



RUBENS DIOGO JUNIOR

**EXPRESSÃO DE GENES CODIFICANTES PARA
PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO EM
SEMENTES DE LINHAGENS DE MILHO**

**LAVRAS-MG
2018**

RUBENS DIOGO JUNIOR

**EXPRESSÃO DE GENES CODIFICANTES PARA PROTEÍNAS DE
CHOQUE TÉRMICO EM SEMENTES DE LINHAGENS DE MILHO**

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

Prof(a). Dr(a). Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientador(a)

Prof(a). Dr(a). Heloisa Oliveira dos Santos
Coorientador(a)

**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).**

Diogo Junior, Rubens.

Expressão de genes codificantes para proteínas de choque
térmico em sementes de linhagens de milho / Rubens Diogo Junior.
- 2018.

63 p. : il.

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

Coorientador(a): Heloisa Oliveira dos Santos.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Qualidade fisiológica de sementes. 2. Estresse abiótico:
tolerância ao calor. 3. Transcriptômica. I. Von Pinho, Édila Vilela
de Resende. II. Santos, Heloisa Oliveira dos. III. Título.

RUBENS DIOGO JUNIOR

**EXPRESSÃO DE GENES CODIFICANTES PARA PROTEÍNAS DE
CHOQUE TÉRMICO EM SEMENTES DE LINHAGENS DE MILHO**

**EXPRESSION PROFILE OF GENES ENCODING HEAT SHOCK PROTEINS
IN SEEDS OF CORN INBRED LINES**

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

APROVADA em 27 de fevereiro de 2018.

Dr(a). Édila Vilela de Resende Von Pinho UFLA
Dr(a). Heloisa Oliveira dos Santos UFLA
Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva UNESP

Prof(a). Dr(a). Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientador(a)

Prof(a). Dr(a). Heloisa Oliveira dos Santos
Coorientador(a)

**LAVRAS-MG
2018**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por nos conceder a vida e nos ensinar - por meio de Jesus, encarnação do Verbo Divino - que os caminhos do bem e da verdade se fundem, tornando-se um só da maneira mais harmoniosa possível, nos estudos científicos e na fé.

Agradeço à minha família pelo eterno incentivo. Principalmente ao meu pai, por seu exemplo de trabalho e integridade, à minha mãe, por suas orações e por me ensinar o quê é o amor verdadeiro, e à minha irmã, por sua sabedoria e carinho, além de estar sempre ao meu lado, independentemente da distância.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras e à Universidade do Kentucky, pela oportunidade de estudar Agronomia e por me mostrar, através de seus técnicos, funcionários e alunos, toda a beleza contida nos estudos que envolvem a Fitotecnia e a Biotecnologia.

Agradeço a todos os professores que, de uma forma ou de outra, me orientaram durante as mais variadas etapas deste processo de aprendizagem, especialmente a Édila Von Pinho, Heloísa Oliveira, Luciano Paiva, e Sharyn Perry. Vocês me deram o melhor presente que eu poderia receber nesta vida: o conhecimento, terreno fértil da esperança, e único para a realização da verdadeira liberdade humana.

Agradeço aos membros da banca examinadora desta dissertação.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudos que financiou tal projeto de pesquisa.

Agradeço a todos os colegas de trabalho, bem como aos amigos de Lavras-MG, São Paulo-SP, Lexington-KY e Sidney-MT, pela amizade e companheirismo durante todos esses momentos especiais.

Além disso, em particular, agradeço a Nossa Senhora de Aparecida, pela intercessão nos momentos delicados da vida e por cuidar, da minha família e de mim, em todos os cantos deste mundo.

RESUMO

Dentre as proteínas que conferem a capacidade de termotolerância às sementes de milho, destacam-se as proteínas de choque térmico (HSP's), pertencentes à classe das deidrininas que, por sua vez, constituem o grupo dois das proteínas LEA, reconhecidas por participarem na resposta a diversos tipos de estresses em plantas. As HSP's atuam na montagem de complexos multiproteicos, no transporte de proteínas para o compartimento subcelular de destino, no controle e sinalização do ciclo celular, na proteção das células contra estresse por altas temperaturas, e contra uma eventual apoptose decorrente. Diante disto, objetivou-se, com o presente trabalho, quantificar a expressão de genes codificantes para proteínas de choque térmico em sementes de linhagens de milho com diferentes níveis de tolerância a altas temperaturas de secagem. Após revisão de literatura, foram selecionados 37 genes codificantes para HSP's e para outras proteínas atuantes no metabolismo de resposta às altas temperaturas e, para cada gene, foi desenhado um par de *primers* específico. Sementes de dez linhagens de milho, pertencentes à Geneseeds Recursos Genéticos Ltda[®] e pré-identificadas como contrastantes em relação à tolerância a altas temperaturas de secagem, foram multiplicadas e submetidas a dois tratamentos de secagem: 35° C e 50° C. Após serem submetidas à avaliação da qualidade fisiológica, por meio dos testes de germinação, primeira contagem de germinação, teste de frio, e envelhecimento acelerado, as linhagens foram classificadas em dois grupos: tolerantes e não-tolerantes à alta temperatura de secagem aplicada. Seis linhagens contrastantes para esta característica, sendo três de cada grupo, foram submetidas a uma análise de polimorfismo por meio da técnica de PCR Convencional, utilizando-se os 37 pares de *primers* previamente sintetizados. Dentre estes, 10 demonstraram algum grau de polimorfismo entre os dois grupos de linhagens, evidenciando alguma função no metabolismo de resposta às altas temperaturas de secagem. Estes 10 pares de *primers*, juntamente com 5 *primers* candidatos a genes de referência, tiveram suas eficiências testadas por meio da técnica de PCR em Tempo Real. Dentre estes, 3 pares de *primers* dos genes-alvos atenderam às condições de eficiência, entre 80% e 100%, e de pico único na curva de Melting, e então tiveram suas expressões relativas calculadas. Observou-se que os genes HSP 26 e HSP 70-74-B tiveram, sob condições de estresse, aumento significativo dos seus níveis de expressão em todos os materiais analisados, tanto no grupo de linhagens tolerantes quanto no das não tolerantes. Para o gene HSP 70-74-A, ficou evidenciado um padrão diferente quanto à mudança do perfil de expressão entre o tratamento controle (secagem a 35° C) e aquele sob altas temperaturas (50° C), já que seus níveis de expressão aumentaram após a secagem sob alta temperatura nos materiais considerados tolerantes (L64 e L63), enquanto que, naqueles materiais não-tolerantes (L30 e L57), houve redução desta expressão. Infere-se, portanto, que a expressão deste gene está associada à aquisição de termotolerância em sementes de milho. Assim sendo, conclui-se que os 3 genes avaliados durante todas as etapas destes experimentos têm participação efetiva no metabolismo de resposta ao estresse por altas temperaturas de secagem.

Palavras-chaves: Marcador molecular. Transcriptômica. Estresse abiótico. Tolerância ao calor.

ABSTRACT

Among the proteins that confer the thermotolerance capacity to maize seeds, it stands out the heat shock proteins (HSP's), belonging to the class of dehydrins that, in turn, constitute the second LEA proteins group, recognized for their participation in the response to different kinds of stresses in plants. HSP's act in the assembly of multiprotein complexes, in the appropriate transport of proteins to their target subcellular compartment, in the control and signaling of the cell cycle, in the protection of cells against high temperature stress, and against an eventual apoptosis. In view of this, the objective of this work was to quantify the expression of genes coding for heat shock proteins in seeds of maize lineages with different tolerance levels at high drying temperatures. After reviewing the literature, 37 genes coding for HSPs and for other proteins acting on high temperature response metabolism were selected, so for each gene a specific primer pair was designed. Seeds of ten maize lines, belonging to Geneseeds Recursos Genéticos Ltda® and pre-identified as contrasting with respect to tolerance to high drying temperatures, were multiplied and submitted to two drying treatments: 35° C and 50° C. After being submitted to the evaluation of the physiological quality, through the germination test, first count, cold test, and accelerated aging test, the genotypes were classified into two different groups: tolerant and non-tolerant to high applied drying temperature. Six contrasting inbred lines for this characteristic, three of each group, were submitted to a polymorphism analysis through the conventional PCR technique, using the 37 pairs of primers previously synthesized. Among these, ten showed some degree of polymorphism between the two groups of genotypes, evidencing some function in the metabolism of response to high drying temperatures. These ten pairs of primers, along with five other reference gene candidate primers, had their efficiencies tested through the Real Time PCR technique. Among these, three pairs of target genes primers met the required conditions: efficiency ranging from 80% to 100%, and single peak on the Melting curve. So then had their relative expressions calculated. It was observed that, after the application of the high drying temperature, the HSP 26 and HSP 70-74-B genes increased their expression levels in all the materials analyzed in both the tolerant and non-tolerant lineages. For the HSP 70-74-A gene, a different pattern of expression profile change was observed between control (drying at 35 ° C) and the high temperature treatment (drying at 50 ° C): their expression levels increased at the tolerant genotypes (L64 and L63), whereas in the non-tolerant materials (L30 and L57) this expression was reduced. It is inferred, therefore, that the expression of this gene is associated with the acquisition of thermotolerance in corn seeds. Thus, it is concluded that the 3 genes evaluated during all stages of these experiments have an effective participation in the metabolism of stress response by high drying temperatures.

Keywords: Molecular markers. Transcriptomic. Abiotic stress. Heat tolerance.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
2.1	Secagem de sementes.....	10
2.2	Qualidade fisiológica de sementes e aquisição da termotolerância....	12
2.3	Aspectos morfológicos e bioquímicos relacionados à tolerância à dessecação.....	15
2.4	LEA's deidrinadas e proteínas <i>heat-shock</i>	20
2.4.1	Proteínas de choque térmico do milho.....	22
2.4.2	Pequenas proteínas de choque térmico do milho.....	25
2.4.3	Outras proteínas relacionadas com as HSP's e sHSP's.....	26
2.4.4	Localização das HSP's e sHSP's e importância em outras culturas.....	27
2.4.5	Fatores de transcrição das proteínas <i>heat-shock</i>	29
2.4.6	Relação das HSP's e sHSP's com enzimas e fito-hormônios.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Escolha dos materiais genéticos e produção de sementes.....	34
3.2	Avaliação da qualidade de sementes.....	36
3.2.1	Teor de água.....	36
3.2.2	Teste de germinação e de primeira contagem de plântulas.....	36
3.2.3	Envelhecimento acelerado.....	37
3.2.4	Teste de frio.....	37
3.2.5	Análise dos dados fisiológicos.....	37
3.3	Análise da expressão de transcritos.....	38
3.3.1	Escolha dos genes.....	38
3.3.2	Desenho dos <i>primers</i>	38
3.3.3	Análise prévia do polimorfismo.....	40
3.3.4	Análise transcriptômica por meio da técnica de RT-qPCR.....	41
4	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	43
5	CONCLUSÕES.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

No sistema de produção de sementes de milho, uma das etapas mais importantes é a secagem destas sementes. Tal processo demanda tempo e atenção especial por parte dos profissionais envolvidos, uma vez que pode afetar negativamente a qualidade das sementes produzidas e, também, o potencial de armazenabilidade destas.

No Brasil, há a predominância da colheita de sementes de milho em espigas e, muitas vezes, as sementes se encontram com altos teores de água. Nesta condição, as sementes são mais intolerantes à secagem sob altas temperaturas, o que pode inviabilizar a produção de sementes com alta qualidade utilizando-se tal procedimento.

Sabe-se que a tolerância às altas temperaturas de secagem é uma condição multifatorial, atribuída a uma série de mecanismos. Assim, entender como estes fatores interagem, bem como o nível de regulação gênica para esta característica, torna-se algo indispensável para a seleção de materiais com tal propriedade de tolerância nos programas de melhoramento.

Por meio de pesquisas mais avançadas, tem sido observado que as chamadas “proteínas de choque térmico”, *heat-shock proteins* (HSP's), altamente conservadas e presentes em quase todas as células de todos os organismos conhecidos, indício de seu grande valor evolutivo, são importantes para a aquisição desta termotolerância, especialmente em plantas. As HSP's são compreendidas como uma categoria especial dentre as chaperonas, proteínas “acompanhantes” que participam de um processo de associação a outras proteínas funcionais, formando complexos multiproteicos e atuando no transporte, no controle e na sinalização daquelas, além de proporcionarem proteção às células contra o estresse e eventual apoptose decorrente.

Dentre estas proteínas de choque térmico, destacam-se: a sHSP 26 kDa, cuja expressão é aumentada após exposição a altas temperaturas e/ou seca induzida, oferecendo proteção aos cloroplastos sob condição demasiada de calor; as HSP's de 70 a 74 kDa, que também têm suas expressões aumentadas após desidratações decorrentes de situações de calor excessivo, atuando na defesa antioxidante induzida pela ABA; as sHSP's de 16,9 a 17,2 kDa, acumuladas em embriões de sementes secadas prematuramente, e cuja expressão é induzida pelo choque térmico; e a HSP 101, que também se expressa após aplicação de altas temperaturas de secagem, com a função de reduzir os efeitos deletérios desta fonte de estresse.

Deve-se enfatizar que algumas destas HSP's parecem estar envolvidas de maneira bastante efetiva neste mecanismo de resposta a diversos tipos de estresse metabólico, principalmente os abióticos (tais como calor, seca e frio), em vários tecidos (endosperma, embrião, folha), e em diferentes estágios de desenvolvimento da planta ou da plântula de milho.

Em sementes, particularmente, estas proteínas são acumuladas na fase final de desenvolvimento, razão de deduzir que a secagem natural de maturação, ou ainda aquela artificialmente imposta, desde que dentro de certos limites de temperatura e duração, torna-se vital para a expressão destas proteínas e, conseqüentemente, para a longevidade de sementes, atributo diretamente relacionado à qualidade fisiológica destas.

Desta forma, o estudo da expressão de genes que codificam para as proteínas de choque térmico faz-se importante não somente no intuito de se entender a ação destas nos mecanismos de tolerância às altas temperaturas de secagem, mas também visando à prospecção de marcadores moleculares que possam ser utilizados, no futuro, para a seleção de materiais com estas características.

Assim, neste trabalho, objetivou-se quantificar a expressão de genes codificantes para proteínas de choque térmico em sementes de linhagens de milho com diferentes níveis de tolerância à alta temperatura de secagem.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Secagem de sementes

O processo de secagem, para a grande maioria do grupo de sementes classificadas como ortodoxas, é imprescindível dentro do processo produtivo. Além de reduzir o ataque de pragas e microrganismos, aumenta o período de armazenamento das mesmas e promove maior versatilidade do processo de pós-colheita como um todo. A secagem também possibilita a antecipação da colheita e evita, por consequência, que a semente esteja susceptível à deterioração e aos diversos tipos de injúrias que, eventualmente, podem acontecer sob condições desfavoráveis, ainda no campo.

Contudo, uma secagem realizada de forma inadequada pode implicar em danos irreversíveis às sementes, comprometendo a qualidade das mesmas e, por decorrência, sua comercialização. Sabe-se que o teor de água das sementes no início do processo, bem como a temperatura, a velocidade do ar de secagem, a umidade relativa do local e, principalmente o genótipo, influenciam na tolerância das sementes ao calor e à dessecação e, consequentemente, na qualidade final das mesmas.

De maneira geral, as sementes de milho colhidas em espiga possuem altos teores de água e, portanto, necessitam de métodos de secagem artificial antes do beneficiamento. Entretanto, estas ações são perfeitamente justificáveis, uma vez que retirar as espigas do campo precocemente implica em menores riscos quanto à incidência de pragas, doenças e injúrias causadas por fatores abióticos adversos, tais como chuva, orvalho, e flutuações extremas de temperatura, além de liberar o campo mais cedo para o próximo cultivo. No entanto, sementes com altos teores de água são mais intolerantes à secagem, principalmente sob altas temperaturas.

Sabe-se que, em milho, a tolerância das sementes contra os danos causados por altas temperaturas de secagem depende diretamente do genótipo, de modo que características estruturais (morfológicas) e bioquímicas associam-se para a aquisição e manutenção deste tipo de “proteção” contra o estresse térmico e a dessecação (HALPERIN; KOSTER, 2006). Não obstante, essa tolerância parece estar associada ao efeito materno, de modo que, numa eventual produção de sementes híbridas, o genitor feminino deve ser escolhido *a priori* na busca por materiais F1 com características de tolerância às altas temperaturas (JOSÉ et al., 2004).

Pesquisando-se a sensibilidade de diferentes linhagens de milho, colhido em espigas, quanto à secagem artificial de sementes com variáveis níveis de teor de água na colheita e em diversas temperaturas de secagem, observou-se que há variabilidade quanto à sensibilidade à alta temperatura (43°C) entre as linhagens avaliadas pelo autor (SCHUH et al., 2013). Também foi observado, no mesmo trabalho, que a temperatura do ar de secagem, quando estabelecida a 43° C, acarreta perdas da qualidade das sementes em determinadas linhagens.

Estes e outros autores observaram, ainda, que as sementes da maioria das linhagens avaliadas apresentaram melhor qualidade fisiológica quando a colheita havia sido realizada com teores de água entre 35 e 40% (SCHUH et al., 2013, (GUPTA; GEORGE; PARWATA, 2005; IZLI; ISIK, 2010).

