



JOANA SOUZA FERNANDES

**LOSS AND REINDUCTION OF DESICCATION TOLERANCE
IN MILLET SEEDS**

LAVRAS - MG

2018

JOANA SOUZA FERNANDES

LOSS AND REINDUCTION OF DESICCATION TOLERANCE IN MILLET SEEDS

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

Orientador

Dr. Renato Mendes Guimarães

Coorientadores

Dr. José Marcio Rocha Faria

Dr. Henk W. M. Hilhorst

LAVRAS - MG

2018

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

Fernandes, Joana Souza.

Perda e reindução da tolerância à dessecação em sementes de
milheto (*Pennisetum glaucum* L.) / Joana Souza Fernandes. - 2018.
82 p. : il.

Orientador(a): Renato Mendes Guimarães.

Coorientador(a): José Marcio Rocha Faria, Henk W. M.
Hilhorst.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Açúcares solúveis. 2. Proteínas resistentes ao calor. 3.
Restabelecimento da TD. I. Guimarães, Renato Mendes. II. Faria,
José Marcio Rocha. III. Hilhorst, Henk W. M.. IV. Título.

JOANA SOUZA FERNANDES

LOSS AND REINDUCTION OF DESICCATION TOLERANCE IN MILLET SEEDS

**PERDA E REINDUÇÃO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES DE
MILHETO (*Pennisetum glaucum* L.)**

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

Aprovada em 18 de janeiro de 2018.

Dr. José Marcio Rocha Faria

UFLA

Dr. Anderson Cleiton José

UFLA

Dr. Sttela Dellyzete Franco da Rosa

EMBRAPA

Dr. Everson Reis Carvalho

UFU

Dr. Renato Mendes Guimarães
Orientador

Coorientadores
Dr. José Marcio Rocha Faria
Dr. Henk W. M. Hilhorst

**LAVRAS - MG
2018**

*Aos meus pais João e Eni, pelo carinho e apoio.
A minha irmã Jovana, pela força e incentivo.
Ao Evaldo, pelo apoio, amor e companheirismo incondicionais.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelas bênçãos em minha vida, sempre presente mesmo nos momentos mais difíceis, me dando forças para continuar.

Aos meus pais, João e Eni; e minha irmã, Jovana, pelo apoio e carinho.

Ao meu companheiro de vida Evaldo pela paciência, amor, apoio, exemplo e incentivo incondicionais.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães, pela paciência, ensinamentos, confiança e carinho em todos os momentos, nesses seis anos de colaboração para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu coorientador Prof. Dr. José Marcio Rocha Faria, pelos ensinamentos e todo apoio para a realização do estágio de doutorado sanduíche na Universidade de Wageningen, na Holanda.

Aos professores do Setor de Sementes, João Almir Oliveira, Édila Vilela de Resende Von Pinho, Maria Laene Moreira de Carvalho, e aos pesquisadores Sttela Dellyzete Franco da Rosa e Antônio Rodrigues Vieira, pelos conhecimentos transmitidos durante todo meu período de formação acadêmica, da graduação ao doutoramento.

Aos funcionários do Laboratório de Sementes, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Jaqueline, Dalva, Geraldo e Franciele, à secretária Viviana, e à secretária do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Marli, pela disposição em nos auxiliar.

Aos pós-doutorandos, Diego, Wilson, Marcus, e demais pós-graduandos do Setor de Sementes, pelo companheirismo e auxílio nos momentos de dúvidas; e aos alunos de iniciação científica, pelo auxílio na execução dos trabalhos.

Aos queridos amigos do laboratório, e do NESem, que foram essenciais durante o curso e me proporcionaram momentos de muita alegria e que estarão sempre no meu coração.

Agradeço, também aos pesquisadores, doutorandos e técnicos do Laboratory of Plant Physiology, Wageningen University (Holanda), onde realizei parte do meu doutorado. Em especial ao Dr. Henk Hilhorst e Dr. Wilco Ligterink, a doutoranda Mariana Aline Silva Arthur, e ao técnico Leo Willians, com os quais tive o prazer de trabalhar e aprimorar meus conhecimentos. A pesquisadora Jill Farrant, que tive o prazer de conhecer pessoalmente, e que levarei para sempre no meu coração.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e Departamento de Agricultura, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aprimoramento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos nacional e internacional.

À empresa Sementes Adriana pelo fornecimento das sementes para a realização da pesquisa, e a todos que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho, **MUITO OBRIGADA.**

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis”.*
(José de Alencar)

RESUMO

A dessecação é a forma mais severa de estresse hídrico, e em sementes ortodoxas a tolerância à dessecação é adquirida durante a maturação e perdida durante ou logo após a germinação visível. Essa característica pode ser restabelecida no momento de sensibilidade à dessecação, levando a um maior entendimento da recalcitrância, e da tolerância a estresses abióticos durante a germinação das sementes. Nesta pesquisa, foram avaliados aspectos fisiológicos relacionados a perda da tolerância à dessecação por meio da expressão das enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidase e α -amilase, juntamente com a expressão de proteínas resistentes ao calor, nos tempos de embebição determinados em ensaios para caracterização do momento da perda da tolerância à dessecação: 0h, 3h, sementes com 1mm e 3mm de radícula. Na reindução da tolerância à dessecação, foram testados diversos protocolos, e a análise do teor de açúcares, a expressão de genes relacionados a proteínas resistentes ao calor, juntamente com a quantificação dessas proteínas, foram feitas em radículas e parte aérea de sementes embebidas por 18 horas, secadas sob 30 e 50% de umidade relativa a 22 °C por 72 horas (MADT). Sementes de milho perderam a tolerância à dessecação quando a radícula alcançou 1 mm de comprimento. Pelos padrões enzimáticos, observou-se que as enzimas peroxidase e α -amilase, assim como a atividade de proteínas resistentes ao calor têm relação com a perda da tolerância à dessecação em sementes de milho. Na reindução da tolerância à dessecação foi observado acúmulo de rafinose, estaquiase e frutose em radículas submetidas ao tratamento MADT 50% UR, havendo provável correlação com a reindução da tolerância. Os genes analisados, *PgLEA* (membro da família 7); *PgDHN* (dehidrina, membro da família 2) e *PgHsp10* (chaperona classificada como Hsp10), não evidenciaram correlação com os tratamentos, assim como a análise da expressão geral de proteínas resistentes ao calor, que mesmo presentes, não foram significativamente alteradas com a aplicação dos tratamentos de reindução da tolerância à dessecação estudados.

Palavras-chave: Açúcares solúveis. Enzimas. Expressão gênica. Proteínas resistentes ao calor. Restabelecimento da TD. Sensibilidade à dessecação.

ABSTRACT

Desiccation is the most severe form of water stress, and in orthodox seeds the desiccation tolerance is acquired during maturation, lost during or shortly after visible germination. This trait can be reestablished at the moment of desiccation sensitivity, leading to a better understanding of recalcitrance and tolerance to abiotic stresses during the seed germination. In this research, physiological aspects related to the loss of desiccation tolerance were evaluated through the expression of the enzymes superoxide dismutase, catalase, peroxidase and α -amylase, and also the expression of heat-resistant proteins at the points determined in assays for characterization of desiccation tolerance loss: 0h, 3h, seeds with 1mm and 3mm of radicle. Several protocols were tested for the desiccation tolerance re-induction, and the analysis of the sugar content, the expression of genes related to heat resistant proteins, and the general quantification of this proteins, was done in radicle and aerial part of seeds after 18 hours of imbibition in germinated seeds dried under 30 and 50% relative humidity at 22 °C for 72 hours (MADT). Millet seeds lost desiccation tolerance when the radicle reached 1 mm in length. According to the enzymatic standards, peroxidase and α -amylase enzymes, as well as the activity of heat-resistant proteins, were related to loss of tolerance to desiccation in millet seeds. In the re-induction of desiccation tolerance, raffinose accumulation, stachyose and fructose were observed in radicles submitted to MADT 50% RH treatment, with a probable correlation with the desiccation tolerance reinduction. The analyzed genes, PgLEA (member of family 7); PgDHN (dehydrin, family member 2) and PgHsp10 (chaperone chassis as Hsp10), showed no correlation with the treatments, as well as analysis of the general expression of heat-resistant proteins, which even present, were not significantly altered with the application of treatments of desiccation tolerance reinduction studied.

Keywords: Soluble sugars. Enzymes. Gene expression. Heat resistant proteins. Re-establishment of DT. Sensitivity to Desiccation.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figure 1 - Imbibition curve of millet seeds (*Pennisetum glaucum* L.). The arrow indicates the moment of radicle protrusion.32
- Figure 2 - Electrophoretic patterns and quantification of SOD enzyme activity in millet seeds (*Pennisetum glaucum* L.) submitted to different imbibition periods, followed by dehydration and subsequent rehydration. Treatments: 1: control (0 h); 2: 3 h of imbibition; 3: seeds with a 1 mm radicle; 4: seeds with a 3 mm radicle.....35
- Figure 3 - Electrophoretic patterns and quantification of CAT enzyme activity in millet seeds (*Pennisetum glaucum* L.) submitted to different imbibition periods, followed by dehydration and subsequent rehydration. Treatments: 1: control (0 h); 2: 3 h of imbibition; 3: seeds with a 1 mm radicle; 4: seeds with a 3 mm radicle36
- Figure 4 - Electrophoretic patterns and quantification of POX enzyme activity in millet seeds (*Pennisetum glaucum* L.) submitted to different imbibition periods, followed by dehydration and subsequent rehydration. Treatments: 1: control (0 h); 2: 3 h of imbibition; 3: seeds with a 1 mm radicle; 4: seeds with a 3 mm radicle.....36
- Figure 5 - Electrophoretic patterns and quantification of α -amylase enzyme activity in millet seeds (*Pennisetum glaucum* L.) submitted to different imbibition periods, followed by dehydration and subsequent rehydration. Treatments: 1: control (0 h); 2: 3 h of imbibition; 3: seeds with a 1 mm radicle; 4: seeds with a 3 mm radicle.....37
- Figure 6 - Electrophoretic patterns and quantification of heat-resistant proteins in millet seeds (*Pennisetum glaucum* L.) submitted to different imbibition periods, followed by dehydration and subsequent rehydration. Treatments: 1: control (0 h); 2: 3 h of imbibition; 3: seeds with a 1 mm radicle; 4: seeds with a 3 mm radicle. M: molecular marker.38

CAPÍTULO 3

- Figura 1 - Porcentagem de sobrevivência de sementes de milheto (*P. glaucum* L.), submetidas (com exceção de sementes maduras) a diferentes períodos de embebição em água (12h, 18h e 24h), e posterior secagem em sílica gel por 72 horas. Formação de plântulas normais (●) e formação de plântulas anormais (■). As médias seguidas pela mesma

letra minúscula não diferem entre si pelo teste LSD (Least Significant Difference) a 5% de probabilidade.	55
Figura 2 - Sementes de milho (P. glaucum L.) após 18 horas de embebição.	56
Figura 3 - Variação no teor de água (% base úmida) em sementes de milho durante a embebição e após a secagem em sílica gel.	56
Figura 4 - Efeito dos diferentes tratamentos de reindução da TD em sementes germinadas de milho (P. glaucum L.). As letras representam diferenças estatísticas significativas pelo teste de LSD (Least significant Difference) para plântulas normais (barra cinza clara). A porcentagem de plântulas anormais para cada tratamento é representada no gráfico pela barra preta.	58
Figura 5 - Efeito de diferentes tratamentos para reindução da tolerância à dessecação na porcentagem de sobrevivência (barra cinza escuro), de plântulas anormais (barra preta) e de sementes mortas (barra cinza clara) de milho (P. glaucum L.) embebidas por 18 horas. *Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de LSD ao nível de 5% de probabilidade.	59
Figura 6 - Teor de água (%) de sementes germinadas de milho (P. glaucum L.) submetidas aos tratamentos de reindução da TD, juntamente com o tratamento de maior sobrevivência seguido de secagem em sílica gel.	60
Figura 7 - Análise de plântulas anormais separada em tecidos de sementes germinadas de milho submetidas a diferentes tratamentos de reindução da tolerância à dessecação. A porcentagem de raízes anormais (barra preta) e parte aérea anormal (barra cinza) foram comparadas entre os tratamentos de reindução com base no número total de plântulas anormais pelo teste LSD a nível de 5% de probabilidade. *Médias seguidas pela mesma letra para análise de raízes para parte aérea não diferem entre si.	61
Figura 8 - Teor absoluto de rafinose em radículas (A) e parte aérea (B) de sementes germinadas de milho submetidas aos tratamentos de reindução da TD. * Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.	63
Figura 9 - Teor absoluto de estaquiose em radículas (A) e parte aérea (B) de sementes germinadas de milho submetidas aos tratamentos de reindução da TD. * Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.	63
Figura 10 - Teor absoluto de frutose em radículas (A) e parte aérea (B) de sementes germinadas de milho submetidas aos tratamentos de reindução da TD. * Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.	65

- Figura 11 - Teor absoluto de sacarose em radículas (A) e parte aérea (B) de sementes germinadas de milho submetidas aos tratamentos de reindução da TD. * Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.66
- Figura 12 - Teor absoluto de trealose em radículas (A) e parte aérea (B) de sementes germinadas de milho submetidas aos tratamentos de reindução da TD. * Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.67
- Figura 13 - Teor absoluto de glicose em radículas (A) e parte aérea (B) de sementes germinadas de milho submetidas aos tratamentos de reindução da TD. * Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.68
- Figura 14 - Expressão média de estabilidade (M) dos genes de referência testados para normalização de dados de qRT-PCR para tecidos de sementes germinadas de milho submetidos a tratamentos de reindução da TD.71
- Figura 15 - Perfil de expressão relativa na radícula e parte aérea de sementes germinadas de milho submetidas a reindução da tolerância à dessecação. A- expressão relativa em radículas de PgHsp10; B- expressão relativa em parte aérea de PgHsp10; C- expressão relativa em radículas de PgDHN; D- expressão relativa em parte aérea de PgDHN; E- expressão relativa em radículas de PgLEA; F- expressão relativa em parte aérea de PgLEA. *Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.73
- Figura 16 - Padrão eletroforético e quantificação de proteínas resistentes ao calor em tecidos de sementes germinadas de milho submetidos a diferentes tratamentos de reindução da tolerância à dessecação. Tratamentos: 1- controle radícula; 2- radículas submetidas ao tratamento MADT30%; 3- radículas submetidas ao tratamento MADT 50%; 4- parte aérea controle; 5- parte aérea submetida ao tratamento MADT 30%; 5- parte aérea submetida ao tratamento madt 50%. M- marcador molecular.75

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Table 1 - Mean values of first germination count (FC), germination (G), germination speed index (GSI) and electrical conductivity (EC) in millet seeds subjected to different imbibition periods, followed by dehydration and subsequent rehydration.	33
--	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Primers dos genes alvo utilizados na análise de qRT-PCR.....	51
Tabela 2 - Primers dos genes de referência candidatos para análise de qRT-PCR.....	52
Tabela 3 - Teor de água (% em base úmida) em tecidos de sementes de milho antes e após os tratamentos de reindução da tolerância a dessecação.	61
Tabela 4 - Genes alvo estudados e amplificados para tecidos de sementes germinadas de milho submetidas a tratamentos de reindução da TD.	69
Tabela 5 - Genes de referência testados e amplificados para tecidos de sementes germinadas de milho submetidos a tratamentos de reindução da TD.	69

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL.....	16
1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Tolerância à dessecação em sementes	17
2.2	Perda e reindução da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas germinadas	18
2.3	Compostos de reserva e a tolerância à dessecação.....	19
2.4	Aspectos moleculares da tolerância à dessecação	20
2.5	Caracterização da espécie.....	21
	REFERÊNCIAS.....	22
	CAPÍTULO 2 - Physiological and biochemical changes during desiccation tolerance loss in millet (Pennisetum glaucum L.) seeds.....	26
1	INTRODUCTION	28
2	MATERIAL E METHODS	29
2.1	Local and plant material.....	29
2.2	Imbibition curve.....	29
2.3	Characterization of the desiccation tolerance loss.....	30
2.4	Physiological analyzes	30
2.5	Biochemical analyses.....	31
2.6	Statistical analysis	31
3	RESULTS AND DISCUSSION	32
4	CONCLUSION	38
	REFERENCES	39
	CAPÍTULO 3 - Reindução da Tolerância à Dessecação em sementes germinadas de milheto (Pennisetum glaucum L.): variação de carboidratos solúveis e expressão de genes relacionados à proteínas resistentes ao calor	43
1	INTRODUÇÃO.....	45
2	MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1	Local e Material vegetal.....	47
2.2	Confirmação da perda da tolerância à dessecação	47
2.3	Reindução da Tolerância à Dessecação em sementes germinadas de milheto (Pennisetum glaucum L.).....	48
2.3.1	Validação do Tratamento de Reindução da TD em sementes germinadas de milheto.....	49
2.3.2	Variação no teor de água	49
2.4	Análise de Sensibilidade de tecidos de plântulas de milheto (Pennisetum glaucum L.) à Dessecação	49
2.5	Análise de carboidratos solúveis na reindução da TD.....	50
2.6	Análise da expressão dos transcritos por meio da técnica de qRT-PCR durante a reindução da TD.....	50
2.7	Atividade de Proteínas Resistentes ao Calor.....	54
2.8	Análise estatística	55
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4	CONCLUSÕES.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77

CAPÍTULO 1 Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial e as perspectivas futuras de mudanças climáticas geram a necessidade de adoção de novas práticas agrícolas a fim de suprir a necessidade de alimentos, manter a segurança alimentar humana e preservar a biodiversidade existente. Em 2070, estima-se que a população será de cerca de 9 bilhões de pessoas, e esse número está longe de ser estabilizado (LEPRINCE et al., 2017). A chave para a segurança alimentar futura, e conservação dos recursos genéticos, está nas sementes, que se produzidas e armazenadas de maneira correta são fundamentais na conservação *ex situ* e no estabelecimento inicial da grande maioria das espécies vegetais. Assim, demandam pesquisas sobre sua conservação, o que gera a necessidade do entendimento da tolerância à dessecação em sementes.

Os mecanismos de tolerância à dessecação são alvo de estudo para o entendimento de alterações celulares que permitem a secagem e armazenamento das sementes sem haver perda de sua viabilidade. A tolerância à dessecação é a capacidade dos organismos vivos em lidar com as perdas de água inferiores a 0,1 g H₂O/g de peso seco e sobreviver ao processo de reidratação, sem danos permanentes (MAIA et al., 2011). A tolerância e a sensibilidade à dessecação em sementes de diferentes espécies é variável, sendo elas classificadas quanto a essa capacidade em sementes extremamente tolerantes à dessecação, ou ortodoxas, e extremamente sensíveis ou recalcitrantes (FARRANT et al., 1996).

No processo de germinação sementes de espécies ortodoxas têm comportamento similar às recalcitrantes, perdendo sua tolerância à dessecação. Os mecanismos envolvidos na capacidade de sobreviver a perda de água resumidamente podem ser divididos em três grupos principais: 1) mecanismos de sinalização, regulação gênica e proteômica; 2) ajuste metabólico e sistemas antioxidantes e 3) estabilidade macromolecular e mecânica (MOORE et al., 2009). O entendimento dos mecanismos necessários para a tolerância à dessecação e seus reguladores, pode auxiliar na busca de informações para o melhoramento da tolerância das sementes ao estresse causado por altas temperaturas e ao posterior estado seco (RAMANJULU; BARTELS, 2002).

O milheto (*Pennisetum glaucum* L.), é uma planta rustica, com capacidade de produzir sementes ortodoxas em condições de altas temperaturas, baixa fertilidade de solo e em

ambientes muito secos, o que torna essa espécie interessante para estudos de tolerância a dessecação. Possivelmente, a aquisição de uma maior tolerância ao estresse causado pela desidratação sirva para permitir o melhoramento de espécies quanto a tolerância a dessecação, além de poder promover a melhoria do armazenamento de espécies recalcitrantes e auxiliar na adaptação de plântulas à condições adversas durante a fase inicial de estabelecimento.

Assim, objetivou-se com esta pesquisa o estudo de alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares durante o processo de perda e reindução da tolerância à dessecação em sementes de milho, com intuito de promover maior entendimento sobre como essas alterações atuam no processo da tolerância à dessecação na espécie estudada.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Tolerância à dessecação em sementes

A tolerância à dessecação (TD) é a habilidade de certos organismos em lidar com a extrema perda de água, a níveis inferiores a 0,1g H₂O por grama de peso seco, com subsequente reidratação sem acúmulos de danos letais (MAIA, et al., 2011). A TD é referente à remoção de quase toda água celular, sendo que os organismos que possuem essa capacidade não evitam a perda de água, mas se equipam com moléculas protetoras, entrando em um estado metabolicamente inativo (ALPERT, 2005).

Em plantas, a TD é rara em tecidos vegetativos, porém está presente em sementes e pólen (GAFF; OLIVER, 2013). A maioria das espécies de angiospermas, produz sementes que toleram a dessecação, podendo ser armazenadas por longos períodos de tempo e são chamadas de ortodoxas. No entanto, um grande número de espécies selvagens, e/ou de clima úmido, produzem sementes que são sensíveis a dessecação, sendo chamadas de recalcitrantes, (ROBERTS, 1973).

