares com níveis de qualidade fisiológica contrastantes. Em nível proteico foram estudados os sistemas isoenzimáticos álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH), fosfoglicose isomerase (PGI), sorbitol desidrogenase (SDH), Piruvato descaboxilase (PDC), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), isocitrato liase (ICL), esterase (EST), glutamato oxaloacetato transferase (GOT) e proteínas resistentes ao calor. Para o estudo dos níveis de transcritos foi utilizada a técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR). O método utilizado foi o do CT comparativo, sendo estudados os genes que codificam para as enzimas SOD, CAT, MDH, PGI, ICL e PRX. Concluiu-se por meio de testes de germinação e vigor, que as sementes das cultivares CD201, CA115 e MS8400 foram classificadas como de alta qualidade, enquanto que as cultivares Syn1263, Syn1279 e CD202 foram classificadas como de baixa qualidade. Por meio das análises das enzimas envolvidas no processo de respiração a exemplo do álcool desidrogenase, fosfoglicose isomerase e piruvato descarboxilase, são marcadores promissores para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. A maior expressão da enzima Peroxiredoxina pode estar relacionada à baixa qualidade fisiológica de sementes de soja.

Palavras chave: *Glycine max*. Isoenzimas. Transcriptômica. Proteômica. Germinação. Vigor.

## ABSTRACT

The production of soybean seeds with high physiological quality is important to guarantee the productivity of improved plants. It's is still known that exists genetic variability for this characteristic between cultivar of soybeans. The objective of this work was to select genotypes of soybeans for physiological quality characteristic through germination and vigor tests, and to study the expression of genes through transcripts and proteins related to the physiological quality of seeds. Were evaluated a first experiment producing seeds from 12 cultivars: CD 201, CA115, MS8400, Syn1263, Syn1279, CD202, CD215, BRS820, Conquista, Savana, UFLA1, and BMXpot. A second experiment, were evaluated, chosen 6 cultivars with contrasting quality and new seed multiplied for evaluation. Protein level were studied the isoenzymes systems like alcohol dehydrogenase (ADH), malate dehydrogenase (MDH), phosphoglucose isomerase (PGI), sorbitol dehydrogenase (SDH), piruvato decarboxylase, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), isocitrate liase (ICL), esterase (EST), glutamate oxaloacetato transferase (GOT), and proteins resistant to heat. For the study of levels of transcripts were used the PCR in real time technique (qRT-PCR). The method used was the comparative CT and the genes worked were for the following enzymes: SOD, CAT, MDH, PGI, ICL and PRx. It can be concluded through the results of germination and vigor tests, that seeds from cultivars CD 201, CA115 and MS8400 were classified like high physiological quality and the cultivars SYN1263, SYN1279 and CD202 were classified like low physiological quality. The proteomic analysis with the enzymes involved in the process of respiration like alcohol dehydrogenase, phosphoglucose isomerase and pyruvate decarboxylase, it can be inferred that these are promissory markers to the evaluation of physiological quality of soybeans seeds. Higher expression of peroxiredoxins enzyme could be related to the low physiological quality of soybeans seeds.

Keywords: *Glycine max*. Isoenzymes. Transcripts. Proteomic. Germination. Vigor.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Qualidade de sementes da soja</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2</b>	<b>Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)</b> .....	<b>15</b>
<b>2.3</b>	<b>Expressão Gênica</b> .....	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Multiplicação de sementes de cultivares e seleção de genótipos contrastantes para a característica de qualidade fisiológica de sementes</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2</b>	<b>Determinação da qualidade das sementes</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3</b>	<b>Análise da expressão gênica</b> .....	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Análises fisiológicas</b> .....	<b>31</b>
<b>4.2</b>	<b>Análise da expressão gênica por meio de proteínas</b> .....	<b>38</b>
<b>4.3</b>	<b>Análise da expressão gênica por meio de transcritos</b> .....	<b>51</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A soja é um cultivo de grão oleaginoso mais importante para o consumo humano e alimentação animal. A produção e exportações de soja são dominadas pelos Estados Unidos, Brasil e Argentina, bem como e cada vez mais importante Paraguai, Bolívia e Uruguai, que compõem o bloco económico de Mercosul. No âmbito global é o quarto produto entre os cereais e oleaginosos de consumo humano mais importante em produção e comércio mundial. Sendo utilizada para consumo direto e insumo de indústrias agrícola e química ou como combustível.

A soja ou *Glycine max*, é uma leguminosa domesticada pelos chineses, que se desenvolveu no leste da China, principalmente ao longo do Rio Amarelo, na China. Sua evolução começou com o aparecimento de plantas oriundas, derivadas do cruzamento natural com plantas nativas e outras variedades de sojas selvagens existentes na região, que foram domesticadas por cientistas da antiga China. A sua importância na dieta alimentar da antiga civilização era tal, que a soja, juntamente com outras plantas nativas, era considerada grão sagrado.

O Complexo Soja tem um papel importante no desenvolvimento da economia brasileira. Em 2011, foram movimentados cerca de 24 bilhões de dólares apenas nas exportações de soja, farelo e óleo. A sojicultura brasileira gera 1,5 milhão de empregos em 17 estados do País.

O crescimento dos setores envolvidos com a soja por meio de investimentos em tecnologias, novas áreas agrícolas e indústrias de processamento de grãos e refino de óleos tem promovido resultados positivos, não apenas em volumes operados, mas também na melhoria de vida da população.

A planta precisa de um grupo de estudos de maneira contínua sobre o conhecimento da espécie, bem como suas relações no ambiente onde esta cultivada, dando assim um entendimento cada vez melhor sobre a espécie e suas

particularidades e podendo assim melhorar cada vez mais sua produtividade e adequando-a as adversidades naturais.

Sistemas de produção de sementes são sustentados por meio do desenvolvimento de cultivares com características de interesse para os agricultores, produtores de sementes e pela indústria. Neste contexto a seleção de cultivares de soja com potencial genético de sementes de alta qualidade fisiológica em programa de melhoramento é importante para garantir o vigor das sementes no campo, inclusive sob condições climáticas desfavoráveis.

O desenvolvimento de cultivares com potencial genético para prover sementes de alta qualidade, tem se tornado muito importante no Brasil, em função da diversidade climática em que a soja é cultivada. De modo geral, a seleção para esta característica, nem sempre tem sido priorizada em programas de melhoramento de soja no Brasil. Assim, nos programas de melhoramento de soja, a seleção de cultivares associada à avaliação da qualidade fisiológica de sementes é importante para garantir a sustentabilidade dos sistemas de produção de sementes e grãos.

A avaliação da qualidade fisiológica de sementes tem sido realizada preferencialmente por meio de testes de germinação e de vigor. No entanto, tem se buscado por meio de pesquisas na área de biologia molecular, a obtenção de marcadores moleculares associados à qualidade fisiológica das sementes. Estudar a expressão de genes relacionados à qualidade fisiológica de sementes tem sido um desafio, principalmente em função da complexidade do controle genético.

Diante disso, objetivou-se no presente trabalho identificar genótipos de soja para características de qualidade fisiológica por meio de testes de germinação e vigor, e, estudar a expressão de genes por meio de transcritos e de proteínas relacionadas a qualidade fisiológica de sementes.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Qualidade de sementes da soja**

A soja é um dos grãos mais consumidos no mundo, e a sua demanda cresce a cada dia, exigindo-se a produção de sementes com alta qualidade fisiológica. A qualidade fisiológica de sementes é importante para garantir o estabelecimento da população de plantas, característica importante que contribui para atingir níveis altos de produtividade. Sabe-se que a qualidade fisiológica de sementes de soja é máxima em sua maturidade. A partir deste momento são iniciados diferentes processos degenerativos de natureza física, fisiológica e bioquímica, acarretando a deterioração das sementes. (FRANÇA NETO et al., 2010)

A deterioração é um processo que envolve complexas alterações, que interferem no potencial fisiológico da semente. A velocidade do processo de deterioração é determinada principalmente, pela interação entre o genótipo, o teor de água da semente e a temperatura do ambiente. (DELOUCHE, 2002) Antes da morte da semente, como decorrência da deterioração, ocorrem várias alterações fisiológicas, bioquímicas e genéticas, tais como: danificação cromossômica (ROBERTS, 1973), perda de enzimas (WOODSTOCK, 1973), degradação do sistema respiratório (ABDUL-BAKI; ANDERSON, 1972), diminuição da produção de ATP (ANDERSON, 1977) e desorganização das membranas celulares (BASAVARAJAPPA; SHETTY; PRAKASH, 1991).

Além da perda da compartimentalização celular, a desintegração do sistema de membranas promove descontrole do metabolismo, e das trocas de água e solutos entre as células e o meio exterior, determinando a queda da viabilidade da semente (MARCOS FILHO; KRZYZANOWSKI, 1999b).

De acordo com Moraes (2000), a rapidez com que ocorre a perda de qualidade das sementes após a sua maturidade fisiológica é função da espécie, da cultivar e das condições de campo em que são submetidas após a colheita e durante o processo de produção, colheita e operações de beneficiamento e armazenamento.

Em algumas pesquisas, tem sido observado que o processo de deterioração de sementes de soja, em determinado ambiente é atribuída ao genótipo. Por este motivo é fundamental o melhoramento para seleção de genótipos de soja, com alta qualidade fisiológica de sementes (LIMA, 2007).

Segundo Carvalho et al. (2014a) e Gris (2009), cultivares de soja de alta e baixa qualidade apresentaram resultados diferentes, independentes do teor de lignina nos tegumentos dessas sementes. Reiterando a observação da relação da qualidade fisiológica das sementes com fatores inerentes a cada genótipo e não somente relacionados ao teor de lignina no tegumento das sementes.

No Brasil tem sido verificado que algumas cultivares de soja, apesar de altamente produtivas, apresentam baixa qualidade de sementes, dificultando assim sua permanência no mercado. Assim, a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de cultivares de soja, anteriormente ao lançamento no mercado, confere mais segurança aos diferentes setores envolvidos nos sistemas de produção de sementes e de grão, para atender as demandas destes mercados. O uso de sementes de boa qualidade é um requisito essencial para o sucesso no estabelecimento dos cultivos e na obtenção de elevados rendimentos no campo. Sabe-se que o genótipo influencia a qualidade fisiológica de sementes, desta forma, em programas de melhoramento deve ser considerado a seleção para esta característica.

A maneira oficial de se avaliar a qualidade fisiológica das sementes é pelo teste de germinação, que conduzido sob condições ótimas de ambiente fornece o potencial de germinação do lote após a sua semeadura. Entretanto, em

razão de suas limitações, principalmente quanto à menor sensibilidade para a diferenciação da qualidade e à frequente discrepância dos resultados, com a emergência das plântulas em campo recomenda-se também a avaliação da qualidade fisiológica de sementes por meio de testes de vigor (OLSON, 2010).

Os testes de vigor são desenvolvidos com o objetivo de identificar diferenças no potencial fisiológico dos lotes de sementes, principalmente daqueles que apresentam resultados semelhantes no teste de germinação (MARCOS FILHO; KRZYZANOWSKI, 1999a). Desta forma, espera-se que os testes de vigor permitam distinguir, com segurança, lotes de alto e de baixo vigor (MARCOS FILHO, 2005). O nível de vigor das sementes pode afetar o potencial de armazenamento do lote e persistir no campo, influenciando o desenvolvimento da planta, a uniformidade da lavoura e o seu rendimento (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Dentre os vários testes de vigor, o teste de envelhecimento acelerado é um dos mais utilizados para a avaliação do potencial fisiológico de diversas espécies (HAMPTON; TEKRONY, 1995). Este teste tem como princípio, o aumento considerável na taxa de deterioração das sementes, quanto a sua exposição em níveis elevados de temperatura e umidade relativa do ar, considerados os fatores ambientais preponderantes na intensidade e velocidade de deterioração. Assim, sementes de baixa qualidade deterioram-se mais rapidamente do que as mais vigorosas, apresentando redução acentuada de sua viabilidade (ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS - AOSA, 1983 citado por OLSON, 2010).