Em outro trabalho envolvendo genótipos de milho, a germinação não foi afetada quando a secagem foi realizada até a temperatura de 40° C, independentemente do teor de água das sementes. Porém, houve redução da qualidade de sementes com níveis de teor de água variando entre 40 e 50% e secadas a 50°C (GUPTA; GEORGE; PARWATA, 2005). Deste modo, infere-se que a temperatura de secagem pode até ser aumentada, em alguns casos, para 50° C, desde que as sementes apresentem baixos teores de água, próximos aos 20%.

Utilizando-se a temperatura de 60° C no momento da secagem, os danos mecânicos, mensurados aqui pela taxa de fissuras das sementes de milho, aumentaram 35%, embora a velocidade de secagem tenha sido acelerada em 4% por hora (ZHANG; ZHOU, 2010).

Quando esta temperatura atinge 75° C, a velocidade de secagem aumenta consideravelmente, mas a taxa de fissuras também é incrementada rapidamente, bem como os níveis de MDA (malondialdeído, composto orgânico marcador para estresse oxidativo) e de ácidos graxos, ocorrendo, em contrapartida, diminuição da atividade da POD (peroxidase).

Ao submeter um lote de sementes a uma temperatura ainda maior (80° C), observou-se uma menor atividade da enzima α -amilase remanescente, importante para hidrolisar o amido no processo de germinação, em comparação com outros lotes de sementes, os quais foram secados lentamente, “ao Sol”, numa temperatura de 35° C (SETIAWAN et al., 2010). Recordar-se que, além da temperatura de secagem, o teor de água das sementes é outra variável crítica a ser considerada: quanto maior a umidade inicial do milho, maior a influência da força de secagem sobre os parâmetros de qualidade (ZHANG; ZHOU, 2010). Destaca-se, ainda, que caracteres morfológicos e fisiológicos (ex: teor de amido, relação amilose vs amilopectina, tipo básico do milho: pipoca, *flint*, *dent*, *flour*, doce, dentre outras características) influenciam diretamente nos parâmetros pertinentes à secagem, tais como

temperatura ideal, fluxo de ar a ser aplicado, taxa de secagem, e umidade inicial necessária para “entrar no secador”.

Em geral, conforme exposto na Tabela 1, diversos autores consideram que temperaturas entre 35° C e 45° C são adequadas para a secagem de sementes de milho colhidas no estágio ML5 (de acordo com a “linha do leite”) e com umidade variando entre 30 e 35%, parâmetros estes adotados neste trabalho (BORBA et al., 1998; GUPTA; PARWATA, 2005; JITTANIT; DRISCOLL, 2010b; SETIAWAN et al., 2010; SCHUH et al., 2013; ZHANG; ZHOU, 2010).

Tabela 1 - Temperaturas limites (máximas) para a o processo de secagem de sementes de milho.

Limite	Fenótipos observados após aplicação de altas temperaturas	Autor (Ano)
42° C	43° C acarretou perdas qualitativas em algumas linhagens	Schuh et al (2013)
40° C	80° C aumentou a taxa de secagem, porém ocasionou danos	Jittanit & Driscoll (2010)
45° C	60° C aumentou a taxa de fissuras das sementes em 35%	Zhang & Zhou (2010)
45° C	75° C gerou o menor custo operacional, mas causou danos	Islı & Izık (2010)
35° C	80° C acarretou menor atividade da amilase remanescente	Setiawan et al (2010)
40° C	50° C foi danoso para sementes com altas %'s de umidade	Gupta & Parwata (2005)
40° C	60° C provocou queda nas %'s de germinação e emergência	Borba et al (1998)

Fonte: Do autor (2018).

No entanto, na maioria dos trabalhos relacionados à secagem de sementes de milho, também tem sido observada importante influência do genótipo.

Assim, na busca pela facilitação, barateamento e maior rapidez do processo de secagem de sementes de milho, o ideal é utilizar materiais genéticos que suportem uma secagem mais rápida, sem danos à qualidade destas sementes.

2.2 Qualidade fisiológica de sementes e aquisição da termotolerância

Não há dúvidas sobre o fato da alta qualidade fisiológica das sementes comercializadas atualmente constituir-se como um referencial da eficiência e da credibilidade das suas empresas produtoras, uma vez que a manifestação desta qualidade é prontamente identificada após a instalação da cultura, e haja vista que o pleno estabelecimento do estande constitui um dos pilares que sustenta a obtenção de produções cada vez mais elevadas por unidade de área, um dos objetivos maiores da agricultura desde sempre. Neste contexto, pode-se considerar o potencial fisiológico como o conjunto de aptidões que permite estimar a capacidade teórica de um lote de semente manifestar adequadamente suas funções vitais após

a semeadura (MEDINA et al, 1990). E, desta maneira, as informações sobre germinação e vigor, obtidas por meio de testes laboratoriais, devem permitir a real comparação entre lotes de sementes, e avaliar fielmente a probabilidade de sucesso com a sua utilização.

Contudo, deve-se recordar que a qualidade fisiológica não está associada unicamente a aspectos relativos à germinação (em termos de morfologia da plântula, e de acordo com os padrões mínimos legais) e ao vigor (potencial para uma emergência rápida e uniforme) das sementes, mas também: à viabilidade, predição inicial, necessitada de confirmação *a posteriori*, que significa a capacidade de sementes vivas germinarem, e cujo termo está intimamente associado ao teste de tetrazólio, sobretudo nas culturas de café, braquiária e soja; à dormência, fator indesejado nas espécies amplamente cultivadas, e que denota a inércia quanto ao desenvolvimento da semente, o qual é temporariamente suspenso ainda que em condições favoráveis do ambiente; e à longevidade, aspecto relacionado ao metabolismo da semente, sobretudo no que diz respeito à sua composição bioquímica e à tolerância contra fatores abióticos diversos, como a dessecação, e que reflete diretamente no potencial de armazenabilidade daquele material.

Deste modo, ainda que a plena consolidação de todo aquele potencial fisiológico da semente exerça uma influência concentrada no momento de estabelecimento do estande e no desenvolvimento inicial das plantas, muitos outros aspectos positivos podem ser enumerados com a utilização de sementes de alta qualidade fisiológica, tais como: melhor desempenho sob ampla variação do ambiente; redução da competição com plantas daninhas; uniformidade do desenvolvimento inicial da cultura, fator que reflete em todo o ciclo, incluindo a colheita; menor risco da necessidade de replantio; menor incidência de outros eventuais insucessos, etc.

Entende-se que as sementes ortodoxas, tão logo submetidas à secagem natural do processo de maturação, ainda na planta-mãe, entrem em estado de quiescência, onde adquirem tolerância à dessecação, condição que permite, assim, o seu armazenamento com baixo teor de água e sua sobrevivência sob uma amplitude maior no que concerne às várias condições ambientais. E, sob condições favoráveis, esta tolerância pode durar muitos anos.

Contudo, durante a germinação, esta mesma tolerância contra dessecação é rapidamente perdida, muitas das vezes depois de apenas algumas horas de embebição, às vezes antes disto, ou após, a partir da emergência da radícula, dependendo da espécie. Neste sentido, não há dúvidas de que estresse térmico prejudique o metabolismo vegetal, uma vez que exerce efeito diferencial sobre a estabilidade protéica e as reações enzimáticas, o que provoca o desacoplamento de diferentes complexos multiproteicos, a acumulação de diferentes intermediários tóxicos, o aumento da fluidez das membranas, a desestabilização e

desintegração do DNA, e a superestabilização de estruturas secundárias do RNA, fatos que culminam na ruptura da transcrição e da tradução, respectivamente, bem como em prejuízos no processo de *turnover* (“reciclagem”) do RNA.

Do ponto-de-vista fisiológico, sabe-se que a exposição a altas temperaturas induz o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO's), O_2 , H_2O_2 , O_2^- e OH , que não são somente subprodutos citotóxicos oriundos de processos metabólicos como a respiração e a fotossíntese, mas que também agem como moléculas de sinalização que regulam respostas vegetais a diversos sinais ambientais e endógenos (TAIZ & ZEIGER, 2017).

Entretanto, as ERO's, que têm um efeito negativo no crescimento, no desenvolvimento e na produtividade vegetal, haja vista que causam estresse oxidativo em plantas e consequente desnaturação ou condensação de proteínas, inativação de enzimas, peroxidação lipídica, danos às membranas celulares, vazamento de eletrólitos, inibição da fotossíntese, da respiração e, portanto, do crescimento de plantas, podem desempenhar um efeito positivo nas células, ativando as rotas de transdução de sinal que induzem os mecanismos de aclimação e, em última instância, caracterizando-se como moléculas sinalizadoras para o metabolismo de resposta a eventos de estresses, incluindo aqueles abióticos relacionados às altas temperaturas, fato que ajuda na neutralização dos efeitos negativos deste tipo de estresse.

Já no aspecto molecular, diversos estudos revelaram grupos de genes que têm sua expressão significativamente modificada, podendo esta ser aumentada (*upregulated*) ou diminuída (*downregulated*) durante a aquisição da termotolerância.

Análises genômicas diversas mostraram que diferentes tratamentos (no caso, diversos tipos de exposição a diferentes fontes de estresse térmico) dão origem a diferentes perfis de transcrição e, conseqüentemente, a diversos graus de termotolerância. Contudo, tais estudos sugerem, no geral, que a supressão da transcrição é um fator crítico para a termotolerância (LARKINDALE; VIERLING, 2008).

Quanto aos fatores envolvidos na aquisição da termotolerância em plantas, percebe-se uma íntima relação deste efeito com as seguintes variáveis: espécie; genótipo; estágio de crescimento dos materiais vegetais (fenologia da planta); método e duração de procedimentos de aclimação, sobretudo quanto ao tempo de recuperação pós-aclimação; tolerância cruzada, conhecida como *crossstalk*, onde a resposta a um determinado estresse ambiental ajuda a proteger a planta de outro, coincidente ou subsequente; e, no caso específico de sementes, além dos supracitados: fase de desenvolvimento, método e tempo de secagem; e tempo de embebição sob o qual as sementes foram submetidas, dentre outros (SONG; JIANG; ZHAO, 2012).

Um grande número de mecanismos tem sido sugerido para conferir esta tolerância a fatores abióticos adversos tais como exposição a altas temperaturas e dessecação, incluindo: acumulação de moléculas com potencial efeito protetor, como as proteínas LEA, sobretudo aquelas do grupo das deidrinas; presença de um eficiente sistema antioxidante; mecanismos de desdiferenciação intracelular; metabolismo *switching off* (“desligar”); operação dos sistemas de reparo durante a reidratação das sementes (BERJAK, 2006); resposta cruzada na cascata de eventos que sucede a exposição a tais situações de estresse ambiental (SONG; JIANG; ZHAO, 2012); entre outros, de modo que já está bem sedimentada, há pelo menos duas décadas, a ideia de que a tolerância à dessecação (decorrente, neste caso, do estresse por calor) não é susceptível de ser atribuído a um único mecanismo, mas sim a uma propriedade multifatorial, em que cada componente é igualmente crítico (LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993).

As mesmas séries de estudos indicam que, embora a secagem lenta, e em estágio dito apropriado, pareça, a princípio, elevar a capacidade germinativa da semente, existem diversos fatores que podem inibi-la, tais como: déficit nos potenciais hídricos; elevadas concentrações de ABA; presença de tecidos menos permeáveis circundando o embrião; entre outros que, agindo em conjunto, podem dificultar a avaliação da tolerância à dessecação tão somente pela análise da capacidade germinativa. Tais conclusões têm aplicações bastante práticas, como o fato do teste de germinação ser, portanto, um método avaliativo que pouco diferencia possíveis danos ocasionados nas sementes durante a exposição às altas temperaturas (WANG et al., 2014c).

2.3 Aspectos morfológicos e bioquímicos relacionados à tolerância à dessecação

As plantas respondem às condições de estresse por meio de processos fisiológicos, morfológicos e metabólicos. Porém, um elemento comum em resposta a muitos estresses de origem ambiental é a desidratação celular. Este, por sua vez, induz à biossíntese do ácido abscísico (ABA), que é bem conhecido como um “hormônio do estresse” devido à sua rápida acumulação sob condições de *déficit* hídrico acentuado, e pela sua participação em vias de transdução do sinal destes estresses. Já foi observado que o estresse térmico, oriundo da aplicação de uma temperatura de 40° C, aumentou os níveis de ABA em linhagens de milho não tolerantes, ao passo que não alterou os níveis deste fito-hormônio em plantas tolerantes (DINLER; DEMIR; KOMPE, 2014).

A desidratação, e o consequente aumento nos níveis de ABA, causam alterações na concentração de osmoprotetores, sobretudo daqueles importantes para a composição e fluidez da membrana. Estes osmoprotetores, como as betaínas e trealose, acumulados no citosol, fazem com que as células possam suportar altas trocas osmóticas. Algumas destas moléculas permitem, inclusive, que as células sobrevivam quase que totalmente desidratadas, possibilitando que aquele organismo entre num estado de “animação suspensa”, ao qual se denomina criptobiose. Neste estado, o citosol e tais solutos convertem-se em algo parecido com um “sólido cristalino”, condição de vitrificação, fator que ajuda na estabilização de proteínas e de membranas celulares contra os efeitos nocivos da dessecação (CROWE; CARPENTER; CROWE, 1998). Em alguns casos, outra estratégia para a tolerância a estresses abióticos, como o calor e a seca, é a proteção de células contra injúrias via diversos ajustes nos níveis bioquímicos e moleculares: aumento da síntese de antioxidantes; alterações na elasticidade da parede celular; indução do aumento na expressão de deidrinas e de outras proteínas com função protetora, como chaperonas, enzimas reparadoras, estabilizantes das membranas dos tilacóides, entre outras; e associação entre proteínas específicas, relacionadas às respostas contra o estresse, na regulação da transcrição, e nos processos pós-transcricionais e/ou de sinalização (ASHRAF, 2010).

Destaca-se que diversos outros caracteres morfológicos e bioquímicos, a exemplo do teor de amido, moléculas que o compõe, espessura do tegumento, dentre outras características, influenciam diretamente na tolerância da semente à secagem sob temperaturas mais altas. Além disso, certo número de proteínas de resposta a estresses tem sua expressão fortemente aumentada durante a desidratação de embriões maduros de genótipos de milho tolerantes à dessecação, embora estes embriões também tenham restringido, notadamente, a expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos e daquelas associadas ao próprio metabolismo da semente, fatos que não ocorreram em embriões sensíveis à dessecação. Esta pode ser a razão pela qual tais genótipos intolerantes não respondam, de forma tão eficiente, ao estresse causado pela desidratação (HUANG; MØLLER; SONG, 2012).

Importante ressaltar que as plantas são conhecidas por exibir "*crosstalk*", casos em que um ou mais componentes de uma via de transdução de sinal afeta outra, sendo que a mais comum é a resposta cruzada entre proteínas de sinalização numa cascata de eventos. No que diz respeito, especificamente, aos mecanismos de resposta aos diferentes estresses abióticos, é comum haver, nestas vias de transdução de sinal, componentes partilhados, que podem interagir em cada uma das vias (SONG; JIANG; ZHAO, 2012).

Neste sentido, a secagem natural do processo de maturação prepara os embriões maduros, dando-lhes tempo suficiente para responder à dessecação que se seguirá (HUANG; SONG, 2013). Por conseguinte, embriões de milho imaturos assemelham-se a sementes recalcitrantes, mantendo seu metabolismo bastante ativo ao passo que permanecem intolerantes à desidratação (HUANG; MØLLER; SONG, 2012).

Admitindo-se que a tolerância à dessecação depende, primordialmente, de um eficiente sistema de proteção de membranas, e que os diferentes componentes deste tipo de tolerância não são induzidos como uma sequência universal de eventos, mas sim atuando como processos independentes que variam entre espécies, tecidos, graus de maturação e condições de dessecação das sementes, têm-se a seguinte relação: uma alta proporção de ácidos graxos carboxílicos de cadeia alifática, em comparação com fosfolipídeos, implica em uma maior desesterificação que, por sua vez, diminui a T_m , temperatura de transição da fase gel-lamelar para a fase líquido-cristalina da dupla camada fosfolipídica da membrana, acarretando um aumento excessivo da viscosidade desta membrana, e ocasionando uma menor tolerância contra a dessecação. Não se tendo dúvidas de que a termoestabilidade das membranas é algo essencial para a tolerância a altas temperaturas, também foi sugerido que o ácido fosfatídico (diacil-glicerofosfolipídeo) pode desempenhar um papel importante nesta função termoestável e, por conseguinte, protetora (CHEN et al., 2010).

Por outro lado, a peroxidação de lipídeos gera oxigênio ativado, oriundo também da respiração e da fotossíntese, sendo que este radical livre promove a desesterificação de lipídeos, causando danos à membrana. Uma vez que a peroxidação da membrana lipídica diminui sua fluidez, o tocoferol (vitamina E) apresenta um papel fundamental na proteção do organismo contra os efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigênio (ERRO's), que são formadas metabolicamente e/ou encontradas no ambiente. Por isso mesmo, torna-se um protetor celular necessário no auxílio para que tais membranas das sementes suportem esta oxidação.