O desenvolvimento das sementes é dividido em duas fases: embriogênese e maturação. Na embriogênese ocorre a especificação e padronização de tecidos, por uma série de divisões e diferenciações celulares. Já na fase de maturação, que é subdividida em inicial e tardia (BEWLEY et al., 2013), a TD é adquirida na fase inicial. Esta fase do desenvolvimento, também é marcada pelo acúmulo de compostos de reserva, como proteínas, óleos e carboidratos (VERTUCCI; FARRANT, 1995). Na fase tardia de maturação, as sementes perdem água e ocorrem mudanças à nível de transcrito e metaboloma. Em sementes de

Arabidopsis, nessa fase do desenvolvimento, foi observado o acúmulo de proteínas LEAs (Late embryogenesis abundant) e de açúcares não redutores, como a sacarose, e oligossacarídeos da família rafinose (OFRs), (ANGELOVICI et al., 2010; DEKKERS et al., 2015). Após a fase tardia da maturação, os mecanimos celulares são organizados para conferir gradualmente a longevidade no estado seco, porém uma semente tolerante à dessecação pode não tolerar longos períodos de armazenamento, uma vez que a TD é um pré-requisito para que as sementes adquiram a longevidade (VERDIER et al., 2013).

Nesse período de maturação tardia das sementes ocorre também a preparação para a germinação, na qual a capacidade de tolerar perdas extremas de água sem danos subsequentes é perdida, no entanto, esta pode ser resgatada em um curto período durante ou após a germinação (LEPRINCE et al., 2017; DEKKERS et al., 2015).

2.2 Perda e reindução da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas germinadas

Sementes ortodoxas perdem a tolerância à dessecação durante a germinação, tornando-se sensíveis. Sun (1999) propôs a utilização de sementes ortodoxas germinadas como modelo de estudo da tolerância à dessecação. Uma vez que tornam-se sensíveis, os mecanismos envolvidos na perda e reindução da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas podem ser estudados de maneira prática para o maior entendimento da recalcitrância e de como esses mecanismos estão envolvidos na capacidade de lidar com a perda extrema de água.

Bruggink e Van der Toorn (1995) demonstraram ser possível restaurar a tolerância à dessecação em sementes ortodoxas germinadas de *Cucumis sativus* e *Impatiens walleriana*, e sugeriram esta abordagem também como modelo para pesquisas de reindução da TD em sementes. O sucesso da técnica de restaurar a TD também foi reconhecido para espécies como *Arabidopsis thaliana*, e *Medicago truncatula* (BUITINK et al., 2003; BUITINK et al., 2006; FARIA et al., 2005; VIEIRA et al., 2010; MAIA et al., 2011).

O método mais utilizado para reinduzir a tolerância à dessecação em sementes ortodoxas germinadas é a aplicação de ácido abscísico exógeno e/ou a pré-secagem com estresse osmótico moderado. No entanto já foi comprovado por estudos que esta metodologia, além de laboriosa, pode ter efeitos prejudiciais com relação ao bloqueio do movimento da água nas plantas e uma menor solubilidade e transporte de oxigênio (LAGERWERFF; OGATA; EAGLE, 1961; LAWLOR, 1970; MEXAL et al., 1975).

Após a protrusão radicular, em algumas espécies, existe uma pequena “janela de desenvolvimento” na qual a TD pode ser restabelecida, pois quando as radículas crescem acima de certo comprimento, a TD pode não ser completamente readquirida (DEKKERS et al., 2015).

2.3 Compostos de reserva e a tolerância à dessecação

Um dos muitos mecanismos utilizados pelas plantas para minimizar efeitos deletérios causados por estresses abióticos é a produção e acúmulo de solutos, dentre eles, os açúcares (ELSAYED; RAFUDEEN; GOLLDACK, 2014).

Os carboidratos são componentes reguladores importantes em processos fisiológicos nas plantas, como a fotossíntese, germinação de sementes, florescimento, senescência e muitos outros processos relacionados à resposta de exposição das plantas à estresses abióticos (SAMI et al. 2016). Além deles, os açúcares desempenham papel na fragmentação de carbono, metabolismo de lipídios, controle osmótico, estabilização de membranas, síntese de proteínas e expressão gênica (ROSA et al., 2009; HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001), fatores que estão diretamente ligados a tolerância à dessecação.

Durante a desidratação, açúcares específicos podem prevenir os efeitos dos danos causados pela dessecação nas membranas pela substituição das pontes de hidrogênio nas moléculas de água, e também interagindo com proteínas, como um escudo protetor contra possíveis mudanças conformacionais que levam à perda de suas funções (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001; LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993).

Açúcares como a glicose e sacarose são os mais associados com os processos metabólicos, como a produção de energia, biosíntese de polímeros, geração de metabolitos e regulação de atividades de fonte e dreno (SAMI, et al. 2016). Esses açúcares, juntamente com a frutose desempenham importante papel na regulação do crescimento e estruturação das plantas de maneira muito complexa devido a especificidade de localização, exigindo muitas vezes, longos sinais para se coordenar com as mudanças fisiológicas e ambientais (LEMOINE et al., 2013).

Na regulação do crescimento a trealose pode afetar a forma e as funções dos órgãos, como a inflorescência, o desenvolvimento de folhas, tubérculos e sementes (PAUL; DIJCK, 2011). Também auxilia no ajuste osmótico, além de proteger as membranas contra espécies reativas de oxigênio (EROs) formadas em situações de estresse (SINGH et al., 2015; KEUNEN et al., 2013).

A família de oligossacarídeos rafínosíca (FORs), composta por: rafinose, estaquiose e verbascose, também caracterizada como solutos compatíveis, participa de várias funções cruciais na planta, e funcionam como compostos de reserva e osmoprotetores durante a dessecação da semente (MOHAMMADKHANI; HEIDARI, 2008). Em algumas espécies de plantas de ressurreição o aumento dos níveis de FORs durante a dessecação, auxilia na estabilização da membrana fosfolipídica (FARRANT, 2007).

A formação de vidros intracelulares também esta ligada a proteção conferida pelos açúcares durante a dessecação. A formação desses vidros previne a desnaturação de moléculas e formação de agregados intracelulares, evitando também a concetração de solutos e alteração de pH (KOSTER, 1991).

2.4 Aspectos moleculares da tolerância à dessecação

Os mecanismos envolvidos na TD em sementes são de ordem complexa e podem agir em sinergismo. Durante a dessecação ocorrem várias alterações nas células, gerando a habilidade de tolerar ou reparar, os danos causados por esse estresse. Ocorre síntese e acúmulo de proteínas LEA (late embryogeneses abundant), proteínas de choque térmico (Heat shock proteins - HSP), açúcares não redutores, e enzimas antioxidantes que desempenham papel de moléculas protetoras (SINGH et al., 2015; BLACKMAN; OBENDORF; LEOPOLD, 1992). Estas mudanças podem conferir graus variados de tolerância à dessecação nas sementes, em função da intensidade com que os mecanismos de proteção são impostos.

As proteínas LEA, e HSP podem agir como protetores estruturais de membranas, como um tampão de hidratação sequestrando íons, e protegendo também a conformação de outras proteínas (TUNNACLIFFE; WISE, 2007). Açúcares não redutores preenchem o volume criado na desidratação entre moléculas, diminuindo mobilidade na matriz celular (BUITINK; LEPRINCE, 2008). Outras adaptações estruturais que ocorrem durante a desidratação são a compactação da cromatina, (VAN ZANTEN et al. 2011), redução da atividade metabólica, para minimizar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que gera a necessidade de produção de sistemas de defesa antioxidante (CONTRERAS-PORCIA et al., 2011).

O sequenciamento do genoma de espécies vegetais proporciona ao estudo da TD em sementes uma maneira de investigar os componentes de sinalização mais detalhadamente. Esses sinais ativam genes responsáveis pela acumulação de proteínas LEA, açúcares,

osmólitos e aminoácidos, entre outras moléculas que são necessárias para TD (TUNNACLIFFE; WISE, 2007; MOORE et al., 2009), a identificação de genes relacionados a TD além de proporcionar maior entendimento sobre a regulação da sobrevivência de sementes ao posterior estado seco, pode proporcionar avanços para a produção agrícola sob estresses abióticos (MAIA et al., 2011).

2.5 Caracterização da espécie

Os chamados “milhetos” são a maior fonte de alimento humano e animal em regiões subdesenvolvidas, especialmente em regiões semi-áridas e tropicais da África e Ásia. A espécie mais cultivada é o “Pearl millet”, ou milheto pérola (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.), sendo o sexto cereal mais economicamente importante e responsável pela segurança alimentar de aproximadamente 90 milhões de pessoas em suas regiões de cultivo (TADELE, 2016).

O milheto (*P. glaucum* L.), ($2n=2x=14$), é uma planta C_4 , de polinização cruzada, ciclo curto e que produz pequenas sementes, pertencente a família *Poaceae* e a subfamília *Panicoidae* (SHIVHARE; LATA, 2017). É, em sua maioria, cultivado em regiões áridas e semi-áridas, de chuvas escassas, sob condições precárias de fertilidade do solo e altas temperaturas, onde cereais básicos como milho, arroz, trigo, e mesmo sorgo não são capazes de se desenvolver (VADEZ et al., 2012). Seus grãos são ricos em nutrientes, proteínas e aminoácidos, ultrapassando o milho e o trigo nas concentrações de micronutrientes como o zinco e ferro, além de ser economicamente viável e de resistir às condições ambientais adversas em que é cultivado (KUMAR et al., 2016; SHIVHARE; LATA, 2017).

Em 18 de setembro de 2017, um grupo de pesquisadores divulgaram o sequenciamento completo do genoma do milheto (*Pennisetum glaucum* (L.), sinônimo, *Cenchrus americanus* (L.) Morrone), com aproximadamente 38.579 genes. Por meio deste estudo, foi possível estabelecer associações de marcadores para seleção genômica, e definir conjuntos heteróticos para predição do desempenho de híbridos (VARSHNEY, et al., 2017). O intuito principal é que de posse desses recursos, pesquisadores possam melhorar e investigar mais a fundo esta cultura que tem como um dos principais atributos a tolerância à estresses abióticos.

REFERÊNCIAS

- ALPERT, P. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life1. **Integrative and Comparative Biology**, Mclean, v. 45, n. 5, p. 685-695, 2005.
- ANGELOVICI R., et al. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends in plant science**, Oxford v. 15, n. 4, p. 211-218, 2010.
- BEWLEY, J. D. et al. Seeds: physiology of development, germination and dormancy. **Springer**, New York, 2013.
- BLACKMAN S. A., OBENDORF, R. L., LEOPOLD, A. C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. **Plant physiology**, Bethesda v. 100, n. 1, p. 225-230, 1992
- BRUGGINK, T., VAN DER TOORN, P. Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 5, n. 1, p. 1–4, 1995.
- BUITINK, J. et al. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 13, n. 4, p. 273–286, 2003.
- BUITINK, J. et al. Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. **Plant Journal**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 735-750, 2006.
- BUITINK, J., LEPRINCE, O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. **Comptes Rendus Biologies**, Paris v. 331, n. 10, p. 788-795, 2008.
- CONTRERAS-PORCIA, L. et al. Identification of copper-induced genes in the marine alga *Ulva compressa* (Chlorophyta). **Marine Biotechnology**, New York, v. 13, n. 3, p. 544–556, 2011.
- DEKKERS, B. J. W., et al. Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. **Planta**, Berlin, v. 241, n. 3, p. 563-577, 2015.
- ELSAYED, A. I., M. S. RAFUDEEN, M. S., GOLLDACK, D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2014
- FARIA, J. M. R. et al. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation-tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 418, p. 2119-2130, 2005.
- FARRANT, J. M. et al. Presence of dehydrin-like proteins and levels of abscisic acid in recalcitrant (desiccation sensitive) seeds may be related to habitat. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 6, n. 4, p. 175-182, 1996.

- FARRANT, J. M. Mechanisms of desiccation tolerance in angiosperm resurrection plants. In: Jenks, M. A.; Wood, A. J. **Plant desiccation tolerance**, 1st. ed. Australia: Blackwell, 2007, p. 51-90.
- GAFF D. F., OLIVER M. The evolution of desiccation tolerance in angiosperm plants: a rare yet common phenomenon. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 40, n. 4, p. 315-328, 2013.
- HOEKSTRA, F., GOLOVINA, E., BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in plant science**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 431-438, 2001.
- KEUNEN, E. et al. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. **Plant, cell & environment**, [s.l] v. 36, n. 7, p. 1242-1255, 2013.
- KOSTER, K. L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n. 1, p. 302-304, 1991.
- KUMAR, S. et al. Mapping quantitative trait loci controlling high iron and zinc content in self and open pollinated grains of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.]. **Frontiers in plant science**, New Haven, v. 7, p. 1636, 2016.
- LAGERWERFF, J. V., OGATA G., EAGLE H. E. Control of osmotic pressure of culture solutions with polyethylene glycol. **Science**, Washington v. 133, n. 3463, p. 1486-1487, 1961.
- LAWLOR, D. W. Absorption of Polyethylene Glycols by Plants and their Effects on Plant Growth. **New phytologist**, Cambridge, v. 69, n. 2, p. 501-513, 1970.
- LEMOINE, R. et al. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. **Frontiers in plant science**, New Haven v. 4, p. 1-21, 2013.
- LEPRINCE, O. et al. Late seed maturation: drying without dying. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 68, n. 4 p. 827–841, 2017.
- LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford v. 3, n. 4, p. 231-246, 1993
- MAIA, J. et al. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds and its associated transcriptome. **PlosOne**, California, v. 6, n. 12, e29123, 2011.
- MEXAL, J. et al. Oxygen availability in polyethylene glycol solutions and its implications in plant-water relations. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 55, n. 1, p. 20-24, 1975.
- MOHAMMADKHANI; N., HEIDARI, R. Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. **World Appl. Sci. J**, [s.l] v. 3, n. 3, p. 448-453, 2008.
- MOORE J. P., et al. Towards a systems-based understanding of plant desiccation tolerance. **Trends in plant science**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 110-117, 2009.

PAUL, M.; DIJCK, P. How do sugars regulate plant growth? **Frontiers in plant science**, New Haven, v. 2, p. 90, 2011.

RAMANJULU S.; BARTELS, D. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 141–151, 2002.

ROBERTS E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, p. 499–514, 1973.

ROSA, M. et al. Soluble sugars- metabolism, sensing and abiotic stress. **Plant signaling & behavior**, Philadelphia v. 4, n. 5, p. 388-393, 2009

SAMI, F. et al. Role of sugars under abiotic stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 109, p. 54-61, 2016.

SHIVHARE, R., LATA, C. Exploration of Genetic and Genomic Resources for Abiotic and Biotic Stress Tolerance in Pearl Millet. **Frontiers in plant science**, New Haven v. 7, p. 2069, 2017

SINGH, M. et al. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, [s.l] v. 14, n. 3, p. 407-426, 2015

SUN, W. Q. Desiccation sensitivity of recalcitrant seeds and germinated orthodox seeds: can germinated orthodox seeds serve as a model system for studies of recalcitrance? In: MARZALINA, M. et al. (Ed.). **IUFRO seed symposium “recalcitrant seeds”**. Kuala Lumpur: Forest Research Institute of Malaysia, p. 29-42, 1999.

TADELE, Z. **Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives**. Cap 26: Drought Adaptation in Millets, p. 639-664.

TUNNACLIFFE, A., WISE, M. J. The continuing conundrum of the LEA proteins. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 94, n. 10, p. 791-812, 2007.

VADEZ, V. et al. Phenotyping pearl millet for adaptation to drought. **Front. Physiol.** v. 3: p. 386. 2012.

VAN ZANTEN M., et al. Seed maturation in *Arabidopsis thaliana* is characterized by nuclear size reduction and increased chromatin condensation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l] v. 108, n. 50, p. 20219-20224, 2011.

VARSHNEY; R. K. et al. Pearl millet genome sequence provides a resource to improve agronomic traits in arid environments. **Nature biotechnology**, New York v. 35, n. 10, p. 969, 2017.

VERDIER, J., et al. A Regulatory Network-Based Approach Dissects Late Maturation Processes Related to the Acquisition of Desiccation Tolerance and Longevity of *Medicago truncatula* Seeds **Plant Physiology**, Oxford, v. 163, n. 2, p. 757-774, 2013.

VERTUCCI, C. W., FARRANT J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: Kigel J, Galili G (eds) **Seed development and germination**. Marcel Dekker, New York, p 237–271, 1995.

VIEIRA C. V. et al. Stress-associated factors increase after desiccation of germinated seeds of *Tabebuia impetiginosa* Mart. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 62, n. 3, p. 257-263, 2010.

CAPÍTULO 2 - Physiological and biochemical changes during desiccation tolerance loss in millet (*Pennisetum glaucum* L.) seeds

(Artigo aceito para publicação em 30/06/2017 na revista Acta Scientiarum Agronomy, classificação A2 pela CAPES)

RESUMO

Esta pesquisa objetivou avaliar as alterações fisiológicas e bioquímicas relacionadas à perda da tolerância à dessecação em sementes de milheto. Os pontos estudados foram determinados de acordo com a curva de embebição de sementes do híbrido de milheto ADRF6010: controle (0 h), 3 h, 1 e 3 mm de radícula. As sementes foram secadas em sílica gel por 72 h a 20 °C, seguida de pré-umidificação a 25 °C por 24 horas. Foi avaliada a qualidade fisiológica pelo teste de condutividade elétrica e de germinação, e o vigor por meio da primeira contagem e índice de velocidade de germinação. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os sistemas enzimáticos avaliados foram: superóxido dismutase, catalase, peroxidase e α -amilase, juntamente com a expressão de proteínas resistentes ao calor. A atividade das enzimas e de proteínas foi quantificada por meio do software ImageJ®. Sementes de milheto perderam a tolerância à dessecação quando a radícula alcançou 1 mm de comprimento. Pelos padrões enzimáticos, observou-se que as enzimas peroxidase e α -amilase, assim como a atividade de proteínas resistentes ao calor têm relação com a perda da tolerância à dessecação em sementes de milheto.

Palavras chave: Sensibilidade à Dessecação. Germinação. Proteínas. Enzimas.

ABSTRACT

This research aimed to evaluate the physiological and biochemical changes related to loss of desiccation tolerance in millet seeds. The points studied were determined according to the seed imbibition curve of the millet hybrid ADRF6010: 0 h, 3 h, 1 and 3 mm radicle. The seeds were dried on silica gel for 72 h at 20 °C, followed by pre-humidification at 25 °C for 24 h. The physiological quality was evaluated by the electrical conductivity and germination test, and the seed vigor by means of the first count and germination speed index. The experimental design was completely randomized and means were compared by the Scott-knott test at 5% probability. The enzymatic systems evaluated were: superóxido dismutase, catalase, peroxidase, and α -amylase, and the expression of heat-resistant proteins. The enzymatic activity was quantified through the software ImageJ®. Millet seeds lost desiccation tolerance when the radicle reached 1 mm of length. According to the enzymatic standards, the enzymes peroxidase and α -amylase, as well as the activity of heat-resistant proteins, was related to the loss of desiccation tolerance in millet seeds.

Keywords: Desiccation sensitivity. Germination. Proteins. Enzymes.

1 INTRODUCTION

Desiccation tolerance is the ability of some organisms to survive extreme water loss, at levels below $0.1 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}$ of dry tissue, followed by subsequent rehydration without accumulation of lethal damage (OLIVER; TUBA; MISHLER, 2000). In orthodox seeds, this survival mechanism is acquired during seed development, in the reserves accumulation period (LE et al., 2010, VERDIER et al., 2013). During this period, seed moisture is gradually reduced, and molecular and metabolic changes occur that allow seed dispersion and tolerance to long periods without water (ANGELOVICI et al., 2010; HUANG; SONG, 2013). On the other hand, recalcitrant seeds lack the genetic mechanisms required to tolerate drying, or if are present, these mechanisms are not functional (BERJAK; PAMMENTER, 2008; DELAHAIE et al, 2013).

Orthodox seed cells become sensitive to desiccation during the germination process (FARRANT, 2010). Thus, during germination, they behave similarly to recalcitrant seeds and can be used as a model in the study of dehydration sensitivity (SUN, 1999), which affects longevity and seed storage (BERJAK; FARRANT; PAMMENTER, 2007; WALTERS, 2015).

Desiccation tolerance in orthodox seeds is directly linked to changes in cellular components, to the activation of antioxidant enzyme systems, to oligosaccharides and to heat-resistant proteins (BERJAK; PAMMENTER, 2008; SPANÒ et al., 2011; WALTERS, 2015).

Reactive oxygen species (ROS) are normal components of the aerobic metabolism whose production is enhanced under stress conditions, such as the dehydration process, that generate toxic products for the cells. Thus, ROS production and activity are controlled by antioxidant enzyme systems such as superoxide dismutase, catalase and peroxidase (GILL; TUTEJA, 2010). Along with the enzyme systems, certain sugars act as signaling mechanisms. The synergistic interaction of sugars may contribute to stress tolerance, especially in tissues or organelles abundant in soluble sugars (BOLOURI-MOGHADDAM, 2010). The α -amylase enzyme converts starch into sugars; thus, its expression is linked to reserve mobilization in seeds. The late embryogenesis abundant (LEA) and heat shock proteins (HSP) are accumulated under stress conditions, such as high temperatures, and have an important role in the protection mechanism that ensures desiccation tolerance in seeds (BOSWELL; MOORE; HAND, 2014).

The identification of physiological and biochemical changes in the regulatory mechanisms of DT combined with the genetic improvement of plants can help develop cultivars better adapted to abiotic stresses (SHANKER et al., 2014). Previous studies on agronomic species have sought a greater understanding of the changes that occur in seeds as they lose water to develop new seed drying methods (VEIGA et al., 2007). However, little is known about the possible biochemical changes caused by DT loss in seeds of agronomic species.

Pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) is an African annual grass belonging to the *Poaceae* family that is able to produce seeds in extremely dry conditions and low soil fertility (OUMAR et al., 2008). The species is also resistant to drought and produces orthodox seeds. The aim of the present study was to evaluate the biochemical and physiological changes during the DT loss process in *P. glaucum*, to better understand these changes and to generate information for the improvement and development of the seed production and technology field.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Local and plant material

The experiment was carried out in the Seed Analysis Laboratory of the Federal University of Lavras. Millet seeds (hybrid ADRF6010) from the 2015 crop year were provided by the Sementes Adriana company. The seeds were stored in a cold room at 10 °C and 50% RH before the beginning of the experiments.

2.2 Imbibition curve

The initial moisture content was determined on a wet basis using an oven set at 105 ± 3 °C for 24 hours (BRASIL, 2009) with 4 replicates (25 seeds in each). The calculation was performed, and the result was expressed as a percentage.

To evaluate the water absorption pattern of the seeds, 4 replicates with 25 seeds in each were used to determine the hydration process and obtain the imbibition curve. The seeds were soaked in germination boxes with two sheets of blotting paper as substrate saturated with distilled water and conditioned in incubators regulated at 25 °C with a photoperiod of 12

hours. Every 3 hours, during 18 hours, the seeds were removed and weighed on a scale with an accuracy of 0.01 g, the data of absorbed water (g) in each point, were plotted in a graph.

2.3 Characterization of the desiccation tolerance loss

One-hundred seeds were divided into four replicates of 25 in each of the following points on the imbibition curve: control (0 h), 3 h of imbibition, 1 and 3 mm radicle. Hydration was performed in germination boxes containing 2 sheets of blotting paper saturated with water until the pre-established hydration periods were reached. Dehydration was performed in germination boxes sealed with a plastic film: the seeds were placed on a screen with a layer of 100 g of silica gel in the bottom and conditioned in incubators regulated at 20 °C during 72 hours to keep the seeds in a prolonged stress situation. After dehydration, the seeds were pre-moistened in humid air (100% RH) during 24 hours in incubators regulated at 25 °C to prevent any possible damage caused by subsequent imbibition (CROWE; CROWE; HOEKSTRA, 1989). Then, a germination test was performed in germination boxes in incubators regulated at 25 °C (BRASIL, 2009).

The survival analysis was performed by identifying the seeds that returned to germination and produced normal seedlings as follows.

2.4 Physiological analyzes

To analyze the physiological changes in the seeds the following tests were performed:

- **Germination test:** Four replicates of 50 seeds were distributed in germination boxes with two sheets of blotting paper moistened with distilled water until reaching 2.5 times the weight of the dry paper. The germination boxes were maintained in incubators regulated at 25 °C with a photoperiod of 12 hours. Seven days after sowing, the number of normal seedlings was counted (BRASIL, 2009), and the results were expressed as percentages.

- **First germination count (FC):** During the germination test, the number of normal seedlings observed three days after sowing was counted and the results are expressed as percentages.

- **Germination speed index (GSI):** The number of seedlings that returned to germination from the beginning until the last day of the test was counted daily. The GSI calculation was performed following Maguire (1962).

- **Electrical conductivity:** Four replicates of 25 seeds were used; the seeds were weighed with 0,01 g of accuracy and subjected to imbibition in plastic cups containing 50 mL of deionized water during 24 hours at 25 °C (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999). Subsequently, the conductivity was measured with a conductivimeter DIGIMED CD-21, and the results were expressed in $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ of seed.

2.5 Biochemical analyses

In each of the selected points of the imbibition curve, the seeds were removed from the imbibition paper, and at this humidity condition, they were macerated in liquid nitrogen with polyvinylpyrrolidone (PVP) and stored in a deep freezer at -86 °C.

The methodology described in Alfenas (2006) was used for the extraction, electrophoretic run and quantification of superoxide dismutase isoenzymes, catalase, peroxidase and α -amylase.

For the extraction of heat resistant proteins (HRP), 100 mg of each sample was used and placed in 1500 μL microtubes. After adding an extraction buffer solution (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 500 mM NaCl; 5 mM MgCl_2 and 1 mM PMSF) in a proportion of 1:10 (material weight: volume of extraction buffer), the samples were homogenized by vortexing. The homogenates were centrifuged at 13,000 rpm for 30 min at 4 °C. The supernatant was transferred to new microtubes, incubated in a water bath at 85 °C for 15 min and centrifuged again. The supernatant was then transferred to new microtubes, and the pellet was discarded. The quantification of enzymes and heat-resistant proteins was performed using the ImageJ® software (2016), where each gel photograph obtained in the electrophoresis was evaluated by the intensity and size of the isoforms. The results were expressed in mm^2 .

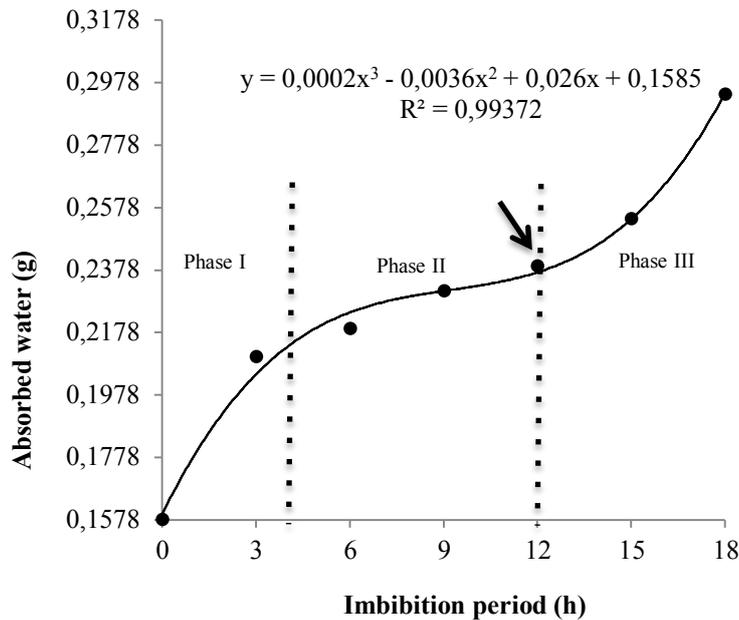
2.6 Statistical analysis

The experiments were performed in a completely randomized design (CRD), with four replicates of 50 seeds for the germination test and four replicates of 25 seeds for the electrical conductivity test. The results were tested with analysis of variance and comparison of means by the Scott-Knott test at a 5% probability. The analyses were performed using the SISVAR® statistical software (FERREIRA, 2011).

3 RESULTS AND DISCUSSION

The increase in the fresh weight of millet seeds (Figure 1) indicated water absorption following the three-phasic pattern proposed by Bewley and Black (1994).

Figure 1 - Imbibition curve of millet seeds (*Pennisetum glaucum* L.). The arrow indicates the moment of radicle protrusion.



Source: Author (2017)

The initial water content of the seeds was 11% and reached approximately 46% after 18 h of imbibition.

Phase I of germination lasted approximately 4 h and was characterized as a physical phenomenon of water absorption causing seed metabolism activation (BEWLEY; BLACK, 1994). Similar to what was observed by Bewley (1997), Phase II of millet seed germination lasted longer (approximately 8 h) and was characterized by slow water absorption, involving a series of metabolic events before radicle protrusion, which occurred at the beginning of Phase III (after 12 hours of imbibition).

A significant effect was observed for all treatments in the physiological tests of DT loss in millet seeds (Table 1).

Table 1 - Mean values of first germination count (FC), germination (G), germination speed index (GSI) and electrical conductivity (EC) in millet seeds subjected to different imbibition periods, followed by dehydration and subsequent rehydration.

Treatments	FC (%)	G (%)	GSI	EC ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)
Control (0 h)	81 a	93 a	42.67 a	158.96 a
3 h of imbibition	47 b	76 b	46.59 a	128.72 a
1 mm radicle	4 c	8 c	4.54 b	240.6 b
3 mm radicle	0 c	0 c	0.54 b	450.52 c
CV (%)	27.88	22.56	10.96	14.58

* Means followed by the same lowercase letter in a column do not differ from each other according to the Scott-Knott test at a 5% probability.

Source: Author (2017).

The highest percentage of germination in the first count was obtained from control seeds. For seeds subjected to three hours of imbibition followed by dehydration and rehydration, the percentage of normal seedlings at the first count decreased, showing a negative effect on seed vigor.

For seeds with 1 and 3 mm radicles, the mean FC was practically null and did not differ significantly between them. Similar results were observed for the final germination percentage. Masetto, Faria and Fraiz (2015) observed that germinated seeds of *Sesbania virgata* with a 1 mm radicle still maintained their desiccation tolerance and that total loss of this capacity only occurred when the radicles reached 2 mm. Similar results of DT loss after radicle protrusion were found by Guimarães et al. (2011) in *Peltophorum dubium*.

For the germination speed index, the highest values were observed for the control treatment and for seeds subjected to 3 h of imbibition with subsequent drying on silica gel and rehydration. The rapid drying technique on silica gel allows drying to a sufficiently low water content without adverse effects on seed viability and vigor (VARGHESE; NAITHANI, 2008). However, Reis et al. (2013), who studied seed conditioning, stated that rapid drying could be harmful to seed vigor. For millet seeds dried on silica gel in the present study, the germination speed index of the seeds soaked for 3 h did not differ from the control treatment (0 h). GSI values were observed for seeds with 3 mm radicles that were dried on silica gel with subsequent rehydration, even with null germinations. This result is due to the abnormal seedlings (4%) accounted in the determination of the GSI. Under these study conditions, millet seeds only developed a shoot part and were considered abnormal (BRASIL, 2009). In a study on the reestablishment of DT in germinated seeds of *Arabidopsis thaliana*, Maia et al. (2011) observed that different parts of the seed had different sensitivities to drying.

Furthermore, seedlings that did not return to root growth frequently developed a cotyledon or hypocotyl, as observed in millet seedlings in low proportion in the present study.

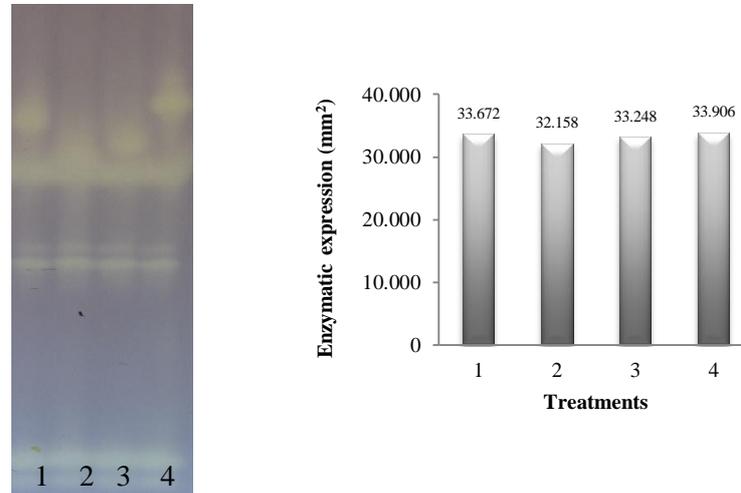
In the electrical conductivity test, higher values were observed for seeds with radicle protrusion (1 and 3 mm). The germination process is followed by the release of sugars, amino acids and electrolytes in different amounts depending on the state of organization of the membrane system (TORRES et al., 2015). In the present study, the rapid drying process applied to germinated millet seeds resulted in damage to the cell membranes and a subsequent rise in these solutes.

In a study on DT loss during seed germination of pioneer neotropical species, Daws et al. (2007) concluded that this tolerance was gradually lost during germination. Rapid drying with subsequent rehydration affected the physiological performance of millet seeds at the germination stages studied, and desiccation tolerance was lost when the radicle reached 1 mm. This result indicates the potential of millet seeds for studies on DT loss. In addition, millet is a species resistant to abiotic stresses (KHOLOVÁ et al., 2009), with a relatively short germination period and a growing agricultural interest in Brazil.

In addition to the evaluation of seed physiological quality and vigor, possible biochemical changes were evaluated through the analysis of enzyme systems: Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Peroxidase (POX) and α -amylase with heat-resistant proteins (HRP).

The SOD enzyme activity (Figure 2) in millet seeds during imbibition and with 1 and 3 mm of radicle presented a constant expression among the treatments. Xin et al. (2010), in a study on the viability loss of *Antiaris toxicaria* embryonic axes under rapid dehydration and its relation with oxidative damages, concluded that viability loss occurred due to mechanical and physical damages with no relation to the metabolic effects studied, such as SOD expression. In millet seeds, the expression of this enzyme did not differ significantly among the treatments.

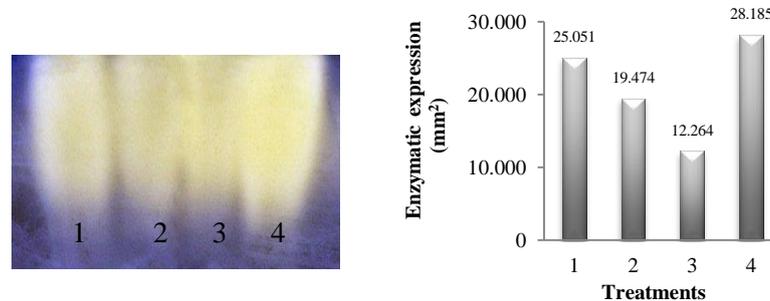
Figure 2 - Electrophoretic patterns and quantification of SOD enzyme activity in millet seeds (*Pennisetum glaucum* L.) submitted to different imbibition periods, followed by dehydration and subsequent rehydration. Treatments: 1: control (0 h); 2: 3 h of imbibition; 3: seeds with a 1 mm radicle; 4: seeds with a 3 mm radicle.



Source: Author (2017)

CAT enzymatic expression was higher for seeds with a 3 mm radicle (Figure 3), indicating higher oxidative stress. Silva et al. (2015) concluded that the presence of CAT might be associated with the acquisition of desiccation tolerance in *Rhamnidium elaeocarpum* seeds. Their results indicated an increase in the content of oxidative free radicals that are harmful to membranes, confirmed by the increase in electrolyte solutes and the loss of germination capacity in desiccation-intolerant seeds. Similar results were observed in the present study for millet seeds with a 3 mm radicle that did not tolerate desiccation, had high electrical conductivity values and null germination.

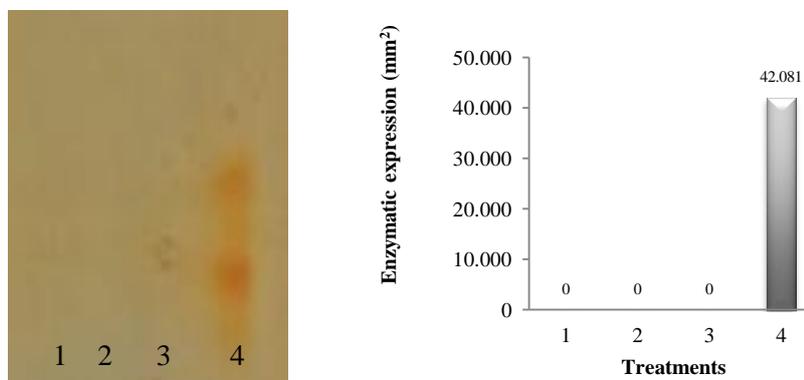
Figure 3 - Electrophoretic patterns and quantification of CAT enzyme activity in millet seeds (*Pennisetum glaucum* L.) submitted to different imbibition periods, followed by dehydration and subsequent rehydration. Treatments: 1: control (0 h); 2: 3 h of imbibition; 3: seeds with a 1 mm radicle; 4: seeds with a 3 mm radicle



Source: Author (2017)

POX enzymatic expression was null for the control, for seeds subjected to 3 hours of imbibition, and for seeds with a 1 mm radicle (Figure 4). A higher expression was observed in seeds with a 3 mm radicle that corresponded to the lowest results in the physiological tests. Coelho et al. (2015), who studied biochemical changes in coffee seeds exposed to different drying methods, observed that in seeds subjected to rapid drying, the activity of peroxidase increased as water content decreased. According to Berjak; Farrant e Pammenter, (2007), desiccation damages to membranes can be caused by oxidation, which promotes phospholipid esterification or lipid peroxidation. These results reiterate the high POX activity observed in seeds with a 3 mm radicle in our study.

Figure 4 - Electrophoretic patterns and quantification of POX enzyme activity in millet seeds (*Pennisetum glaucum* L.) submitted to different imbibition periods, followed by dehydration and subsequent rehydration. Treatments: 1: control (0 h); 2: 3 h of imbibition; 3: seeds with a 1 mm radicle; 4: seeds with a 3 mm radicle.

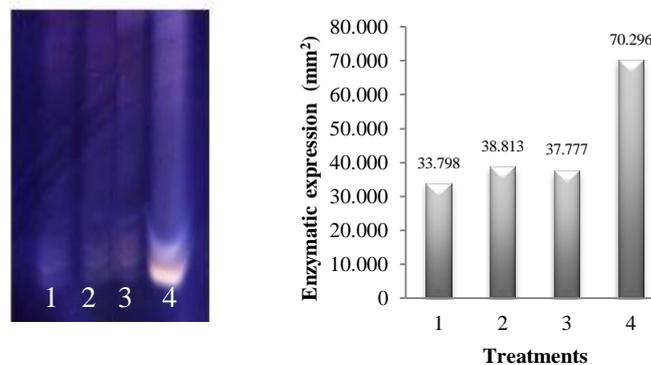


Source: Author (2017)

The production of oxygen-reactive species (ROS) is directly associated with sugar metabolism, acting as stress indicator molecules mainly in tissues or organelles with abundant

soluble sugars (SMEEKENS et al., 2010). Sugars that accumulate during dehydration have membranes and macromolecule protection and eliminate oxygen-reactive species (ZHANG; SONG; BARTELS, 2016). In millet seeds, a greater activity of α -amylase was observed in seeds with 3 mm radicles, indicating a higher supply mobilization. Overall, the activity of this enzyme remained constant for the other treatments (Figure 5).

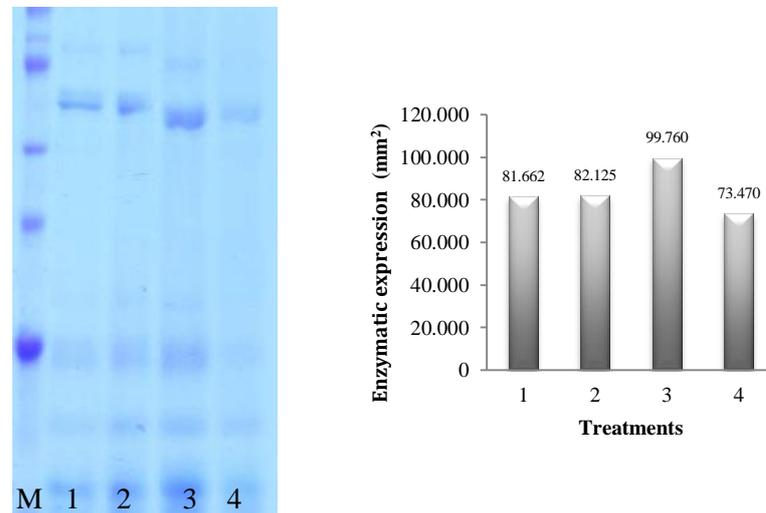
Figure 5 - Electrophoretic patterns and quantification of α -amylase enzyme activity in millet seeds (*Pennisetum glaucum* L.) submitted to different imbibition periods, followed by dehydration and subsequent rehydration. Treatments: 1: control (0 h); 2: 3 h of imbibition; 3: seeds with a 1 mm radicle; 4: seeds with a 3 mm radicle.



Source: Author (2017)

The lowest activity of heat-resistant proteins was observed in seeds with 3 mm radicles (Figure 6). Studies with other species have shown a reduction in the HRP stripe intensity derived from DT loss, supporting the hypothesis that HRPs are involved in this process (BOUDET et al, 2006). HRPs contribute to the stabilization of macromolecules and the prevention of cell protein denaturation through connections between water molecules and their surface, maintaining the stability of other protein membranes and adjusting the osmotic cell pressure (MOHAMMADKHANI; HEIDARI, 2008).

Figure 6 - Electrophoretic patterns and quantification of heat-resistant proteins in millet seeds (*Pennisetum glaucum* L.) submitted to different imbibition periods, followed by dehydration and subsequent rehydration. Treatments: 1: control (0 h); 2: 3 h of imbibition; 3: seeds with a 1 mm radicle; 4: seeds with a 3 mm radicle. M: molecular marker.



Source: Author (2017)

Previous research on seed drying showed that an increase in the heat-resistant protein stripe intensity was related to water loss, indicating that the drying process leads to HRP synthesis in seeds with a low humidity content (ABREU, et al., 2014). In our study, a greater expression of HRPs was observed in seeds with 1 mm radicles. A higher activity of HRPs was also observed by Abreu et al., (2016) who subjected less tolerant corn lineage seeds to different water stress potentials during germination. Mishra and Grover (2016) determined that certain proteins from the HRP group had important roles in the response to dehydration.

4 CONCLUSION

- In millet (*Pennisetum glaucum* L.) seeds, the desiccation tolerance is lost after germination when the radicle reaches 1 mm in length.
- The desiccation tolerance loss in millet seeds is associated with the expression of peroxidase, α -amylase and heat-resistant proteins and less related to the expression of superoxide dismutase and catalase.