A deterioração controlada é um teste de vigor semelhante ao de envelhecimento acelerado, porém com o controle do teor de água das sementes durante o período de envelhecimento (HAMPTON; TEKRONY, 1995). O teor de água inicial das sementes de todos os lotes é uniformizado antes da exposição à deterioração (MATTHEWS, 1980) e este, permanece constante durante o

período de deterioração, fato não verificado no teste de envelhecimento acelerado (SILVEIRA, 2006).

Embora outros testes sejam utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja, o teste de envelhecimento acelerado tem sido utilizado com frequência para a identificação de genótipos com alta qualidade fisiológica de sementes desta espécie.

Além dos testes fisiológicos, em pesquisas mais recentes e avançadas tem se buscado marcadores moleculares para a seleção de cultivares de soja de alta qualidade fisiológica, por meio da expressão de transcritos e de proteínas. No entanto, vários genes parecem estar envolvidos no controle da qualidade fisiológica de sementes de soja (BALDONI, 2013).

Existem genes envolvidos com o sistema oxidativo, estes, codificam para enzimas onde atuam quando é iniciado o estresse oxidativo produzido pelas espécies reativas de oxigênio (ERO's), moléculas formadas a partir da degradação natural do oxigênio. Estas são produzidas constantemente como subprodutos de várias vias metabólicas localizadas em diferentes compartimentos celulares (APEL; HIRT, 2004). Existem diversas situações ambientais capazes de produzir estresse oxidativo, portanto, a produção de ERRO's pode ser considerada como uma característica universal de estresse (CARRILLO; VALLE, 2005). O estresse oxidativo provocado por estas espécies reativas de oxigênio podem causar deterioração, gerando inibição enzimática, degradação de clorofilas, fragmentação do DNA e peroxidação dos lipídeos, processos que afetam diretamente a qualidade fisiológica das sementes. Por esta razão o estudo de genes que codificam para enzimas que combatem o estresse oxidativo e de suma importância para estabelecer marcadores que permitam identificar a qualidade fisiológica de sementes.

## 2.2 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Espécies reativas de oxigênio (EROs) estão diretamente relacionadas ao processo de deterioração de sementes. Muitos dos processos deletérios impostos pelas plantas submetidas a condições adversas, são mediados por espécies reativas de oxigênio (ERO's) geradas em diferentes compartimentos celulares, como consequência tanto do mau funcionamento de vias metabólicas como dos processos fisiológicos normais. O efeito sinalizador ou destrutivo das ERO's depende de suas concentrações, locais de produção e interação com compostos relacionados a outros tipos de estresse na planta, assim como do estágio de desenvolvimento da mesma (GECHEV et al., 2006).

Existem diversas situações ambientais capazes de produzir estresse oxidativo, portanto, a produção de ERO's pode ser considerada como uma característica universal de estresse (CARRILLO; VALLE, 2005).

Os compostos antioxidantes são substâncias que atuam em altas concentrações em substratos oxidáveis, inibindo ou atrasando significativamente a peroxidação lipídica e também influenciam na qualidade fisiológica das sementes. As sementes em geral são ricas em ácidos graxos essenciais, fibras e compostos fenólicos que exercem atividade antioxidante (HALLIWELL, 1995).

A destruição do maior número de radicais livres e atividades das ERO's ocorre por meio da oxidação e dos antioxidantes endógenos (LORENZI; MATOS, 2002). Uma vez formadas, as espécies reativas de oxigênio, atuam nos tecidos vegetais causando danos, tanto fisiológicos como bioquímicos. As espécies reativas de oxigênio, como superóxido ( $-O_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $-OH$ ), são produzidas constantemente como subprodutos de várias vias metabólicas localizadas em diferentes compartimentos celulares (APEL; HIRT, 2004). Em células de plantas, as ERO's, principalmente a  $H_2O_2$  são geradas no citosol, cloroplastos,

mitocôndrias, peroxissomas e espaço apoplástico. As espécies reativas de oxigênio ocorrem normalmente no metabolismo celular, porém, quando acumuladas tornam-se tóxicas (QUAN et al., 2008).

Algumas ERO's são classificadas como radicais livres por apresentarem elétrons desemparelhados na sua estrutura, fazendo com que reajam avidamente com moléculas biológicas, como DNA, proteínas e lipídeos podendo alterar suas funções. O efeito final gerado depende não só do compartimento que está sendo afetado, mas do tipo de ERO's que está reagindo (DRÖGE, 2002).

Enzimas removedoras de radicais livres também desempenham papel importante na qualidade de sementes. A enzima superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima do grupo que atua na linha de defesa contra formas reativas de oxigênio, uma vez que esta enzima anula a ação dos superóxidos  $O_2^-$ , catalisando reações de transferência de dois elétrons para a produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (MCDONALD, 1999).

Outra enzima relacionada à remoção de radicais livres é a catalase (CAT), uma enzima intracelular, encontrada nos glioxisomas, com capacidade de transformar formas reativas de oxigênio em formas inofensivas, bem como a decomposição do peróxido de hidrogênio (LEHNINGER, 2006). De acordo com JENG; SUNG, (1994), quando a semente é envelhecida ocorre maior peroxidação dos lipídios e redução na atividade das enzimas removedoras de peróxidos.

As peroxiredoxinas PRx's são um grupo de peroxidases independentes de selênio, deduzem peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), hidroperóxidos orgânicos e peroxinitritos (RHEE; CHAE; KIM, 2005), função que realiza junto com uma tioredoxina redutase (TrxR), que cedem elétrons e NADPH (BARBOSA et al., 2014). As Prx são enzimas abundantes que constituem entre 0.1-0.8% das proteínas solúveis totais, embora a sua eficiência catalítica seja menor que a catalase (RHEE; CHAE; KIM, 2005).

Todas as Prx's apresentam-se como homodímeros e contêm um resíduo de cisteína conservado na região NH<sub>2</sub>- terminal localizado num ambiente estrutural conservado e que é essencial para a atividade catalítica (BAIER; DIETZ, 1996c; CHAE et al., 1993; RHEE; CHAE; KIM, 2005; VERDOUCQ et al., 1999). Tem se sugerido que a oxidação das Prx's é um marcador de oxido-redução altamente sensível, mais importante que os marcadores usados para determinar o estado redox celular (CESARATTO et al., 2005). As Prx's nas plantas têm sido classificadas em quatro subgrupos, em função da sequência aminoacídica e mecanismo catalítico: peroxirredoxinas de 1-Cys (Prx de 1-Cys), peroxirredoxinas de 2-Cys (Prx de 2-Cys), peroxirredoxinas de tipo II y peroxirredoxina Q. Os distintos grupos de Prx apresentam distinta distribuição tissular, diferente regulação transcricional e diferentes propriedades bioquímicas e estruturais, sugerindo que apresentam distintos papéis biológicos (DIETZ et al., 2006; HORLING et al., 2003; MEDINA, 2006; PARK et al., 2000).

Outra enzima importante no processo de germinação de sementes é a Isocitrato-liase (ICL). Em sementes de soja, a isocitrato-liase (ICL) é considerada uma enzima chave na regulação do ciclo do glioxilato e está envolvida no metabolismo de lipídios armazenados nas sementes oleaginosas e no desenvolvimento das atividades no glioxisomos. A atividade dessa enzima aumenta durante a germinação das sementes, obtendo-se valores máximos quando ocorre o máximo da proporção de lipídios degradados e na síntese de sacarose (BEWLEY; BLACK, 1994). Neste ciclo, os lipídeos insolúveis das sementes se transformam em açúcares solúveis (sacarose), os quais são facilmente deslocados para os meristemas radiculares e apicais (CIONI; PINZAUTI; VANNI, 1981).

Outras enzimas envolvidas no processo de respiração das sementes também podem estar relacionadas à qualidade fisiológica de sementes.

A enzima Fosfogluco isomerase (PGI) atua nas reações de glicólise e desempenha função vital às plantas. Esta enzima catalisa a isomerização reversível de glicose 6-fosfato, uma aldose, em frutose 6-fosfato, uma cetose (LEHNINGER, 2006).

A enzima Esterase (EST) esta envolvida com o rompimento lipídico durante o processo de germinação. Este processo é relevante para renovar o crescimento do eixo embrionário, especialmente em sementes ricas em lipídeos como no caso da soja (CARVALHO et al., 2014b).

A enzima glutathione (GSH) é um tripeptídeo não proteico, constituído por 3 aminoácidos: cistina, glutamato e glicina. A glutathione é o principal antioxidante das células, encontrada em todas as partes e ajuda a proteger das espécies reativas de oxigénio, como radicais livres e os peróxidos. A glutathione é encontrada principalmente no seu estado reduzido (GSH) (BARBOSA et al., 2014).

Outras enzimas também estão associadas à qualidade fisiológica de sementes, tais como a malato desidrogenase (MDH), que desempenha papel significativo no ciclo de Krebs, uma vez que catalisa a conversão de malato a oxaloacetato, produzindo NADH, que é um produto fundamental na produção de ATP e de compostos intermediários essenciais ao funcionamento das células (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Já a álcool desidrogenase (ADH) é uma enzima que está relacionada com a respiração anaeróbica, promovendo redução do acetaldeído e etanol. O acetaldeído acelera a deterioração das sementes, portanto, com o aumento da atividade da ADH as sementes ficam mais protegidas contra a ação deletéria deste composto (ZHANG et al., 2008).

A Piruvato descarboxilase faz parte do complexo da piruvato desidrogenase, é um produto da via glicolítica que é convertido a Acetil CoA, um substrato para o ciclo de Krebs. É encontrado na matriz mitocondrial, e, sob condições aeróbicas

é convertido em  $\text{CO}_2$  e em um fragmento de dois carbonos (CAMPBELL, 2000). Quando a via aeróbica é comprometida, a via anaeróbica da respiração é ativada e produtos tóxicos às células, como acetaldeído e etanol, são acumulados. No metabolismo anaeróbico, o piruvato, primariamente produzido na glicólise, é convertido para acetaldeído pela ação da enzima piruvato descarboxilase e o acetaldeído é, então, reduzido para etanol pelo álcool desidrogenase (ADH) (TIMÓTEO, 2011).

A Sorbitol desidrogenase (SDH) é uma enzima oxiredutora que catalisa a reação de remoção de termos de hidrogênio do monossacarídeo sorbitol, possibilitando a degradação deste monossacarídeo além da obtenção de energia para a célula. É uma enzima que pela via glicolítica está intimamente relacionada à atividade respiratória (OHTA et al., 2005). Existem outras enzimas que catalisam a reação de transferência do grupo amino ( $-\text{NH}^+$ ) dos aminoácidos à um  $\alpha$ -cetoácido, conhecidas como transaminases ou aminotransferases, sendo uma das mais conhecidas a oxaloacetato transaminases (GOT), que tem uma importante participação em reações de transaminação durante a eliminação do nitrogênio dos aminoácidos e na formação de grupos Ceto, para o ciclo de Krebs e gluconeogenese. A enzima GOT é chamada também como aspartato aminotransferasa (AST) (TUNES et al., 2007).

Outro grupo de proteínas que mais recentemente parecem estar associadas à qualidade fisiológica de sementes e das proteínas resistentes ao calor (ANDRADE, 2015). São exemplos destas, as proteínas tipo LEA, que são ricas em glicina e outros aminoácidos hidrofílicos e apresentam poucos resíduos hidrofóbicos. São extraídas em condições de alta temperatura e não apresentam nenhuma atividade catalítica aparente. Essas proteínas resistentes ao calor, por sua natureza conservada, propriedades físicas e abundância, têm sido associadas com a tolerância à dessecação das sementes (BLACKMAN, 1995).

O estudo da expressão destes genes relacionados à qualidade de sementes, pode auxiliar na seleção de genótipos com sementes de alta qualidade fisiológica durante o desenvolvimento de novas cultivares.

Desde a domesticação das plantas, a seleção de características de interesse tem sido realizada principalmente por meio do fenótipo. Com o desenvolvimento de técnicas biotecnológicas vislumbrou-se a possibilidade de seleção diretamente do genótipo, por meio de técnicas moleculares. Algum sucesso foi obtido, no entanto, é importante aprimorar os conhecimentos sobre os fatores que interferem na qualidade fisiológica, buscando a integração de informações geradas em níveis estrutural, transcripcional, proteico e funcional, bem como compreender os mecanismos de controle de expressão gênica envolvidos em diferentes processos relacionados à qualidade fisiológica das sementes de soja.