Deste modo, visando evitar e/ou reparar estes diversos tipos de problemas, existe os seguintes mecanismos de proteção às membranas: proteção por moléculas antioxidantes hidrossolúveis (ácido ascórbico e glutatona) e lipossolúveis (α -tocoferol e β -caroteno); proteção mediada por açúcar, como a estabilização de fosfolipídeos por meio da ligação do grupo OH dos açúcares à cabeça polar dos fosfolipídeos, ou a estabilização de proteínas via substituição das ligações de hidrogênio entre proteínas e moléculas H_2O por proteína + açúcar; sistema de enzimas removedoras de radicais livres, que inclui a catalase, que é uma peroxidase oxidorrredutase encontrada nos peroxissomas e nos glioxissomas e que usa o

peróxido como aceitador/doador de elétrons, a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, a glutathione peroxidase, que também é responsável pela detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos, entre outras; açúcares atuando como agentes protetores *in vitro*, fazendo com que determinado tecido seja mais tolerante contra dessecação pela maior presença de sacarose e de oligossacarídeos, como a stachiose e a rafinose.

A formação de estrutura vítrea no citoplasma impede a difusão molecular, reduzindo as reações químicas, prevenindo processos degradativos e culminando, geralmente, em situação de quiescência. Além disso, ocupa espaço na célula, prevenindo o colapso da mesma, retém solutos ditos caóticos, e forma um “banco de hidrogênio” na interface entre o “vidro” e os sítios de ligações dos componentes celulares.

Vale ressaltar que: os agentes oxidantes são produzidos em muitos processos celulares e devem ser tornados inócuos, sob pena de danificar as membranas e/ou outros componentes celulares; os monossacarídeos (galactose, manose, glicose e frutose) não são “bons protetores”, uma vez que não formam estruturas vítreas em temperaturas biológicas, ocasionam maiores taxas respiratórias, e ainda são passíveis de se submeter à Reação de Maillard, entre um aminoácido ou proteína e um carboidrato redutor, que prejudica a síntese protéica e pode causar danos ao DNA.

As diversas combinações entre formas de amido e proteínas com tamanhos diferentes, e entre os arranjos de grãos de amido entre as partes vítreas e opacas, bem como as diferentes distribuições e proporções das duas partes, conduzem a diferenças quanto às texturas existentes nas sementes de variedades de milho. E as taxas de secagem das sementes estão diretamente relacionadas com essa textura, além de outras características morfológicas, sendo que esta relação pode ser usada, inclusive, para o ajuste das constantes empíricas em equações para se estimar tais taxas no beneficiamento de sementes de milho (SUN et al., 2016).

Além dos carboidratos, como sucrose, a glicose e a frutose, outras classes de osmólitos, grupo de solutos de baixo peso molecular envolvidos na estabilização proteica em resposta a condições ambientais de estresse, acumulam-se em células de plantas expostas à deficiência hídrica. Como exemplos destes osmólitos, temos: prolina, glicina betaína, putrescina, ácido γ -aminobutírico, dentre outros. Alguns deles também cumprem certo papel estabilizador e protetor para as membranas celulares e enzimas, uma vez que podem interagir com os resíduos hidrofóbicos das proteínas, reduzindo a taxa de desnaturação destas proteínas, fator este que poderia culminar na perda de sua funcionalidade (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008).

As proteínas pertencentes à família das LEA's, incluindo as deidrinas, podem atuar de uma maneira semelhante àquela dos carboidratos, com função protetora e estabilizadora de membranas (LANGRIDGE; PALTRIDGE; FINCHER, 2006). Estas proteínas foram umas das primeiras a serem identificadas utilizando-se bibliotecas de cDNA, criadas a partir de técnicas de RNA-Seq, e permitiram o rastreamento de genes cuja transcrição é induzida pela seca (BRAY, 2007).

Recentes progressos envolvendo pesquisas sobre análises transcriptômicas para resposta à seca e ao estresse salino em plantas revelaram, também, que o processamento de RNA, bem como o de *smallRNA*'s e a própria regulação da cromatina, estão envolvidos nestas respostas contra estresse abióticos (SEKI et al., 2007).

Também foi comprovado, via escalonamento da cromatina e quebra da fita de DNA, que o estresse por calor persistente induz ao aumento da concentração de ânions superóxidos (O_2^-), acompanhados de altas taxas de perda de íons que, combinados, levam à “morte programada das células” (apoptose) em folhas de plântulas de milho. Do mesmo modo, o DNA destes materiais apresentou modificações nos padrões epigenéticos, sobretudo nas histonas, as quais desempenham um papel crucial na regulação da arquitetura da cromatina e, conseqüentemente, na função de responder a estímulos externos adversos (WANG et al., 2014b).

Ainda deve-se incluir, nesta rede de mecanismos de proteção, o chamado “fator de alongamento térmico instável” (*elongation factor thermo unstable*, EF-Tu), um dos fatores de alongamento presentes em procariotos, que se liga e transporta a maioria dos aminoacil-*tRNA*'s bacterianos para os ribossomos, em um processo dependente de GTP, controlando sua entrada num sítio A que esteja “livre”. Este fator tem sido amplamente relacionado à tolerância ao calor em milho, já que o precursor desta proteína (pre-EF-Tu) exibe atividades chaperônicas, protegendo as enzimas instáveis ao calor, tais como a citrato-sintase e a malato-desidrogenase, contra agregação térmica (RISTIC et al., 2004).

A atividade chaperônica dos pre-EFtu's de milho e trigo foi comprovada por meio da capacidade de ambas em reduzir a agregação térmica da Rubisco-ativase *in vitro*. De fato, em milho recombinante com superexpressão de *pre-Ef-tu*, houve maior proteção contra este tipo de agregação proteica (RISTIC et al., 2007).

2.4 LEA's, deidrinas e proteínas *heat-shock*

As chamadas "proteínas abundantes na fase tardia da embriogênese" (*Late Embryogenesis Abundant Proteins*) ou, simplesmente, *LEA proteins*, constituem um conjunto de proteínas que participam do mecanismo de resposta a diversos tipos de estresses abióticos em plantas. Em geral, elas se acumulam naturalmente em estruturas tolerantes à dessecação, tais como sementes e grãos de pólen; ou, ainda, em tecidos vegetativos quando estes são expostos a fatores abióticos adversos.

Poucas, dentre estas, mostram uma expressão constitutiva, ou seja, poucas têm expressão invariável: a maioria dos genes que as codificam são expressos em resposta a sinais moleculares, enquadrando-se no conceito de expressão gênica regulada (TUNNACLIFFE; WISE, 2007).

Estas também são encontradas em alguns organismos anidrobióticos, os quais podem resistir à total perda de água, sem prejuízo da viabilidade, em plantas "ressuscitadas", designação para plantas poiquilohídricas ou ectohídricas, que não têm mecanismos reguladores, estruturais ou funcionais para manter e/ou regular o teor de água até atingir a homeostase de células e tecidos e que, portanto, têm seu conteúdo hídrico dependente da disponibilidade ambiental de água, podendo sobreviver à dessecação extrema, ainda que por meses ou anos, e recuperar-se sem danos fisiológicos (HUANG; BANTON; TUNNACLIFFE, 2010).

Assim, e de maneira resumida, a presença de proteínas LEA correlaciona-se com a aquisição de tolerância à dessecação, perfazendo, por conseguinte, um papel importante nas respostas adaptativas ao estresse em células vegetais (SHIH; HOEKSTRA; HSING, 2008).

As proteínas LEA foram classificadas em alguns grupos, com base em seus domínios conservados, em sequências específicas de aminoácidos, em semelhanças quanto à composição peptídica, e/ou em determinados *motifs* (sequências padrão). Em geral, os grupos 1, 2 e 3 são considerados como os três principais, já que estes contêm a maioria dos membros desta família de proteínas (BIES-ETHÈVE et al., 2008). As LEA's do grupo 1 (*Pfam* 00477) estão presentes, em sua maioria, em plantas, e contêm, pelo menos, uma cópia do seguinte *motif* de 20 aminoácidos: GGQTRREQLGEEGYSQMGRK.

Já as LEA's do grupo 2, conhecidas como deidrinas (*Pfam* 00257) também são encontradas em algas, além das plantas, e compartilham um segmento "K" (EKKGIMDKIKEKLPK), comum entre elas e presente em uma ou várias cópias, e necessária/suficiente para ligação a vesículas de fosfolípídeos aniônicos e para adoção de

estruturas tipo α -hélice (KOAG et al., 2009). Muitas deidrininas, ricas em glicina e outros aminoácidos polares/hidrofílicos, também contêm um segmento “S”, trecho de polisserina que também pode conter um segmento de resíduos de treonina, além de outro(s) formado(s) pela própria serina, que pode ser submetido a uma extensa fosforilação por CK2, e/ou por outras proteínas quinases intimamente relacionadas a estes dois aminoácidos, funcionando como um sinal de localização nuclear e nucleolar. Além disto, possuem um domínio “Y” (DEYGNP), semelhante ao sítio de ligação das chaperonas, proteínas que ajudam outras proteínas a atingir a configuração terciária “correta”, usando energia oriunda da hidrólise de ATP para desenovelá-las e possibilitando, assim, um novo enovelamento, desta vez na forma e lugar corretos.

Basicamente, as variações no número e na disposição destes domínios definem cinco sub-classes de DHN’s: $YnSKn$, SKn , Kn , $YnKn$, e KnS , em que n é o número de repetições de cada domínio (CAMPBELL; CLOSE, 1997).

Enquanto isso, as LEA’s do grupo 3 (*Pfam* 02987), também encontradas em nematóides e procariontes, são caracterizadas por conter, pelo menos, uma cópia do seguinte *motif* de 11 aminoácidos: TAQAAKEKAXE (BATTAGLIA et al., 2008).

É válido ressaltar que o banco de dados *Pfam* compreende uma grande coleção de famílias de proteínas, cada uma delas representada por vários alinhamentos de sequências e modelos ocultos de Markov (HMM’s).

De maneira resumida, pode-se perceber claramente a funcionalidade de cada grupo de LEA’s em milho: aquelas do grupo 1 destacam-se por apresentar uma combinação complexa de diferentes tipos de modificações pós-traducionais na proteína nativa, incluindo fosforilação, acetilação, metilação e desaminação, fato que pode ser relevante para o seu papel específico na semente; já as do grupo 3 apresentam pronunciadas propriedades antiagregativas associadas a condições de desidratação, as quais resultam numa redução dos efeitos do encolhimento celular proveniente de perdas de água; enquanto isso, as do grupo 2 (deidrininas), também exibem uma potente atividade antiagregativa, que evita a desnaturação das proteínas sob estresse, além de uma capacidade de se ligar a compostos lipídicos sob situação de choque térmico, confirmando seu papel fundamental na proteção das membranas (AMARA et al., 2012).

Uma característica marcante das proteínas LEA é sua conformação desdobrada, sua hidrofílicidade e a elevada proporção de aminoácidos carregados que as compõem. Estas propriedades bioquímicas contribuem para sua estabilidade ao calor e em meio ácido (OLIVEIRA et al., 2007). Embora as proteínas LEA sejam desordenadas intrinsecamente, e

mostrem, na maioria dos casos, uma estrutura em espiral aleatória quando em solução, algumas delas podem adotar certo grau de conformação durante a secagem e/ou na presença de agentes de promoção de estrutura α -hélice (HAND et al., 2011).

Ao nível subcelular, as proteínas LEA têm sido encontradas na maior parte das células, incluindo: citoplasma, núcleo, nucléolos, mitocôndrias, cloroplastos, vacúolo, retículo endoplasmático, peroxissomos, e até mesmo na membrana plasmática, onde podem exercer funções de proteção (HUNDERTMARK; HINCHA, 2008). Em relação às modificações pós-traducionais envolvendo as LEA's, a maioria dos relatos têm reportado, essencialmente, reações de fosforilação. Tais fosforilações não são raras em análises proteômicas de sementes de *Arabidopsis*, sendo que muitas outras espécies também mostraram essa fosforilação *in vivo* (IRAR et al., 2006).

Há vasta informação sobre os efeitos protetores das proteínas LEA em diferentes ensaios *in vitro* e *in vivo*, em abordagens em que as mesmas, expressas em plantas transgênicas ou, de maneira heteróloga, em leveduras e bactérias, produziram fenótipos tolerantes à seca, ao estresse salino, e/ou ao frio. Por exemplo, sobre a proteína ZmLEA3, pertencente ao grupo 3, sabe-se que desempenha seu papel atuando na proteção das plantas contra danos de origem abiótica, resguardando a estrutura das proteínas e ligando-se a metais (Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , e Zn^{2+}) em eventuais situações de estresses osmóticos e/ou oxidativos (LIU et al., 2013b). Em geral, considera-se que tais proteínas contribuam para a proteção e a estabilização de macromoléculas e estruturas celulares durante as respostas adaptativas ao estresse causado em plantas. Contudo, suas funções específicas ainda não são completamente entendidas.

Assim, em nível molecular, foi proposto que tais efeitos protetores das LEA's dos grupos 1, 2 e 3 ocorrem por meio de diversos mecanismos: ligação ou substituição às moléculas de água, sequestro de íons, estabilização e renaturação de proteínas outrora desdobradas, e manutenção de membranas, agindo isoladamente e/ou em combinação com açúcares.

2.4.1 Proteínas de choque térmico do milho

Foram identificados, em plântulas de linhagens europeias de milho, 39 genes relacionados à tolerância ao calor, cujas funções moleculares para expressar tal característica naqueles fenótipos permanecem desconhecidas, devendo ser esclarecidas por meio de estudos funcionais (FREY et al., 2015). Em outro trabalho, identificaram-se 11 proteínas que estariam

potencialmente envolvidas em conferir tolerância à dessecação, sendo que a maior parte se refere às chamadas “proteínas de estresse”. Nove delas acumularam-se durante a maturação de embriões de sementes de milho, tendo seus níveis diminuídos durante a germinação, e aumentados durante a dessecação, sempre em embriões considerados tolerantes a este efeito abiótico. Por outro lado, outras duas proteínas mostraram um padrão inverso e, portanto, provavelmente também participam deste efeito, mas na condição de indicadores da sensibilidade à dessecação (HUANG; MØLLER; SONG, 2012).

De maneira análoga ao estudo anterior, um total de 80 e 114 proteínas tiveram suas expressões duplicadas, ou mais, durante a secagem natural da maturação em embriões e endosperma de sementes de milho, respectivamente. Um número pequeno, dentre elas, teve essa abundância alterada durante a secagem prematuramente imposta, enquanto outras tiveram suas expressões alteradas unicamente durante esta secagem dita “natural da maturação”, e podem estar ligadas ao vigor de plântulas e à resistência contra infecções fúngicas.

Teoria que condiz com os fatos observados, uma vez que sementes secadas prematuramente (40 DAP) germinaram quase tão bem quanto aquelas colhidas logo depois de maduras (65 DAP), mas o crescimento de plântulas foi significativamente mais lento, além destas terem sido gravemente infectadas por fungos durante as análises (WANG et al., 2014c).

Ressalta-se que as *heat-shock proteins* podem ser classificadas com base nas sequências de aminoácidos que as compõem, nos seus domínios conservados e, principalmente, no seu peso molecular (em kDa), sendo geralmente separadas em seis grandes famílias: HSP100/Clp, HSP90, HSP70, HSP60 (chaperoninas), HSP40, e as *small HSP's*, que possuem baixo peso molecular. Deste modo, dentre as HSP's citadas pela literatura, aquelas consideradas como principais e mais relevantes para o presente estudo serão abordadas na sequência:

A HSP 101 se acumula, em milho, durante a maturação e a dessecação de embriões, persistindo em níveis elevados nas primeiras 24 horas seguintes à embebição, ainda que na ausência de estresse por calor. Esta proteína possui uma função conhecida na desagregação de complexos de elevado peso molecular e, muito provavelmente, age como reguladora da tradução de mRNA's específicos, além de induzir à termotolerância.

Em análises comparativas entre plantas mutantes de milho, no que diz respeito à expressão do gene que codifica para a HSP101, foram observadas, via espectrometria de massa, expressões diferenciais de diversas chaperonas, de proteínas relacionadas com a

tradução, de actina, cujos filamentos compõem parte da epiderme do milho, e de enzimas que participam do metabolismo da citocinina, fatores tais que modificaram, parcialmente, o crescimento de raiz e a arquitetura nas mudas do material mutante. Além disso, houve alterações na síntese específica de proteínas *de novo*. Isto, somado ao fato da HSP101 ter sido encontrada como parte de complexos de iniciação da tradução, vinculados ao “capacete”, logo no início da embebição, confirma a hipótese de sua função como reguladora da tradução durante a germinação, expondo a relevância da HSP101 para os mecanismos de síntese de proteínas durante a germinação de sementes de milho (LÁZARO-MIXTECO et al., 2012).

Sabendo-se que há estimulação da formação precoce de raízes adventícias, originadas do nó coleoptilar, pela luz e pelo choque térmico, fator este que é afetado pela herança genética e pelo estágio de desenvolvimento das plântulas, verificou-se aumento nos níveis da proteína HSP101 no nó coleoptilar de plantas de milho induzidas por tais estresses, em especial na região procambial, onde ocorre a formação destas raízes nodais (LÓPEZ-FRÍAS et al., 2011).