REFERENCES

- ABREU, L. A. S. et al. Behavior of coffee seeds to desiccation tolerance and storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v.36, n.4, p.399-406, 2014.
- ABREU, V. M. et al. Heat-resistant protein expression during germination of maize seeds under water stress. **Genetics and molecular research: GMR**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 3, 2016.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2.ed. Viçosa: Ed. UFV, 627p, 2006.
- ALPERT, P. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life1. **Integrative and Comparative Biology**, Mclean, v. 45, n. 5, p. 685-695, 2005.
- ANGELOVICI R., et al. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends in plant science**, Oxford v. 15, n. 4, p. 211-218, 2010.
- BERJAK. P.; FARRANT J. M.; PAMMENTER N. W. "Seed desiccation-tolerance mechanisms," IN **Plant Desiccation Tolerance** (Eds), Jenks, M. A., & Wood A. J. Ames: Blackwell Publishing., v. 1, p. 151-192, 2007.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From Avicennia to Zizania: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, London, v. 101, n. 2, p. 213-228, 2008.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**, 2. ed. New York: Plenum, 1994.
- BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, Rockville, v.9, n.7, p.1055-1066, 1997.
- BOLOURI-MOGHADDAM, M. R. et al. Sugar Signalling and Antioxidant Network Connections in Plant Cells. **The FEBS journal**, Oxford, v. 277, n. 9, p. 2022-2037, 2010.
- BOSWEL, L. C.; MOORE; D. S.; HAND, S. C. (2014). Quantification of cellular protein expression and molecular features of group 3 LEA proteins from embryos of *Artemia franciscana*. **Cell Stress and Chaperones**, [s.l] v. 19, n. 3, p. 329-341, 2014.
- BOUDET, J., et al. Comparative Analysis of the Heat Stable Proteome of Radicles of *Medicago truncatula* Seeds during Germination Identifies Late Embryogenesis Abundant Proteins Associated with Desiccation Tolerance. **Plant Physiology**, Bethesda v. 140, n. 4, p. 1418-1436, 2006.
- Brasil. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. *Regras para Análise de sementes*, Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009, 398 p.
- COELHO, S. V. B. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.50, n.6, p.483-491, 2015.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; HOEKSTRA, F. A. Phase transitions and permeability changes in dry membranes during rehydration. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 21, n. 1, p. 77-91, 1989.

DAWS M. I. et al. Loss of desiccation tolerance during germination in neo-tropical pioneer seeds: implications for seed mortality and germination characteristics. **Seed Science Research**, Wallingford v. 17, n. 4, p. 273-281, 2007.

DELAHAIE, J. et al. LEA polypeptide profiling of recalcitrant and orthodox legume seeds reveals ABI3-regulated LEA protein abundance linked to desiccation tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 14, p. 4559-4573, 2013.

FARRANT, J. M. Editorial: special issue Grow “plant desiccation stress”. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 62, n. 3, p. 189-191, 2010.

FERREIRA, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GILL S. S.; TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, Paris, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GUIMARÃES, C. C. et al. Avaliação da perda da tolerância à dessecação e da quantidade de DNA nuclear em sementes de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert durante e após a germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 207-215, 2011.

HUANG H.; SONG S. Change in desiccation tolerance of maize embryos during development and germination at different water potential PEG-6000 in relation to oxidative process. **Plant physiology and biochemistry**, Paris, v. 68, p. 61-70, 2013.

ImageJ®. **Image Processing and Analysis in Java**. [s.l.] 2016. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/> . Acesso em 27/07/2016.

KHOLOVÁ, J. et al. Constitutive water-conserving mechanisms are correlated with the terminal drought tolerance of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.]. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 2, p. 369-377, 2009.

LE, B. H. et al. Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.] v. 107, n. 18, p. 8063-8070, 2010.

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MAIA, J. et al. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds and its associated transcriptome. **PlosOne**, Califórnia, v. 6, n. 12, e29123, 2011.

- MASETTO; T. E., FARIA; J. M. R.; FRAIZ, A. C. R. (2015). Loss and re-establishment of desiccation tolerance in the germinated seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) (Pers.). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 37, n. 3, p. 313-320, 2015.
- MISHRA, R. C.; GROVER, A. ClpB/Hsp100 proteins and heat stress tolerance in plants. **Critical reviews in biotechnology**, Boca Raton, v. 36, n. 5, p. 862-874, 2016.
- MOHAMMADKHANI, N.; HEIDARI, R. Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties. **Turkish Journal of Biology**, [s.l.] v. 32, n. 1, p. 23–30, 2008.
- OLIVER M. J.; TUBA Z.; MISHLER B. D. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. **Plant Ecology**, Dordrecht v. 151, n. 1, p. 85-100, 2000.
- OUMAR, I. et al.. Phylogeny and origin of pearl millet (*Pennisetum glaucum* [L.] R. Br) as revealed by microsatellite loci. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 117, n. 4, p. 489-497, 2008.
- REIS, R. G. E et al. Qualidade de sementes de berinjela osmocondicionadas submetidas à secagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.11, p.1507-1516, 2013.
- SILVA, L. A. et al. (2015). Desiccation tolerance of *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek (Rhamnaceae) seeds. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 37, n. 2, p. 181-189, 2015.
- SHANKER, A. K. et al. (2014). Drought stress responses in crops. **Functional & integrative genomics**, Berlin, v. 14, n. 1, p. 11-22, 2014.
- SMEEKENS, S. et al. Sugar Signals and Molecular Networks Controlling Plant Growth. **Current opinion in plant biology**, [s.l.] v. 13, n. 3, p. 273-278, 2010.
- SPANÒ, C. et al. Responses to desiccation injury in developing wheat embryos from naturally- and artificially-dried grains. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 49, n. 4, p. 363-367, 2011.
- SUN, W. Q. Desiccation sensitivity of recalcitrant seeds and germinated orthodox seeds: can germinated orthodox seeds serve as a model system for studies of recalcitrance? In: MARZALINA, M. et al. (Ed.). **IUFRO seed symposium “recalcitrant seeds”**. Kuala Lumpur: Forest Research Institute of Malaysia, p. 29-42, 1999.
- TORRES, S. B. et al. Teste de condutividade elétrica na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de coentro. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 46, n. 3, p. 622-629, 2015.
- VEIGA, A. D. et al., Tolerância de sementes de soja à dessecação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 773-780, 2007.
- VERDIER, J., et al. A Regulatory Network-Based Approach Dissects Late Maturation Processes Related to the Acquisition of Desiccation Tolerance and Longevity of *Medicago truncatula* Seeds **Plant Physiology**, Oxford, v. 163, n. 2, p. 757-774, 2013.

VARGHESE, B; NAITHANI, S.C. Oxidative metabolism related changes in cryogenically stored neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) seeds. **Journal of plant physiology**, Stuttgart v. 165, n. 7, p. 755-765, 2008.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: Krzyzanowski, F. C., V, R. D., & França Neto, J. B. (Ed.). *Vigor de sementes: conceitos e testes*, Londrina: Abrates. cap. 4, p. 1-26, 1999.

XIN X. et al. Viability loss pattern under rapid dehydration of *Antiaris toxicaria* axes and its relation to oxidative damage **Journal of integrative plant biology**, [s.l.] v. 52, n. 5, p. 434-441, 2010.

WALTERS, C. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. **Planta**, Berlin, v. 242, n. 2, p. 397-406, 2015.

ZHANG, Q.; SONG, X.; BARTELS, D. Enzymes and Metabolites in Carbohydrate Metabolism of Desiccation Tolerant Plants. **Proteomes**, [s.l.] v. 4, n. 4, p. 40, 2016

CAPÍTULO 3 - Reindução da tolerância à dessecação em sementes germinadas de milho (*Pennisetum glaucum* L.): variação de carboidratos solúveis e expressão de genes relacionados a proteínas resistentes ao calor

RESUMO

A dessecação é a forma mais severa de estresse hídrico, onde quase todo conteúdo de água é perdido, levando a alterações fisiológicas e subcelulares. Em sementes ortodoxas a tolerância à dessecação é adquirida durante a maturação e perdida durante ou logo após a germinação visível. Porém pode ser restabelecida com aplicação de um estresse leve como incubação em ácido abscísico, tratamento osmótico ou secagem, no momento de sensibilidade à dessecação, levando a um maior entendimento da recalcitrância e da tolerância a estresses abióticos. Objetivou-se estudar o restabelecimento da tolerância à dessecação e sua relação com alterações de carboidratos solúveis (trealose, glicose, sacarose, frutose, rafinose e estaquiase), expressão gênica por meio da técnica de PCR em tempo-real, e atividade de proteínas resistentes ao calor em sementes germinadas de milho. Para restabelecer a tolerância à dessecação foram testados diferentes protocolos sendo o mais adequado a secagem com controle de umidade relativa (“Mild air drying treatment”- MADT) sob duas condições, 30% e 50% UR, onde as sementes germinadas permaneceram por 72 horas, a 22 °C. As análises de açúcares e expressão gênica foram feitas em radículas e parte aérea de sementes embebidas por 18 horas, com base em resultados obtidos na caracterização da perda da tolerância à dessecação, e porcentagem de sobrevivência de plântulas. Na reindução da tolerância à dessecação foi observado acúmulo de rafinose, estaquiase e frutose em radículas submetidas ao tratamento MADT 50% UR, havendo provável correlação com a reindução da tolerância à dessecação. Os genes analisados, descritos para LEAs (Late embryogenesis abundant) proteína (membro da família 7); desidrina (membro da família 2 de LEAs) e uma chaperona classificada como Hsp10, não evidenciaram correlação com os tratamentos, assim como a análise da atividade e expressão geral de proteínas resistentes ao calor, que mesmo presentes, não foram significativamente alteradas com a aplicação dos tratamentos de reindução da tolerância à dessecação.

Palavras-chave: Restabelecimento da TD. Expressão gênica. LEA proteínas. Proteínas de choque térmico. Açúcares solúveis.

ABSTRACT

Desiccation is the most severe form of water stress, where almost all water content is lost, leading to severe physiological and subcellular changes. In orthodox seeds the desiccation tolerance is acquired during maturation, and lost during or shortly after visible germination. However, it can be restored with the application of a mild stress such as incubation in abscisic acid, osmotic treatment or drying, at the moment of desiccation sensitivity, leading to a better understanding of recalcitrance and tolerance to abiotic stresses. The objective was to study changes in the reestablishment of desiccation tolerance and its relation with changes in soluble carbohydrates (trehalose, glucose, sucrose, fructose, raffinose and stachyose) gene expression through the real-time PCR technique and the activity of heat resistant proteins in germinated millet seeds. In order to reestablishment the desiccation tolerance, different protocols were tested and the most suitable was to dry with Mild air drying treatment (MADT) under two conditions, 30% and 50% RH, where the germinated seeds remained for 72 hours, at 22 °C. The analysis was done in radicles and aerial part of seeds after 18 hours of imbibition, based on results obtained in the characterization of the desiccation tolerance loss, and percentage of seedling survival. In the re-induction of desiccation tolerance, raffinose, stachyose and fructose accumulation were observed in radicles submitted to MADT 50% RH treatment, with a probable correlation with the re-induction of the tolerance. The analyzed genes, described for LEA (Late embryogenesis abundant) protein (member of family 7); dehydrin (a member of the LEAs family 2) and a chaperone classified as Hsp10, showed no correlation with the treatments, as well as analysis of the activity and general expression of heat-resistant proteins, which were not significantly altered with the application of treatments for desiccation tolerance reinduction.

Key-words: Reestablishment of TD. Gene expression. LEA proteins. Heat shock proteins. Soluble sugars.

1 INTRODUÇÃO

Tolerância à dessecação (TD) é definida como a habilidade do organismos em lidar com a extrema perda de água, a níveis inferiores a 0,1g H₂O por grama de tecido seco, com subsequente reidratação sem acúmulo de danos letais (OLIVER; TUBA; MISHLER, 2000). Apesar de ser rara em órgãos vegetativos, a TD está presente em sementes da maioria das espécies de plantas, chamadas de sementes ortodoxas (BEWLEY et al., 2013; GAFF; OLIVER, 2013).

Em vários estudos foi demonstrado que sementes em diferentes estágios da germinação, e principalmente após a germinação visível não sobrevivem a secagem rápida, devido a perda da TD (BUTINK et al., 2003; DAWS et al., 2007; MAIA et al., 2011). No entanto, sementes germinadas podem sobreviver a um tratamento de secagem quando pré-condicionadas em estresse osmótico leve, antes da dessecação, o que já foi comprovado em várias espécies (DEKKERS et al., 2015). Essa habilidade depende do estágio de desenvolvimento da radícula e do tempo de armazenamento. Sementes germinadas, após um certo período de tempo, perdem completamente a capacidade de tolerar a extrema secagem e tornam-se sensíveis a dessecação (VIEIRA et al., 2010; MAIA et al., 2011; DEKKERS et al., 2015).

No método tradicional de reindução da TD em sementes germinadas é utilizado polietileno glicol (PEG) como agente restritor hídrico na etapa de pré-secagem, ou no pré-condicionamento. Possíveis efeitos negativos do PEG foram reportados, como bloqueio da movimentação da água nas plantas e redução do transporte de oxigênio (LAWLOR, 1970; MEXAL et al., 1975). Além da reindução da TD em sementes germinadas com PEG ser um método laborioso, que envolve uma limpeza após a pré-secagem para remoção do agente (o que no caso de sementes germinadas pode causar danos nas estruturas), é uma condição de secagem relativamente rápida para algumas espécies, na qual não é possível a retomada de crescimento após a dessecação. Assim, outros métodos tem sido estudados e utilizados como o “*Mild air drying treatment*” – MADT. O método de secagem em ar úmido consiste em secar as sementes em uma superfície de papel úmida, sob baixa umidade relativa.

Vários são os mecanismos envolvidos na reindução da TD em sementes germinadas. Dentre eles, podemos citar os açúcares e as proteínas resistentes ao calor. O papel desempenhado pelos açúcares solúveis está, na maioria das vezes, relacionado a eliminação de radicais livres acumulados na dessecação, e na manutenção da turgidez celular, evitando a

desidratação de proteínas e protegendo membranas (KRASENSKY; JONAK, 2012; XU et al., 2007). Os açúcares também atuam como solutos compatíveis durante a perda inicial de água e, quando o volume de água é removido, protegem as macromoléculas substituindo a água por grupos OH e formando um vidro, que estabiliza as estruturas macromoleculares por longos períodos de tempo (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001).

Atuando de forma similar, as LEA (Late embryogenesis abundant) proteínas além de desempenharem papel protetor nas condições de seca, mostraram em ensaios *in vitro* prevenir alterações conformacionais de polipeptídeos hidrofílicos, quando a última camada de hidratação é removida (WOLKERS et al., 2001; SHIH et al., 2004). Essas proteínas foram descobertas no estágio de desenvolvimento tardio de embriões de sementes de algodão (DURE; GREENWAY; GALAU, 1981; GALAU; HUGHES; DURE, 1986), desde então, surgiram vários estudos e classificações para essas complexas proteínas. Battaglia et al. (2008) categorizaram 7 grupos ou famílias de LEAs, com base nas informações disponíveis sobre motivos conservados em várias espécies de plantas e na sequências de aminoácidos dessas complexas proteínas.

Atualmente, mesmo com alguns avanços, o papel das LEAs proteínas na aquisição, perda e reindução da tolerância à dessecação em sementes e plantas não é totalmente conhecido. Em estudos com espécies modelo, autores concluíram que estas proteínas de alguma forma, auxiliam na tolerância à seca, salinidade e dessecação (BOUDET, et al., 2006; DEKKERS et al., 2015).

O milheto (*Pennisetum glaucum* L.) é uma planta rústica, com capacidade de desenvolvimento em regiões muito áridas, tolerante a seca e baixa fertilidade do solo. Produz grãos e biomassa em condições ambientais adversas, sendo o principal cereal cultivado nas regiões semi-áridas da África e no subcontinente indiano (MISHRA, et al., 2007). Com as atuais mudanças climáticas e crescimento populacional, a necessidade do entendimento de características como a tolerância à dessecação são crescentes, podendo auxiliar futuramente no desenvolvimento de espécies mais adaptadas à estresses abióticos e ao armazenamento de sementes.

Assim, o objetivo nesta pesquisa foi estudar a reindução da TD, a mudança nos teores de carboidratos solúveis e a expressão de genes relacionados a proteínas resistentes ao calor em sementes germinadas de milheto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e Material vegetal

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Sementes e no Laboratório de Biologia molecular do Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade de Wageningen, na Holanda. Foram utilizadas sementes do híbrido ADR6010 do ano agrícola de 2015.

Parte dos tratamentos de reindução foram realizados no Laboratório de Sementes da Universidade Federal de Lavras e os resultados foram levados em consideração na repetição e realização dos tratamentos de reindução.

2.2 Confirmação da perda da tolerância à dessecação

Sementes de milho (*Pennisetum glaucum* L.) do híbrido ADRF6010 foram colocadas para germinar em caixas plásticas (15 cm x 21 cm) com duas folhas de papel (Anchor paper Co.) umedecido com 50mL de água. Com base nos resultados anteriores foram tomados como pontos de estudo para a confirmação da perda da TD os seguintes tratamentos: sementes sem secagem; sementes após desidratação em sílica gel; sementes embebidas por 12 horas com posterior desidratação em sílica gel; sementes embebidas por 18 horas com posterior desidratação em sílica gel e sementes embebidas por 24 horas com posterior desidratação em sílica gel.

A desidratação foi conduzida em dessecador vedado, com sílica gel ao fundo, acondicionado em câmara a 20 °C, no escuro por 72 horas. Após a desidratação as sementes foram pré umidificadas em ar úmido por 24 horas, e 4 repetições de 25 sementes de cada ponto de estudo, foram colocadas para germinar em mesa de Copenhagen a 25 °C sob regime de 12h de luz. A análise de sobrevivência foi realizada aos 7 dias após a semeadura e foram computados os números de plântulas normais e anormais (BRASIL, 2009), com os resultados expressos em porcentagem.

O teor de água foi determinado em base úmida pelo método da estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$, por 17 horas (ISTA, 2014), antes e após cada tratamento de reindução, com 4 repetições de 15 sementes cada. O peso foi determinado com acurácia de 0,0001g, e os resultados expressos em porcentagem em base úmida.

2.3 Reindução da tolerância à dessecação em sementes germinadas de milho (*Pennisetum glaucum* L.)

Para realização dos tratamentos de reindução da tolerância à dessecação em sementes de milho, estas foram colocadas para germinar e, quando atingiram 1mm de protusão radicular, (ponto da perda da TD, que ocorre aproximadamente após 18 horas de embebição) foram amostradas em 4 repetições de 25 sementes para o teste de diferentes protocolos com intuito de definir as condições necessárias para o restabelecimento dessa característica:

As sementes com 1 mm de radícula foram expostas a diferentes concentrações de ácido abscísico (ABA 100 μ M e ABA 50 μ M) e/ou polietileno glicol (PEG -3 MPa; PEG -2,2 MPa; PEG -1,8 MPa; PEG -2,2 MPa + 100 μ M de ABA; PEG -2,2 MPa + 50 μ M de ABA; PEG -1,8 MPa + 100 μ M de ABA e PEG -1,8 MPa + 50 μ M de ABA) e/ou Cloreto de Lítio (LiCl 83% UR + 100 μ M de ABA e apenas LiCl 83% UR) em caixas plásticas tipo gerbox com telado (no caso da exposição à solução salina) e em placas de petri, ambas acondicionadas a 4° C por 72 horas. Após este período, as sementes germinadas que ficaram em contato direto com os tratamentos (PEG e/ou ABA) foram lavadas com água corrente para remoção de eventuais resíduos e secadas cuidadosamente (para evitar danos mecânicos) em papel toalha para retirada do excesso de água. A secagem em solução salina de LiCl foi preparada dissolvendo-se o sal em água, em quantidade suficiente para alcançar a saturação, sendo esta confirmada pela formação de cristais no fundo dos recipientes.

Além dos tratamentos listados acima, foi aplicado um novo método para reindução da TD em sementes germinadas de milho. As sementes foram colocadas sob uma membrana de celulose em bandejas plásticas (15 cm x 21 cm) com duas folhas de papel (Anchor paper Co.) umedecido com 25mL de água purificada e acondicionadas em câmaras com controle de umidade relativa, em duas condições: 32% e 50% de UR a 22 °C por 72 horas. Esse método é chamado de “Mild Air Drying Treatment” (MADT), Silva, (2015).

Após a aplicação dos métodos de reindução as sementes foram pré-umedecidas em ar úmido (100 % UR) por 24 horas a 25 °C para prevenir danos causados pela embebição (CROWE; CROWE; HOEKSTRA, 1989), e colocadas para reidratação em mesa de Copenhagem a 25 °C. A análise de sobrevivência foi realizada após sete dias considerando as sementes que retomaram o crescimento e produziram plântulas normais e, o número e a forma de anormalidade também foi computado após sete dias. Os resultados foram expressos em porcentagem.

2.3.1 Validação do tratamento de reindução da TD em sementes germinadas de milho

Nos tratamentos onde foi observada a maior porcentagem de plântulas normais na reidratação, foi analisado novamente como descrito no item 2.3, com 4 repetições de 25 sementes e com posterior desidratação em dessecador vedado com sílica gel ao fundo, acondicionado a 22 °C por 72 horas no escuro. Após a desidratação, as amostras foram pré umedecidas em ar úmido como descrito anteriormente e colocadas para reidratação em mesa de Copenhague a 25 °C com 12h de fotoperíodo. Após sete dias foram computados o número de plântulas normais e anormais e os resultados expressos em porcentagem.