O entendimento da expressão dos genes é fundamental para o desenvolvimento de tecnologias de produção que garantam a produção e a comercialização de sementes com alta qualidade.

### **2.3 Expressão Gênica**

Muitos eventos relacionados ao crescimento, desenvolvimento de plantas ou até mesmo em resposta a vários estímulos são resultantes da alteração na 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. A expressão gênica pode ser estudada em nível proteico ou de transcritos das células (KUIPER et al., 2001).

Esta expressão é observada com a ajuda de técnicas como a eletroforese, sendo uma técnica bioquímica versátil, relativamente simples, rápida e de grande

poder informativo, tornando-se indispensável nas mais diversas áreas da biologia molecular. É aplicada na análise de enzimas, de proteínas e ácidos nucleicos. Em virtude de seu acervo informativo, apresenta grande potencial para caracterização de cultivares e linhagens de plantas, resistentes a estresses bióticos, entre outros. (BRAMMER, 2001).

A maximização da sensibilidade dos métodos de quantificação tem levado ao desenvolvimento de técnicas cada vez mais avançadas, dentre elas o PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR), que já é usado há bastante tempo na área médica, mas apenas recentemente tem sido utilizado como ferramenta nos estudos de expressão gênica e quantificação de sequências específicas em plantas (GACHON; SAINDRENAN, 2004). De modo geral, a investigação da expressão gênica em plantas, tem facilitado o conhecimento e o entendimento de genes e vias metabólicas.

O qPCR difere do PCR clássico, pela mensuração do produto de PCR amplificado em cada ciclo da reação da PCR. A PCR em tempo real permite a quantificação destes ácidos nucléicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação.

A quantificação é a característica mais importante do qPCR. A quantificação absoluta é calculada com auxílio de uma curva padrão. A quantificação relativa pode ser reduzida, considerando diferentes Ct entre as amostras e padrões de expressão constitutiva (BUSTIN, 2000).

Comparada com o PCR clássico, uma das principais vantagens do qPCR é a rapidez em fornecer dados confiáveis. É altamente sensível na detecção de DNA ou RNA, devido à combinação de amplificação realizada pelo passo de PCR 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. É uma técnica muito

conveniente para estudos com limitada quantidade de material inicial ou para avaliar a expressão de um grande número de genes com quantidades mínimas de RNA (FREEMAN; WALKER; VRANA, 1999).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Multiplicação de sementes de cultivares e seleção de genótipos contrastantes para a característica de qualidade fisiológica de sementes**

Em um primeiro ensaio foram produzidas sementes de 12 cultivares de soja, sendo seis genótipos classificados como de baixa qualidade fisiológica de sementes e seis de alta qualidade. Esta classificação foi feita a partir de pesquisas anteriores a esta, e de informações de profissionais de empresas produtoras de sementes. Foram multiplicadas sementes das cultivares de soja: CD201, SYN1263, SYN1279, BMX Potência, UFLA1, CA115, MSoy-8400, CD215, CD202, Conquista, Savana e BRS 820, cultivares recomendados para regiões sudeste e centro oeste do Brasil. As sementes foram multiplicadas na estação experimental de hortaliças Hortiagro Sementes Ltda., do município de Ijací (MG), situado a 13 km ao noroeste da cidade de Lavras., a uma altitude de 833 nmm, Latitude: 21° 9' 24" sul, e longitude Sul: 44° 55' 34" Oeste.

O delineamento experimental utilizado foi blocos inteiramente casualizados com três repetições.

As sementes foram colhidas no estágio R8 (95% maturidade das sementes, com um teor de água de 18%). Posteriormente foram secadas naturalmente até 12% de teor de água. No beneficiamento foram usadas peneiras de crivo circular, entre 5.55 mm e 6.35 mm, para a uniformização do tamanho das sementes. Em seguida foram pesadas e armazenadas em sacos de papel, sob condições controladas em câmara fria no laboratório central de sementes, a 10 °C e 50% de umidade relativa. Após a produção das sementes, estas foram levadas para o laboratório Central de sementes, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde foram feitos os testes fisiológicos.

A partir dos resultados dos testes fisiológicos foi realizado um segundo ensaio, conduzido na estação experimental Hortiagro baixo sob o delineamento de blocos casualizados, onde foram multiplicadas sementes de seis cultivares, identificados como as cultivares mais contrastantes quanto à qualidade fisiológica. Foram multiplicadas sementes das cultivares CD201, CA115, MS8400, CD202, Syn 1263, e Syn1279. A colheita e beneficiamento foram realizados como descrito no primeiro ensaio. Após, as sementes foram avaliadas quanto à qualidade fisiológica e a expressão de proteínas e de transcritos, no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### **3.2 Determinação da qualidade das sementes**

#### **Teor de água**

O teor de água das sementes foi determinado pelo método de estufa, a 105°C durante 24 horas, utilizando-se quatro sub amostras de sementes para cada bloco, (42 gramas de sementes por sub amostra). Os resultados foram expressos em percentagem média de umidade conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

#### **Teste de germinação**

O teste de germinação foi realizado com quatro repetições de 50 sementes para cada bloco. As sementes foram semeadas em papel germitest umedecido com água destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco. Os rolos foram colocados em germinador a 25°C. As avaliações foram realizadas aos cinco e oito dias após a semeadura, e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

### **Envelhecimento acelerado**

O teste foi realizado com quatro repetições de 50 sementes para cada bloco, foram utilizadas caixas plásticas tipo "gerbox" e as sementes colocadas em camada única sobre a tela, e, no fundo das caixas plásticas, utilizaram-se 40 ml de água destilada. Estas caixas gerbox ficaram em câmara tipo B.O.D, a 42°C, por um período de 72 horas em câmara tipo B.O.D (McDONALD; PHANEENDRANATH, 1978). Foi instalado um segundo teste de envelhecimento por 82 horas após a exposição por 72 e 82 horas a 42°C, as sementes foram submetidas ao teste de germinação, conforme descrição anterior, com contagens das plântulas normais aos cinco e sete dias após a semeadura conforme (BRASIL, 2009).

### **Deterioração controlada**

A deterioração controlada foi avaliada utilizando envelopes de alumínio, onde foram colocadas 42 gramas de sementes de cada tratamento. O grau de umidade das sementes foi de 15%. Posteriormente os envelopes foram acondicionados em câmara fria a 10 °C durante 24 horas, e na sequência em câmara B.O.D, temperatura de 42°C durante 48 horas (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA, 1995; ROSSETO; MARCOS FILHO, 1995).

### **Condutividade Elétrica**

Para o teste de condutividade elétrica, para cada bloco foram utilizadas quatro amostras de 50 sementes, previamente pesadas. Em seguida, foram colocadas em copos de plástico (capacidade de 200 ml) contendo 75 mL de água deionizada durante 24 horas à temperatura de 25°C. Por meio de um condutivímetro de massa, marca DIGIMED®, modelo CD 21A, foi efetuada a leitura da condutividade da solução de embebição das sementes de cada cultivar

e os resultados expressos em S cm<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> de sementes (VIEIRA; CARVALHO, 1994).

O teste de condutividade elétrica foi realizado em sementes produzidas no segundo ensaio.

A análise dos dados obtidos nos testes fisiológicos, foi realizada por meio da análise de variância, utilizando o programa estatístico Sisvar®. A comparação de médias foi realizada pelo teste de Skott-knott, com 5% de probabilidade.

### **3.3 Análise da expressão gênica**

#### **Análise de Proteínas**

Para a análise de proteínas foi utilizada uma amostra de 50 sementes para cada tratamento e destas, retiradas as duplicatas para os géis. As sementes foram maceradas em cadinhos contendo nitrogênio líquido e antioxidante PVP (Polivinil Pirrolidone). Foram retiradas sub amostras de 100 mg, nas quais foram adicionadas 300 ul de éter etílico + 300 ul de água para retirada do óleo. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 14000 rpm, 4° C, realizando-se esse processo duas vezes. Para a extração das enzimas, 250 ul do tampão de extração (Tris HCl 0,2 M pH 8 + 0,1% de beta mercaptoetanol), foi utilizado. Em seguida as amostras foram agitadas rapidamente em vortex, permanecendo durante a noite em geladeira. Na manhã seguinte as amostras foram centrifugadas a 4° C a 14000 rpm por 30 minutos. Foram aplicados 50 µL do sobrenadante no gel de corrida (gel separador – poliacrilamida 7,5% e gel concentrador – poliacrilamida 4,5%). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi a Tris glicina pH 8,9. As corridas foram efetuadas a 150 V por 6 horas. Após a eletroforese, foi realizada a revelação de cada enzima, seguindo o protocolo para cada uma delas (ALFENAS, 2006).

A análise para a expressão enzimática foi realizada mediante a presença ou ausência de bandas em cada gel.

### **Análise da expressão das enzimas por meio da técnica de qRT PCR**

#### **Extração de RNA total e síntese de cDNA**

A extração do RNA foi realizada a partir da maceração de cinco sementes de cada cultivar, em nitrogênio líquido. Depois, todos os materiais utilizados foram previamente submetidos a H<sub>2</sub>O tratada com DEPC 0,1% (dietilpirocarbonato), para inibir a ação das enzimas RNAses. O RNA total foi extraído em duas repetições biológicas para cada amostra, utilizando o reagente PureLink Plant RNA (INVITROGEN) segundo recomendações do fabricante e, para 0,1 g da semente, 500 µL de PureLink Plant RNA, agitado em vórtex por 20 segundos e mantido em repouso na posição horizontal por 5 min., para melhor homogeneização do material. Em seguida, o material foi centrifugado a 14.000 xg a 4°C, durante 15 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo, adicionando-se 300 µL de clorofórmio, 100 µL de cloreto de potássio (5M), seguido de agitação. Novamente foi realizada a centrifugação a 14.000 xg a 4 °C, durante 10 min. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo adicionando-se o mesmo volume de álcool isopropílico e o microtubo foi mantido em repouso, durante 10 min. Posteriormente, o material foi centrifugado a 14.000 xg, a 4 °C, por 10 min. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e adicionou-se 1 ml de etanol 70% centrifugando-se a 14.000 xg em temperatura ambiente, durante 1 min. O sobrenadante foi removido e o pellet secado por 10 min, o qual foi ressuscitado em 20 µL de água com DEPC 0,1% e armazenado a -80°C.

A quantificação do RNA total extraído foi feita em espectrofotômetro, medindo-se a absorbância a 260 e 280nm, observando a razão de comprimento de onda 260/280, cujos valores se encontraram na faixa de 1,8 a 2,0, o que

indica extração de alta qualidade. A integridade do RNA também foi analisada por eletroforese em gel de agarose (1,5%), contendo tampão TBE 1x e corado com solução de brometo de etídeo. A corrida aconteceu a 90V, durante 30 min.

### **Tratamento com DNase**

As amostras extraídas de RNA foram tratadas com DNase (AMBION), conforme instruções do fabricante. Para a obtenção do cDNA foi utilizado o kit Hight-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems).

### **Desenho de primers**

Utilizando o banco de genes da NCBI, foram selecionadas as sequencias dos diferentes genes que codificam para as enzimas avaliadas. Posteriormente, os primers foram desenhados por meio do programa Primer Express 3 (Applied Biosystems). Foram escolhidos os genes GAPDH (gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase) e CYP2 (peptidil-prolil-cis-transisomerase2).