Vale salientar que a HSP101 abriga, na região 5'UTR do seu mRNA, um elemento IRES (*internal ribosome entry site*), que significa “local de entrada de ribossomo interno” e que permite a iniciação da tradução de um modo independente da extremidade, como parte de um processo otimizado da síntese proteica, de modo que o início desta tradução se dê indiferentemente da presença do “capacete”, haja vista que o reconhecimento do 5' *cap* seria, normalmente, necessário para a montagem do complexo de iniciação. Neste IRES, ocorre uma associação com a proteína HSP90, que medeia a tradução do mRNA da *HSP101* em milho (JIMÉNEZ-GONZÁLEZ et al., 2014).

Em relação à HSP90, que participa da transdução de sinais de estresses abióticos e da resistência a doenças em plantas, progressos significativos foram feitos na compreensão dos seus mecanismos de atuação em plantas, incluindo interações com proteínas co-chaperonas e mudanças conformacionais quando acopladas a ATPase's.

As HSP90's constituem-se de três domínios: um de ligação à ATP, localizado no N-terminal (N); um domínio medial (M); e um de dimerização, localizado no C-terminal (C), onde se encontra a sequência aminoacídica MEEVD. Os três domínios da HSP 90 interagem com diferentes substratos e, além disto, existe uma região carregada entre os domínios N e M. Classificou-se, inclusive, a família HSP90 em três grupos distintos, com base em relações filogenéticas, estrutura genética e funções biológicas (XU et al., 2012).

2.4.2 Pequenas proteínas de choque térmico do milho

As pequenas proteínas de choque térmico (sHSP's), HSP's de peso molecular inferior a 40 kDa, são chaperonas moleculares que protegem as células do efeito do calor e contra outras tensões, sendo que algumas de suas formas são expressas em fases específicas do desenvolvimento e, especialmente em plantas, diferentes classes são expressas nos diversos compartimentos celulares (KLEIN et al., 2014). Todos os organismos possuem estas pequenas *heat-shock proteins* (sHSP's), indicando que estas proteínas evoluíram muito cedo, antes da divergência dos três domínios da vida (*Archaea*, *Bacteria*, e *Eukarya*) e, apesar da considerável divergência de aminoácidos, muitas características estruturais são conservadas, incluindo uma forma oligomérica com um β -sanduíche (WATERS, 2013).

Diferentes sHSP's podem compartilhar a capacidade de prevenir a agregação de proteínas (associação, esta, induzida pelo calor), além de manterem tais proteínas num estado redobrável. Porém, fazem isso com diferentes níveis de eficiência. Assim, as razões funcionais para distinguirem seus padrões específicos de expressão podem refletir a existência de substratos definidos para cada sHSP dentro dos diferentes compartimentos intracelulares (MORROW; HEIKKILA; TANGUAY, 2006).

Algumas plantas têm mais de 30 sHSP's individuais, sendo que as plantas terrestres, ao contrário de outros grupos, possuem subfamílias distintas de sHSP's, a maioria delas altamente regulada positivamente em resposta ao calor e outros fatores de estresse (WATERS, 2013). Além disso, foi observado que sHSP's acumulam-se em maior grau nos genótipos de trigo tolerantes à seca e ao estresse por calor (SALEKDEH; KOMATSU, 2007).

De modo parecido, estudando-se a resposta a de *Arabidopsis thaliana* frente a fatores abióticos diversos, percebeu-se um incremento significativo de várias sHSP's, as quais protegem outras proteínas contra a desnaturação, do mesmo modo que facilitam a desnaturação de proteínas deformadas (TAYLOR et al., 2009).

Uma pequena proteína *heat-shock* (sHSP26) foi identificada em milho. Neste estudo, verificou-se um aumento significativo desta proteína, além de chaperonas, chaperoninas e algumas outras deidrininas, fato induzido pela seca (BENEŠOVÁ et al., 2012). Posteriormente, ficou comprovada que um total de 45 proteínas de protoplastos de milho interagiram com a sHSP26, sendo que 33 delas são cloroplastídicas e diminuíram significativamente em abundância sob situação de estresse por calor em plantas com a sHSP26 “silenciada”.

Além disso, a acumulação de H₂O₂ nos cloroplastos aumentou a expressão da sHSP26, enquanto a supressão dessa sua expressão reduziu a taxa de evolução de O₂ do fotossistema II

ainda sob tal estresse térmico, resultados estes que demonstram a relevância da sHSP26 em proteger os cloroplastos de milho sob condição demasiada de calor (HU et al., 2015a).

E sobre o efeito chaperônico de duas sHSP's de milho, possuindo sequências quase idênticas, foram notadas diferenças significativas entre elas durante choque térmico a 43° C: a sHSP17,8 se dissocia em oligômeros menores do que sHSP17,0 sendo, essa primeira, uma chaperona mais eficiente quando o alvo é a enzima citrato sintase (KLEIN et al., 2014).

A partir do isolamento da sHSP16,9 do milho, uma sHSP citosólica classe I, descobriu-se que esta é expressa na raiz, na folha e no caule sob tratamento a 40° C, sendo regulada por estresse térmico e por H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) exógeno. A superexpressão de *Zmhs*16,9 em plantas transgênicas de tabaco conferiram tolerância ao calor a aos estresses oxidativos (SUN et al., 2012). Após um choque térmico, verificou-se maior expressão deste gene em plântulas de milho. Além disso, observou-se que seu cDNA é similar aos de sHSP's17-18 de outras espécies (ALEXANDROV et al., 2009).

2.4.3 Outras proteínas relacionadas com as HSP's e sHSP's do milho

O gene *ZmERD2*, após ser clonado e ter sua proteína deduzida, mostrou conter uma estrutura de domínio conservado semelhante àquela presente na HSP70, três sequências típicas da família HSP70, além de um específico *motif* Hsp70 citosólico. De acordo com os resultados consultados, percebeu-se que a expressão do gene *ZmEDR2* é controlada pelo estresse térmico, e que a proteína codificada também desempenha um papel na resposta das plantas ao frio, à desidratação, ao PEG e à alta salinidade (SONG et al., 2016).

Também foi observado que células expressando a proteína MLG3, uma LEA do grupo 3, evidenciaram redução dos efeitos de retração celular durante a desidratação, e que RAB17, uma LEA do grupo 2 (e, portanto, uma deidrina) foi localizada em compartimentos lipídicos nas folhas após o choque térmico, fatos tais que evidenciaram diferenças entre os grupos de proteínas LEA em milho, sugerindo diversidade funcional entre eles (AMARA et al., 2012).

O gene *ZmDHN2b*, codificante para outra deidrina do milho, foi isolado para ser caracterizado e, após, a geração de plantas transgênicas de tabaco com superexpressão constitutiva do mesmo, ficou comprovado que tal proteína estava envolvida na resposta das plantas à baixa temperatura, sendo que níveis mais baixos de malondialdeído, induzido pelo frio, foram observados, assim como um menor vazamento de eletrólitos, em comparação com o tipo “selvagem” de tabaco (XING et al., 2011).

Genes raros induzíveis pelo frio (*ZmRCI's*), estruturalmente conservados, codificam pequenas proteínas, altamente hidrofóbicas e envolvidas em resposta a vários estresses abióticos, sugerindo terem um importante papel na resposta à seca (ZHAO et al., 2014). Ainda no que diz respeito à tolerância para este fator abiótico, a *ZmCPK1*, uma proteína quinase dependente de cálcio, atua como reguladora negativa da sinalização do estresse por frio em milho (WECKWERTH; EHLERT; ROMEIS, 2015).

Interessante citar que o milho DroughtGard[®] foi desenvolvido por meio de expressão constitutiva da proteína *cold shock B* (CSPB), oriunda do *Bacillus subtilis*, visando melhorar seu desempenho em condições limitadas de água e tornando-se, segunda a empresa produtora, o primeiro genótipo de milho, oriundo da biotecnologia, tolerante à seca (WANG et al., 2015). Ficou comprovado, inclusive, que a forragem e os grãos destes materiais são, em termos de composição, equivalentes à do milho convencional (HARRIGAN et al., 2009).

2.4.4 Localização das HSP's e sHSP's, e importância em outras culturas

Neste contexto, vale ressaltar que deidrininas vegetais (DHN's) pertencentes à grande família RAB/DHN/LEA vêm sendo reconhecidas por desempenhar um papel protetor durante o processo de desidratação. Destaca-se que a maior parte das sequências de deidrininas de plantas tem, em média, 50% de identidade.

Com base na homologia com deidrininas do milho (RAB17) e da cevada (DHN-4 e DHN-5), foi isolada e caracterizada uma nova deidrina no trigo duro, denominada DHN-5. Nesta, há evidências de uma série de domínios conservados e, assim como a própria RAB17, a DHN-5 é rica em glicina e também contém uma região central, formada por 30 aminoácidos e contendo vários locais putativos de se ocorrer fosforilações (BRINI et al., 2007).

Técnicas de imunolocalização e resultados obtidos a partir de fracionamento subcelular demonstraram que membros das deidrininas estão presentes no núcleo, citoplasma, e membrana plasmática (DANYLUK et al., 1998). Confirmando esta informação, a RAB17 foi encontrada acumulando-se no citoplasma e no núcleo. Em vários alinhamentos entre DHN-5, RAB17 e proteínas de ligação a NLS's (sinalizadores de localização nuclear), observaram-se domínios conservados, além do *cluster* de serina ácida seguido pela região consenso de fosforilação da proteína quinase CK2, de modo que esta CK2 mostra-se essencial como “alvo nuclear” para a RAB17 do milho, no chamado mecanismo de localização via fosforilação (RIERA et al., 2004). Curiosamente, a forma não fosforilada de RAB17 é altamente acumulada no nucléolo, onde também desempenha função específica (BRINI et al., 2007).

Ademais, embora já tivesse sido noticiada a presença de DHN's no citoplasma e no núcleo, as mesmas também foram encontradas em outras organelas, como as mitocôndrias e os cloroplastos (RORAT, 2006). Também se verificou que duas proteínas similares às deidrinas (*dehydrin-like proteins*, DLP's) foram acumuladas nas mitocôndrias de trigo de inverno (*Triticum aestivum*), centeio de inverno (*Secale cereale*), e do próprio milho, sempre em resposta ao frio (BOROVSKII et al., 2000).

A mesma correlação positiva, entre a acumulação de duas DLP's mitocondriais e a tolerância ao frio, foi encontrada em outro trabalho envolvendo plântulas de milho, centeio e trigo (BOROVSKII et al., 2002). Os níveis de expressão de cinco sHSP's (sHSP26,7; sHSP23,2; sHSP17,9A; sHSP17,4; e sHSP16,9A) podem ser considerados como biomarcadores para o rastreamento de cultivares de arroz com diferentes capacidades de tolerar o estresse térmico.

No mesmo estudo verificou-se, por meio de interações proteína-proteína, que a HSP101 regula a biossíntese de tiamina, que a HSP82 afeta o metabolismo do nitrogênio, e que a HSP81 está envolvida na manutenção de açúcar e/ou na síntese de amido em plantas de arroz submetidas a este estresse por calor (CHEN et al., 2014). Enquanto isso, o gene *OsClpB-C*, cuja proteína é expressa em tecidos vegetativos e, constitutivamente, em sementes de arroz, sempre quando estes são submetidos a estresse térmico, independe da função da 5'UTR para ser expresso em sementes (MISHRA et al., 2016).

Deste modo, considera-se que proteínas CLPB-C têm um papel crítico na resposta de calor, sendo altamente conservadas em várias espécies de plantas. Coerentemente com este conceito, plantas mutantes que tiveram tais proteínas silenciadas mostraram-se altamente sensíveis ao calor (MISHRA; GROVER, 2016). Análises filogenéticas do gene *PgHsp10* de milho revelaram que este compartilha de 70 a 98% de identidade com homólogos de outras plantas, estando evolutivamente perto do homólogo *ZmHsp10*, do milho. Em análise quantitativa, via RT-qPCR, o gene *PgHsp10* foi expresso diferencialmente em resposta a diversos estresses abióticos, com o mais alto nível de expressão encontrado sob condições de estresse por calor (NITNAVARE et al., 2016).

Quanto à família de proteínas HSP100, caracterizadas primeiramente em espécies biológicas mais simples, como *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* (*yeast-HSP104*), sabe-se que estas são cruciais para a aquisição de termotolerância (FREIDIN et al., 2009). Neste sentido, a *yeast-HSP104* está implicada na desagregação de proteínas inativadas por calor e, de acordo com estudos de complementação, notou-se que as proteínas vegetais HSP100, que contêm vários domínios conservados, são funcionalmente análogas a esta, de

modo que interagem entre si e recrutam componentes do maquinário de tradução de mRNA's específicos, a fim de melhorar sua tradução. Em arroz e milho, tais proteínas HSP100 também são reguladas pelo estresse térmico, assim como pelo estágio fenológico (AGARWAL; KATIYAR-AGARWAL; GROVER, 2002)

2.4.5 Fatores de transcrição das proteínas *heat-shock*

Admitindo-se que os diversos tipos de estresses abióticos afetam drasticamente a sobrevivência, o crescimento e a reprodução das plantas, e que estas plantas respondem a tais mudanças desfavoráveis por meio de mecanismos fisiológicos, bioquímicos e de desenvolvimento, os quais requerem a expressão de genes responsivos ao estresse, regulados por uma rede de fatores de transcrição, os HSF's (fatores de transcrição relacionados ao estresse por altas temperaturas) desempenham um papel crucial na regulação da expressão de determinados genes, como aqueles codificantes para proteínas de choque térmico (GUO et al., 2016).

Em condições de alta temperatura, os fatores de transcrição *heat-shock* (HSF's) ativam proteínas de choque térmico (HSP's), combinando-se com elementos de estresse térmico (HSE's) em seus promotores, levando à defesa contra o estresse por calor. Desde que o primeiro gene *HSF* foi identificado, em tomate, muitos outros genes da família HSF foram completamente caracterizados em outras plantas. Determinado trabalho estabeleceu a correlação entre 123 genes *HSF*'s de gramíneas, e destacou que novas funcionalizações, oriundas de mudanças nos padrões de expressão e de função, e derivadas da duplicação dos genes, são importantes para a manutenção e divergência destes genes naquelas gramíneas. (YANG et al., 2014).

Durante a última década, muitos estudos têm sido conduzidos no intuito de se entender a diversificação e interação funcional dos HSF's, bem como a sua integração nos complexos de sinalização e resposta das plantas aos estresses abióticos. A primeira revisão completa de uma família HSF foi apresentada para *Arabidopsis thaliana* (NOVER et al., 2001). Mais tarde, foram compilados dados para 252 HSF's de nove espécies de plantas, as quais já tinham seus genomas completos, ou quase, fornecendo *insights* relevantes sobre as relações filogenéticas dentro desta família HSF em plantas, e permitindo, assim, uma classificação destas proteínas em grupos distintos (SCHARF et al., 2012).

Foi observado, também, que o genoma do milho continha mais genes *HSF*'s do que os de outras gramíneas: 30 no total, com pelo menos seis eventos de duplicação e um de perda

(YANG et al., 2014). Devido à disponibilidade de sequências completas do genoma desta espécie, 25 genes *HSF*'s não redundantes foram identificados, sendo posteriormente nomeados *ZmHSF*'s. Deste modo, a localização cromossômica, os domínios conservados das proteínas codificadas, e a organização dos *motifs* destes *ZmHSF*'s puderam ser, enfim, analisados. Em análises de RT-qPCR foi detectado que os 25 respectivos transcritos exibiram diferentes níveis de expressão quando as folhas sofriam estresse por calor (LIN et al., 2011).

Uma árvore filogenética, produzida por meio do *software* MEGA 5.0[®], com base na comparação de sequências de aminoácidos dos domínios de ligação ao DNA nos HSF's de três espécies (soja, milho e *Arabidopsis thaliana*), também foi proposta (LI et al., 2014b). Usando o método de clonagem de homologia, demonstrou-se que um gene semelhante ao fator de transcrição de choque térmico (*Zmhsf-like*), clonado a partir do milho e contendo 1404 pb's, os quais codificam 467 aminoácidos, onde existe o domínio de ligação ao DNA tipicamente mais conservado da família HSF, provavelmente regula as reações sensíveis a estresses abióticos, especialmente aqueles relacionados ao choque térmico e à seca, através de diferentes vias de transdução de sinais (LI et al., 2014a).

Níveis mais elevados de expressão da proteína HSF06 em grãos de pólen e em órgãos em desenvolvimento de milho aumentaram a tolerância destes às altas temperaturas, bem como a tolerância à seca de plantas transgênicas de *Arabidopsis* sob condições de estresse envolvendo calor moderado, o que sugere que o gene *Zmhsf06* pode ser um representante central dos fatores *heat-shock*, e útil como candidato no melhoramento molecular de milho visando novos mecanismos de tolerância a tal condição abiótica adversa (LI et al., 2015). Ainda no que diz respeito à ortologia genética, por meio de análises transcriptômicas comparativas e em resposta ao estresse térmico em quatro monocotiledôneas (arroz, trigo, milho e *switchgrass*), foram identificados 16 genes comuns, a maioria dos quais associados a processos de renaturação/redobramento de proteínas. Estes genes seriam biomarcadores valiosos para a identificação, dentro de um banco de germoplasma, de plantas tolerantes a altas temperaturas, uma vez que respondem tanto na curta duração quanto nos tratamentos de estresse por calor crônico, sendo expressos em diferentes fases e tecidos daquelas plantas (LI et al., 2013).