2.3.2 Variação no teor de água

O teor de água foi determinado em base úmida pelo método da estufa a 103 ± 2 °C, por 17 horas (ISTA, 2014), antes e após cada tratamento de reindução, com 4 repetições de 15 sementes cada. O peso foi determinado com acurácia de 0,0001g, e os resultados expressos em porcentagem.

2.4 Análise de sensibilidade de tecidos de plântulas de milho (*Pennisetum glaucum* L.) à Dessecação

Após a realização dos tratamentos de reindução da TD, os dois tratamentos que obtiveram maior índice de retomada do crescimento (MADT 30% e MADT 50% de UR) foram estudados quanto à formação de plântulas normais e anormais (BRASIL, 2009).

Durante a análise de sobrevivência foram computadas a formação de plântulas normais (formação de raiz principal e parte aérea bem definidas) e anormais (com formação defeituosa ou sem parte aérea ou raiz principal). Os resultados foram expressos em porcentagem.

A fim de estudar possíveis diferenças da Tolerância à Dessecação entre os tecidos no estágio de desenvolvimento da perda da TD (sementes germinadas com 1mm de radícula e início da formação da parte aérea) os tecidos de sementes germinadas de milho submetidos aos tratamentos MADT 30% e MADT 50% de UR, foram removidos com auxílio de bisturi, congelados em nitrogênio líquido, e acondicionados em freezer a -80 °C para as análises posteriores.

2.5 Análise de carboidratos solúveis na reindução da TD

Foram estabelecidos os tratamentos para o estudo da variação de carboidratos solúveis na reindução da TD com base na diferença de sensibilidade de tecidos de sementes germinadas de milho expostas aos métodos de reindução:

Radícula: Controle (sem secagem); MADT 30% UR e MADT 50% UR;

Parte aérea: Controle (sem secagem); MADT 30% UR e MADT 50% UR;

Foram utilizadas 3 repetições biológicas de 2,5 mg de material seco de cada tecido, para cada tratamento. Os referidos tecidos foram removidos manualmente com auxílio de um bisturi, secos em “*Freeze dryer*” (EDWARDS, Modulyo 4k) durante 24 horas, macerados com auxílio de desmembrador (Mo Bio 96 Well Plate Shaker/MM 400) e pesados. A cada amostra foi adicionado 1 mL de metanol 80% com 400 mg/L de melezitose (padrão interno). As amostras passaram por 20 minutos de sonicação, foram incubadas a 76 °C, durante 15 minutos e, posteriormente, o metanol remanescente foi evaporado em evaporador rotatório (Automatic Environmen SpeedVac System AES 1010), a 30° C, durante 3 horas, para concentração do sobrenadante. O material foi ressuscendido em 500 mL de água miliQ e misturado em vortex, sendo considerado como extrato bruto.

Para a análise quantitativa de açúcares, obtida pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), o extrato bruto foi diluído 10 vezes em água miliQ, e analisado em cromatógrafo Dionex modelo DX-300, utilizando coluna CarboPac PA- 1. Foi injetado um volume de 20 µL com tempo de análise de 40 minutos por amostra. Os resultados foram expressos em mg por grama de massa seca.

2.6 Análise dos transcritos por meio da técnica de qRT-PCR durante a reindução da TD

A análise da expressão dos transcritos envolvidos no processo de reindução da tolerância à dessecação por meio da técnica de qRT-PCR foi realizada para genes descritos na literatura por sua relação conhecida com proteínas de função protetora na tolerância a estresses abióticos e na dessecação na cultura do milho.

As sequências dos genes-alvo escolhidos foram encontradas por meio de busca no banco de dados da biblioteca de Expressed Sequence Tags (EST) no NCBI construída por Misha et al., (2007), e com base em trabalhos que utilizaram as referidas sequências para a

confeção de *primers* específicos para a espécie estudada. Baseando-se nessas sequências foram desenhados os *primers* utilizando-se o software CLCbio (AQuiagen®Company, versão 7.6.2). As sequências dos *primers* utilizados para os genes alvo estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - *Primers* dos genes alvo utilizados na análise de qRT-PCR.

Genes Alvo	Descrição	Sequencia 5' ---- 3'	Referência Bibliográfica
PgLEA	Proteína abundante na embriogênese tardia - grupo 7	F – TGGAGATCCCAGCCA AGGT R – TGGTGGTAGACGGGA TGGTG	REDDY, et al. (2012).
PgDHN	Dehidrina - LEA grupo 2	F – GGAGGAGGAAGAAAG GCAT R - TCTTCTCTCCGGTGCT CT	SINGH, et al. (2015).
PgHsp10	Proteína resistente ao calor 10 – chaperona	F -GACTT GGGACATCGACTACG A R - GTGGTACTGCTACCG AACAGC	NITNAVARE, et al. (2016).

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

Fonte: Do autor (2017).

Para os genes de referência foram testados seis pares de *primers* descritos na literatura como estáveis para a espécie estudada (Tabela 2). A análise de estabilidade foi feita através do software qbase+ (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium) pelo cálculo de expressão estável geNORM (VANDESOMPELE et al., 2002).

Tabela 2 - *Primers* dos genes de referência candidatos para análise de qRT-PCR.

Genes de referencia	Descrição	Sequencia 5'----- 3'	Referência Bibliográfica
UBC-E2	Ubiquitina-enzima conjugada E2	F - ACCGCCTGACAATCC CTATG R - GGGATAGTCTGGCGG AAAATG	Shivhare e Lata. (2016).
EF-1 α	Fator de alongação -1 alpha	F - GTTACAACCCAGACA AGATTGC R - TGGACCTCTCAATCG TGTTG	Shivhare e Lata. (2016)..
ACT	Actina	F - AACCCCAAGGCCAAT AGAGAGA R - CATACATTGCCGGAC ATTCAAA	Shivhare e Lata. (2016).
PP2A	Proteina fosfatase 2A	F - TGAGAGCAGACAAAT CACTCAA R - AAGAGCTGTGAGAG GCAAATAA	Saha, P.; Blumwald, E Plos One, (2014).
eIF4A	Fator de iniciação eucariótico - 4A	F - GCGTGCATGTTGTTG TTGGT R - GTGACTGCCTACGCA ACATGTC	Saha, et al. (2014).
MDH	Malato desidrogenase	F - CAAGGAAGAAGATG GATGCC R - CGACGCTGGAGTTTC TTTAT	Reddy, et al. (2015).

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

Fonte: Do autor (2017).

Na análise de transcritos para os genes alvo foram utilizados os três genes mais estáveis para normalização dos dados de expressão.

Para a extração de RNA foram utilizadas três repetições biológicas de 35 radículas e 35 parte aéreas foram removidas de sementes germinadas de milho submetidas ao

tratamentos estudados: controle (sem secagem), MADT 30% e MADT 50% de UR. Os tecidos extraídos foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e mantidos em ultra-freezer (-80 °C) até o momento da extração.

As amostras foram maceradas em dismembrador (Mo Bio 96 Well Plate Shaker/MM 400), e para a extração de RNA foi utilizado o método do borato quente (WAN; WILKINS, 1994). A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1% e visualizada após a coloração com brometo de etídio. A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro (Trinean Xpose, Nova Biostorage).

Foi realizado também uma PCR convencional com o RNA extraído de todos os pontos de estudo a fim de verificar possíveis contaminações com gDNA (controle negativo). A amostra utilizada como controle positivo foi o gDNA extraído de sementes de milho e um primer genômico específico (1654 bp). Foi preparado um gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo para a visualização das possíveis ampliações.

Após o processo de extração e purificação, o RNA foi utilizado como molde para a síntese de cDNA. Para isso foi utilizado o kit IScript (Bio Rad, Hercules, CA, USA) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. O cDNA foi diluído 10x para o uso nas reações de RT-qPCR e armazenado a -20 °C até a condução das reações.

As reações foram preparadas em um volume total de 10 µL, contendo 2,5 µL de cDNA, 0,5 µL de mix *forward/reverse* dos *primers* (a partir de uma solução de trabalho a 10 µM), 5 µL de iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) e dois µL de água purificada. Os RT-qPCRs foram executados em um CFX (Bio-Rad). O programa da reação de qRT-PCR consistiu de: um primeiro passo a 95°C por três minutos, seguidos de 40 ciclos alternados entre 95°C por 10 segundos, e 60°C por 30 segundos. As curvas T_m (melting curves) foram registradas após 40 ciclos por aquecimento de 65 a 95° C com aumento de temperatura a cada cinco segundos em 0,58 °C.

Para a análise, foram utilizadas três repetições biológicas em duas replicatas técnicas, para cada gene em estudo, sendo os resultados normalizados usando o Ciclo Threshold (CT) obtidos pela expressão dos genes de referência.

O CT foi determinado pelo número de ciclos no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha de base (threshold). Foi utilizado o método do CT comparativo. Para isso, previamente, foi realizado um experimento de validação para comprovar que as eficiências de amplificação dos genes alvo e de referências são similares e bem próximas de

100% (TYAGI; BRATU; KRAMER, 1998). As curvas padrões para testar a eficiência da reação dos genes em estudo foram geradas a partir da diluição de 1:5.

Para calcular o nível de expressão dos genes de interesse foram considerados: Ct (aumento exponencial do produto de PCR) do gene-alvo e controle endógeno, $\Delta Ct = Ct$ (amostra) – Ct (controle endógeno) e o $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (amostra) - ΔCt (calibrador). Em seguida o nível de expressão foi calculado pela fórmula: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os dados foram coletados e exportados pelo software CFX (Manager Version: 3.1.1517.0823), e analisados em planilha Excel (Microsoft), com os resultados expressos em gráficos.

2.7 Atividade de proteínas resistentes ao calor

A determinação da atividade de proteínas resistentes ao calor foi feita através da técnica de eletroforese utilizando-se 60 mg de sementes dos referidos tratamentos da etapa de reindução da tolerância à dessecação: Controle; radículas submetidas a MADT 30%; parte aérea submetidas a MADT 50%; radículas submetidas a MADT 50% e parte aérea submetidas a MADT 50%.

As referidas amostras foram maceradas até a formação de um pó fino na presença de nitrogênio líquido e PVP (polivinilpirrolidona) em cadinhos e armazenas a $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura. As amostras foram misturadas com tampão de extração (50 mM TrisHCl pH 7,5; 0,5 M NaCl; 0,005 M MgCl₂; 0,001 M PMSF; e 0,1% β -mercaptoetanol) na proporção 1:10 (peso da amostra: volume do tampão). Os microtubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 30 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o sobrenadante recolhido para novos tubos, que foram colocados em banho-maria por 15 minutos a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, as referidas amostras foram novamente centrifugadas, conforme descrito anteriormente e foram pipetados 70 μL do extrato para novos microtubos, aos quais foram adicionados 40 μL de tampão da amostra (2,5 mL glicerol; 0,46 g SDS; 20 mg azul de Bromofenol e tampão de extração em q.s.p. 20 mL).

Os microtubos foram, então, imersos em água fervente por cinco minutos e 50 μL da amostra aplicados em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). Foi realizada a corrida eletroforética, a 150 V por cinco horas e a coloração do gel feita, utilizando-se solução de 0,05% Coomassie Brilhante Blue R 250 por 12 horas com solução de ácido acético para descoloração. A avaliação do gel foi realizada, visualmente, com utilização de transluminador, sendo considerada a intensidade das bandas.

2.8 Análise estatística

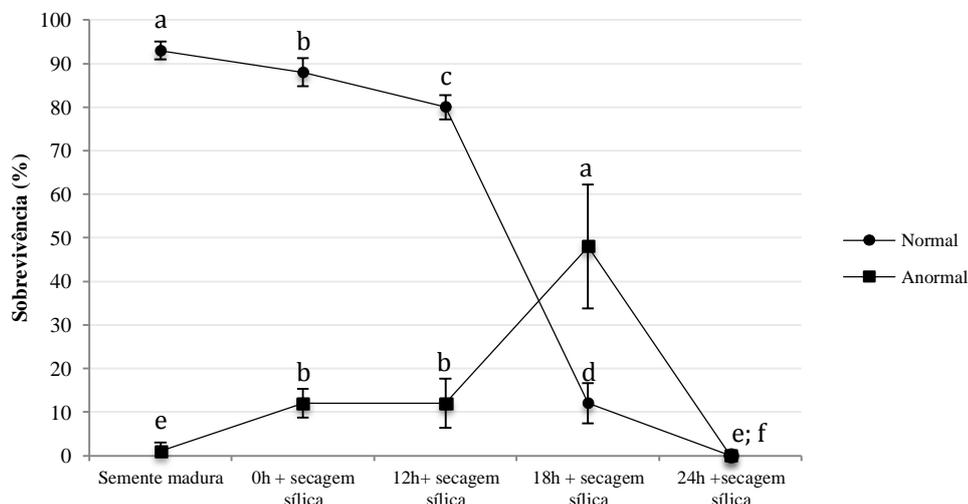
Para os dados da caracterização fisiológica da perda e reindução da tolerância à dessecação a análise foi realizada por meio de modelos lineares generalizados (GLM) e, quando constatada diferença entre os tratamentos, utilizou-se o teste de LSD (Least Significant Difference) a 5% de probabilidade, com auxílio do software R para Windows (versão 3.4.0).

Os dados de quantificação dos açúcares e expressão gênica foram avaliados por análise de variância e quando constatada diferença entre os tratamentos pelo teste F, foi realizado teste de comparação de médias de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. A quantificação das proteínas resistentes ao calor foi feita através do software ImageJ® (2016), com os resultados expressos em gráfico em mm^2 .

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

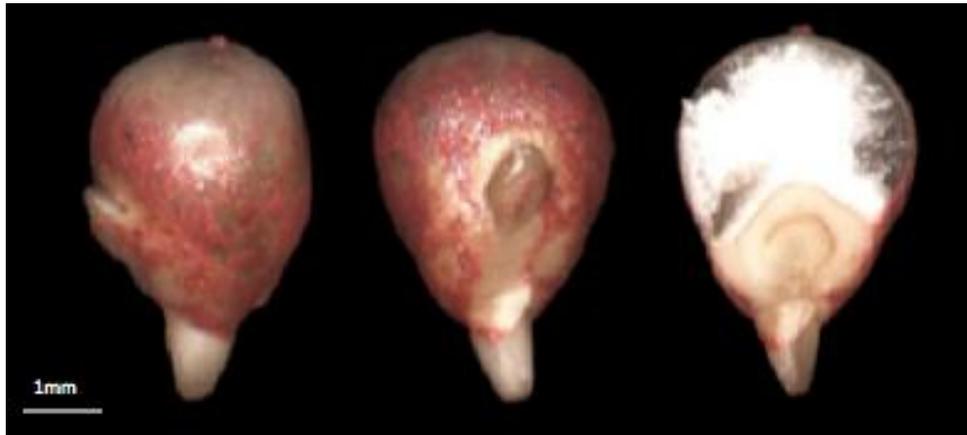
Na análise de sobrevivência realizada em diferentes pontos de embebição seguida de secagem em sílica gel observa-se que o ponto de perda da TD ocorre aproximadamente após 18 horas de embebição (Figura 1), onde as sementes apresentam cerca de 1 mm de radícula e início de desenvolvimento de parte aérea (Figura 2).

Figura 1 - Porcentagem de sobrevivência de sementes de milho (*P. glaucum* L.), submetidas (com exceção de sementes maduras) a diferentes períodos de embebição em água (12h, 18h e 24h), e posterior secagem em sílica gel por 72 horas. Formação de plântulas normais (●) e formação de plântulas anormais (■). As médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste LSD (Least Significant Difference) a 5% de probabilidade.



Fonte: Do autor (2017).

Figura 2 - Sementes de milho (*P. glaucum* L.) após 18 horas de embebição.

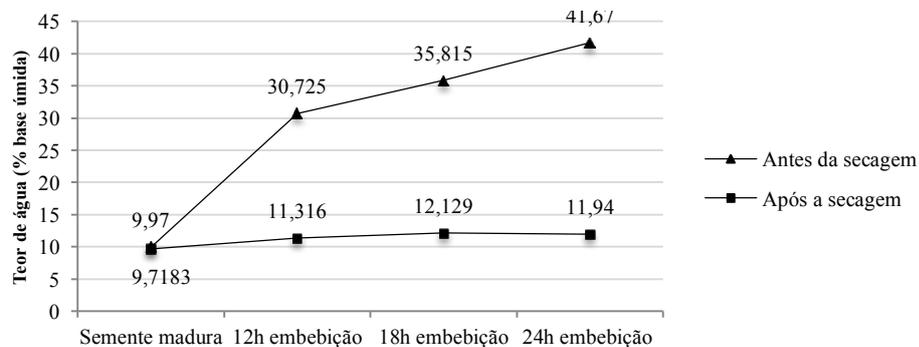


Fonte: Do autor (2017)

Esse resultado corrobora com experimento realizado anteriormente, onde após 18 horas de embebição seguida de secagem em sílica gel por três dias que para este estudo foi considerado como a secagem mais rápida dentre os demais tratamentos. Observa-se sobrevivência de 10% das plântulas. Pela observação da porcentagem de plântulas anormais no ponto da perda da TD (cerca de 48%), (Figura 1). pode-se inferir que existe uma diferença entre o grau de tolerância à dessecação em tecidos durante a embebição com posterior secagem em sílica, visto que 36% da anormalidade constatada foi relacionada com a formação de radículas, que não retomaram o crescimento, ou cresceram com má formação.

O teor de água das sementes variou de 9,97% a 41,67% após 24 horas de embebição. Observa-se uma pequena variação durante a secagem por 72 horas em sílica gel entre os pontos estudados, entre 9,7% a 12,13%. No ponto de perda da TD o teor de água caiu de 35,8% para 12,1% (Figura 3).

Figura 3 - Variação no teor de água (% base úmida) em sementes de milho durante a embebição e após a secagem em sílica gel.



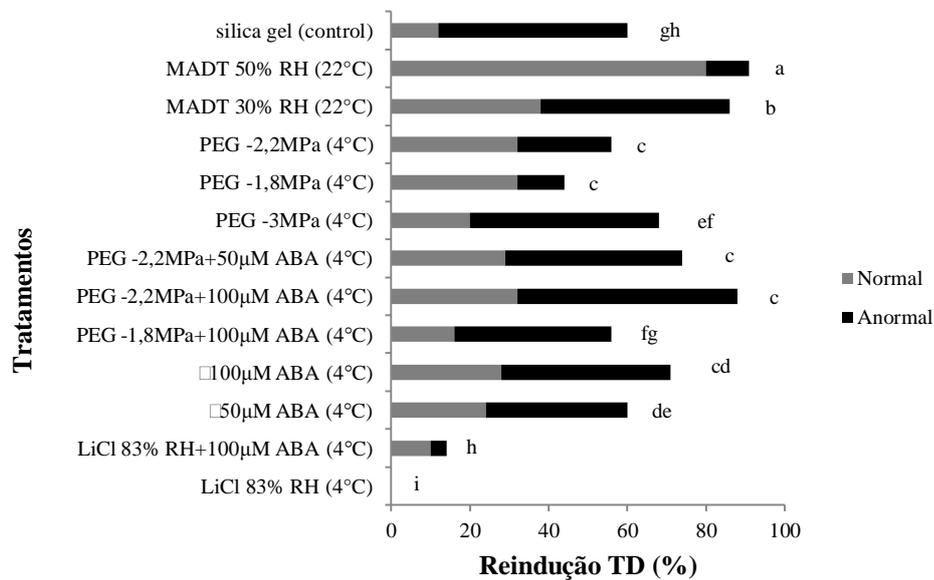
Fonte: Do autor (2017)

A TD é estabelecida antes da fase de secagem, na maturação, e geralmente é perdida durante a germinação (BEWLEY et al., 2013). Na dessecação, sementes ortodoxas podem atingir níveis de água de 5-10%, e frequentemente serem secas até 1-5% de teor de água com uma pequena ou nenhuma perda de viabilidade (MANFRE, et al., 2008).

O aumento na disponibilidade de água na embebição permite que os processos metabólicos retomem atividade, fazendo com que a germinação ocorra. Esse fato, ocorre juntamente com a diminuição da tolerância à dessecação (MAIA et al., 2011). No entanto, após a protrusão radicular, existe uma pequena “janela de desenvolvimento” na qual a TD pode ser restabelecida, pois quando as radículas crescem acima de certo comprimento, a TD pode não ser completamente readquirida (DEKKERS et al., 2015). Possivelmente, a aquisição de uma maior tolerância ao estresse causado pela lenta desidratação sirva para permitir o melhoramento de espécies quanto à tolerância à dessecação, além de poder promover a melhoria do armazenamento de sementes recalcitrantes e auxiliar na adaptação de plântulas à condições adversas durante a fase de estabelecimento inicial.

Usualmente o restabelecimento da TD é feito com a aplicação de um tratamento osmótico com polietileno glicol (PEG), promovendo uma desidratação moderada sendo um agente osmótico que não provoca plasmólise, e/ou com hormônio vegetal regulador da germinação, ácido abscísico (ABA), (BUTINK et al. 2003; MAIA et al., 2014) que reestimula o metabolismo durante essa “janela de desenvolvimento. Porém em sementes germinadas de milho, a maior taxa de restabelecimento da TD foi com a aplicação do tratamento de secagem em ar úmido com controle de umidade relativa de 50% (MADT 50%UR), (Figura 4).