Tabela 1 Primers utilizados na análise de qRT-PCR para a análise das cultivares selecionadas de alta e baixa qualidade fisiológica

Gene	Sequência do Primer
GAPDH F	5' TCCAAGGGGACCTAACGGAGA 3'
GAPDH R	5' TGGGTCAAGAGCTGGATGGTG 3'
CYP2 F	5' CGGGACCAGTGTGCTTCTTCA 3'
CYP2 R	5' CCCCTCCACTACAAAGGCTCG 3'
SOD F	5' GTTGAAAAGCCA GGGGACA 3'
SOD R	5' TCTTACCCCTTGA GCGTGG 3'
PRXF	5' TCCTGACTATTATTTCCGCATCAC 3'
PRX R	5' TTATCACACATGCGCTTGAATTT 3'
CAT F	5' TGTTGCTGCAGTTGCGTACA 3'
CAT R	5' CGGAAAACCAAGTCTCATCAACTA 3'
PGI F	5' AACAAACGGCACTGACAGTTACG 3'
PGI R	5' GAGCACCACCCTGTTTGGTT 3'
MDH F	5' GGCACCCTGTTTGGTGGGACA 3'
MDH R	5' GTTGAAAAGCCA GGGGACA 3'
ICL F	5' TGGGTCAAGAGCTGGATGGTG 3'
ICL R	5' CGGGACCAGTGTGCTTCTTCA 3'

(F) sequência do primer forward. (R) sequência do primer reverse

### PCR em tempo real

As reações foram preparadas em triplicatas para cada uma das duas repetições biológicas e realizadas no termociclador ABI PRISM 7500 Real Time PCR (APPLIED BIOSYSTEMS), utilizando-se SYBR Green PCR Master Mix (APPLIED BIOSYSTEMS). A expressão quantitativa relativa foi determinada pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

Primeiro, foi testada a eficiência dos primers, em diferentes diluições do cDNA (1:5, 1:25, 1:125, 1:625, 1:3125), foi selecionada a diluição 1:5 em função do resultado na eficiência de cada primer.

As condições das reações foram 50 ° C durante 2 min, 95 ° C durante 10 min, 45 ciclos de 95 ° C durante 2 min, 62 ° C durante 30 s e 72 ° C durante 30 s. Após terem sido realizadas as devidas padronizações, as reações de

amplificação foram conduzidas em um volume final da reação de 20  $\mu\text{L}$  contendo: 10  $\mu\text{L}$  de SYBR Green PCR Master Mix (APPLIED BIOSYSTEMS), 2  $\mu\text{L}$  de cDNA (250 ng), 0,4  $\mu\text{L}$  de cada um dos primers forward e reverse e 7,2  $\mu\text{L}$  de água ultrapura autoclavada.

Após a amplificação por PCR em tempo real, cada produto da amplificação foi analisado por uma curva de dissociação, certificando que para cada gene e tratamento, o produto amplificado não apresentou bandas inespecíficas e/ou formação de dímeros de primer. A análise dos dados foi realizada por meio do programa 7500 Software SDS (Versão 2.0.1) (APPLIED BIOSYSTEMS).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Análises fisiológicas**

Houve diferença significativa para a qualidade fisiológica das sementes de soja entre cultivares pelos testes de germinação e vigor ( $P < 0,05$ ), no primeiro ensaio no qual foram avaliadas sementes de 12 cultivares.

Dos testes utilizados para a avaliação do vigor, o de envelhecimento acelerado por 82 horas, cuja avaliação foi feita no quinto dia após a semeadura foi o que propiciou maior separação entre cultivares. Nestas condições, maiores valores de vigor foram observados em sementes da cultivar MS8400, seguido da cultivar CD 201. Neste mesmo teste, menores valores de vigor foram observados para as cultivares Syn1263 e CD202.

Para as demais cultivares foram observados valores intermediários de vigor. Quando as sementes foram envelhecidas por 72 horas houve menos distinção entre as cultivares quanto ao vigor, em relação as envelhecidas por 82 horas, nestas condições, foram verificadas maiores valores e vigor, quanto a avaliação realizada no quinto dia, em sementes das cultivares MS8400, CD201, CA 115 e BRS820. As demais apresentaram-se com menor vigor e não houve diferença estatística dos valores de vigor entre as mesmas.

Em sementes envelhecidas por 72 horas e quando a avaliação foi realizada no sétimo dia, houve diferenças em dois grupos. Os menores valores de vigor foram observados em sementes das cultivares Syn 1263, Syn1279, CD215 e BMXpot. As demais cultivares foram agrupadas com maiores níveis de vigor das sementes.

Outro teste utilizado para avaliação do vigor das sementes de soja foi a deterioração controlada. Quando a avaliação foi realizada no quinto dia após a semeadura, não houve diferença estatística entre os valores de vigor das

sementes, das doze cultivares avaliadas. Quando a avaliação foi estendida para o sétimo dia, o menor vigor foi observado em sementes da cultivar Savana. Para as demais cultivares não houve diferença estatística nos valores de vigor. Neste contexto foi verificado que o teste de envelhecimento acelerado, propicia melhor separação entre os níveis de vigor de sementes de diferentes cultivares.

Já pelo teste de germinação com avaliação realizada no quinto dia, menores valores de germinação foram observados em sementes das cultivares Conquista e Savana. Em avaliação realizada aos sete dias após a semeadura, além das cultivares Conquista e Savana classificadas com menor vigor de sementes, também as sementes das cultivares SYN 1263, UFLA 1 e BMX Potencia, também se apresentaram com menor vigor (Tabela 1).

De uma maneira geral, os resultados obtidos nos testes utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes, variaram entre as cultivares, ou seja, não foi possível classificar cultivares com sementes com alta e baixa qualidade fisiológica, considerados todos os testes.

Tabela 1 Médias obtidas dos testes fisiológicos: envelhecimento acelerado (EA), com 82 horas; envelhecimento acelerado (E.A) com 72 horas; germinação (GER) com 5 e 7 dias; deterioração controlada (D.C) com 5 e 7 dias de sementes de soja de 12 cultivares produzidas no ensaio um

<b>Cultivares</b>	<b>E.A 5 dias (82 horas)</b>	<b>E.A 5 dias (72horas)</b>	<b>GER. 5 dias</b>	<b>GER. 7 dias</b>	<b>D.C 5 dias</b>	<b>D.C 7 dias</b>
<b>Syn1263</b>	13.0 e	92.0 b	95.0 a	97.0 b	98.0 a	100 a
<b>CD 202</b>	13.0 e	93.0 b	98.0 a	100 a	95.0 a	97.0 a
<b>Syn 1279</b>	26.0 d	86.0 b	98.0 a	99.0 a	98.0 a	98.0 a
<b>CD 215</b>	27.0 d	87.0 b	99.0 a	99.0 a	97.0 a	99.0 a
<b>BRS 820</b>	30.0 d	96.0 a	98.0 a	98.0 a	98.0 a	98.0 a
<b>Conquista</b>	31.0 d	93.0 b	91.0 b	96.0 b	94.0 a	97.0 a
<b>Savana</b>	32.0 d	91.0 b	88.0 b	95.0 b	90.0 a	93.0 b
<b>UFLA 1</b>	34.0 d	93.0 b	96.0 a	97.0 b	98.0 a	99.0 a
<b>BMX pot.</b>	41.0 c	91.0 b	96.0 a	97.0 b	96.0 a	97.0 a
<b>CA 115</b>	41.0 c	97.0 a	98.0 a	99.0 a	96.0 a	98.0 a
<b>CD201</b>	63.0 b	100 a	98.0 a	99.0 a	98.0 a	98.0 a
<b>MS 8400</b>	73.0 a	97.0 a	98.0 a	99.0 a	95.0 a	97.0 a
<b>CV%</b>	15.39	3.88	2.77	1.73	3.10	2.16

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância

Ao compilar os resultados obtidos neste primeiro ensaio, principalmente quando as sementes foram submetidas ao envelhecimento acelerados por 82 horas e também baseando-se nos resultados obtidos nas pesquisas de Baldoni (2013) e Menezes (2008), definiu-se por selecionar as cultivares em dois grupos, sendo as que apresentaram sementes com alta qualidade fisiológica, as cultivares CD201, CA115 e MS8400 e com baixa qualidade fisiológica, as cultivares SYN 1263, SYN 1279 e CD 202.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados relacionados como os testes de germinação e vigor das sementes do ensaio dois, com os resultados das seis cultivares de soja, selecionados como as mais contrastantes.

Tabela 2 Médias obtidas dos testes fisiológicos: germinação (GER.) com 5 e 7 dias; envelhecimento acelerado (EA), com 82 horas e 72 horas; deterioração controlada (D.C); e condutividade elétrica (C.E), de sementes produzidas no segundo ensaio de 6 cultivares contrastantes consideradas de alta e baixa qualidade fisiológica de sementes

Cultivares	GER.		E.A 72 horas		E.A 82 horas		D.C.		C.E
	5 dias	7 dias	5 dias	7 dias	5 dias	7 dias	5 dias	7 dias	
<b>CD 201</b>	97 a	99 a	83 b	92 a	89 b	95 a	94 a	97 a	11,35 a
<b>MS8400</b>	97 a	100a	96 a	98 a	98 a	98 a	95 a	97 a	8,89 b
<b>CA115</b>	97 a	99 a	93 a	96 a	91 b	95 a	97 a	98 a	9,33 b
<b>CD202</b>	77 b	90 b	85 b	94 a	75 c	88 b	96 a	98 a	10,68 a
<b>Syn1263</b>	97 a	99 a	63 c	86 b	49 d	73 c	90 a	96 a	8,60 b
<b>Syn1279</b>	97 a	98 a	85 b	96 a	87 b	96 a	98 a	99 a	7,79 b
<b>CV(%)</b>	3,21	1,84	4,90	4,44	5,28	4,15	5,06	2,29	8,03

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância

Pelo teste de germinação tanto aos cinco dias de avaliação após a sementeira, quanto aos oito dias, o menor valor foi verificado em sementes do cultivar CD 202. Para as demais cultivares, não houve diferença estatística significativa entre os valores obtidos. Quando as sementes foram submetidas ao envelhecimento artificial por 72 horas e 82 horas, os menores valores de vigor foram observados em sementes do cultivar SYN 1263, tanto nas avaliações realizadas aos cinco quanto aos oito dias. Nestas avaliações, também foi observado baixo vigor em sementes da cultivar CD 202. Considerando estas quatro avaliações, ou seja, sementes envelhecidas por 72 horas e 82 horas e as avaliações realizadas no quinto e oitavo dia, houve maior vigor em sementes da cultivar MS 8400, seguidas das cultivares CA 115 e CD 201. Em relação a cultivar SYN 1279, o vigor das sementes foi menor quando as avaliações ocorreram no quinto dia em sementes envelhecidas por 72 e 82 horas. No entanto, este comportamento não se manteve, quando as avaliações foram realizadas no oitavo dia após a sementeira.

Ao analisar os resultados de condutividade elétrica verifica-se que não foi possível associar a qualidade fisiológica com os valores de condutividade. Os menores valores de condutividade elétrica foram observados em sementes das cultivares MS 8400 e CD 202, sendo a primeira, classificada como de alta qualidade e a segunda, de baixa qualidade fisiológica. Os maiores valores foram observados em sementes das cultivares CD 201 e CD 202, também discrepantes quanto à característica de qualidade fisiológica.

De uma maneira geral pelo teste de envelhecimento acelerado com 82 horas, foi possível uma melhor separação e contraste entre as cultivares, bem como diferenciar a qualidade fisiológica das sementes entre as cultivares.

Pelo teste de deterioração controlada não foi possível diferenciar a qualidade fisiológica das sementes entre as cultivares avaliadas. A cultivar CD 201 é uma cultivar convencional e tem sido utilizada em diferentes estudos de

produtividade e qualidade fisiológica. Na maioria dos trabalhos tem sido classificada como de alta qualidade fisiológica de sementes (LUDWING et al., 2011).

Menezes et al. (2009) fizeram uma seleção de genótipos, para a característica de qualidade fisiológica de sementes, observaram então que sementes, das cultivares CD201 e MS-8400, mostraram-se mais vigorosas.

Resultados semelhantes, quando submetidas aos testes de envelhecimento acelerado e índice de velocidade de emergência foram observadas por Baldoni (2013).

A cultivar CA 115 possui a tecnologia RR 2 Bt, classificadas como de alta qualidade fisiológica, ainda não é cultivar comercial, mas esta sendo estudada e considerada como uma cultivar de alta qualidade fisiológica pela empresa obtentora da mesma.