2.4.6 Relação das HSP's e sHSP's com enzimas e fito-hormônios

Deve-se destacar que o aumento das atividades enzimáticas, incluindo da superóxido dismutase (SOD), da ascorbato peroxidase (APX), da glutathiona redutase (GR) e da catalase

(CAT), é induzido pelo calor e, em menor grau, pela seca. De maneira análoga, a síntese de HSP70 e a produção de H₂O₂ aumentam de maneira significativa sob estes dois tipos de estresses, sendo que pré-tratamentos com ABA incrementaram significativamente as atividades de enzimas antioxidantes, os níveis de expressão da HSP70, e a própria produção de H₂O₂ sob condições de estresse térmico e/ou hídrico, em comparação com plantas mutantes deficientes em ABA e sem pré-tratamento. Tais fatos sugerem que a HSP70 pode desempenhar um papel importante na defesa antioxidante induzida pela ABA do milho em situações de seca e/ou calor excessivo (HU et al., 2010). Outros dados sugerem que a superexpressão de *Zmgols2* (gene da galactinol sintase, primeira enzima comprometida na via de biossíntese de rafinose), já citado como indutor de tolerância a estresses abióticos e alvo do fator de transcrição *ZmDREB2A*, resultou em hiper-acumulação de galactinol e de rafinose, tornando-se um objeto prático para a geração de lavouras tolerantes a estresses como seca, choque térmico, e salinidade (GU et al., 2016).

Numa pesquisa anterior, já havia sido identificado um elemento *heat-shock* (HSE), cuja deleção ou triplicação deste *motif* HSE aboliu ou melhorou, respectivamente, a resposta ao choque térmico do promotor (fragmento de 1.5 kb na região regulatória 5') do *ZmGOLS2*, analisado através de expressão do gene repórter da luciferase em cultura de protoplastos de milho (GU et al., 2013).

Também foi proposto que a frutose-6-fosfato-1-fosfotransferase (PFP), dependente de pirofosfato (PPi), pode alterar (induzindo ou atenuando, sempre com gasto de ATP) a expressão dos genes *HSP's* durante a modificação do endosperma em *Quality Protein Maize* (variedade de milho que contém valores elevados de lisina e triptofano, e são usados em dietas ricas em proteína) (GUO et al., 2012).

Sobre o ABA, embora alguns estudos anteriores tenham mostrado que este regula a expressão de várias pequenas proteínas *heat-shock* (sHSP's) em folhas de milho submetidas à combinação de estresse por seca e calor, não foram identificadas sHSP's entre as proteínas de raiz reguladas por este mesmo fito-hormônio (LIU et al., 2013a). Ainda assim, sementes de milho mutante, deficiente em ABA, mostraram expressão diferencial de 46 proteínas, a maioria delas relativas ao embrião e relacionadas com estresse, sendo principalmente LEA's e sHSP's, além de proteínas de armazenamento (WU et al., 2015).

Genes *BSK's* (*brassinosteroid signaling kinases*, quinases citoplasmáticas do tipo receptor específico de plantas), envolvidos na via de transdução de sinal dos brassinosteróides, codificam proteínas com *motifs* típicos (PKc e TPR) e um complexo N-

terminal (composto por extensas cadeias e hélices), hidrofílicas, ácidas, e presentes nos cloroplastos, onde provavelmente interagem com as HSP's (HU et al., 2015b).

Em plantas de milho previamente estressadas com calor, houve aumento na expressão de HSP60 e sHSP's. Por conseguinte, observou-se que este tipo de tratamento (*pre-heat-stressed*), bem como os efeitos que diferentes níveis de CO₂ e de nitrogênio exercem na termotolerância fotossintética, podem contribuir para mudanças na produtividade, na distribuição, e na diversidade das plantas (WANG; FAN; HECKATHORN, 2014).

Sabe-se que situações de encharcamento também induzem a expressão das HSP's, que são consideradas elementos-chave no início das respostas ao estresse por inundações. O interessante é que o tratamento de pré-imersão com esperimidinas, composto de poliamina encontrado em ribossomos e em diversos tecidos vivos, e que tem as mais variadas funções metabólicas, atenuou os danos celulares induzidos por encharcamento, em milho, por meio de três mecanismos, sendo que um deles é justamente o aumento da expressão e da abundância de proteínas HSP70 e HSP90 (LIU et al., 2014).

Ainda no que diz respeito à HSP90, descobriu-se, durante estudo destinado a identificar proteínas alvo da CK2 (caseína quinase II) na resposta da planta ao ácido salicílico, que a P23, a menor proteína no complexo HSP90 e considerada uma co-chaperona, é alvo desta CK2, sendo prontamente fosforilada *in vitro* pela CK2 do milho, e estando envolvida em vias de transdução de sinal onde reações de fosforilação podem representar um mecanismo para a regulação fina de respostas celulares a diversos fatores (TOSONI et al., 2011).

Uma pequena proteína *heat-shock* do milho (sHSP 18,2), composta por 159 aa's e cuja massa molecular é de 18,17 kDa, contém um domínio CS semelhante ao domínio da P23, compartilhando certa semelhança com esta co-chaperona da HSP90. Os níveis de expressão desta proteína, maiores nas folhas, foram significativamente super-regulados pela desidratação. Além disso, plantas transgênicas de *Arabidopsis* com superexpressão de *Zmshsp* tinham menor teor de citocinina endógena, ficando mais sensíveis à citocinina durante a fase de germinação, sugerindo que a sHSP 18,2 exerça certa função na resposta a este fitohormônio também no milho (CAO et al., 2010).

Nanopartículas de CeO₂ (óxido de cério), matéria-prima utilizada na nanotecnologia e inevitavelmente lançada ao meio ambiente, com consequências ainda desconhecidas frente à sua toxicidade potencial quando transferida para a cadeia alimentar, provocaram aumento da regulação do HSP70 em raízes, indicando uma resposta de estresse sistêmico. Tais resultados

sugerem que esta HSP70 pode ajudar as plantas a se defenderem contra uma eventual injúria oxidativa induzida por esta nanopartícula (ZHAO et al., 2012).

Também é conhecido o fato de que aldeídos são gerados em resposta a um conjunto de pressões ambientais que perturbam o metabolismo, tais como desidratação, dessecação, salinidade e choques térmicos, seja envolvendo frio ou calor. Neste sentido, três genes do milho (*ZmALDH9*, *ZmALDH13* e *ZmALDH17*) são potencialmente úteis no melhoramento genético da cultura, visando aquisição deste tipo de tolerância.

Deste modo, ficou evidenciada, nesta revisão, a grande complexidade dos fatores envolvidos no processo de tolerância aos fatores abióticos, a exemplo da secagem sob altas temperaturas, fato que justifica plenamente a pesquisa proposta.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Escolha dos materiais genéticos e produção das sementes

Os experimentos foram conduzidos na área experimental do Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, de propriedade da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e localizado no município de Lavras-MG, entre as coordenadas UTM/SAD 69 23 K 500.609 mE; 7.656.485 mN e 502.467 mE; 7.655.079 mN. Esta área encontra-se na região dos Campos das Vertentes, com clima do tipo Cwa (temperado chuvoso: mesotérmico, com inverno frio e seco, e verão quente e úmido), de acordo com a classificação climática proposta por Köppen-Geiger.

Foram utilizadas, a princípio, dez linhagens de milho, pertencentes ao programa de melhoramento da empresa Geneseeds Recursos Genéticos Ltda[®], e que foram pré-selecionadas com base na literatura (TABELA 2), haja vista que se destacaram em estudos prévios relacionados ao tipo de estresse que está sendo estudado (altas temperaturas de secagem), bem como em outros trabalhos envolvendo outros tipos de estresse abiótico (incluindo seca e frio) que, teoricamente, compartilham fatores (vias de transdução de sinais) na cascata de eventos em resposta da planta a tais situações de estresse (ABREU et al., 2016; ANDRADE et al., 2013; DUTRA, 2014; SALGADO et al., 2008; SILVA NETA, 2014).

Tabela 2 - Linhagens que se destacaram em série de estudos sobre resposta a estresses abióticos diversos, selecionadas em função dos resultados obtidos por diversos autores. (Continua)

L.	CICLO	FENÓTIPO APRESENTADO	AUTOR
64	Super precoce	↑ expressão do gene ZmAN-13 (estresses térmicos)	Dutra et al (2014)
		↑ expressão do gene AOX-1 (tolerância a estresses abióticos)	Dutra et al (2014)
		após aplicação de ABA exógeno: ↑ADH	Andrade et al (2015)
		após aplicação de ABA exógeno: ↑PGI	Andrade et al (2015)
		tolerante a baixas temperaturas	Silva Neta et al (2014)
		responsiva à deterioração controlada: ↑ LEA	Dutra et al (2014)
91	Normal	após aplicação de ABA exógeno: = MDH	Andrade et al (2015)
		após aplicação de ABA exógeno: ↓ protusão radicular	Andrade et al (2015)
		após aplicação de ABA exógeno: ↑ LEA acumulada	Andrade et al (2015)
75	Super precoce	tolerante a baixas temperaturas	Silva Neta et al (2014)
		tolerante a altas temperaturas	Dutra et al (2014)
		responsiva à deterioração controlada: ↑ expressão ZmAN-13	Dutra et al (2014)
		↑ expressão do gene ZmDBP2 (tolerância a estresse salino)	Dutra et al (2014)
		tolerante ao estresse hídrico	Abreu et al (2016)
75	Super precoce	↑ expressão do gene AOX-2 (tolerância a estresses abióticos)	Dutra et al (2014)
		↑ qualidade fisiológica de sementes	Abreu et al (2016)
		genótipo promissor quanto à tolerância ao estresse hídrico	Abreu et al (2016)

Tabela 2 - Linhagens que se destacaram em série de estudos sobre resposta a estresses abióticos diversos, selecionadas em função dos resultados obtidos por diversos autores. (Conclusão)

L.	CICLO	FENÓTIPO APRESENTADO	AUTOR
63	Precoce	tolerante a baixas temperaturas ↑ qualidade fisiológica de sementes responsiva à deterioração controlada: ↑ LEA responsiva à deterioração controlada: ↑ expressão ZmAN-13 ↑ expressão do gene AOX-2 (tolerância a estresses abióticos) tolerante ao estresse hídrico	Silva Neta et al (2014) Oliveira et al (2013) Dutra et al (2014) Dutra et al (2014) Dutra et al (2014) Abreu et al (2016)
54	Super precoce	tolerante a altas temperaturas ↓ vigor de sementes não tolerante a baixas temperaturas	Dutra et al (2014) Oliveira et al (2015) Silva Neta et al (2014)
57	Precoce	não tolerante ao estresse hídrico não tolerante a baixas temperaturas ↓ qualidade fisiológica de sementes após aplicação de ABA exógeno: = α -amilase após aplicação de ABA exógeno: ↑PGI	Abreu et al (2016) Silva Neta et al (2014) Gomes et al (2000) Andrade et al (2015) Andrade et al (2015)
30	Precoce	após aplicação de ABA exógeno: ↓ protrusão radicular após aplicação de ABA exógeno: = α -amilase responsiva à deterioração controlada: ↑ LEA após aplicação de ABA exógeno: ↑ LEA acumulada ↑ expressão do gene AOX-1 (tolerância a estresses abióticos) após aplicação de ABA exógeno: = MDH	Andrade et al (2015) Andrade et al (2015) Dutra et al (2014) Andrade et al (2015) Dutra et al (2014) Andrade et al (2015)
24	Super precoce	não tolerante ao estresse hídrico durante a germinação melhoria na resposta (índice Z) em sob estresse hídrico	Abreu et al (2016) Abreu et al (2016)
37	Precoce	↓ vigor após testes de envelhecimento acelerado tolerante ao estresse hídrico durante a germinação melhoria na resposta (índice Z) sob estresse hídrico	Abreu et al (2016) Abreu et al (2016) Abreu et al (2016)
31	Precoce	não-tolerante ao estresse hídrico durante a germinação ↓ vigor após testes de envelhecimento acelerado	Abreu et al (2016) Abreu et al (2016)

Fonte: Do autor (2018).

Para a multiplicação das sementes, o solo foi preparado convencionalmente e as adubações de plantio feitas de acordo com a análise química do mesmo. Foi utilizado o espaçamento de 0,6 m entre linhas, e de 0,2 m entre as plantas na linha, resultando em cinco plantas por metro linear e em uma população de cerca de 83.000 plantas/ha. Uma área adicional (*split*) foi plantada com intervalo de 10 dias, a fim de se garantir coincidência do florescimento, visando contornar eventuais casos de protandria e/ou protoginia nas linhagens trabalhadas.

A adubação de cobertura e os demais tratamentos culturais foram realizados de acordo com a recomendação para a cultura. Para prevenir cruzamentos indesejados, as espigas foram protegidas com sacos plásticos, antes da emissão dos estilo-estigmas. Quando os estilo-estigmas se apresentaram receptivos, foram realizadas, manualmente, as autofecundações. As sementes foram constantemente amostradas para a determinação do teor de água, e a colheita foi realizada quando estas apresentavam cerca de 30% de umidade.

Então, as espigas foram despalhadas manualmente e, logo em seguida, submetidas à secagem artificial a 35°C e 50°C até que tais sementes atingissem o teor de água de aproximadamente 13%. As duas temperaturas diferentes de secagem caracterizaram-se como os dois tratamentos aplicados, sendo esta variável a base para o presente estudo.

O sistema de secagem foi composto por quatro secadores estacionários experimentais, de camada fixa e pequena escala, os quais permitiam o controle preciso do fluxo e da temperatura do ar de secagem, por meio de um painel eletrônico. Cada secador foi composto de quatro bandejas removíveis, de fundo perfurado e seção quadrada, com lados de 60 cm e profundidade de 20 cm. As bandejas ficaram dispostas uma sobre as outras em cada secador, sendo que a ordem entre elas era alterada a cada 90 minutos, de modo que não houvesse variação significativa na temperatura e no fluxo de ar entre as amostras.

Os termômetros foram colocados no meio da massa de espigas, a fim de fazer este controle de temperatura de modo independente do equipamento, garantindo maior precisão ao controle desta variável. O fluxo de ar utilizado foi de $34 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ton}^{-1}$.

3.2 Avaliações da qualidade das sementes

3.2.1 Teor de água

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

3.2.2 Testes de germinação e de primeira contagem de plântulas

O teste de germinação foi realizado com 200 sementes. Estas foram divididas em quatro repetições de 50 sementes. A semeadura foi realizada em papel do tipo Germitest[®], umedecidas com água em quantidade igual a 2,5 vezes o peso do papel seco. Em seguida, as sementes foram mantidas em germinador, regulado à temperatura de 25°C.

As avaliações foram realizadas no quarto e no sétimo dia. O número de plântulas normais foi computado de acordo com as prescrições contidas nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). O teste de primeira contagem de germinação foi realizado

concomitantemente com este primeiro, sendo avaliado no quarto dia após a semeadura (BRASIL, 2009).

3.2.3 Envelhecimento acelerado

O teste de envelhecimento acelerado foi realizado mantendo as sementes por 96 horas à temperatura de 42°C. As sementes foram distribuídas de modo uniforme, sobre uma tela suspensa, no interior de uma caixa do tipo "gerbox" contendo 40 mL de água. Em seguida, foi efetuado o teste de germinação, à temperatura de 25°C. A avaliação foi realizada no quarto dia após a instalação do teste, contabilizando-se o porcentual de plântulas normais, sendo aquelas que apresentassem no mínimo 2,5 cm de parte aérea e, pelo menos, duas raízes seminais, além da raiz principal. (MARCOS FILHO, 1994).

3.2.4 Teste de Frio

Realizado com o uso do papel Germitest[®], assim como os demais, consistiu-se de quatro repetições de 50 sementes por tratamento, em papel umedecido com 2,5 vezes seu peso seco em água, colocados em sacos de plástico e mantidos em câmara fria a 10° C, onde permaneceram por sete dias (BARROS et al., 1999).

Após este período, os rolos foram retirados dos sacos e colocados em germinadores programados a 25° C e, decorridos quatro dias a partir de então, foram computadas as porcentagens de plântulas normais.

3.2.5 Análise estatística dos dados fisiológicos

Para os testes de germinação, primeira contagem da germinação, envelhecimento acelerado e teste de frio, nas sementes secadas a 35°C e 50°C, realizados para avaliação da qualidade fisiológica, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados foram interpretados estatisticamente por meio da análise de variância, enquanto que as médias foram comparadas e agrupadas utilizando-se a metodologia proposta por Scott e Knott (1974). As análises foram realizadas no programa estatístico Sisvar[®].