Figura 4 - Efeito dos diferentes tratamentos de reindução da TD em sementes germinadas de milho (*P. glaucum* L.). As letras representam diferenças estatísticas significativas pelo teste de LSD (Least significant Difference) para plântulas normais (barra cinza clara). A porcentagem de plântulas anormais para cada tratamento é representada no gráfico pela barra preta.



Fonte: Do autor (2017)

Observa-se que quando os tratamentos MADT 50% e MADT 30% foram aplicados, houve maior porcentagem de retomada de crescimento e formação de plântulas normais, com 80% e 38% respectivamente. No tratamento de secagem com LiCl a 83% de UR, nenhuma sobrevivência foi constatada.

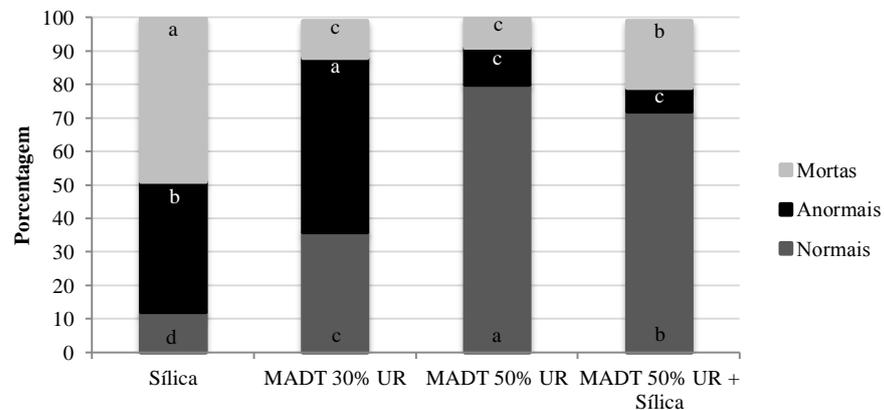
Sementes sensíveis a dessecação respondem de maneira diferente a velocidade com que a secagem é realizada. No presente estudo, onde sementes germinadas de milho foram submetidas a diferentes protocolos de reindução da TD, observa-se a importância e a relação entre velocidade de secagem e umidade relativa, uma vez que a secagem aplicada com LiCl (83% de UR) foi a mais prejudicial levando todas as sementes germinadas a morte.

A aplicação de estresse osmótico com polietileno glicol (PEG) e/ou ácido abscísico (ABA), é usada com frequência e sucesso no restabelecimento da TD em diversas espécies, (BRUGGINK; VAN DER TOORN, 1995; BUITINK et al., 2003; FARIA et al., 2005; MAIA et al., 2011; MASETTO; FARIA; FRAIZ, 2015; GUIMARÃES et al., 2016), porém esses métodos de reindução são trabalhosos e podem causar outros efeitos indesejáveis nas células (SILVA, 2015), assim, o desenvolvimento e aplicação de um método de reindução da TD simples, e robusto torna-se desejável. Além de se mostrar eficiente para a espécie estudada, a

otimização de tempo e facilidade de reprodução é uma das vantagens do método de secagem em ar úmido com o controle da umidade relativa.

Os tratamentos MADT 30% UR, MADT 50% UR, foram estudados mais detalhadamente. A eficiência do tratamento MADT 50% foi comprovada quando realizou-se a secagem em sílica gel por 72 horas após a realização do tratamento (Figura 5).

Figura 5 - Efeito de diferentes tratamentos para reindução da tolerância à dessecação na porcentagem de sobrevivência (barra cinza escuro), de plântulas anormais (barra preta) e de sementes mortas (barra cinza clara) de milho (*P. glaucum* L.) embebidas por 18 horas. *Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de LSD ao nível de 5% de probabilidade.



Fonte: Do autor (2017)

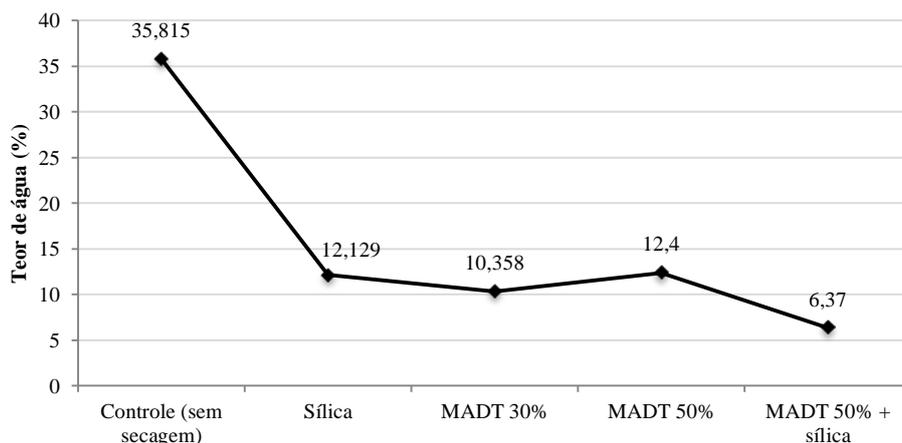
Observa-se que no método de pré-secagem MADT 50% UR com posterior secagem em sílica gel por 72 horas houve um pequeno decréscimo na porcentagem de restabelecimento quanto a plântulas normais, porém o percentual se manteve maior (com a sobrevivência de cerca de 72%) em comparação com o método MADT 30% UR. O maior percentual de plântulas anormais foi obtido após o tratamento MADT 30% UR, o que pode estar relacionado a sensibilidade dos tecidos a secagem, juntamente com a velocidade em que esta é realizada. Na secagem lenta as sementes germinadas permanecem por longo período em graus de umidade intermediários, se comparada com a secagem rápida, que provoca a perda de viabilidade pela ação de processos biofísicos (BERJAK; PAMMENTER, 2013).

Taxas de secagem juntamente com diferentes condições de desidratação influenciam significativamente a resposta de tecidos à sensibilidade a dessecação (TOBIAS; NORMAN, 2009). A diferença de sensibilidade entre os tecidos embrionários durante a dessecação já foi reportada anteriormente em espécies modelo. Maia et al. (2011) estudando a perda e reindução da TD em diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de *Arabidopsis*,

observou que no tratamento onde foi restabelecida a TD o tecido mais sensível foi a raiz principal, seguida dos cotilédones.

Com relação ao teor de água no ponto estudado, o valor decresceu de 35% para 12% após a secagem em sílica gel (Figura 6). Entre os tratamentos de reindução da TD observa-se um leve acréscimo após a aplicação do MADT 50% UR em comparação com MADT 30%, sendo os percentuais de 12% e 10% respectivamente. Para a confirmação do tratamento MADT 50% UR foi aplicada a secagem subsequente em sílica gel por 72 horas, fazendo o teor de água das sementes germinadas atingir 6%, comprovando a eficiência do tratamento e a não correlação com a diferença inicial no teor de água entre os tratamentos de reindução estudados.

Figura 6 - Teor de água (%) de sementes germinadas de milho (*P. glaucum* L.) submetidas aos tratamentos de reindução da TD, juntamente com o tratamento de maior sobrevivência seguido de secagem em sílica gel.



Fonte: Do autor (2017)

Black et al. (1999), estudando a indução da TD em embriões imaturos de trigo, observou que uma diminuição relativamente pequena no teor de água atua como o sinal para o desenvolvimento da tolerância à dessecação, nesse caso após 24 h de pré-secagem, os embriões subsequentemente excisados foram capazes de resistir a dessecação severa, enquanto que os embriões que não haviam perdido água anteriormente não resistiram.

Uma vez detectada a diferença de TD entre os tecidos, também foi realizada a determinação do teor de água em cada tecido separadamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Teor de água (% em base úmida) em tecidos de plântulas de milho antes e após os tratamentos de reindução da tolerância a dessecação.

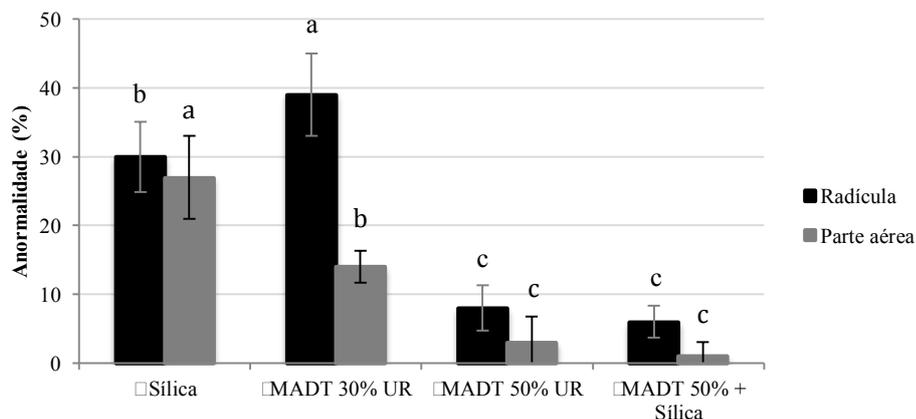
Tratamentos	Teor de água (%)	
	Radícula	Parte aérea
Controle (sementes embebidas 18h)	62,72	46,25
MADT 30% UR	7,89	6,95
MADT 50% UR	9,17	7,75

Fonte: Do autor (2017)

A determinação do teor de água nos tecidos separadamente, descarta a possibilidade de estes estarem sendo secados de maneira diferente, afetando assim os resultados de sobrevivência obtidos na reidratação.

Uma vez observada a diferença de sensibilidade a dessecação entre os tecidos, a análise de plântulas anormais foi separada entre radícula e parte aérea (Figura 7), com base no número de plântulas anormais.

Figura 7 - Análise de plântulas anormais separadas em tecidos de sementes germinadas de milho submetidas a diferentes tratamentos de reindução da tolerância à dessecação. A porcentagem de raízes anormais (barra preta) e parte aérea anormal (barra cinza) foram comparadas entre os tratamentos de reindução com base no número total de plântulas anormais pelo teste LSD a nível de 5% de probabilidade. *Médias seguidas pela mesma letra para análise de raízes para parte aérea não diferem entre si.



Fonte: Do autor (2017)

Observa-se que sementes germinadas de milho submetidas ao tratamento de reindução MADT 30% UR obtiveram alto índice de má formação de radícula após reidratação. Já o tratamento de reindução em ar úmido a 50% de umidade relativa promoveu baixa porcentagem de anormalidades tanto relacionadas a radícula quanto a parte aérea.

Como citado anteriormente existe diferença entre a sensibilidade de tecidos de plantas quanto à desidratação, o que é confirmado também para a espécie estudada diante dos

resultados obtidos. As raízes de milho com 1 mm de comprimento são mais sensíveis a taxa de secagem que o início da parte aérea desenvolvida nesse estágio, não sendo capazes de retomar o crescimento normal quando expostas as condições do tratamento a 30% de umidade relativa, mesmo em condições úmidas. A secagem de células sensíveis abaixo de 90% UR causa danos a todos os componentes celulares (LEPRINCE; BUITINK, 2015), e diferentes tecidos sensíveis a dessecação tem seu ponto crítico onde não é mais possível a reorganização do aparato celular para a retomada de crescimento. Fato observado quando as radículas de 1 mm de comprimento são expostas a secagem úmida a 30% de UR.

As respostas a dessecação envolvem um complexo mecanismo de proteção contra o estresse mecânico causado pela remoção da água, que causa modificações na parede e membranas celulares, citoesqueleto e compactação da cromatina (DEKKERS, et al., 2015). A deposição de compostos de reserva insolúveis e açúcares não redutores atuam como escudos moleculares prevenindo e protegendo a agregação de proteínas e preenchendo o espaço celular que antes era ocupado pela água que foi removida evitando danos mecânicos entre grandes moléculas (BUITINK; LEPRINCE, 2008).

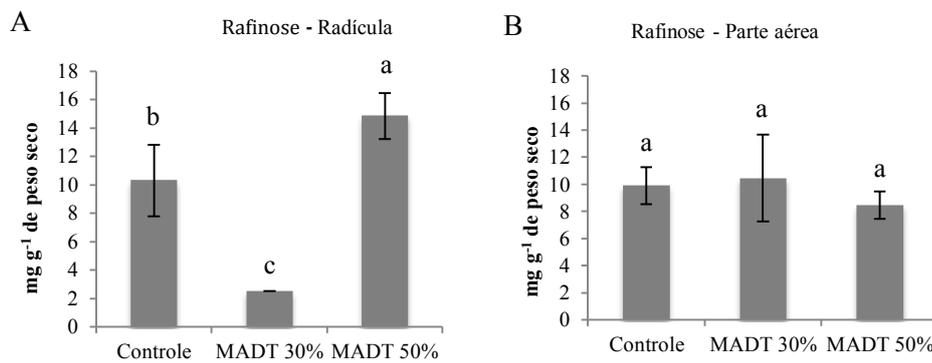
A fim de estudar a possível relação entre carboidratos solúveis e a reindução da TD nos diferentes tecidos de sementes germinadas de milho, a mudança na concentração de açúcares foi determinada em radículas e na parte aérea antes e após os tratamentos MADT 30% e 50% de UR.

Oligossacarídeos da família rafínosica (RFOs), que compreende a rafinose, estaquiase e a verbascose, são citados como importantes na estabilização de membranas fosfolipídicas em plantas de ressurreição durante a dessecação, quando é observado um aumento no nível desses açúcares (FARRANT, 2007). Esses açúcares são formados por até 10 monossacarídeos, em que um resíduo de sacarose está unido a um, dois ou três resíduos de galactose para formar, respectivamente, rafinose, estaquiase e verbascose (KERBAUY, 2004).

Certas espécies de plantas usam RFOs como principais compostos de transporte (DOS SANTOS et al., 2012), embora sejam caracterizados como solutos relacionados aos mecanismos de tolerância ao estresse, a família rafínosica participa de várias outras funções cruciais nas plantas, como transporte e armazenamento de carbono e exportação de mRNA (OKADA; YE, 2009). Além disso, os RFOs funcionam como compostos de reserva e osmoprotetores (SARAVITZ; PHARR; CARTER, 1987) durante a dessecação da semente (HOEKSTRA et al., 1997).

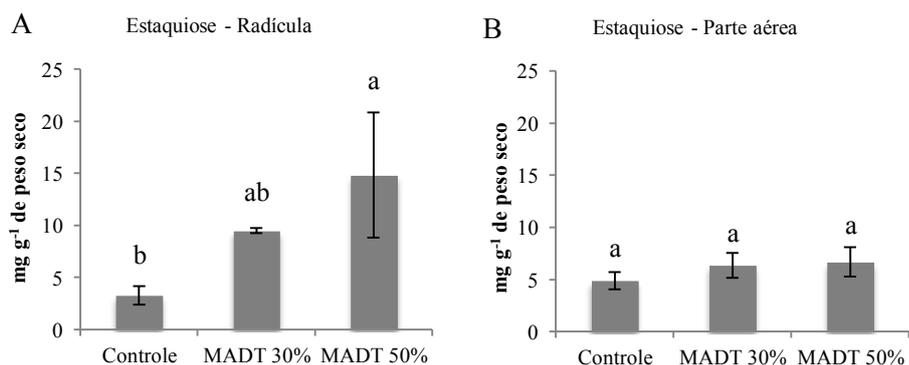
Os teores de rafinose e estaquiose em radículas e parte aérea de sementes germinadas de milho após os tratamentos de reindução da TD, MADT 30% e MADT50% de UR, estão apresentados nas Figuras 8 e 9.

Figura 8 - Teor absoluto de rafinose em radículas (A) e parte aérea (B) de sementes germinadas de milho submetidas aos tratamentos de reindução da TD. * Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



Fonte: Do autor (2017)

Figura 9 - Teor absoluto de estaquiose em radículas (A) e parte aérea (B) de sementes germinadas de milho submetidas aos tratamentos de reindução da TD. * Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



Fonte: Do autor (2017)

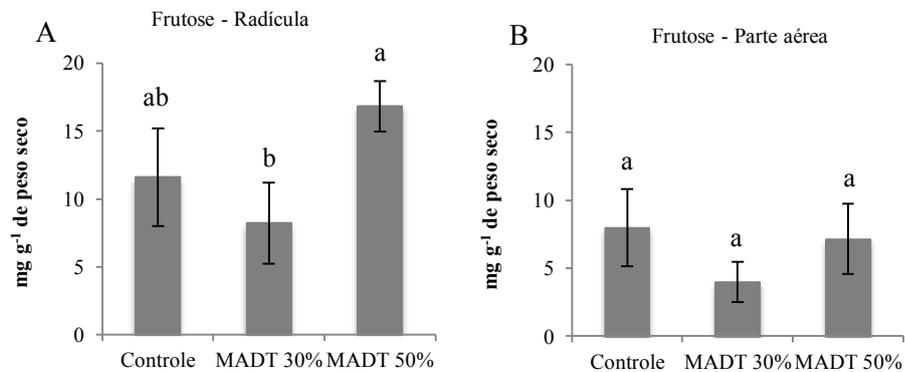
Observa-se que tanto o teor de rafinose quanto o de estaquiose aumentou significativamente comparado ao controle em radículas submetidas ao tratamento MADT 50% UR, o que pode estar correlacionado a sobrevivência destas. No entanto apenas o teor de rafinose no tratamento MADT 30% UR apresentou diferença significativa quando comparado ao tratamento MADT 50% UR. Para a análise de parte aérea não houve diferença significativa para nenhum dos açúcares RFOs estudados. Fato que corrobora com o resultado observado, onde houve desenvolvimento normal de parte aérea para os dois tratamentos de reindução da TD estudados, sendo os maiores efeitos nocivos concentrados no desenvolvimento radicular.

Em sementes de *Arabidopsis* mutantes sensíveis ao ácido abscísico, os níveis de RFO são menores quando comparados ao tipo selvagem, e quando a TD foi reinduzida com aplicação de ABA exógeno houve acúmulo desses açúcares (DEKKERS et al., 2016). O que reitera o fato de que o acúmulo desse grupo específico de açúcares está relacionado com a reindução da TD em sementes, sobretudo na radícula.

Sami et al. (2016), estudando o papel dos açúcares sob estresses abióticos correlaciona os açúcares RFOs com a resistência a estresse hídrico, salino e a baixas temperaturas. O que reforça a importância dessa família como moléculas protetoras de membranas e com ação de scavengers, auxiliando a remoção de radicais livres produzidos por situações de estresse (KRASENSKY; JONAK, 2012). Peters et al. (2007) estudando a espécie de ressureição *Xerophyta viscosa*, sob condições de estresse hídrico, constatou o acúmulo de sacarose e rafinose, assim, foi proposto que esses açúcares não contribuem apenas com a proteção subcelular contra as injúrias da dessecação, mas também disponibilizam energia para auxiliar na recuperação durante a reidratação.

A frutose favorece a diferenciação celular e a maturação e, juntamente com a glicose, está envolvida com a regulação da divisão e expansão celular, e acúmulo de reservas (YASEEN et al., 2013). Para o teor de frutose também foi observado um aumento no tratamento de reindução MADT 50% em comparação com MADT 30% em radículas. Esse aumento pode estar relacionado com a sobrevivência das mesmas, no tratamento de reindução de pré-secagem a 50% de umidade relativa. Já para a parte aérea, assim como os teores de rafinose e estaquiose não houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle (Figura 10).

Figura 10 - Teor absoluto de frutose em radículas (A) e parte aérea (B) de sementes germinadas de milho submetidas aos tratamentos de reindução da TD. * Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



Fonte: Do autor (2017)

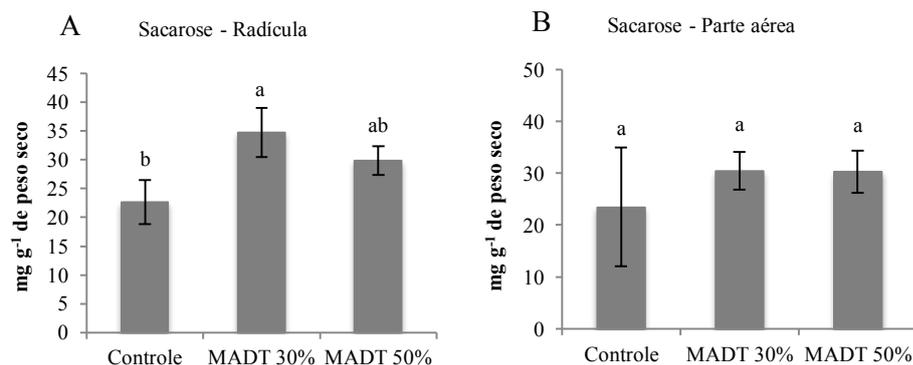
De maneira geral, observa-se que em sementes germinadas de milho submetidas aos tratamentos de reindução da TD estudados, e no tratamento controle (sem pré-secagem) o teor de frutose (mg.g⁻¹ de peso seco) é menor na parte aérea, podendo atingir até 11 mg.g⁻¹ de peso seco.

Ribeiro et al., (2014b) estudando mudanças fisiológicas e bioquímicas de plântulas de *Ricinus communis* em diferentes temperaturas observou que o teor de frutose decresceu em raízes expostas a mais alta temperatura estudada. O que pode estar relacionado ao decréscimo desse açúcar no tratamento de maior estresse aplicado nas radículas de milho quando secadas sob 30% de umidade relativa. Leprince et. al. (2004) estudando o papel dos açúcares e a fosforilação de hexoses na regulação da reindução da TD em radículas de *Cucumis sativa* e *Medicago truncatula* observou aumento progressivo da enzima frutose kinase durante a reindução da TD, o que reitera o acúmulo desse açúcar na reindução da tolerância a dessecação para as espécies estudadas.