As cultivares consideradas de baixa qualidade, como Syn 1263 e Syn 1379, são consideradas cultivares de alta produtividade, mas tem apresentado sementes com baixa qualidade fisiológica (FERREIRA, 2015). Isto pode inviabilizar a recomendação desta cultivar no mercado.

A cultivar CD 202, foi selecionada como de baixa qualidade quando avaliada por Menezes et al. (2009) e Minuzzi et al. (2010).

Ao analisar os resultados obtidos em diferentes pesquisas, relacionadas a seleção de cultivares para a característica de qualidade fisiológica, observa-se variações nos valores de germinação e vigor em sementes das mesmas cultivares, produzidas em diferentes locais e safras.

Há situações em que as classificações quanto à qualidade fisiológica de sementes, muda completamente. Esta situação demonstra a complexidade do controle genético para esta característica em sementes de soja. Assim infere-se que esta característica seja controlada por vários genes.

#### 4.2 Análise da expressão gênica por meio de proteínas

Para a enzima álcool desidrogenase (ADH), observa-se maior atividade nas sementes das cultivares CD201, MS8400 e CA115. (Figura 1).

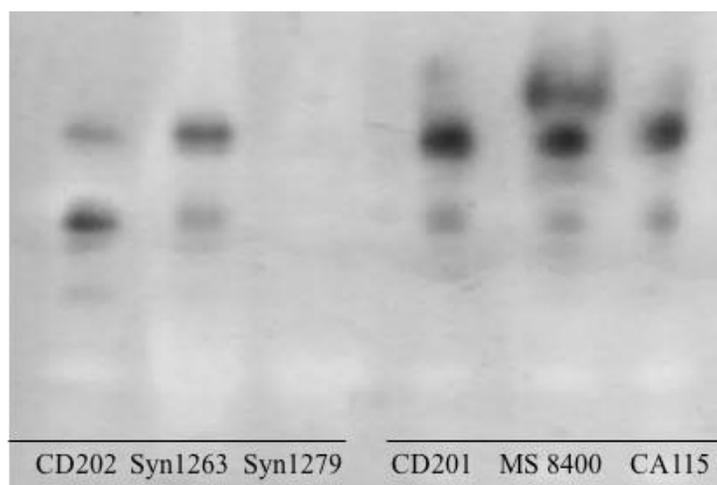


Figura 1 Padrões isoenzimáticos em sementes de soja das cultivares CD 201, MS8400, CA 115, CD202, SYN 1363, SYN1279) revelados para a enzima Álcool desidrogenase (ADH)

A ADH está relacionada à respiração anaeróbica, promovendo a redução do acetaldeído a etanol (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2005). Maior expressão da enzima em sementes das cultivares classificadas como de alta qualidade, quando comparadas a expressão desta, em sementes de cultivares consideradas de baixa qualidade. A ADH está envolvida no processo respiratório anaeróbico e tem como função a remoção do acetaldeído o transformando em etanol, para evitar deterioração nas sementes.

Baldoni (2013), observou resultados semelhantes em sementes dessas cultivares, tanto em sementes colhidas no estágio R8, quanto aquelas colhidas 15 dias após o estágio R8, possivelmente por se encontrarem mais vulneráveis à

deterioração e conseqüentemente com maior produção de acetaldeído, que é considerado mais tóxico às sementes, quando comparado ao etanol (ZHANG et al., 2008). Padrões semelhantes para a atividade da ADH foram encontrados por Vidigal (2009).

Carvalho et al. (2014a) constataram maiores expressões de ADH em sementes de cultivares de soja que apresentaram melhor qualidade fisiológica. As sementes ficam menos suscetíveis à ação deletéria do acetaldeído, com uma maior atividade da ADH (VEIGA et al., 2010).

Em relação à enzima MDH (Figura 2), observou-se padrões de expressão semelhantes desta enzima em todas as cultivares avaliadas. A enzima Malato Desidrogenase (MDH) tem sido associada com a biossíntese de oxaloacetato (OAA), pela interconversão do malato para oxaloacetato, durante o ciclo dos ácidos tricarbóxicos (Ciclo de Krebs) em plantas (GASPARMALONE et al., 2007). Assim, essa enzima assume uma função importante em uma ampla variedade de reações biosintéticas, tais como síntese de aminoácidos, gluconeogênese, manutenção dos potenciais redox e intercâmbio de metabólitos entre o citoplasma e as organelas. Contudo, espera-se que a atividade de MDH seja intensa nos primeiros estádios do processo de germinação, em que a síntese de novos tecidos requer mais energia para o crescimento (GASPARMALONE et al., 2007). A enzima MDH se expressa em diferentes organelas da célula. Assim infere-se que a expressão da mesma, ocorra em sementes com diferentes níveis de deterioração e qualidade fisiológica.

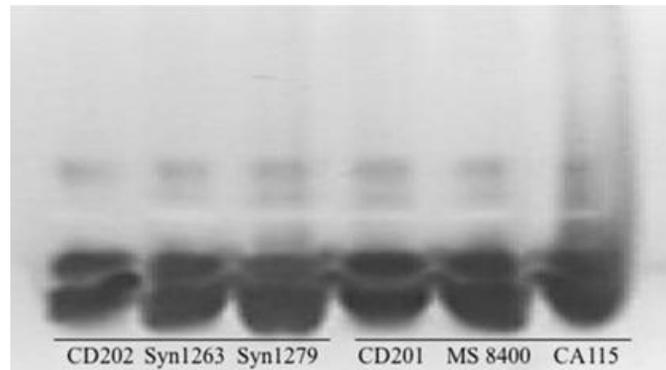


Figura 2 Padrões isoenzimáticos de sementes de soja de baixa (CD 202, SYN1263, SYN1279) e alta qualidade fisiológica (CD 201, MS8400, CA 115), revelados para a enzima MDH

O zimograma referente à enzima fosfoglico isomerase (PGI), está apresentada na figura 3. A expressão dessa enzima foi maior em sementes das cultivares CD 201 e CA 115 classificadas como de alta qualidade.

A maior expressão desta enzima esta associada à efetividade da enzima no processo de fosforilação de açúcares na glicólise, importante para a produção de energia, durante a respiração. É importante ressaltar que em sementes do cultivar MS 8400, a expressão da PGI foi semelhante à observada em sementes de baixa qualidade.

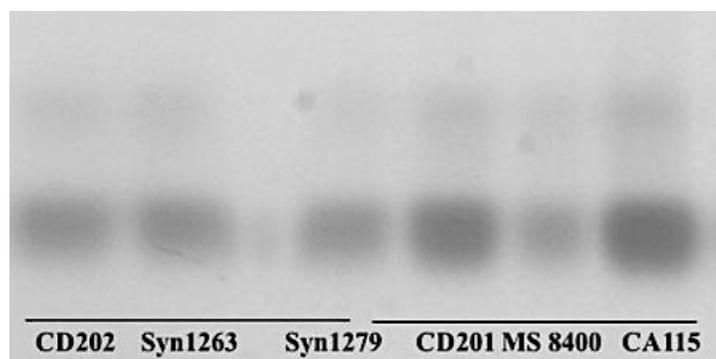


Figura 3 Padrões isoenzimáticos de sementes de soja de baixa (CD 202 e SYN 1263, SYN 1279) e alta qualidade fisiológica (CD201, MS8400, CA115), revelados para a enzima PGI

Em outras pesquisas com sementes de soja, maior expressão de enzimas envolvidas na respiração, foi verificada, constatou maior expressão destas enzimas em sementes com alta qualidade fisiológica (BALDONI, 2013). Também Castro (2012) observou maior respiração da enzima MDH e expressão em sementes de milho com alta qualidade. Tem sido relatado que em consequência do processo de deterioração das sementes, ocorre um comprometimento da atividade respiratória dessas. Sendo assim, sementes de qualidade fisiológica inferior deveriam apresentar menor atividade de enzimas relacionadas à respiração.

Para a enzima Sorbitol desidrogenase (SDH) (Figura 4), maior atividade foi verificada nas sementes das cultivares de alta qualidade, CD201, Ms8400 e CA115.



Figura 4 Padrões isoenzimáticos de sementes de soja de baixa (CD202, Syn1263, Syn1279) e alta qualidade fisiológica (CD201, MS8400, CA115), revelados para a enzima SDH

A enzima Sorbitol desidrogenase (SDH) é uma enzima importante na respiração aeróbica, agindo na rota metabólica da glicólise e atuando na conversão da glicose a frutose. Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991), verificaram um decréscimo na atividade dessa enzima em sementes de milho, consideradas de baixa qualidade. A perda da atividade da enzima sorbitol desidrogenase em sementes, pode estar associada a baixos níveis de produção de ATP. O estudo da expressão da enzima SDH pode ser considerada promissor marcador bioquímico para avaliação de qualidade de sementes em estádios iniciais de deterioração (BRANDAO JÚNIOR; CARVALHO; VIEIRA, 1999).

Para a enzima piruvato descarboxilase (Figura 5), foi verificada expressão em sementes de alta qualidade CD201, MS8400, CA115. A enzima piruvato descarboxilase atua na via anaeróbica da respiração e consequentemente, há acúmulo de acetaldeído nas células. Na rota anaeróbica, o piruvato produzido na glicólise é convertido em acetaldeído pela ação da enzima piruvato descarboxilase. O acetaldeído é então reduzido para etanol, por meio da enzima álcool desidrogenase (PEREIRA, 2012). No início do processo de germinação ocorre a rota anaeróbica e consequentemente, a expressão destas

enzimas é importante para que ocorra a protrusão radicular e a formação de novos tecidos.

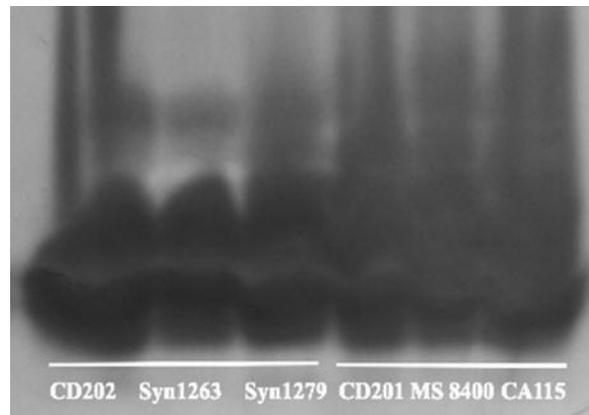


Figura 5 Padrões isoenzimáticos de sementes de soja de baixa (CD202, Syn1263, Syn1279) e alta qualidade fisiológica (CD201, MS8400, CA115), revelados para a enzima Piruvato descarboxilase

Quanto aos padrões obtidos para a enzima superóxido dismutase (SOD), observou-se maior atividade em sementes classificadas como de baixa qualidade, CD 202, Syn1263 e Syn1279, (Figura 6).



Figura 6 Padrões isoenzimáticos de sementes de soja de baixa (CD 202, Syn1363, Syn1279) e alta qualidade fisiológica (CD201, MS8400, CA115), revelados para a enzima SOD. (Fotografia modificada em negativo)

A SOD é considerada uma enzima removedora de radicais livres e é uma das primeiras a atuarem na defesa contra espécies reativas de oxigênio (ERO's). A baixa qualidade fisiológica pode estar associada à maior atividade da SOD, sendo possível que tal comportamento esteja relacionado à eliminação de ERO's, presentes em sementes dessas cultivares. O peróxido de hidrogênio, formado como produto da SOD, apesar de menos reativo que o acetaldeído, em altas concentrações, torna-se tóxico, pois pode reagir formando radicais hidroxila, que causam peroxidação de lipídios (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

Quanto a enzima catalase (CAT), que remove o peróxido de hidrogênio, esperava-se maior atividade desta enzima em cultivares consideradas de baixa qualidade, já que esta enzima faz parte do primeiro

sistema de defesa da célula, quando há o estresse oxidativo com o consequente aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO's). Nesta pesquisa foi observada maior expressão em sementes das cultivares CD 202, Syn 1279, e MS8400, sendo esta última classificada como de alta qualidade fisiológica. (Figura 7).