3.3 Análise da expressão de transcritos

3.3.1 Escolha dos genes

Foi realizada uma revisão bibliográfica a fim de selecionar os genes que se expressavam diferencialmente sob condições de estresse abiótico em milho. Nesta seleção, considerou-se que os genes deveriam, *a priori*, demonstrar uma significativa mudança de expressão após a aplicação do estresse por altas temperaturas de secagem. Buscou-se por genes que poderiam funcionar como marcadores moleculares para a característica estudada.

Foi elaborado, então, um “*ranking*”, a fim de se classificar a importância dos genes para o desenvolvimento do trabalho, sempre com base em resultados relacionados aos níveis de expressão gênica após aplicação de estresse.

3.3.2 Desenho dos *primers*

As sequências de cDNA dos genes-alvo escolhidos foram obtidas por meio de rastreamento realizado nos bancos de dados da NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e do MaizeGDB (*Maize Genetics and Genome Database*). Na sequência, os *primers* foram desenhados utilizando-se os *softwares* Primer Express 3.0[®], da Applied Biosystems, e Custom Primers OligoPerfect Design[®], da ThermoFischer Scientific.

Após a etapa de desenho dos *primers*, fez-se necessária a avaliação da qualidade dos mesmos, numa busca por eventuais *hairpins*, formação de “grampos” que ocorrem quando o *primer* se liga de maneira bastante estável nele mesmo, e/ou dímeros de *primers*, podendo ser *self-dimer*, quando um *primer forward* se liga a outro, ou um *primer reverse* se liga a outro; ou *hetero-dimer*, quando os *primers forward* e *reverse* se acoplam de maneira estável, impedindo que estes se liguem ao fragmento de DNA (*template*) e desempenhem, portanto, sua função crucial de iniciar a reação de polimerização em cadeia.

Esta análise da efetiva qualidade dos *primers* foi realizada no *software* IDT Oligo Analyzer[®], da Integrated DNA Technologies. Importante salientar que, para uma correta averiguação, o *primer reverse* (apenas ele; o *forward* não) deve ter, a partir do modelo proposto, sua sequência previamente “invertida” (de 3’→5’ para 5’→3’), algo que foi feito mediante o uso do *software* Reverse Complement Tool[®], da Bioinformatics.

Após todas essas checagens, os *primers* puderam ser encomendados com segurança. Após as etapas descritas acima foram selecionados, então, 42 pares de *primers* sendo, destes, cinco referentes a genes candidatos a atuarem como referência (TABELA 3).

Tabela 3 - Lista de *primers* utilizados nas análises de PCR. (Continua)

Gene	Amplificação do cDNA para quantificação (RT-qPCR)	
	(F) Primer Forward (5'→3')	(R) Primer Reverse (5'→3')
HSF 08 do Milho	GAGCAGGTGCTGTCTGTCAG	TGTTGCACAGCTTCTTCATCTG
HSF 12 do Milho	AGCGACACCTCCTCGTGAAC	CGTTTCGAGCTCGCTGTCA
HSF 13 do Milho	GAGAACCTGGCGCTCAACAT	CGCCCTTCATCCCTTCGT
HSP 1 16,9-17,2	ACTTCGCAGTTGGCAGACTC	GAAGAGGTCCACGGAGAATG
	CATGTTCCGCTCCATCGT	ATCGACTGGAAGGAGACGC
	TGCTGTATGCTTCCACGTTT	TGATCTCCTTCTCGGTGGTC
HSF 20 do Milho	GAGGACAACGACGAGGAACAA	AGCGTCAGCACGTCCAGATC
HSP 101	TGAGGATCATGGAGGAGGAC	CCACATTCACGGGCTTATCT
HSF 24 do Milho	AGCAGCAAGACAAGAGGAAGGA	TGTTTCGCTTTCATCACT
HSP 26	GTCTCCAACCAGGAAAGCAA	CTGGGGCTATGTGAATCTGG
HSF 25 do Milho	GGCGAGCAGCTCCAGACA	AAGTTGCGGTGCTTGAAGAAG
HSF 05 do Milho	GGCAAGATGGTGGCCTAGAC	TGGCTGCTTCGTTGATCAGA
HSP 70- 74	ACCACTTCGTCCAGGAGTTCAA	GCCCTCATACAGCGAGTCAATC
	GCAGGGTGTCTCTGTTTCC	CGTGCATAGCGAGAAAAACA
HSF 07 do Milho	CGAGGAGCAGGTGCTGTCA	GATGTTGTTGCAGAGCTTCTTC
HSP 90	TGTCGTGGAATCCTGTGAAA	TTTTCTCCACCTTTTGTGG
HSF 09 do Milho	TGGGACTCGCACGTTTTTG	GTAGGTGTTGAGCTGGCGTATG
DHN 1 (RAB 17)	GCGTCAAAGCCGTACTCTTC	CGTACAAATTCACCCACAA
FDL 1	AATCCCTTCAAGCGAGGAGT	ATCAAGCGACCGATCTGAAT
HSF 02 do Milho	CCTTCGGGAAGCGAGTGAA	TGAGACAGGTGATGGCACATG
HSP 22	CGCTTCAGTTTTCTGTGCAA	GGAAACCAAACACGGCATAG
HSF 14 do Milho	ATGGTTATGATCATCCACGGTTA	GGACATCAGATGCATGGCTTT
TIF5A	TTGAGCTGGCTTTTGCTATG	CAGGGTCCAGAATGTAACCAC
HSF 04 do Milho	CAGCAGAACACAAAGGCAAATC	GCATGACACGTGCCAAGAAC
LEA 14-A	CTCGCTCGATCCGTAAGT	CAAGCAGCACAAACAACA
RAB 30 (LEA D-34)	GCGGAGAACCCTGGTGTTCG	GACGAACCTCGGTGACGATG
HSF 06 do Milho	CCTCATGGCAGCGTAGAGTCA	TCGTCATGCACGCTTGTAGTT
HSF 10 do Milho	AGCTCGGGCAGATGAAGAAG	GCGCTGCAGAGGCGTCTA
TUA 4	ATCCTGTGATCTGCCCTGAG	AGGTGGTGAAGCAAAGCAT
KIN 1	CGTCTCTGTTTTCGTTTCTG	CGTTGGGCATCATATCACAG
DREB 2A-S	GGACAGCCCTGGTATCTTGA	AATTCAGTTTAGCCGCTCCA
HSF 03 do Milho	GCGTCCAAGCCTCAGGTAGA	TGCCTTAGCGTGATGACTTCA
HSF 29 do Milho	AGAGCGCTGGGAATTTGCTA	CTGATGGCTATGGCTGTGGAT
sHSP 18	CCCAATACAAGGGCAAGG	GGGTCAGGGCAGGTTCCA
LEA EMB 564	CACGTCGTCAAGTCGTCAAT	TAACAAGGAACCGCCAAACT
Prot. Embriônica DC-8	AGCTCGTTGATCCAAATCCA	AGCCATCAGCCTGGACATAG

Tabela 3 - Lista de *primers* utilizados nas análises de PCR. (Conclusão)

HSF A-4d	ACAGCTGCTGGAGTCGATATGA	TGAGAAACCGCTCCCAGAAT
Actina	TGAAGCCACGTACAACCTCCA	GCAACCACCTTCACCTTCAT
β -Actina	TGTCCATCACTTGTGAAGCCTCC	ACGACCTTAGCCAATATCGCAC
Tubulina α -3	GCTATCCTGTGATCTGCCCTGA	CGCCAAACTTAATAACCCAGTA
ADH	AGGACGCTGAGTTAAGACC	CACATTTGGCAGATCAGTGC
Ubiquitina 60-S Ribos.	AAGGCCAAGATCCAGGACAA	TTGCTTTCCAGCGAAGATGA

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

Fonte: Do autor (2018).

3.3.3 Análise prévia do polimorfismo

Após a seleção destes *primers*, os mesmos foram testados em PCR convencional, utilizando-se o cDNA de cada tratamento para uma prévia seleção dos pares de *primers* que se demonstrassem polimórficos após 35 ciclos. Depois desta amplificação exponencial, que mantém a proporção da expressão gênica naqueles materiais, cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 2%, durante 50 minutos, a 120 Volts de tensão elétrica, numa corrente elétrica de 200 miliAmperes. Utilizou-se um marcador de peso molecular de 100 pb's (pares de bases), para que se pudesse ter certeza de que a banda a ser visualizada no gel fosse, definitivamente, proveniente do *amplicon* desejado.

Desta forma, pôde ser avaliado o nível de intensidade das bandas neste gel. Foram identificados quatro níveis de expressão: 0 (ausência de banda), 1 (banda de intensidade fraca), 2 (banda de intensidade média), 3 (banda de intensidade alta). Os resultados observados nos géis de agarose foram confrontados com os índices obtidos através de análise de imagem, realizada pelo *software ImageJ*[®], capaz de mensurar o número e a intensidade dos *pixels* das imagens.

De posse desta informação, estes quatro níveis, já traduzidos numa escala de número de *pixels* por meio do *software* para processamento de imagens, possibilitaram a elaboração de um *heat-map*, que tornou mais fácil a visualização do polimorfismo presente entre as amostras. Sendo assim, após estas análises, reduziu-se a dez o número de *primers* para os genes alvo selecionados para a próxima etapa, e mantiveram-se os cinco *primers* referentes aos genes candidatos a atuarem como referência durante a RT-qPCR.

3.3.4 Análise transcriptômica por meio da técnica de RT-qPCR

Para a análise dos transcritos via técnica de RT-qPCR, foram utilizadas sementes das linhagens 64, 63, 30 e 57, submetidas à secagem a 35 e 50°C.

A técnica para a determinação da expressão dos transcritos envolvidos no processo de tolerância à alta temperatura de secagem foi dividida em quatro etapas: extração e purificação do RNA, transcrição reversa para síntese do cDNA, PCR em tempo real, e análise dos resultados.

Para a extração do RNA, as sementes foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e com a adição do reagente Pure Link RNA Plant[®], da Invitrogen, seguindo as especificações do manual do fabricante. A integridade e a pureza do RNA foram avaliadas em todas as etapas da técnica, por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose 2% (corados com GelRed[®] Nucleic Acid Stain, 10,000x *in water*) e análise em espectrofotômetro, modelo BioTek Eon Microplate Spectrophotometer[®]. Após as extrações dos ácidos nucleicos, as amostras foram tratadas com DNase I (RNase-Free) para evitar qualquer contaminação com o DNA genômico das amostras. Para isso, foi utilizado o KitDNase Turbo Free[®], da Ambiom, sempre de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante.

Para comprovar a eficiência do tratamento com DNase, foi realizada uma reação de PCR convencional. Como controle positivo, foi utilizada uma amostra de DNA genômico de milho. O *primer* utilizado foi o correspondente ao gene constitutivo da Ubiquitina. Então, preparou-se um gel de agarose a 2%, corado com GelRed[®] para a visualização das possíveis ampliações.

Após o processo de extração e purificação, os mRNA's foram utilizados como molde para a síntese do cDNA. Para tanto, foi utilizado kit High Capacity cDNA Reverse Transcription cDNA[®], da Applied Biosystems, segundo protocolo recomendado pelo fabricante.

Na próxima etapa, foram analisadas a eficiência dos dez *primers* para genes-alvo previamente selecionados na PCR convencional, durante a avaliação do polimorfismo prévio, bem como os cinco *primers* relativos aos genes de referência, baseando-se na inclinação da reta traçada a partir da média de Ct's de cada diluição de cDNA (1:5, 1:25, 1:125, 1:625, e 1:3125, todas estas obtidas a partir de diluições seriadas), a qual deve apresentar seu R² o mais próximo possível de 1,00, indicando 100% de eficiência de um determinado par de *primers* em amplificar o cDNA-alvo exponencialmente a cada ciclo. Após análise de eficiência, foram selecionados os *primers* apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - *Primers* utilizados nas análises de RT-qPCR.

Gene	Identificação	Sequência 5'→3'
Ubiquitina (GRMZM2G116292_T01)	Gene de referência	F AAGGCCAAGATCCAGGACAA RTTGCTTTCCAGCGAAGATGA
ADH (GRMZM2G442658)	Gene de referência	F AGGACGCTGAGTTAAGACC RCACATTTGGCAGATCAGTGC
HSP 26 (GRMZM2G149647_T01)	Proteína de Choque Térmico	F GTCTCCAACCAGGAAAGCAA RCTGGGGCTATGTGAATCTGG
HSP 70-74 A (GRMZM2G340251_T01)	Proteína de Choque Térmico	F ACCACTTCGTCCAGGAGTTCAA RGCCCTCATACAGCGAGTCAATCT
HSP 70-74 B (GRMZM2G366532_T01)	Proteína de Choque Térmico	F GCAGGGTGTCTCTGTTTCC RCGTGCATAGCGAGAAAAACA

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

Fonte: Do autor (2018).

Em seguida, os pares de *primers* que “passaram no teste da eficiência” tiveram suas expressões relativas (aquelas comparadas a uma amostra calibradora) quantificadas. As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento 7500 Real-Time PCR System[®], da Applied Biosystems, em um volume total de 6µL, contendo: 1 µL de cDNA na diluição 1:5; 2,5 µL de SYBR[®] Green Real-Time PCR Master Mixes; 0,2 µL de *primer forward*; 0,2 µL de *primer reverse*; e 2,1 µL de água Milli-Q.

As amplificações ocorreram durante 5 minutos a 95°C (desnaturação inicial), seguida de 40 ciclos de 5 segundos a 95°C (desnaturação) e 30 segundos a 60°C (anelamento e extensão). Utilizaram-se triplicatas técnicas e biológicas, e um controle sem cDNA (NTC) foi incluído para cada par de *primers*. Os resultados foram normalizados usando Ct's (ciclo de *threshold*) obtidos pela expressão dos genes de referência Ubiquitina (UBI) e ADH. O CT foi determinado pelo número de ciclos no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha de base (*threshold cycle*, Ct). A expressão relativa foi analisada pelo método Pfaffl (2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A linhagem 75 demonstrou alta segregação de indivíduos no campo, fato que comprova que está não se encontrava, ainda, em completa homozigose, e/ou que houve contaminação varietal do lote utilizado durante sua semeadura. Já para a linhagem 37, foram produzidas poucas sementes. Considerando tais fatores, estas duas linhagens tiveram de ser excluídas das fases subsequentes do trabalho. Portanto, restaram oito materiais para serem analisados nas etapas laboratoriais: as linhagens 91, 63, 64, 31, 30, 24, 57, e 54, conforme descritas na Tabela 5. O tempo médio gasto com a secagem das sementes foi de 28 horas quando se utilizou a temperatura de 35° C, e de 21 horas para a temperatura de 50° C.

Ressalta-se que as temperaturas aplicadas para a secagem das sementes foram escolhidas pelas seguintes razões: o tratamento a 35° C simularia uma secagem natural e, segundo a bibliografia consultada, não traria nenhum tipo de risco a quaisquer genótipos de milho estudados; e o tratamento 50° C seria capaz de separar as linhagens em dois grupos distintos (tolerantes e não tolerantes à alta temperatura de secagem), promovendo uma expressão diferenciada das proteínas *heat-shock* (HSP's) sem inviabilizar os materiais, ou seja, sem o risco de destruir as sementes.

O teor de água médio das sementes no momento da realização dos testes fisiológicos foi de 11,8%, com variação máxima de 1% entre as amostras e os tratamentos avaliados.

Tabela 5 - Valores médios percentuais para os resultados obtidos nos testes de germinação, primeira contagem da germinação, teste de frio e envelhecimento acelerado em sementes de linhagens de milho, secadas a temperatura de 35°C e 50°C

Linhagem	Germinação		Primeira Contagem		Teste de Frio		Env. Acelerado	
	35° C	50° C	35° C	50° C	35° C	50° C	35° C	50° C
64	98 Aa	98 Aa	94 Aa	94 Aa	97 Aa	91 Aa	96 Aa	86 Ba
63	92 Aa	92 Ab	83 Ab	89 Aa	96 Aa	90 Aa	94 Aa	79 Bb
31	96 Aa	81 Bc	76 Ab	51 Bb	93 Aa	81 Bb	95 Aa	69 Bc
24	96 Aa	87 Bb	96 Aa	73 Bb	79 Ab	73 Bb	99 Aa	61 Bd
54	96 Aa	69 Bd	95 Aa	46 Bc	90 Aa	59 Bc	89 Ab	23 Be
91	100 Aa	21 Bf	100 Aa	14 Bd	100 Aa	11 Be	99 Aa	5 Bf
30	98 Aa	31 Be	94 Aa	14 Bd	97 Aa	23 Bd	90 Ab	7 Bf
57	97 Aa	22 Bf	97 Aa	16 Bd	95 Aa	6 Bf	84 Ac	1 Bf
CV(%)	5,07		7,95		5,60		5,87	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúsculas na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Scott Knott.

Para o teste de germinação, quando a secagem das sementes foi realizada a 35°C, não houve diferença significativa entre os materiais avaliados. Assim, pode-se inferir que todos os materiais analisados apresentaram resultados semelhantes quando secados a esta temperatura, a qual não afetou a germinação das sementes das linhagens estudadas. Esta informação confirma o fato de as sementes terem sido colhidas em estádios de desenvolvimento semelhantes, condição importante para o trabalho em questão, sobretudo para a correta interpretação dos dados a seguir, comprovando que a tolerância apresentada à alta temperatura de secagem (50° C) foi decorrente apenas de fatores intrínsecos ao genótipo, e não ocasionada por uma eventual variável, que estaria correlacionada, neste caso hipotético, a diferentes graus de desenvolvimento de sementes.