Em plantas de maneira geral, o aumento na concentração de açúcares solúveis como glicose, frutose e sacarose contribui para a tolerância a vários estresses abióticos como seca, salinidade e baixas temperaturas (RATHINASABAPATHI, 2000).

A sacarose foi o açúcar mais abundante em tecidos de sementes de milho, atingindo cerca de 40 mg⁻¹.g de peso seco. Foi observado aumento significativo no teor de sacarose em radículas submetidas ao tratamento MADT 30%. Para a parte aérea não foi observada diferença significativa entre os tratamentos (Figura 11).

Figura 11 - Teor absoluto de sacarose em radículas (A) e parte aérea (B) de sementes germinadas de milho submetidas aos tratamentos de reindução da TD. * Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



Fonte: Do autor (2017)

Estudos relacionados ao transcriptoma e metaboloma indicam que a sacarose é produzida pela mobilização de lipídios e amido, sendo normalmente acumulada em radículas tolerantes a dessecação (BUIKINK et al., 2006). Em plântulas de *Brassica napus* foi observado que a aplicação exógena de sacarose inibe o crescimento de hipocótilo e estimula o crescimento de raízes (SAMI et al., 2016). Porém, no presente estudo foi observado maior teor de sacarose para radículas sob o tratamento que obteve menor porcentagem de formação de raízes normais.

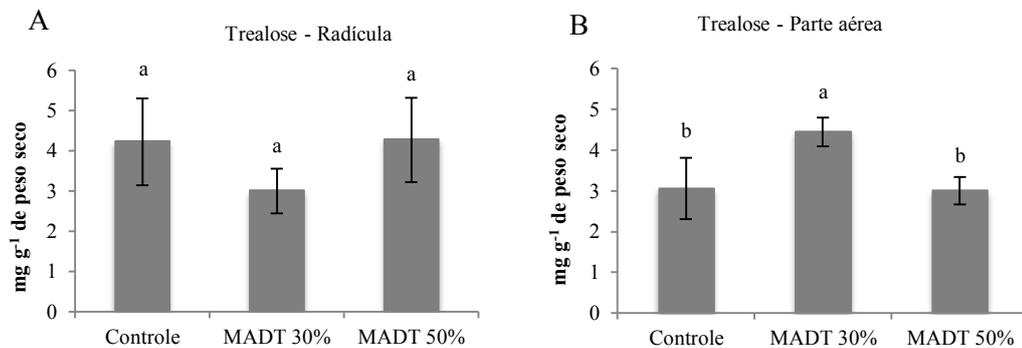
Açúcares solúveis (sacarose, glicose e frutose), desempenham papel importante na manutenção da estrutura e no crescimento das plantas (ROSA et al., 2009). A regulação desses compostos acontece de maneira muito complexa por causa do sítio de especificidade o que necessita sinais distantes e coordenados com as alterações fisiológicas, no desenvolvimento e também em resposta a mudanças no meio ambiente (LEMOINE et al., 2013). Toda complexidade envolvida no desempenho das funções desses compostos muitas vezes torna-se um entrave no entendimento de relações mais específicas, como no caso da reindução da TD.

Correlações entre teor de açúcares e tolerância a dessecação em plantas foram primeiramente citadas em relação a pólen e sementes, com estudos posteriores em plantas de

ressurreição (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001). Alguns desses estudos sugerem que a sacarose e oligossacarídeos atuavam como substitutos da trealose. O papel da trealose provou ser necessário quanto a preservação de biomoléculas e células *in vitro* (CROWE 2007). Pesquisas mais recentes evidenciam que nematóides anidrobióticos necessitam da trealose para a sobrevivência no estado seco (ERKUT et al. 2011).

Para sementes germinadas de milho submetidas aos tratamentos de reindução da TD o teor de trealose para os tecidos está apresentado na Figura 12.

Figura 12 - Teor absoluto de trealose em radículas (A) e parte aérea (B) de sementes germinadas de milho submetidas aos tratamentos de reindução da TD. * Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

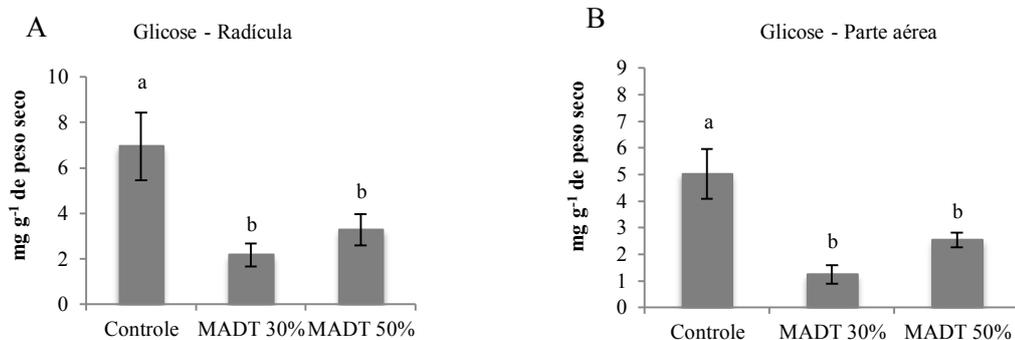


Fonte: Do autor (2017)

O aumento observado no teor de trealose para parte aérea pode estar relacionado com a sobrevivência desse tecido mesmo após o tratamento de pré-secagem a 30% de umidade relativa. Porém, no tecido mais sensível a dessecação não houve relação entre o teor de trealose e sobrevivência das radículas. Pela importância imposta pelos estudos, e pelos efeitos de alta proteção *in vitro*, foi cogitado que a trealose poderia conferir TD. No entanto, foi comprovado posteriormente que a trealose, ou nenhum outro açúcar não redutor, sozinho seria capaz de manter intacto um organismo *in vivo*, após a dessecação, o que sugere a necessidade de mecanismos não baseados em dissacarídeos (TUNNACLIFFE; LAPINSKI 2003; MA et al. 2005; DINAKAR; BARTELS, 2013).

Para os teores de glicose, não foi observada diferença significativa para nenhum dos tecidos estudados com relação aos tratamentos de pré secagem aplicados. O maior teor de glicose foi observado para o tratamento controle, com posterior decréscimo em ambos tratamentos de reindução da TD (Figura 13).

Figura 13 - Teor absoluto de glicose em radículas (A) e parte aérea (B) de sementes germinadas de milho submetidas aos tratamentos de reindução da TD. * Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



Fonte: Do autor (2017)

A glicose, em baixas concentrações, está relacionada ao crescimento assim como o hormônio vegetal ABA. Porém, quando presentes em altas concentrações ambos compostos podem bloquear o desenvolvimento das células em plântulas (DEKKERS; SCHUURMANS; SMEEKENS, 2008). Esses autores observaram que a aplicação exógena de glicose promove aumento no crescimento de raízes em plântulas de *Arabidopsis*.

Na tentativa de reinduzir a TD no presente estudo foram testadas diferentes doses de ABA, sem sucesso. O fitormônio ABA e a glicose, no presente estudo podem não estar relacionados a reindução da TD, uma vez que ambos não influenciaram os tratamentos utilizados para sementes germinadas de milho. Silva et al., (2017), estudando a reindução da TD em sementes germinadas de feijão caupi não constataram a presença desse açúcar na raiz primária dessa espécie.

No estudo de expressão gênica durante a reindução da TD, foram selecionados três genes, relacionados a proteínas envolvidas no estabelecimento da TD em sementes, e na proteção contra estresses abióticos: *PgLEA*; *PgDHN* e *PgHsp10*, a eficiência dos *primers* foi testada através da amplificação por qRT-PCR (Tabela 4).

Tabela 4 - Genes alvo estudados e amplificados para tecidos de sementes germinadas de milho submetidas a tratamentos de reindução da TD.

Genes alvo	Referência bibliográfica	Eficiência qRT-PCR	R²
PgLEA	Reddy et al., Mol Biol Rep (2012).	0,891	0,9917
PgDHN	Singh, et al., Plant Gene, (2015).	1,026	0,9807
PgHsp10	Nitnavare, et al., Molecular Biology Reports, (2016).	0,908	0,9947

Fonte: Do autor (2017)

Para os genes de referência foram testados seis candidatos listados como estáveis para a espécie estudada, e foi feita novamente a análise de eficiência através do software Bio-Rad iQ5 e estabilidade com auxílio do software qBASE+ nas condições de estudo (Tabela 5; Figura 14).

Tabela 5 - Genes de referência testados e amplificados para tecidos de sementes germinadas de milho submetidos a tratamentos de reindução da TD.

Genes de referência	Descrição	Referência bibliográfica	Eficiência qRT-PCR	R²
UBC-E2	Ubiquitina-enzima conjugada E2	Shivhare, R.; Lata, C. Scientific Reports, Nature (2016).	1,03	0,9925
EF-1 α	Fator de alongação -1 alpha	Shivhare; Lata, Scientific Reports, Nature (2016).	1,04	0,9948
ACT	Actina	Shivhare; Lata, Scientific Reports, Nature (2016).	1	0,9989
PP2A	Proteína fosfatase 2A	Saha; Blumwald, Plos One, (2014).	1,05	0,9916
eIF4A	Fator de iniciação eucariótico - 4A	Shivhare; Lata, Scientific Reports, Nature (2016).	1,07	0,9961
MDH	Malato desidrogenase	Singh, et al., Plant Gene, (2015).	1,08	0,9947

Fonte: Do autor (2017)

A eficiência de amplificação para os genes alvo foi de: 89,1% para PgLEA, 90,8% para PgDHN e 102,6% para PgHsp10, e o coeficiente de determinação (R²) foi de: 0,9917, 0,9807 e 0,9947 respectivamente. Para os genes candidatos à referência a eficiência variou de 100% a 108%, e o coeficiente de variação (R²) de 0,9916 a 0,9989. Isso indica que as condições de reação são ótimas e os resultados obtidos são reproduzíveis.

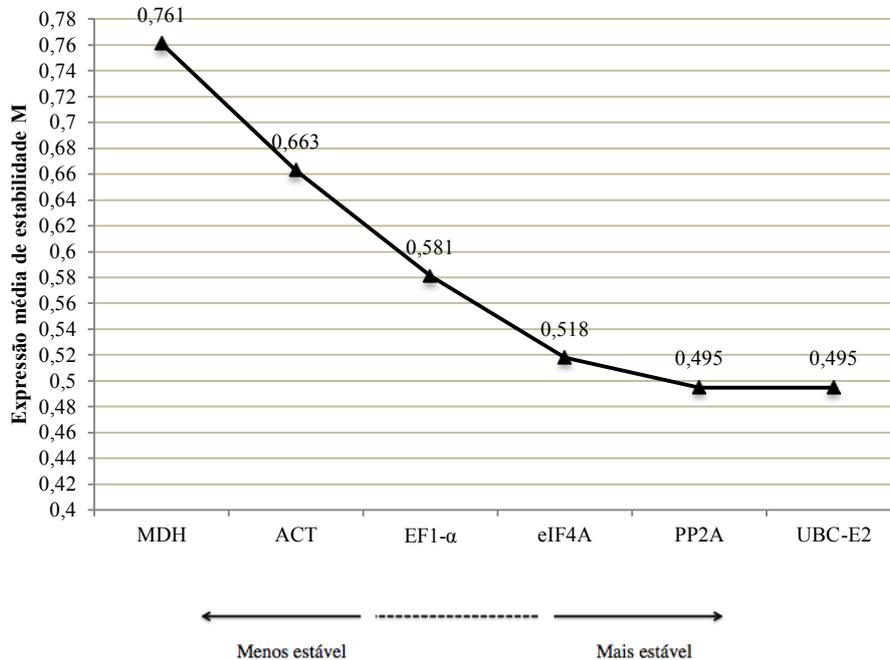
A qRT-PCR é um método para estudos de expressão gênica altamente sensível, preciso e rápido. Além disso, o nível de expressão de alguns genes é tão pequeno que a qRT-PCR se torna a única técnica que pode detectar o número de cópias de mRNA em tempo real (KOZERA; RAPACZ, 2013).

Determinações precisas de expressão genica envolvem a normalização dos valores de CT (ciclo threshold) para a correção de diferenças entre as amostras por erros de amostragem, pipetagem e diferenças de eficiência enzimática (VANDESOMPELE et al., 2002). A normalização dos dados é feita através dos genes de referência, ou genes de controle interno. Em plantas, presume-se que esses genes tenham expressão estável entre diferentes tecidos, estádios de desenvolvimento e condições de crescimento (RIBEIRO et al., 2014a).

No presente trabalho, foram testados o potencial de referencia dos seguintes genes, com base na literatura, para a espécie estudada: *UBC-E2*, *EF-1 α* , *ACT* e *eIF4A* (SHIVHARE; LATA, 2016); *PP2A* (SAHA; BLUMWALD, 2014) e *MDH* (Reddy et al., 2015). As amostras foram analisadas quanto a estabilidade, para dois tecidos (radícula e parte aérea), um estádio de desenvolvimento (1 mm de radícula e início aparente de desenvolvimento de parte aérea), e dois tratamentos de pré-secagem para reindução da TD (MADT 30% UR e MADT 50% UR). O método utilizado para a avaliação da estabilidade foi o GeNorm, que calcula a estabilidade média (M) com base na variação média em pares entre todos os genes testados. Quanto menor o valor de M maior a estabilidade de expressão (VANDESOMPELE et al., 2002).

A ordem de classificação de acordo com o valor M esta representada na Figura 14.

Figura 14 - Expressão média de estabilidade (M) dos genes de referência testados para normalização de dados de qRT-PCR para tecidos de sementes germinadas de milho submetidos a tratamentos de reindução da TD.



Fonte: Do autor (2017)

Em alguns casos, pela heterogeneidade das amostras valores de M inferiores a um são aceitáveis na determinação da estabilidade (HELLEMANS et al., 2007). Porém, valores de M inferiores a 0,5 são os mais confiáveis e utilizados para identificar expressões estáveis de genes de referência em conjuntos relativamente homogêneos de amostras. No caso do presente trabalho observa-se que todos os genes testados apresentaram valor de $M < 0,761$.

O resultado apresentado pelo GeNorm leva a utilização para a normalização os três genes mais estáveis no experimento realizado, sendo eles: *UBC-E2*, *PP2A* e *eIF4A*. Apesar de já serem descritos como estáveis para a espécie, essa combinação de genes de acordo com a estabilidade não havia sido apresentada pela literatura. Shivhare e Lata (2016) concluíram que para o milho nas condições que estudaram a melhor combinação de acordo com as análises realizadas foi *EF-1 α* e *UBC-E2*. Já para Reddy et al. (2015), concluíram que *MDH* e *ACP* foram a melhor combinação para todas as amostras estudadas dentre elas, tecidos, condições de estresse abiótico e genótipos. Por fim, Saha e Blumwald (2014) apresentaram uma maior variedade de genes de referência estáveis nas condições de estudo *PP2A*, *TIP41*, *UBC2*, *UBC5* e *ACT*. Em condições diferentes, para diferentes organismos e mesmo entre tecidos, a suposição básica (que é o nível constante de expressão) não é mantida para muitos dos genes

que são listados como perfeitos candidatos, ressaltando a importância da análise de estabilidade nas condições experimentais estudadas.

As chaperonas são complexos cilíndricos de alto peso molecular da maquinaria celular, que auxiliam no dobramento de proteínas recém-sintetizadas para manterem seu estado ativo. O Grupo I de chaperonas Hsp60, atua na companhia de uma co-chaperona (Hsp10) de forma dependente do ATP. Parte da subfamília GroE é encontrada em mitocôndrias, cloroplastos e bactérias (RANSON; WHITE; SAIBIL, 1998). PgHsp10 é homóloga aos genes Hsp10, encontrados em outras plantas como *Arabidopsis Thaliana* (Gene ID: 838063) e *Zea mays* (Gene ID:100193174), (NITNAVARE et al., 2016).

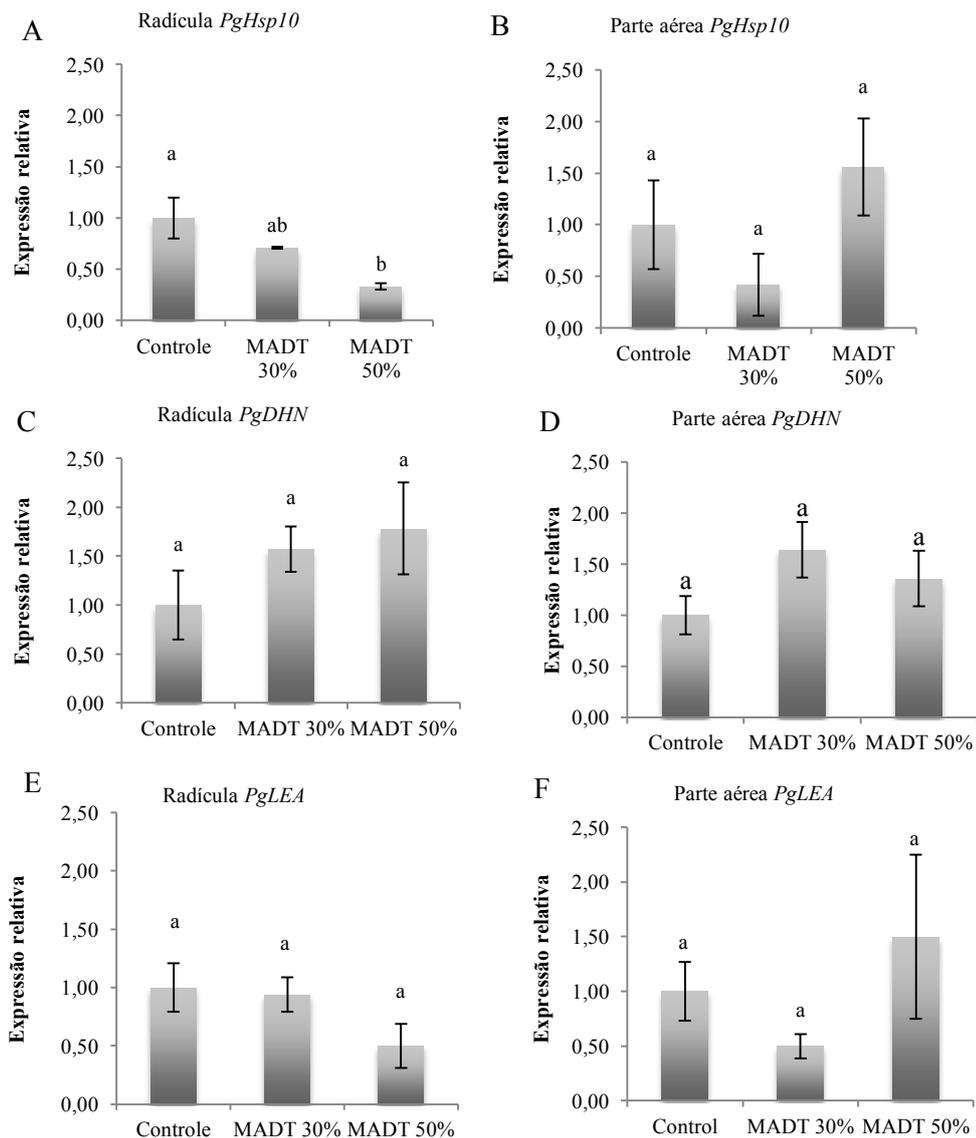
As proteínas LEA são expressas durante a fase de dessecação na maturação das sementes e também se acumulam nos tecidos vegetativos de diferentes espécies de plantas em resposta a ABA, seca, salinidade, frio e congelamento (HANIN et al., 2011; REDDY et al., 2012). São categorizadas em vários grupos estruturais, um dos grupos, chamado LEA 2, contem as desidrinas (DHNs) presentes em todos os organismos fotossintéticos (PUHAKAINEN et al., 2004).

Por estudos in vitro foi constatado o envolvimento de desidrinas em diversas funções, incluindo estabilização da membrana, crioproteção de enzimas e proteção contra espécies reativas de oxigênio (GRAETHER; BODDINGTON, 2014). Desidrinas estão entre as proteínas mais comuns acumuladas em plantas submetidas à estresses relacionados a perda de água. Possuem tipicamente pelo ou menos três sequências conservadas chamadas de segmentos Y-, S- e K (DRIRA et al., 2016).

A análise da sequência proteica de *PgDHN* classificou-a no subgrupo YnSKn de desidrinas, com filogenia relacionada evolutivamente com desidrinas de *Setaria itálica*, também conhecida como “Foxtail millet” (SINGH et al., 2015). Já a análise filogenética revelou que *PgLEA* é evolutivamente próximo ao grupo LEA 7, e como citado anteriormente é uma grande família de proteínas protetoras contra a agregação de outras proteínas durante a dessecação e estresse osmótico (REDDY et al., 2012).

A mudança relativa na expressão dos genes foi verificada na radícula e na parte aérea de sementes germinadas de milho na reindução da tolerância à dessecação para proteína de choque térmico (*PgHsp10*), desidrina (*PgDHN*) e LEA proteína (*PgLEA*), como representado na Figura 15.

Figura 15 - Perfil de expressão relativa na radícula e parte aérea de sementes germinadas de milho submetidas a reindução da tolerância à dessecação. A- expressão relativa em radículas de PgHsp10; B- expressão relativa em parte aérea de PgHsp10; C- expressão relativa em radículas de PgDHN; D- expressão relativa em parte aérea de PgDHN; E- expressão relativa em radículas de PgLEA; F- expressão relativa em parte aérea de PgLEA. *Médias seguidas da mesma letra, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



Fonte: Do autor (2017)

Para a expressão relativa dos genes estudados observa-se que houve diferença significativa apenas para o gene PgHsp10 em radículas submetidas aos tratamentos de reindução da tolerância à dessecação. A expressão no tratamento de reindução MADT50% decresceu pela metade quando comparada ao tratamento controle.