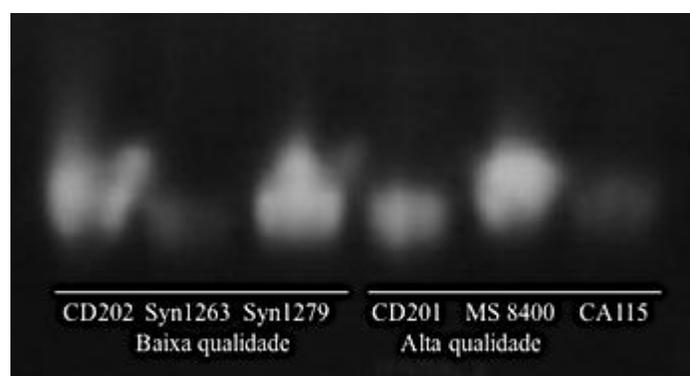


Figura 7 Padrões isoenzimáticos de sementes de soja de baixa (CD 202, Syn1263, Syn1279) e alta qualidade fisiológica (CD201, MS8400, CA115), revelados para a enzima CAT

Já em sementes das cultivares Syn1263 e CA115 foram observadas menores atividades desta enzima.

Por outro lado, Rezende, Salgado e Chaves et al. (2003) relataram que em sementes deterioradas, tem sido observada menor atividade dessa enzima, podendo estar associada a menor eficiência dos sistemas removedores de radicais livres. Baldoni (2013) também observou variações desta enzima, tanto em sementes de alta, como de baixa qualidade.

Em relação a enzima Isocitrato liase (ICL) (Figura 8), houve menor expressão em sementes das cultivares Syn1263 e Syn1279 classificadas como de baixa qualidade fisiológica de sementes. Carvalho et al. (2014b) constataram maior atividade da ICL em cultivares de sementes de soja, com melhor

qualidade fisiológica. Na presente pesquisa em sementes das cultivares CD201, MS 8400 e CA115, classificadas como de alta qualidade fisiológica, também foi verificada maior expressão desta enzima. Mas em sementes do cultivar CD 202 houve maior expressão desta enzima, sendo a mesma classificada como de baixa qualidade fisiológica.

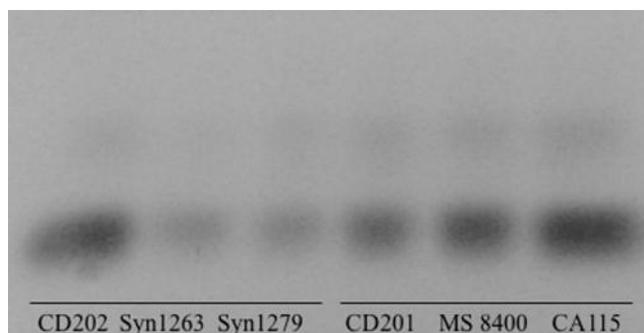


Figura 8 Padrões isoenzimáticos em sementes de soja de baixa (CD202, Syn1263, Syn1279) e alta qualidade fisiológica (CD201, MS8400, CA115), revelados para a enzima ICL

Em sementes de soja, a ICL é considerada uma enzima chave na regulação do ciclo do glioxilato e está envolvida no metabolismo de lipídios armazenados nas sementes oleaginosas e no desenvolvimento das atividades no glioxisomas. Neste contexto, o teor de lipídios pode interferir na expressão desta enzima. Maior atividade da enzima isocitrato liase pode estar relacionada a sementes mais vigorosas (MARTINS et al., 2000). A atividade dessa enzima aumenta durante a germinação das sementes, obtendo-se valores máximos quando ocorre o máximo da proporção de lipídios degradados para a síntese de sacarose (BEWLEY; BLACK, 1994). Neste ciclo, os lipídeos insolúveis das sementes se transformam em açúcares solúveis como a sacarose, os quais são facilmente deslocados para os meristemas radiculares e apicais (CIONI; PINZAUTI; VANNI, 1981).

O zimograma relacionado a enzima esterase (EST), encontra-se na Figura 9. Maior expressão foi observada em sementes da cultivar CD202, seguidas das cultivares MS8400 e CA 115.

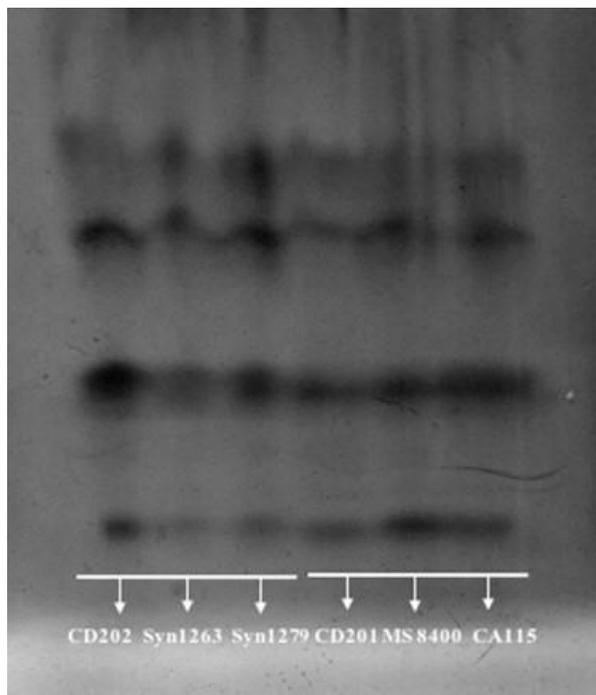


Figura 9 Padrões isoenzimáticos de sementes de soja de baixa (CD202, Syn1263, Syn1279) e alta qualidade fisiológica (CD201, MS8400, CA115), revelados para a enzima EST

A esterase atua no crescimento do eixo embrionário e na quebra de lipídios no processo de germinação, principalmente em sementes oleaginosas como a soja. Em algumas pesquisas tem sido observada em sementes de soja de baixa qualidade, maior atividade desta enzima provavelmente relacionada às alterações na integridade da membrana celular e o processo de deterioração em sementes (VEIGA et al., 2010).

Estes resultados podem estar relacionados com os obtidos no teste de condutividade. Foram observados maiores valores de condutividade elétrica em sementes da cultivar CD202, seguido das cultivares MS8400 e CA115. A expressão da enzima catalase, demonstra que pode ter iniciado um processo de deterioração nas sementes. O teste de condutividade elétrica baseia-se no princípio de que, com o processo de deterioração, ocorre aumento da lixiviação dos constituintes celulares das sementes embebidas em água, devido à perda da integridade dos sistemas de membranas celulares (HEPBURN et al., 1984). Assim, considera-se o vigor das sementes inversamente proporcional aos valores da condutividade elétrica (VIEIRA; CARVALHO, 1994; VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999).

Quanto a expressão da enzima Glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) (Figura 10), observou-se maior expressão em sementes classificadas como de baixa qualidade CD 202, Syn1263 e Syn1279.

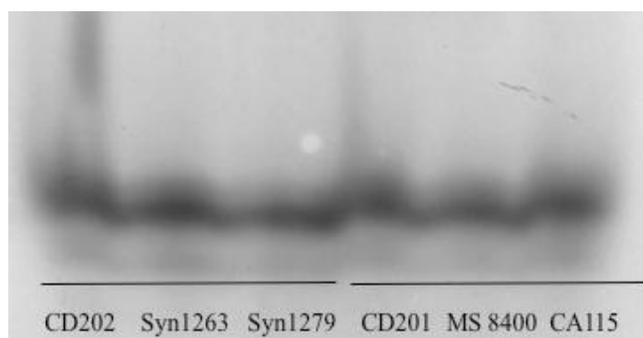


Figura 10 Figura 4. Padrões isoenzimáticos de sementes de soja de baixa (CD202, Syn1263, Syn1279) e alta qualidade fisiológica (CD201, MS8400, CA115), revelados para a enzima GOT

A glutamato oxaloacetato transaminase tem importante participação em reações de transaminação, durante a eliminação do nitrogênio dos aminoácidos, e na formação de grupos ceto, para o ciclo de Krebs e gluconeogênese

(TANKSLEY, 1983). Tunes et al. (2007), associaram alterações do número de isoformas da enzima GOT com o processo de deterioração de sementes. Resultados semelhantes foram observados por Silva Neta (2014) em sementes de milho.

Na Figura 11, encontra-se o zimograma referente a expressão de proteínas resistentes ao calor, em sementes de soja. Maior expressão foi observada em sementes de cultivares classificadas como de baixa qualidade CD202, Syn 1263 e Syn 1279, com mais expressão em sementes da cultivar Syn1279, quando comparada e observada em sementes de alta qualidade.

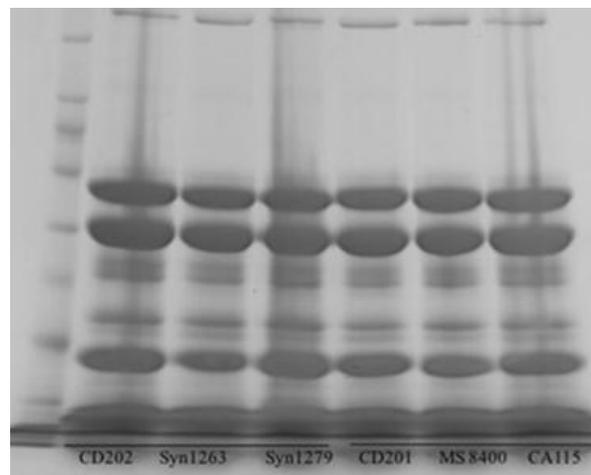


Figura 11 Padrões da proteína resistente ao calor de sementes de soja de baixa (CD 202, Syn1263, Syn1279) e alta qualidade fisiológica (CD 201, MS8400, CA 115)

As proteínas resistentes ao calor são expressas principalmente durante o desenvolvimento da semente, e sua expressão é reduzida após germinação. Essas proteínas atuam na manutenção da taxa de germinação em condições de estresse (ROSA et al., 2005).

Andrade (2015) observou maior expressão destas proteínas em sementes embebidas em ABA em relação à observada em sementes embebidas em água. Constatou alta expressão de proteínas LEA em sementes de linhagens e híbridos de milho, classificadas como de alta qualidade fisiológica.

Alta correlação entre a expressão de proteínas resistentes ao calor e qualidade fisiológica de sementes também foi observada por diversos autores (ROSA et al., 2005; SILVA NETA, 2014).

Houve diferentes padrões de expressado de proteínas em sementes das cultivares estudadas. Estas cultivares apresentaram variabilidade quanto a qualidade fisiológica de sementes, quando foram submetidas aos testes de vigor e germinação. De uma maneira geral, naquelas cultivares com sementes classificadas como de alta qualidade houve maior expressão de enzimas envolvidas no processo de respiração, considerando tanto a rota aeróbica quanto a anaeróbica a exemplos do álcool desidrogenase, malato desidrogenase, fosfoglico isomerase, e piruvato descarboxilase.

Também foi observado um maior expressado das enzimas Isocitrato liase e esterase em sementes da maioria das cultivares classificadas como de alta qualidade. Estas enzimas estão envolvidas no metabolismo de lipídeos, importante durante o processo de germinação de sementes. Em sementes destas cultivares, ainda foi observada menor expressão das enzimas superóxido dismutase e glutamato oxaloacetato transaminase.

Para a catalase não houve como relacionar os resultados de expressão desta enzima com a qualidade fisiológica das sementes.

Para proteínas resistentes ao calor, uma menor expressão foi observada em sementes com alta qualidade.

### 4.3 Análise da expressão gênica por meio de transcritos

Em relação ao estudo de expressão de transcritos, pela técnica de RTq-PCR, observa-se maior expressão do gene SOD, em sementes das cultivares SYN1279 e SYN1263, ambas classificadas como de baixa qualidade fisiológica de sementes.

Estes resultados com os observados na análise proteômica, também se verifica uma maior atividade da enzima SOD em sementes destas cultivares. Ainda em relação aos resultados observados para a expressão de transcritos de SOD, menores valores foram observados em sementes das cultivares CD201, CA 115 e MS8400, classificadas como de baixa qualidade fisiológica. Não houve diferença estatística significativa entre os valores de expressão desta enzima, em sementes das cultivares CA 115 e CD 202 (Figura 12).