Para as sementes secadas a 50°C, observaram-se os maiores valores de germinação na linhagem 64, enquanto nas linhagens 91 e 57 foram observados os menos valores, quando comparados aos das demais linhagens analisadas. Com relação à germinação em função das temperaturas, não houve diferença significativa dos valores observados para as linhagens 63 e 64. No entanto, para as demais linhagens, pôde-se observar significativa redução dos valores de germinação quando estas foram secadas a temperatura de 50°C. Deste modo, infere-se que a temperatura de 50° C afetou a germinação das sementes de linhagens de milho, exceto para as linhagens 63 e 64, previamente classificadas como tolerantes aos estresses abióticos (ABREU et al., 2016; DUTRA, 2014; SILVA NETA, 2014).

Quanto ao teste de primeira contagem, para as linhagens 91, 57, 24, 54, 64 e 30, foram observados os maiores valores quando a secagem ocorreu a 35° C, evidenciando maior vigor em relação às sementes das linhagens 31 e 63. Já aos 50° C, foram verificados maiores valores de vigor em sementes das linhagens 64 e 63, de modo semelhante ao que foi evidenciado no teste de germinação. Os menores valores quanto ao vigor avaliado por meio do teste de primeira contagem, quando a secagem foi realizada a 50° C, foram observados em sementes das linhagens 57, 91 e 30. Neste teste, também não houve diferença significativa dos valores observados em sementes das linhagens 64 e 63 quando estas foram secadas a 35° C e 50° C, resultado também observado no teste de frio. Maiores valores de vigor, pelo teste de frio e no que diz respeito à secagem a 50° C, foram observados em sementes das linhagens 64 e 63, enquanto que os menores valores foram observados em sementes das linhagens 57 e 91. Em relação ao teste de envelhecimento acelerado, intimamente ligado à longevidade da semente, os resultados foram semelhantes aos observados nos demais testes: na secagem a 50° C, maiores valores de vigor para as linhagens 64 e 63, e menores em sementes das linhagens 57, 30 e 91.

Neste teste, para as sementes de todas as oito linhagens, houve redução do vigor quando as sementes foram secadas a 50° C. Baseando-se nos resultados observados nos testes utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica, dentre as oito linhagens avaliadas, aquelas seis nas quais se observaram os dados mais discrepantes (64, 63, 31, 91, 30 e 57) foram avaliadas na próxima etapa: análise de polimorfismo em gel de agarose 2%, após PCR convencional.

As outras duas linhagens (24 e 54), cujos dados fisiológicos demonstraram-se medianos e, portanto, não discrepantes, foram excluídas das etapas subsequentes do trabalho. Assim, baseando-se nos resultados dos testes fisiológicos, foram selecionados seis materiais genéticos, classificados em dois grupos: tolerantes (linhagens 64, 63 e 31) e não-tolerantes (91, 30 e 57) à alta temperatura de secagem.

Na avaliação de polimorfismo, procurava-se por diferenças nos níveis de expressão dos 37 genes-alvo previamente selecionados. Cinco situações, em particular, foram buscadas quanto ao polimorfismo apresentado entre os tratamentos e entre os grupos de linhagens (tolerantes e não tolerantes), e encontram-se ilustradas no Quadro 1.

Quadro 1 - Polimorfismo procurado no perfil de expressão dos genes-alvos.

Linhagens Tolerantes		Linhagens Não Tolerantes		Situação
35° C	50° C	35° C	50° C	
Red	Green	Red	Green	→ Situação 01
Red	Green	Red	Red	→ Situação 02
Green	Green	Red	Red	→ Situação 03
Green	Green	Green	Red	→ Situação 04
Green	Red	Green	Green	→ Situação 05


IMAGE]

Banda	Legenda utilizada no Heat Map
Red	Ausência de Expressão (0 pixels)
Light Green	Baixa Expressão (1 a 2.000 pixels)
Green	Média Expressão (2.001 a 4.000 pixels)
Dark Green	Alta Expressão (>4.000 pixels)

Fonte: Do autor (2018).

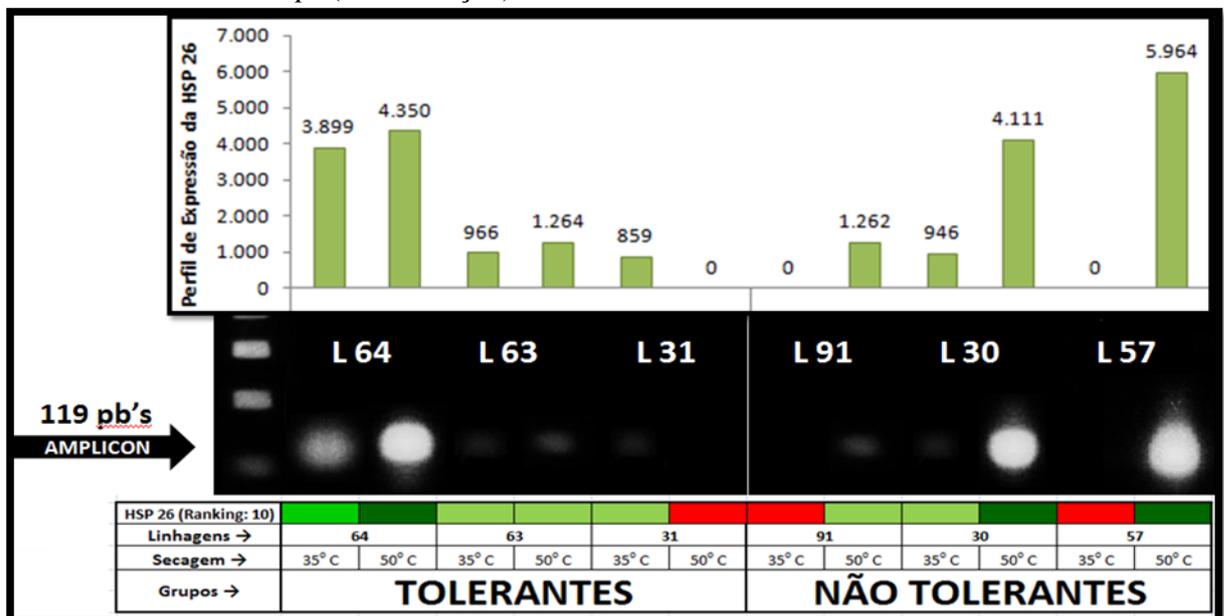
Na primeira situação hipotética tratada no Quadro 1, percebe-se que a aplicação da alta temperatura de secagem (50° C) resultaria no aumento da expressão daquele determinado gene nas linhagens de ambos os grupos (tolerantes e não tolerantes), fato que evidenciaria que aquele gene é superexpressado pela condição de estresse térmico, mas que, a princípio, não estaria correlacionado à aquisição da termotolerância. Contudo, na segunda situação, nota-se que a superexpressão se daria apenas nas linhagens do grupo das tolerantes, reforçando a ideia

de que aquele determinado gene desempenharia papel fundamental na condição de termotolerância.

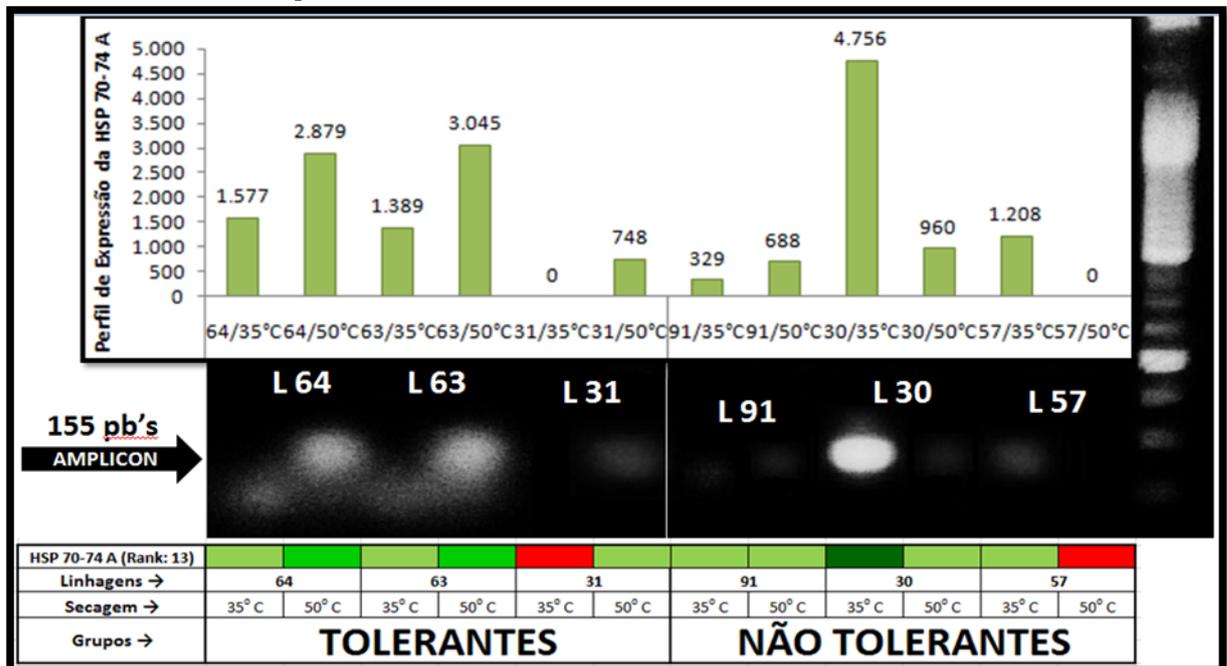
Na terceira situação, a diferença provavelmente aconteceria a nível genômico, e não mais transcriptômico: ou seja, inferir-se-ia que as linhagens tolerantes possuiriam aquele determinado gene, que efetivamente foi expressado em ambas os tratamentos (temperaturas de secagem), enquanto que as linhagens não tolerantes não possuiriam aquele gene ativo e, por isso, ele não foi expressado sob nenhuma das duas condições.

Já na quarta situação, perceber-se-ia que as linhagens não tolerantes até possuiriam aquele determinado gene ativo, mas que ele não seria capaz de se expressar sob situações de estresse térmico, fato que não ocorreria nas linhagens tolerantes e, por isso, associar-se-ia tal gene à característica de tolerar altas temperaturas de secagem. E, finalmente, na quinta e última situação, ocorreria o inverso do que foi exposto na quarta: as linhagens não tolerantes manteriam a expressão daquele determinado gene sob condição de estresse térmico, mas as linhagens tolerantes não o fariam; neste tipo de comportamento, deduzir-se-ia que o gene em questão teria efetiva participação na aquisição de termotolerância, provavelmente como um “repressor de outro repressor” para tal característica, agindo, portanto, de maneira ativa para tal capacidade de suportar o estresse térmico.

Quadro 2 - Fotografia dos géis e correlação com a análise da mesma imagem efetuada pelo *software* ImageJ®, evidenciando a expressão diferenciada de dois genes codificantes para proteínas de choque térmico do milho (HSP 26 e HSP 70-74 A) em 6 linhagens (64, 63, 31, 91, 30 e 57) submetidas a duas temperaturas de secagem (35° C e 50° C), informações que serviram de base para a elaboração de um *heat-map*. (Continuação)



Quadro 2 - Fotografia dos géis e correlação com a análise da mesma imagem efetuada pelo *software* ImageJ®, evidenciando a expressão diferenciada de dois genes codificantes para proteínas de choque térmico do milho (HSP 26 e HSP 70-74 A) em 6 linhagens (64, 63, 31, 91, 30 e 57) submetidas a duas temperaturas de secagem (35° C e 50° C), informações que serviram de base para a elaboração de um *heat-map*. (Conclusão)



Fonte: Do autor (2018).

Para a elaboração do *heat-map*, considerou-se a avaliação visual dos géis (intensidade da banda analisada por meio de transiluminador UV), e também os resultados obtidos na análise pelo *software* ImageJ®, que contabilizou os *pixels* (número e intensidade) de cada imagem.

Conforme ilustrado no Quadro 2, que exemplifica os resultados oriundos da expressão de dois genes apenas (HSP 26 e HSP 70-74 A), procedeu-se a análise visual da fotografia dos géis de cada *primer* (num total de 42, sendo 37 relativos aos genes-alvo e cinco dos genes candidatos a referência), e a posterior correlação com a análise da mesma imagem efetuada pelo *software* ImageJ®. A partir deste conjunto de dados, construiu-se um *heat-map* (QUADRO 3).

A cor vermelha refere-se à ausência total de expressão do referido gene naquele tratamento, enquanto a cor verde-clara representa uma baixa expressão gênica, verificada pela baixa intensidade da banda no gel contendo 2% de agarose. Enquanto isto, o verde representa nível médio de expressão, e o verde-escuro refere-se ao alto nível de expressão daquele gene no tratamento correspondente.

Quadro 3 - *Heat-map* da etapa de avaliação prévia do polimorfismo, elaborado a partir da avaliação da expressão gênica de 42 genes em sementes de seis linhagens de milho, por meio das técnicas de PCR convencional e eletroforese em gel de agarose a 2%.

Grupos →	TOLERANTES						NÃO TOLERANTES					
	64		63		31		91		30		57	
	35° C	50° C	35° C	50° C	35° C	50° C	35° C	50° C	35° C	50° C	35° C	50° C
HSF 08												
HSF 12												
HSF 13												
HSP 16,9-17,2 A												
HSP 16,9-17,2 B												
HSP 16,9-17,2 C												
HSF 20												
HSP 101												
HSF 24												
HSP 26												
HSF 25												
HSF 05												
HSP 70-74 A												
HSP 70-74 B												
HSF 07												
HSP 90												
HSF 09												
DHN 1 (RAB 17)												
FDL 1												
HSF 02												
HSP 22												
HSF 14												
TIF 5A												
HSF 04												
LEA 14-A												
RAB 30 (LEA D-34)												
HSF 06												
HSF												
TUA 4 (Tub α-4)												
KIN 1												
DREB 2A-S												
HSF 03												
HSF 29												
sHSP 18 (=P23)												
LEA EMB 564												
Prot. Embr. DC-8												
HSF A-4d												
Actina												
β-Act.												
Tub.α-3												
ADH												
Ubiq.												

Fonte: Do autor (2018).

Diante disto, analisando-se o Quadro 3 mais detalhadamente, percebe-se que, dentre os 37 pares de *primers* avaliados, um par para cada acesso dos genes-alvos, 10 deles demonstraram polimorfismo interessante nas seis linhagens selecionadas para esta etapa, sendo os seguintes: sHSP 16,9-17,2 A; sHSP 16,9-17,2 B; HSP 101; sHSP 26; HSF 05; HSP 70-74 A; HSP 70-74 B; HSF 07; HSF 09; e RAB 30 (LEA D-34). Na avaliação dos genes sHSP 16,9-17,2 B e HSF 05, observaram-se níveis maiores de expressão no grupo das

linhagens não tolerantes à alta temperatura de secagem, enquanto que, no grupo daquelas tolerantes, tal expressão foi nula na maior parte dos tratamentos.

Este comportamento faz com que se levante a possibilidade destes genes serem indicadores da intolerância para aqueles genótipos que não suportem a aplicação destas altas temperaturas. Em outras palavras, as proteínas codificadas por estes genes poderiam agir como repressoras de algum mecanismo envolvido na cascata de eventos ocorrente no metabolismo de resposta a este tipo de estresse. A ausência de um padrão de mudança de expressão entre os tratamentos (35° C vs 50° C) já havia sido notada por outros autores, que encontraram, após a aplicação de temperaturas elevadas, perfis contrastantes, tais como: aumento da expressão da sHSP 16,9-17,2 B em plântulas (ALEXANDROV et al., 2009), na raiz, na folha e no caule (SUN et al., 2012), aumento significativo da expressão do HSF 05 nas folhas e raízes (LI et al., 2014a) e, contrariamente, diminuição da expressão deste mesmo gene em folhas (LIN et al., 2011).

Inversamente ao padrão verificado nestes últimos dois genes, a RAB 30, também conhecida como LEA D-34, evidenciou os maiores níveis de expressão justamente nos genótipos tolerantes às altas temperaturas de secagem, fazendo com que se possa inferir sobre a possibilidade daquela proteína, codificada por este gene, agir ativamente na aquisição da termotolerância nos referidos materiais. Este dado corrobora, em parte, com o trabalho que comprovou o acúmulo desta proteína em embriões retirados de sementes secas de milho, demonstrando, inclusive, uma enorme afinidade desta proteína com a HSP 101, sabidamente envolvida na aquisição desta termotolerância, donde se deduz que ambas participariam, juntas, do mecanismo de resposta ao estresse por altas temperaturas (LÁZARO-MIXTECO et al., 2012).