Para a expressão dos demais genes estudados não houve diferença significativa entre os tratamentos de reindução da tolerância à dessecação nos tecidos, sendo assim, esses genes específicos não contribuem para a retomada do crescimento em sementes germinadas de milho. Leva-se em consideração a existência de várias proteínas envolvidas na proteção à estresses abióticos. Uma vez que no presente estudo foram analisados apenas três genes relacionados à esse mecanismo protetor, existe a possibilidade de outras formas de LEA, desidrinas e proteínas resistentes ao calor estarem envolvidas com o processo de reindução da TD na espécie estudada.

O dogma central da biologia molecular trata da transferência de informação do DNA via mRNA para proteínas. É muito bem entendido como os genes são transcritos, o mRNA é processado e seqüencialmente traduzido em cadeias de aminoácidos no ribossomo e posteriormente se dobra em proteínas funcionais. No entanto, a maioria dos estudos sobre mRNA e abundância de proteínas encontra apenas uma fraca correlação entre as respectivas abundâncias dessas duas classes de moléculas biológicas. Foram identificados vários fatores biológicos que influenciam essa correlação, mas também as restrições metodológicas desempenham papel fundamental ao comparar o mRNA com os níveis de proteína (MAIER; GÜELL; SERRANO, 2009).

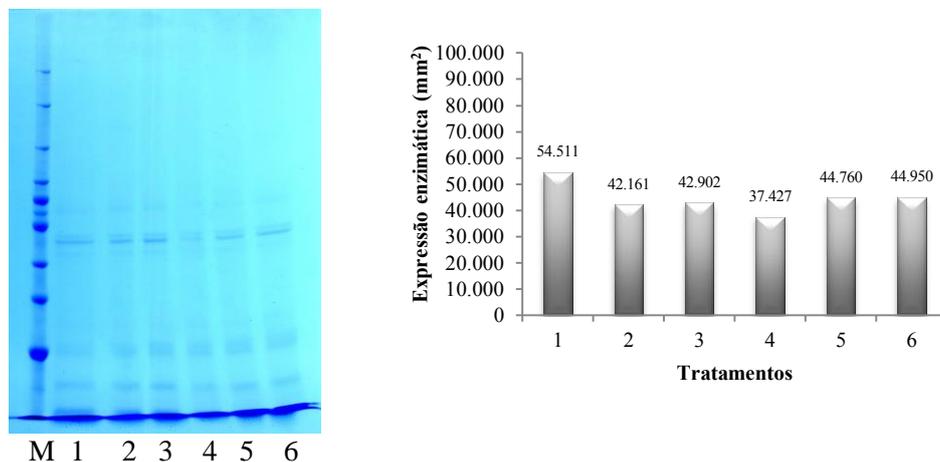
A relação dos transcritos com os eventos aos quais estão vinculados é dificultada, pois em sementes os eventos metabólicos podem estar envolvidos com respostas a outros estresses, ou mesmo ao estágio de desenvolvimento estudado. Assim, poucos estudos sobre reindução da TD em sementes germinadas são capazes de separar os mecanismos que não estão diretamente ligados a TD, porém podem estar associados a outras vias de desenvolvimento concomitantes (MAIA et al., 2014).

Os organismos convertem instruções genômicas em proteínas específicas via transcrição e tradução. É evidente que o ato de transcrição é controlado pela célula, e atualmente os cientistas relativamente têm uma boa compreensão dos mecanismos que regulam a expressão gênica. Com isso, pode-se ter uma visão de biologia bastante "centrada nos transcritos", assumindo que mais transcrição se traduz automaticamente em mais proteínas. Esta é a premissa assumida em inúmeros estudos de transcrição de genes em que os níveis de transcrições são medidos em uma variedade de condições e os resultados são extrapolados para seus produtos proteicos. No entanto, este não é necessariamente o caso, porque os controles a frente da tradução, dobramento de proteínas e degradação de proteínas têm o potencial de superar o impacto da atividade transcricional anterior (STRAUB, L. 2011).

Maier; Güell; Serrano, (2009), também menciona que nem sempre mudanças na expressão gênica são evidências de consequentes mudanças na expressão de proteínas.

Afim de estudar a expressão geral de proteínas resistentes ao calor (PRC), foi realizada a análise das radículas e parte aérea submetidas aos tratamentos de reindução da TD por meio de eletroforese (Figura 16).

Figura 16 - Padrão eletroforético e quantificação de proteínas resistentes ao calor em tecidos de sementes germinadas de milho submetidos a diferentes tratamentos de reindução da tolerância à dessecação. Tratamentos: 1- controle radícula; 2- radículas submetidas ao tratamento MADT30%; 3- radículas submetidas ao tratamento MADT 50%; 4- parte aérea controle; 5- parte aérea submetida ao tratamento MADT 30%; 6- parte aérea submetida ao tratamento madt 50%. M- marcador molecular.



Fonte: Do autor (2017)

Com base nos resultados obtidos não verifica-se relação direta entre a expressão dos genes estudados e a atividade de proteínas resistentes ao calor (PRC). Esse fato pode estar ligado à mecanismos pós-transcricionais, traducionais e pós-traducionais, que podem estar ativos durante a reindução da TD (NELSON; COX, 2013), sem relação direta com a expressão dos transcritos estudados.

Observa-se que para a expressão de proteínas resistentes ao calor na parte aérea referente aos tratamentos de reindução aplicados (MADT 30% UR e MADT 50% UR), respectivamente indicados pelos números 5 e 6 houve um pequeno aumento quando comparado ao controle (4), porém, esse fato não tem relação com a reindução da TD, uma vez que o desenvolvimento de parte aérea foi normal para todos os tratamentos aplicados. Para as radículas, houve um pequeno decréscimo na expressão de PRCs, levando a conclusão de que

estas não estariam envolvidas com a retomada de crescimento radicular normal no tratamento que obteve sucesso na reindução da TD.

Mesmo não estando envolvidas diretamente com a reindução da TD em sementes germinadas de milho observa-se a presença de PRCs, fato que não descarta a hipótese da existência outros genes relacionados a LEAs, desidrinas e heat shock proteínas que podem desempenhar papel importante na reindução da TD.

4 CONCLUSÕES

- A tolerância a dessecação em sementes germinadas de milho após 18 horas de embebição é restabelecida apresentando cerca de 72% de sobrevivência, com a aplicação do método de pré-secagem em ar úmido a 50% de umidade relativa (MADT 50% UR).
- Sementes germinadas de milho após 18 horas de embebição pré-secadas em ar úmido a 30% de umidade relativa retomam o crescimento normal de parte aérea, porém não são capazes de recuperar o crescimento de radículas. O uso exógeno de ABA, PEG e LiCl não foi eficiente na reindução da TD em sementes germinadas de milho.
- Existe diferença de sensibilidade entre os tecidos de radícula e parte aérea em sementes germinadas de milho quanto à tolerância à dessecação, sendo a radícula o mais afetado.
- Ocorre acúmulo de rafinose, estaquiase e frutose na radícula de plântulas submetidas ao MADT 50%UR, melhor tratamento de reindução da TD, fato não verificado na parte aérea e para sacarose, trealose e glicose.
- Para ambos tratamentos de reindução da TD estudados, há decréscimo no teor de glicose em comparação ao tratamento controle.
- Não há relação direta entre os genes PgHsp10, PgDHN e PgLEA e a reindução da tolerância à dessecação em sementes germinadas de milho.
- O tratamento com MADT50% UR, que proporcionou maior taxa de sobrevivência, apresentou menor expressão do gene PgHsp10 na radícula.
- A análise geral da expressão de proteínas resistentes ao calor foi constante entre os tratamentos estudados.

REFERÊNCIAS

- ALPERT, P. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life1. **Integrative and Comparative Biology**, Mclean, v. 45, n. 5, p. 685-695, 2005.
- BATTAGLIA, M., et al. The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 148, n. 1, p. 6-24, 2008.
- BERJAK, P., PAMMENTER, N. W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Plant Physiology**, Washington, v. 4, p. 478, Nov. 2013.
- BEWLEY, J. D., et al. Seeds: physiology of development, germination and dormancy. **Springer**, New York, 2013.
- BLACK, M., et al. Water Content, Raffinose, and Dehydrins in the Induction of Desiccation Tolerance in Immature Wheat Embryos. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 120, n. 2, p. 463-472, 1999.
- Brasil. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. *Regras para Análise de sementes*, Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009, 398 p.
- BOUDET, J., et al. Comparative Analysis of the Heat Stable Proteome of Radicles of *Medicago truncatula* Seeds during Germination Identifies Late Embryogenesis Abundant Proteins Associated with Desiccation Tolerance. **Plant Physiology**, Bethesda v. 140, n. 4, p. 1418-1436, 2006.
- BRUGGINK, T., VAN DER TOORN, P. Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 5, n. 1, p. 1-4, 1995.
- BUITINK, J. et al. Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. **Plant Journal**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 735-750, 2006.
- BUITINK, J. et al. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 13, n. 4, p. 273-286, 2003.
- BUITINK, J., LEPRINCE, O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. **Comptes Rendus Biologies**, Paris v. 331, n. 10, p. 788-795, 2008.
- BUITINK, J. et al. 2003 The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. **Seed Science Research** Cambridge, v. 13, n. 4, p. 273-286, 2003.
- CROWE, J. H. Trehalose as a “chemical chaperone”: fact and fantasy. In: Csermely P., Vigh L. (eds) **Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperones, Membranes and Networks**. Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer, New York, NY, 2007. p. 143-158.

- CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; HOEKSTRA, F. A. Phase transitions and permeability changes in dry membranes during rehydration. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, New York, v. 21, n. 1, p. 77-91, 1989.
- DAWS M. I. et al. Loss of desiccation tolerance during germination in neo-tropical pioneer seeds: implications for seed mortality and germination characteristics. **Seed Science Research**, Wallingford v. 17, n. 4, p. 273-281, 2007.
- DEKKERS B. J. W., et al. The Arabidopsis delay of germination 1 gene affects abscisic acid insensitive 5 (ABI5) expression and genetically interacts with ABI3 during Arabidopsis seed development. **The Plant Journal** [s.l.] v. 85, n. 4, p. 451-465, 2016.
- DEKKERS, B. J. W., et al. Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. **Planta**, Berlin, v. 241, n. 3, p. 563-577, 2015.
- DEKKERS, B., SCHUURMANS, J., SMEEKENS, S. Interaction between sugar and abscisic acid signaling during early seedling development in Arabidopsis. **Plant molecular biology**, Dordrecht, v. 67, n. 1-2, p. 151-167, 2008.
- DINAKAR C, BARTELS D. Desiccation tolerance in resurrection plants: new insights from transcriptome, proteome and metabolome analysis. **Frontiers in plant science**, New Haven v. 4, p. 482, 2013.
- DOS SANTOS R., et al. Manninotriose is a major carbohydrate in red deadnettle (*Lamium purpureum*, *Lamiaceae*). **Annals of botany**, London, v. 111, n. 3, p. 385-393, 2012.
- DRIRA, M., et al. Comparison of full-length and conserved segments of wheat dehydrin DHN-5 overexpressed in *Arabidopsis thaliana* showed different responses to abiotic and biotic stress. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 43, n. 11, p. 1048-1060, 2016.
- DURE, L., GREENWAY, S., GALAU, G. Developmental Biochemistry of Cotton Seed Embryogenesis and Germination: Changing Messenger Ribonucleic Acid Populations as Shown by in Vitro and in Vivo Protein Synthesis. **Biochemistry**, New York, v. 20, n. 14, p. 4162-4168, 1981.
- ERKUT, C., et al. Trehalose renders the dauer larva of *Caenorhabditis elegans* resistant to extreme desiccation. **Current Biology**, London v. 21, n. 15, p. 1331-1336, 2011.
- FARIA, J. M. R. et al. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation-tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 418, p. 2119-2130, 2005.
- FARRANT, J. M. Mechanisms of desiccation tolerance in angiosperm resurrection plants. In: Jenks M.A., Wood A.J. (Eds), **Plant Desiccation Tolerance**. CAB International, Wallingford, UK, 2007.
- GAFF D. F., OLIVER M. The evolution of desiccation tolerance in angiosperm plants: a rare yet common phenomenon. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 40, n. 4, p. 315-328, 2013.

GALAU, G. A.; HUGHES, D. W.; DURE, L. Abscisic Acid Induction of Cloned Cotton Late Embryogenesis-Abundant (Lea) mRNAs. **Plant molecular biology**, Dordrecht v. 7, n. 3, p. 155-170, 1986.

GRAETHER, S. P., BODDINGTON, K. F. Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. **Frontiers in plant science**, New Haven, v. 5, p. 576, 2014.

GUIMARÃES, C. C., et al. Changes in gene expression and soluble carbohydrate contents during the imbibition and re-induction of desiccation tolerance in *Peltophorum dubium* seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 44, n. 1, p. 125-137, 2016.

HANIN, M., et al. Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. **Plant signaling & behavior**, [s.l.] v. 6, n. 10, p. 1503-1509, 2011.

HELLEMANS, J., et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome biology**, [s.l.] v. 8, n. 2, p. R19, 2007.

HOEKSTRA, F., GOLOVINA, E., BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in plant science**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 431-438, 2001.

HOEKSTRA F.A., et al. Membrane stabilization in the dry state. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, New York, v. 117, n. 3, p. 335-341, 1997.

HOEKSTRA, F., GOLOVINA, E., BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in plant science**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 431-438, 2001.

ImageJ®. **Image Processing and Analysis in Java**. [s.l.] 2016. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/> . Acesso em 27/07/2016.

ISTA, International Rules for Seed Testing, International Seed Testing Association, 2014.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KOZERA, B., RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **Journal of applied genetics**, [s.l.] v. 54, n. 4, p. 391-406, 2013.

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

LAWLOR, D. W. Absorption of Polyethylene Glycols by Plants and their Effects on Plant Growth. **New phytologist**, Cambridge, v. 69, n. 2, p. 501-513, 1970.

LEMOINE, R. et al. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. **Frontiers of plant science**, New Haven v. 4, p. 1-21, 2013.

LEPRINCE, O.; BUITINK J. Introduction to desiccation biology: from old borders to new frontiers. **Planta**, Berlin, v. 242, n. 2, p.369–378, 2015.

LEPRINCE, O., et al. The role of sugars and hexose phosphorylation in regulating the re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Cucumis sativa* and *Medicago truncatula*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 122, n. 2, p. 200-209, 2004.

MA, X., et al. A small stress protein acts synergistically with trehalose to confer desiccation tolerance on mammalian cells. **Cryobiology**, San Diego, v. 51, n. 1, p. 15-28, 2005.

MAIA, J. et al. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds and its associated transcriptome. **PlosOne**, California, v. 6, n. 12, e29123, 2011.

MAIER, T., GÜELL, M., SERRANO, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 583, n. 24, p. 3966-3973, 2009.

MANFRE, A. J., et al. Seed Dehydration and the Establishment of Desiccation Tolerance During Seed Maturation is Altered in the *Arabidopsis thaliana* Mutant *atem6-1*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 50, n. 2, p. 243-253, 2008.

MASETTO; T. E., FARIA; J. M. R.; FRAIZ, A. C. R. (2015). Loss and re-establishment of desiccation tolerance in the germinated seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) (Pers.). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 37, n. 3, p. 313-320, 2015.

MEXAL, J. et al. Oxygen availability in polyethylene glycol solutions and its implications in plant-water relations. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 55, n. 1, p. 20-24, 1975.

MISHRA, R. N. et al. Isolation and characterization of expressed sequence tags (ESTs) from subtracted cDNA libraries of *Pennisetum glaucum* seedlings. **Plant molecular biology**, Dordrecht, v. 64, n. 6, p. 713-732, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry, 6 ed. New York: W.H. Freeman Publishers, 2013.

NITNAVARE, R. B. et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a heat shock protein 10 (Hsp10) from *Pennisetum glaucum* (L.), a C4 cereal plant from the semi-arid tropics. **Molecular biology reports**, Dordrecht, v. 43, n. 8, p. 861-870, 2016.

OKADA, M., YE, K. Nuclear phosphoinositide signaling regulates messenger RNA export. **RNA biology**, [s.l.] v. 6, n. 1, p. 12-16, 2009.

OLIVER M. J.; TUBA Z.; MISHLER B. D. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. **Plant Ecology**, Dordrecht v. 151, n. 1, p. 85-100, 2000.

PETERS S., et al. Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 8, p. 1947-1956, 2007.

PUHAKAINEN, T., et al. Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis* **Plant molecular biology**, Dordrecht, v. 54, n. 5, p. 743-753, 2004.

- R CORE TEAM (2014). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>
- RATHINASABAPATHI, B. Metabolic engineering for stress tolerance: installing osmoprotectant synthesis pathways. **Annals of Botany**, London, v. 86, n. 4, p. 709-716, 2000.
- RANSON, N. A.; WHITE, H. E.; SAIBIL, H. R. Chaperonins. **Biochem J**, London, v. 333, n. 2, p. 233-242, 1998.
- REDDY, P. S. et al. Cloning and validation of reference genes for normalization of gene expression studies in pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] by quantitative real-time PCR. **Plant Gene**, [s.l.] v. 1, p. 35-42, 2015.
- REDDY, P. S. et al. Cloning and molecular characterization of a gene encoding late embryogenesis abundant protein from *Pennisetum glaucum*: protection against abiotic stresses. **Molecular biology reports**, Dordrecht v. 39, n. 6, p. 7163-7174, 2012.
- RIBEIRO, P. R., et al. Identification of reference genes for gene expression studies during seed germination and seedling establishment in *Ricinus communis* L. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 24, n. 4, p. 341-352, 2014a.
- RIBEIRO, P. R., et al. Physiological and biochemical responses of *Ricinus communis* seedlings to different temperatures: a metabolomics approach. **BMC plant biology**, [s.l.] v. 14, n. 1, p. 223, 2014b.
- ROSA, M. et al. Soluble sugars- metabolism, sensing and abiotic stress. **Plant signaling & behavior**, Philadelphia v. 4, n. 5, p. 388-393, 2009.
- SAHA, P.; BLUMWALD, E. Assessing reference genes for accurate transcript normalization using quantitative real-time PCR in pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.]. **PloS one**, [s.l.] v. 9, n. 8, p. e106308, 2014.
- SAMI, F. et al. Role of sugars under abiotic stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 109, p. 54-61, 2016.
- SARAVITZ, D. M., PHARR, D. M., CARTER, T. E. Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. **Plant Physiology**, Bethesda v. 83, n. 1, p. 185-189, 1987.
- SINGH, J. et al. Molecular cloning and characterization of salt inducible dehydrin gene from the C4 plant *Pennisetum glaucum*. **Plant Gene**, [s.l.] v. 4, p. 55-63, 2015.
- SHIH, M. D., et al. Gene cloning and characterization of a soybean (*Glycine max* L.) LEA protein, GmPM16. **Plant molecular biology**, Dordrecht, v. 56, n. 5, p. 689-703, 2004.
- SHIVHARE, R., LATA, C. Selection of suitable reference genes for assessing gene expression in pearl millet under different abiotic stresses and their combinations **Scientific reports**, [s.l.] v. 6, p. 23036, 2016.
- SILVA, A. C., et al. Re-induction of desiccation tolerance in germinated cowpea seeds. **South**

African Journal of Botany, Pretoria, v. 113, p. 34-39, 2017.

SILVA, A. T. **Dissecting the seed-to-seedling transition in *Arabidopsis thaliana* by gene co-expression networks**. 2015. 179 p. Thesis submitted in fulfillment of the requirements for the degree of doctor at Wageningen University. Wageningen, 2015.

SINGH, J., et al. Molecular cloning and characterization of salt inducible dehydrin gene from the C4 plant *Pennisetum glaucum*. **Plant Gene** [s.l.] v. 4, p. 55-63, 2015

STRAUB, L. Beyond the Transcripts: What Controls Protein Variation? **PLoS biology**, [s.l.] v. 9, n. 9, p. e1001146, 2011.

TOBIAS, M. N.; NORMAN, W. P. Dehydration kinetics of embryonic axes from desiccation-sensitive seeds: an assessment of descriptive Models. **Journal of integrative plant biology**, [s.l.] v. 51, n. 11, p. 1002-1007, 2009.

TUNNACLIFFE, A.; LAPINSKI, J. Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, [s.l.] v. 358, n. 1438, p. 1755-1771, 2003.

TYAGI, S.; BRATU, D. P.; KRAMER, F. R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. **Nature Biotechnology**, New York, v. 16, n. 1, p. 49-53, 1998.

VANDESOMPELE, J., et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, [s.l.] v. 3, n. 7, p. research0034. 1, 2002..

VIEIRA C. V. et al. Stress-associated factors increase after desiccation of germinated seeds of *Tabebuia impetiginosa* Mart. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 62, n. 3, p. 257-263, 2010.

WOLKERS, W. F. et al. Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, [s.l.] v. 1544, n. 1, p. 196-206, 2001.

XU, S. M., et al. Changes in photosynthesis, xanthophyll cycle and sugar accumulation in two North Australia Tropical species differing in leaf angles. **Photosynthetica**, Prague, v. 45, n. 3, p. 348, 2007.

YASEEN, M., et al. Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development. **Molecular biology reports**, Dordrecht v. 40, n. 4, p. 2837-2849, 2013.