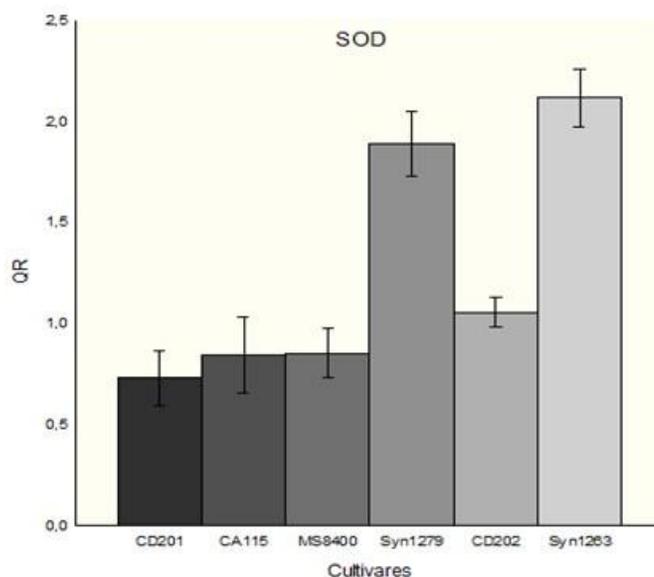


Figura 12 Perfil da expressão quantitativa relativa do gene SOD em sementes de soja de alta (CD201, CA115, MS8400) e baixa qualidade fisiológica (CD202, Syn 1279, Syn1263)

Ao analisar os valores absolutos de expressão observados para esta enzima, houve relação entre os resultados observados nas análises fisiológicas de expressão de transcritos e de proteínas. Em sementes de baixa qualidade fisiológica houve maior expressão da SOD. Esta enzima está associada à formação de  $H_2O_2$  nas células. Assim infere-se que em sementes de baixa qualidade fisiológica de soja há maior formação de radicais livres, havendo a necessidade de expressão desta enzima para a remoção dos mesmos.

Para o gene CAT (Figura 13), também envolvido no sistema de remoção de radicais livres, maior e menor expressão foram observadas em sementes das cultivares SYN 1263 e CD201, classificadas como de baixa e alta qualidade, respectivamente.

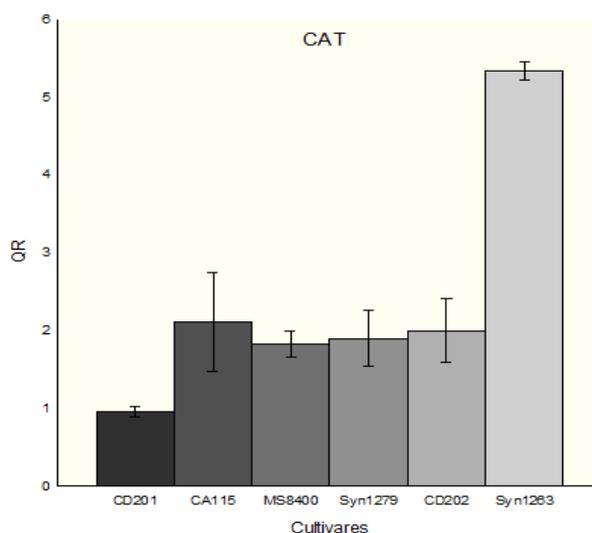


Figura 13 Perfil da expressão quantitativa relativa do gene CAT em sementes de soja de alta (CD201, CA115, MS8400) e baixa qualidade fisiológica (CD202, Syn 1279 e Syn1263)

Espera-se que, quanto maior a produção de  $H_2O_2$  por meio da SOD, maior deve ser a expressão da catalase para a remoção do peróxido de hidrogênio das células. Assim ao analisar os valores absolutos de expressão observados para a SOD, também foram verificados maiores valores de expressão em sementes destas cultivares. Ainda em relação à CAT, não houve diferença nos valores observados em sementes das cultivares CA 115, MS 8400, SYN1279 e CD 202. Ressalta-se que houve relação, ao comparar as expressões de CAT por meio das análises proteômica e transcriptômica. Resultados semelhantes foram observados por Baldoni et al. (2013) trabalhando diferentes cultivares de soja para determinar qualidade de sementes de soja, por Silva Neta (2014), trabalhando com secagem em sementes de café, onde nos dois trabalhos citados, foi possível observar relação entre as análises de proteômica e de transcritos.

Para o gene MDH (Figura 14), foi observado maior expressão em sementes da cultivar Syn 1263, seguida pela expressão em sementes das cultivares CA 115, CD202 e CD 201, não havendo diferença estatística entre os valores observados em sementes das cultivares CD 201 e CD 202. Já a menor expressão foi observada em sementes das cultivares MS 8400 e Syn 1279.

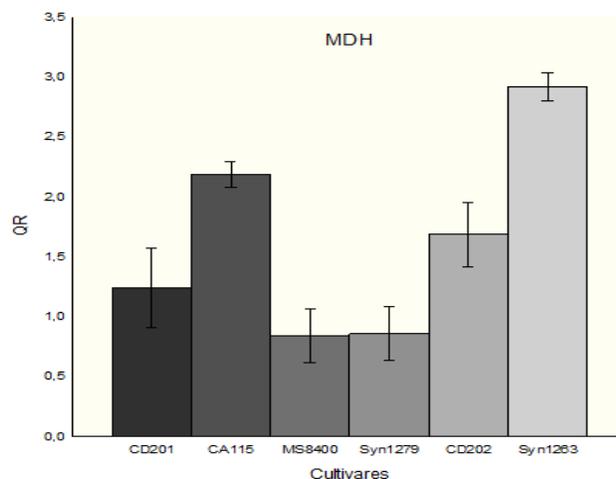


Figura 14 Perfil da expressão quantitativa relativa do gene MDH em sementes de soja de alta (CD201, CA115, MS8400) e baixa qualidade fisiológica (CD202, Syn1279 e Syn1263)

Ao comparar estes resultados com os observados nos testes de germinação e vigor, não foi possível identificar uma relação entre os mesmos. Nos resultados da análise proteômica, como discutido anteriormente, a maior expressão foi observada em sementes classificadas como de alta qualidade fisiológica. Deve-se ressaltar que na análise proteômica avalia-se a expressão da isoenzima MDH. Por outro lado, na análise de transcritos, avaliou-se a expressão de um gene.

Na Figura 15, encontra-se o perfil de expressão de transcrito da PGI. A maior expressão foi observada em sementes da cultivar Syn 1263, seguida em sementes da cultivar Syn1279. Menor expressão foi observada em sementes da cultivar CA115. Não houve diferença de expressão entre as sementes das cultivares CD 201, MS8400 e CD 202. Não foi possível relacionar estes resultados com os observados na análise da enzima PGI e com os resultados observados nos testes de germinação e vigor.

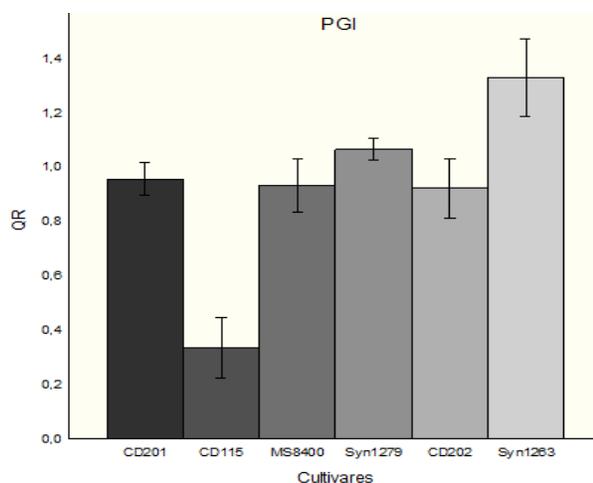


Figura 15 Perfil da expressão quantitativa relativa do gene PGI em sementes de soja de alta (CD201, CA115, MS8400) e baixa qualidade fisiológica (CD202, Syn1279 e Syn1263)

A PGI é uma enzima importante no processo de respiração e se expressa na glicólise. Quando foi avaliada a expressão desta enzima pela técnica de eletroforese (Figura 3), de uma maneira geral, a menor atividade desta, foi observada em sementes de baixa qualidade. Também para a MDH e ADH, enzimas da rota aeróbica e anaeróbica da respiração, foram observadas menor atividade destas enzimas em sementes de cultivares, classificadas como de baixa qualidade. (Figura 1 e 2)

Em relação à expressão do gene ICL (Figura 16), houve diferenças significativas entre as cultivares classificadas de alta e baixa qualidade fisiológica de sementes. A maior expressão foi verificada em sementes do cultivar CA 115, em sequência das observadas em sementes das cultivares MS8400 e CD20. Estas cultivares foram classificadas como de alta qualidade fisiológica de sementes.

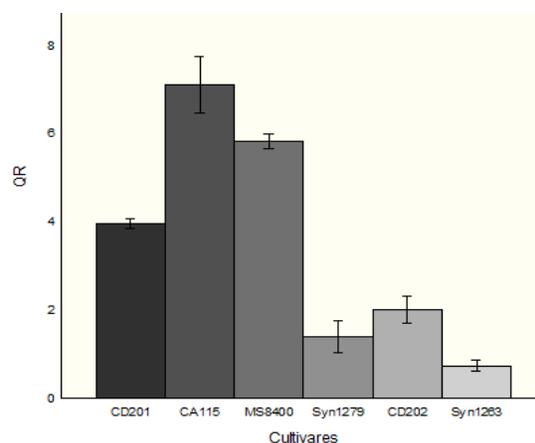


Figura 16 Perfil da expressão quantitativa relativa do gene ICL em sementes de soja de alta (CD201, CA115, MS8400) e baixa qualidade fisiológica (CD202, Syn 1279 e Syn1263)

Observa-se menor expressão de ICL em sementes da cultivar Syn1263, seguida das observadas em sementes das cultivares Syn1279 e CD202. Estas três cultivares foram classificadas como de baixa qualidade fisiológica de sementes. Ao comparar estes resultados, com os observados na análise proteômica pela técnica de eletroforese, pode-se notar que houve também uma menor expressão em sementes de baixa qualidade, principalmente em sementes das cultivares Syn1263 e Syn1279. Menores valores de expressão deste gene foram observados em sementes de cultivares, classificadas como de baixa qualidade fisiológica de sementes em pesquisa desenvolvida por Baldoni (2013).

Esta enzima é importante durante o processo de germinação de sementes, com valores maiores de lipídeos, como a soja. Estes componentes constituem fonte de material de reserva para a produção de energia durante a respiração.

Nesta mesma linha, a esterase também participa deste processo em sementes ricas em lipídeos. Embora não tenha sido avaliada a expressão de

transcrito de esterase, também na análise proteômica, observou-se menor expressão desta enzima em sementes de baixa qualidade.

Quanto a expressão de transcritos para a Peroxiredoxina PRx (Figura 17), houve maior expressão em sementes das cultivares Syn 1279 e Syn1263, seguida da observada em sementes da cultivar CD202. Ressalta-se estas três cultivares, classificadas como de baixa qualidade fisiológica de sementes. Já os menores valores de expressão foram observados em sementes das cultivares CA 115, CD 201, e MS 8400, classificadas como de alta qualidade fisiológica de sementes.

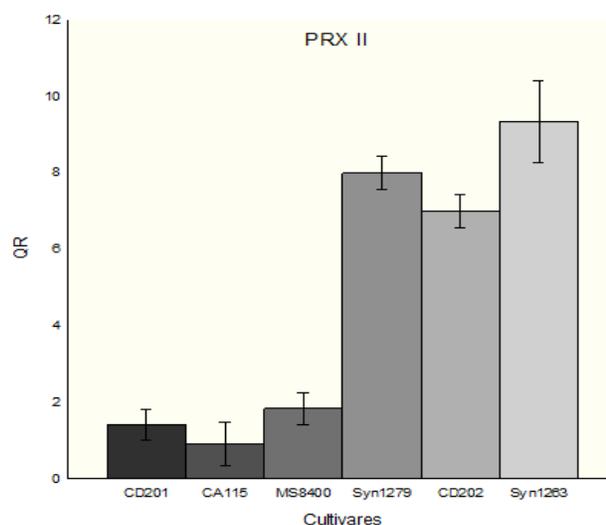


Figura 17 Perfil da expressão quantitativa relativa do gene PRx de sementes de soja de alta (CD201, CA115, MS8400) e baixa qualidade fisiológica (CD202, Syn 1279 e Syn1263)

A enzima Peroxiredoxina PRx, faz parte do grupo das peroxidases, que contribuem no controle de oxido-redução celular pela sua habilidade de reduzir peróxido como  $H_2O_2$ . Assim em sementes com baixa qualidade fisiológica, a maior expressão deste gene pode estar associada a remoção de  $H_2O_2$ .

Características importantes desta enzima é o fato da mesma ser controlada por poucos genes em plantas. Poucas pesquisas foram desenvolvidas com o objetivo de avaliar a expressão deste gene em sementes de soja. No entanto, devido as características do mesmo, infere-se que este pode ser um bom marcador para a seleção de cultivares de soja, embora o custo benefício deva ser avaliado.

Ao avaliar de forma conjunta os resultados obtidos nos testes de germinação e vigor, e nas avaliações de transcritos e de proteínas, conclui-se que a característica de qualidade fisiológica envolve a expressão de vários genes. Isto explica a dificuldade de associar alguns genes estudados nesta pesquisa, seja por meio de transcrito ou por proteínas com a qualidade fisiológica de sementes. Isto explica também a variação observada em relação à classificação das cultivares, quanto à qualidade fisiológica de sementes, quando avaliadas por meio de diferentes testes e quando produzidas sob diferentes condições edafoclimáticas.

Por meio da análise proteômica realizada nesta pesquisa, infere-se que as enzimas envolvidas no processo de respiração, a exemplos do álcool desidrogenase, fosfoglico isomerase e piruvato descarboxilase, são marcadores promissores para avaliação da qualidade fisiológica de sementes. Em relação à análise de transcritos, a maior expressão de peroxiredoxinas parece estar associada à baixa qualidade fisiológica de sementes de soja. Entende-se que a expressão desta proteína deva ser mais explorada em estudos relacionados à qualidade fisiológica de sementes.

## 5 CONCLUSÕES

As cultivares CD201, CA115 e MS8400 foram classificadas como de alta qualidade, enquanto que as cultivares Syn1263, Syn1279 e CD202 foram classificadas como de baixa qualidade, por meio do teste de envelhecimento acelerado em um período de 82 horas.

Por intermédio das análises das enzimas envolvidas no processo de respiração, a exemplos do álcool desidrogenase, fosfoglico isomerase e piruvato descarboxilase, são marcadores promissores para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja.

Uma maior expressão da enzima Peroxiredoxina pode estar relacionada à baixa qualidade fisiológica de sementes de soja.

## REFERÊNCIAS

- ABDUL-BAKI, A. A.; ANDERSON, J. D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOZLOWSKI, T. T. (Ed.). **Seed biological**. New York: Academic, 1972. v. 2, cap. 4, p. 283-315.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2ª ed. Viçosa, MG: UFV, 2006.
- ANDERSON, J. D. Adenylate metabolism of embryonic axes from deteriorated soybean seeds. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 59, p. 610-614, 1977.
- ANDRADE, T. **Controle genético e expressão de genes associados à qualidade fisiológica de sementes de milho**. Lavras: UFLA, 2015.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373–99, Jan. 2004.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigour testing handbook**. Washington, 1983. 88 p. (Handbook on seedtesting. Contribution, 32).
- BALDONI, A. **Expressão de genes relacionados com a qualidade fisiológica de sementes de soja**. 2013. 57 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, 2013.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 453–460, 2014.
- BASAVARAJAPPA, B. S.; SHETTY, H. S.; PRAKASH, H. S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 19, n. 2, p. 279-286, 1991.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.
- BLACKMAN, S. Desiccation tolerance in developing soybean seeds: the role of stress proteins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 93, p. 630-638, 1995.

- BRAMMER, S. P. **A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001.
- BRANDÃO JÚNIOR, D. S.; CARVALHO, M. L. M.; VIEIRA, M. G. G. C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 114-121, 1999.
- BRASIL. Ministerio da Pecuaria e Abastecimento. **Regras para análise de sementes.** Brasília, 2009. 395 p.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & molecular biology of plants.** Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2005. 1367 p.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 25, n. 2, p. 169–193, 2000.
- CAMPBELL M. K. **Bioquímico.** 3th ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 752 p.
- CARRILLO, N.; VALLE, E. M. El lado oscuro del Universo. **Revista de La Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal**, Cordoba, v. 58, n. 2, p. 10–15, 2005.
- CARVALHO, E. R. et al. Alterações isoenzimáticas em sementes de cultivares de soja em diferentes condições de armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 4, p. 967–976, 2014a.
- CARVALHO, E. R. et al. Enzyme activity in soybean seeds produced under foliar application of manganese. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 4, p. 317–327, 2014b.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção.** Jaboticabal: FUNEP, 2000. 429 p
- CASTRO, M. B. **Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de pimenta e pimentão por meio da atividade respiratória.** 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

CESARATTO, L. et al. Overoxidation of peroxiredoxins as an immediate and sensitive marker of oxidative stress in HepG2 cells and its application to the redox effects induced by ischemia/reperfusion in human liver. **Free Radical Research**, London, v. 9, p. 255-268, 2005.

CIONI, M.; PINZAUTI, G.; VANNI, P. Comparative biochemistry of the glyoxylate cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 70, n. 1, p. 1-26, 1981.

DELOUCHE, J. C. Germinação, deterioração e vigor da semente. **Revista Seed News**, Pelotas, v. 6, n. 6, p. 24-31, 2002.

DIETZ, K. J. et al. The function of peroxiredoxin in plant organelle redox metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 1697-170, 2006.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan. 2002.

FERREIRA, V. F. **Adubação com potássio nas características agrônômicas e na qualidade de sementes de soja Lavras - MG**. 2015. 105 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

FRANÇA NETO, J. B. et al. **Mini-curso tecnologia produção de soja de alta qualidade**. 2010. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/30670/1/minicurso01.pdf>>. Acesso em: 22 jan. 2015.

FREEMAN, W. M.; WALKER, S. J.; VRANA, K. E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **BioTechniques**, Natick, v. 26, n. 1, p. 112-22, 124-5, Jan. 1999.

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

GASPARMALONE, P. D. et al. Expressão diferencial de isoenzimas durante o processo de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 29, p. 61-67, 2007.

GECHEV, T. S. et al. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **BioEssays**, Cambridge, v. 28, n. 11, p. 1091–1101, Nov. 2006.

GRIS, C. F. et al. Qualidade fisiológica e teor de lignina no Tegumento de sementes de soja convencional e transgênea RR submetidas a diferentes épocas de colheita. **Ciencias e Agrotecnologias**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 374–381, 2010.

GRIS, C. F. **Qualidade fisiológica de sementes de soja convencional e rr associada ao conteúdo de lignina**. 2009. 148 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization. **Biochemical pharmacology**, New York, v. 49, n. 10, p. 1341–1348, May 1995.

HAMPTON JG; TEKRONY DM. **Handbook of vigor test methods**. Zurich: ISTA, 1995. 117 p.

HORLING, F. et al. Divergent light, ascorbate and oxidative stress-dependent regulation of expression of the peroxiredoxin gene family in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 131, p. 317-325, 2003.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Handbook of vigor test methods**. Bassersdorf, 1995.

JENG, T. L.; SUNG, J. M. Hydration effect on lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes activity of artificially age penault seed. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 22, p. 531-539, 1994.

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

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 4th ed. São Paulo: [s. n.], 2006.

LIMA, W. A. A. et al. Retardamento de colheita como método de diferenciação de genótipos de soja para qualidade de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 29, p. 186-192, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil : nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/bioma\\_caatinga/catalogo/REC000gbpasrvf02wx5ok07shnq94etlj3h.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/bioma_caatinga/catalogo/REC000gbpasrvf02wx5ok07shnq94etlj3h.html)>. Acesso em: 22 fev. 2016.

LUDWING, M. P. et al. Populações de plantas na cultura da soja em cultivares convencionais e Roundup Ready TM. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 58 n 3, p. 305–313, 2011.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MARCOS FILHO, J.; KRZYZANOWSKI, F. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999a. cap. 1, p. 1-21.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999b. cap. 3, p. 1-24.

MARTINS, C. A. O. et al. Atividade da isocitrato-liase durante a germinação de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 42-46, 2000.

MCDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Sci Technol*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 27, n. 1, p. 177–237, Jan. 1999.

MEDINA, S. B. **Caracterización bioquímica y molecular de una peroxiredoxina mitocondrial de Pisum sativum**. 2006. 283 p. Tesis (Doctoral en Farmacia) - Universidad de Granada, Granada, 2006.

MENEZES, M. **Aspectos genéticos asociados a calidad fisiológica de semillas de soya**. 2008. 112 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

MENEZES, M. et al. Aspectos químicos e estruturais da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 12, p. 1716–1723, 2009.

MINUZZI, A. et al. Qualidade de sementes de quatro cultivares de soja, colhidas em dois locais no estado do Mato Grosso do sul. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 32, p. 176–185, 2010.

MORAES, M. L. **Comportamento da pressão estática e da frente de secagem em uma coluna de sementes de arroz**. 2000. 50 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Sementes) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2000.

OHLSON, O. C. et al. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de trigo. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 32, n. 4, p. 118-124, 2010.

OHTA, K. et al. Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non-Rosaceae plant. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2822–2828, 2005.

PARK, S. G. et al. Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, p. 5723-5732, 2000.

PEREIRA, E. D. M. **Avaliação da qualidade** fisiológica de sementes de pimenta e pimentão por meio da atividade respiratória. 2012. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

QUAN, L. J. et al. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 50, n. 1, p. 2–18, Jan. 2008.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123–130, 2003.

RHEE, G. S.; CHAE, H. Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanism and emerging concepts in cell signalling. **Free Radical Biology and Medicine**, London, v. 38, p. 1543-1552, 2005.

ROBERTS, E. H. Loss of seed viability: chromosomal and genetic aspects. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 3, p. 515-527, 1973.

ROSA, S. D. V. F. et al. Free radical-scavenging enzymes and lea proteins associated to maize seed tolerance to high drying temperature. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 91–101, 2005.

ROSSETTO, C. A. V.; MARCOS FILHO, J. Comparação entre os métodos de

envelhecimento acelerado e deterioração controlada para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 1, p. 99-105, 1995.

SILVA NETA, I. C. **Expressão de genes relacionados à tolerância à baixa temperatura de germinação em sementes de milho**. 2014. 81 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

SILVEIRA, C. M. **Teste de deterioração controlada em sementes de amendoim**. 2006. 26 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agrônomicas, Jaboticabal, 2006. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/pts/m/2809.pdf>>. Acesso em: 22 jun. 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 719 p.

TIMÓTEO, T. S. **Condições de armazenamento e conservação do potencial fisiológico de sementes de diferentes genótipos de milho**. 2011. 89 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2011.

TUNES, L. M. et al. Influence of different harvest times on isozyme expression in barley seeds. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 58, n. 2, p. 178–184, 2007.

VEIGA, A. D. et al. Influência do potássio e da calagem na composição química, qualidade fisiológica e na atividade enzimática de sementes de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 953–960, 2010.

VERDOUCQ, L. et al. In vivo characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, p.19714-19722, 1999.

VIDIGAL, D. P. D. Alterações fisiológicas e enzimáticas durante a maturação de sementes de pimenta (*Capsicum annum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 129–136, 2009.

VIEIRA, R.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 103-132.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In:

KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 4, p. 1-26.

WOODSTOCK, L. W. Physiological and biochemical tests for seed vigor. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 1, p. 127-157, 1973.

ZHANG, M. et al. A mechanism of seed deterioration in relation to the volatile compounds evolved by dry seeds themselves. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 1, p. 49–56, Sept. 2008.