E, especificamente sobre a HSP 101, observou-se aumento na sua expressão após a aplicação da alta temperatura de secagem (50° C) em quatro dos genótipos testados, inclusive nas duas linhagens consideradas “mais tolerantes” a este tipo de estresse, a 64 e a 63. Este resultado coere com aqueles trabalhos que também notaram este aumento de expressão no embrião (KOLLIPARA et al., 2002; LÁZARO-MIXTECO et al., 2012), e no nó coleoptilar (LÓPEZ-FRÍAS et al., 2011) após aplicação do choque térmico, bem como identificaram um QTL próximo a este gene, com efeito dominante e aditivo para a tolerância às altas temperaturas de secagem (SALGADO et al., 2008). De modo análogo à situação anterior, também ficou evidenciado, para os genes sHSP 26 e HSP 70-74 B, aumento da expressão em quatro e cinco genótipos, respectivamente, dentre os seis analisados. Assim como a HSP 101, infere-se que as proteínas codificadas por estes dois genes participem de maneira efetiva no

mecanismo de resposta contra este tipo de estresse abiótico e, por conseguinte, na aquisição da característica de termotolerância.

Dados semelhantes foram observados por autores que estudaram, após exposição ao calor e/ou à seca, o perfil de expressão da sHSP 26 em plântulas (FREY et al., 2015) e em folhas (BENEŠOVÁ et al., 2012; HU et al., 2015a), assim como da HSP 70-74 B em plântulas (FREY et al., 2015).

De maneira parecida, mas com um padrão variando entre os grupos de genótipos (tolerantes vs não tolerantes), observou-se que a HSP 70-74-A teve aumento da expressão naquelas duas linhagens classificadas como “mais tolerantes” (64 e 63), ao passo que, nas duas principais linhagens não tolerantes (30 e 57), esta expressão diminuiu, sempre após a aplicação da alta temperatura de secagem (50° C) nestes materiais genéticos. Embora, neste caso, estas variações tenham sido um tanto quanto tênues, elas ratificam os resultados obtidos em outros trabalhos, os quais identificaram aumento na expressão deste gene em diversos tratamentos envolvendo calor excessivo (FREY et al., 2015; HU et al., 2010; SONG et al., 2016; WANG; FAN; HECKATHORN, 2014).

Quanto aos genes HSF 07 e HSF 09, ambos fatores de transcrição para determinadas proteínas de choque térmico, identificou-se um pequeno polimorfismo entre os tratamentos nas duas linhagens “mais tolerantes”. Contudo, neste caso houve uma redução na expressão de tais genes após o tratamento envolvendo a alta temperatura de secagem, fato que culmina numa disparidade quando comparado aos resultados de outro trabalho, que constatou aumento significativo, de 11 e 45 vezes, respectivamente, da expressão destes genes em folhas após sua exposição a estresse por calor (LIN et al., 2011).

E, inversamente a este último caso, observou-se aumento da expressão da sHSP 16,9-17,2 A naquelas duas linhagens “mais tolerantes” (64 e 63), bem como em uma das linhagens não-tolerantes (30). Este comportamento já havia sido noticiado em embriões e endosperma de sementes de milho (HUANG; MØLLER; SONG, 2012; WANG et al., 2014c). A afinidade desta proteína com outra importante na aquisição de termotolerância, a HSP 101, também confirma a possibilidade de sua participação efetiva no mecanismo de resposta às altas temperaturas de secagem (LÁZARO-MIXTECO et al., 2012).

Importante ressaltar que, considerando as seis linhagens avaliadas e os dez genes por meio dos quais se notou maior polimorfismo, observou-se que: a linhagem 64, classificada como a “mais tolerante” ao estresse por altas temperaturas, teve aumento na expressão de cinco genes, dentre os dez, após a aplicação da alta temperatura de secagem (50° C); em três

outros genes (coincidentalmente, os três HSF's). A expressão diminuiu, ao passo que os outros dois genes evidenciaram o mesmo nível de expressão em ambos os tratamentos.

No caso da linhagem 63, o comportamento foi parecido: quatro genes evidenciaram aumento de suas expressões após o tratamento envolvendo a secagem a 50° C, enquanto que dois genes tiveram queda neste perfil de expressão e, para os outros quatro genes, não foi observada mudança alguma. Para a linhagem 31, observou-se aumento na expressão de quatro genes, queda em outros três e, para os três restantes, o perfil de expressão não foi alterado entre os tratamentos. No caso da linhagem 91, observou-se a maior estabilidade entre os tratamentos: oito dos dez genes não demonstraram alteração no perfil de expressão após a aplicação da elevada temperatura de secagem (50° C); os outros dois genes tiveram aumento de suas expressões. Para a linhagem 30, notou-se aumento da expressão para quatro genes, diminuição para outros quatro genes, e ausência de mudança de perfil nos outros dois genes. Por fim, para a linhagem 57, considerada a “menos tolerante” ao estresse por altas temperaturas de secagem, o aumento da expressão foi observado em quatro dos dez genes, enquanto que um gene teve queda na expressão e os outros cinco não evidenciaram mudanças neste perfil entre os tratamentos.

Ainda no que diz respeito à avaliação de polimorfismo, e considerando os dois grupos de linhagens, houve um número maior de alterações no perfil de expressão entre os tratamentos no grupo das linhagens tolerantes às altas temperaturas de secagem, corroborando com a idéia de que estes materiais genéticos respondem mais efetivamente, no que diz respeito à ocorrência de mecanismos de resposta dentro de uma provável cascata de eventos, após a aplicação deste tipo de estresse térmico.

Deste modo, de acordo com o grau de polimorfismo apresentado, decidiu-se que estes dez genes mereciam ser avaliados numa próxima etapa (PCR em Tempo Real), que pudesse mensurar de uma maneira mais criteriosa os seus perfis de expressão em genótipos bastante contrastantes. E, para esta análise dos transcritos, foram selecionadas as linhagens 64 e a 63 como aquelas altamente tolerantes à alta temperatura de secagem aplicada em suas sementes, enquanto as linhagens 30 e 57 foram selecionadas no grupo das não tolerantes. Consequentemente, as linhagens 31 e 91, uma vez que demonstraram resultados fisiológicos e polimórficos mais medianos, foram excluídas desta próxima etapa.

Importante ressaltar que houve variações significativas em relação ao vigor das sementes da linhagem 91, considerada, em outras pesquisas, como tolerante à seca, ao frio e às altas temperaturas, sendo que a exposição a tais fatores de estresse ocorrera durante o

processo de germinação. Este contraste de resultados foi, inclusive, uma razão adicional para a linhagem 91 não ter sido selecionada para a etapa final desta pesquisa.

Outro ponto que merece destaque é o fato daqueles genes candidatos a atuarem como referência na etapa de RT-qPCR (Actina; β -Actina; Tubulina α -3; ADH; e Ubiquitina) terem demonstrado, durante a análise prévia de polimorfismo, níveis de expressão compatíveis com a sua condição de “genes-estáveis”; ou seja, não (ou pouco) variáveis de acordo com as linhagens e tratamentos, perfil exatamente contrário àquele que era buscado para os genes-alvo.

Em suma, para a seleção de genes e linhagens que seriam submetidos à etapa final do trabalho (mensuração da expressão gênica relativa, obtida pela análise transcriptômica efetuada por meio da técnica de RT-qPCR), foram considerados os resultados observados em todos os testes anteriores, desde aqueles fisiológicos até os de avaliação prévia do polimorfismo.

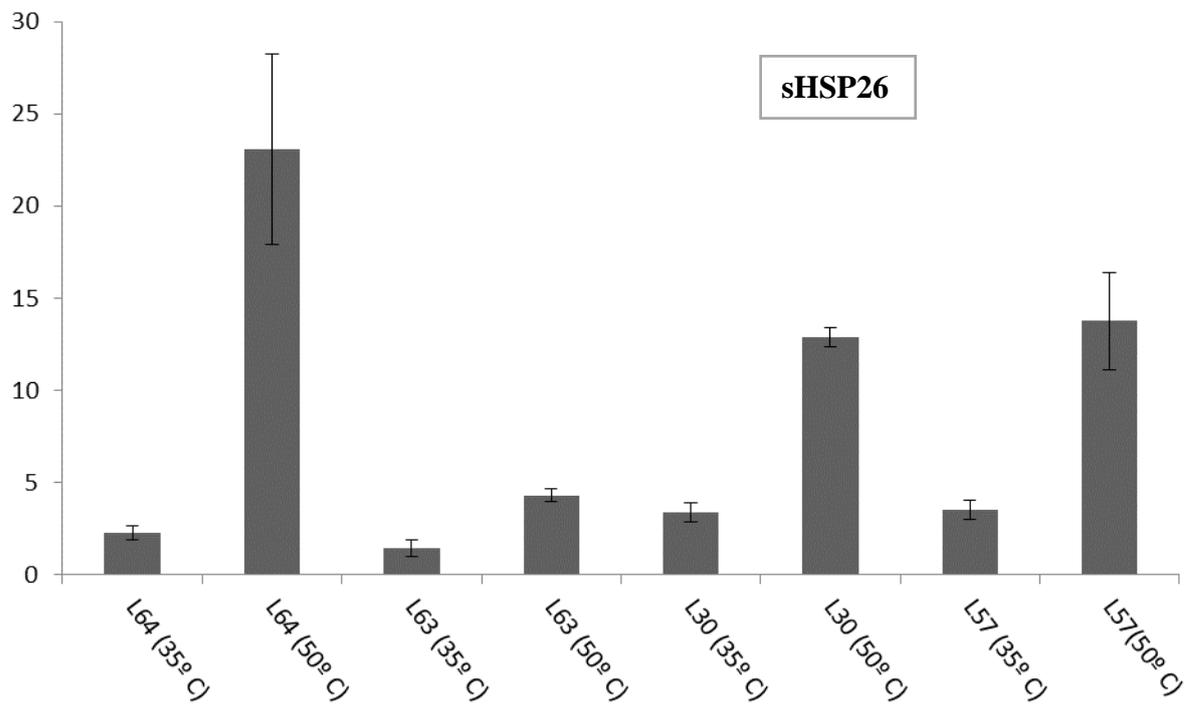
Os quinze pares de *primers*, pertinentes aos dez genes-alvos selecionados e aos cinco candidatos a genes referenciais, foram analisados, já se utilizando a técnica de PCR em Tempo Real (aparelho 7500[®] da Applied BioSystems), quanto à curva de eficiência na série de diluições (1:5, 1:25, 1:125, 1:625, 1:3125) do *pool* de cDNA's das quatro linhagens contrastantes (duas tolerantes: 64 e 63; duas não tolerantes: 30 e 57) sob os dois diferentes tratamentos (35° C e 50° C). Dentre estes quinze pares de *primers*, cinco deles, sendo três relacionados a genes-alvos (sHSP 26; HSP 70-74 A e HSP 70-74 B) e dois a genes candidatos a referência (ADH; e Ubiquitina), evidenciaram resultados satisfatórios nos testes de eficiência, atendendo às condições mínimas exigidas: pico único na curva de *Melting*, e eficiência variando dentro daquela faixa considerada ideal, entre 80% e 100%. Logo, estes genes puderam ter, enfim, suas expressões relativas calculadas nos referidos materiais e tratamentos.

Em relação à análise dos transcritos, realizada por meio da técnica de RT-qPCR, observou-se, no que diz respeito ao gene sHSP 26, aumento nos seus níveis de expressão nos dois grupos de linhagens (tolerantes: 64 e 63; e não tolerantes: 30 e 57), confirmando a hipótese de que a expressão deste gene é aumentada em condições de estresse sob altas temperaturas (BENEŠOVÁ et al., 2012; FREY et al., 2015; HU et al., 2015a). Contudo, o aumento da expressão deste gene na linhagem 64, classificada como tolerante, foi de mais de dez vezes naquelas sementes secadas a 50° C, quando comparada à expressão em sementes secadas a 35° C, enquanto que, nos demais materiais (63, 30, e 57), este aumento foi da ordem de três a quatro vezes (FIGURA 1).

Este fato decorre, provavelmente, da proteção que a sHSP 26 oferece aos cloroplastos sob condição demasiada de calor, otimizando a taxa de evolução de oxigênio do fotossistema II sob tal estresse térmico (HU et al., 2015a), haja vista que as pequenas proteínas de choque térmico (sHSP's) são expressas nos diversos compartimentos celulares (KLEIN et al., 2014; MORROW; HEIKKILA; TANGUAY, 2006).

E acumulam-se em maior grau naqueles genótipos tolerantes à seca e ao estresse por calor em diversas outras culturas, como no trigo (SALEKDEH; KOMATSU, 2007) e em *Arabidopsis thaliana* (TAYLOR et al., 2009), inclusive por agirem protegendo outras proteínas funcionais contra a desnaturação e/ou facilitando a desnaturação de proteínas deformadas.

Figura 1- Expressão do gene sHSP 26 em sementes de linhagens de milho secadas a 35°C e a 50°C. UFLA, Lavras, 2018.



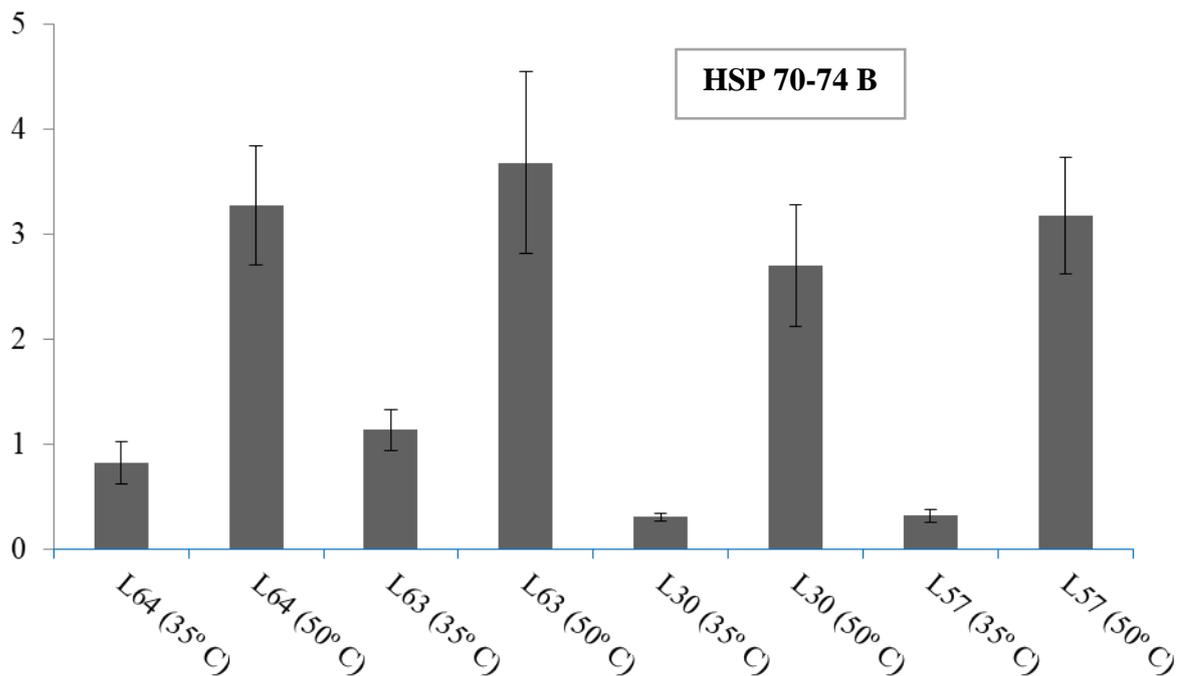
Fonte: Do autor (2018).

Na Figura 2, está representada a expressão do gene HSP 70-74 B. Para este gene, também houve aumento significativo dos níveis de expressão, quando as sementes foram secadas a 50° C, em todos os materiais analisados. Neste caso, ressalta-se que os níveis de expressão não apresentaram diferenças significativas entre os quatro genótipos (64, 63, 30, e 57) após estes terem sido submetidos à secagem a 50° C. Entretanto, quando a secagem foi realizada a 35° C, os maiores valores de expressão foram observados em sementes das

linhagens classificadas como tolerantes (64 e 63), valores estes significativamente maiores que os observados em sementes das linhagens 30 e 57, não tolerantes à alta temperatura de secagem. Estes resultados corroboram com a tese de que a exposição de sementes de milho a situações de estresse térmico induz ao aumento da expressão do gene HSP 70-74 B. (FREY et al., 2015; HU et al., 2010; LIU et al., 2014; WANG et al., 2014a; ZHAO et al., 2012).

Assim, o gene HSP 70-74 B estaria relacionado ao metabolismo de resposta a diversas fontes de estresses abióticos, como variação de temperatura, salinidade, desidratação (FREY et al., 2015), aumento na concentração de CO₂ atmosférico (WANG et al., 2014a), encharcamento (LIU et al., 2014) e danos oxidativos induzido por nanopartículas tóxicas (ZHAO et al., 2012), enfatizando a hipótese de que as plantas exibiriam situações de "crosstalk" em situações de exposição a diversos tipos de estresses abióticos, de maneira que uma via de transdução de sinal afeta outra dentro de um complexo "sistema de sinalização em cascata", havendo a presença de componentes partilhados interagindo em cada uma destas vias no mecanismo de resposta a tais estresses (HUANG; SONG, 2013).

Figura 2 - Expressão do gene HSP 70-74 B em sementes de linhagens de milho secadas a 35°C e a 50°C. UFLA, Lavras, 2018.

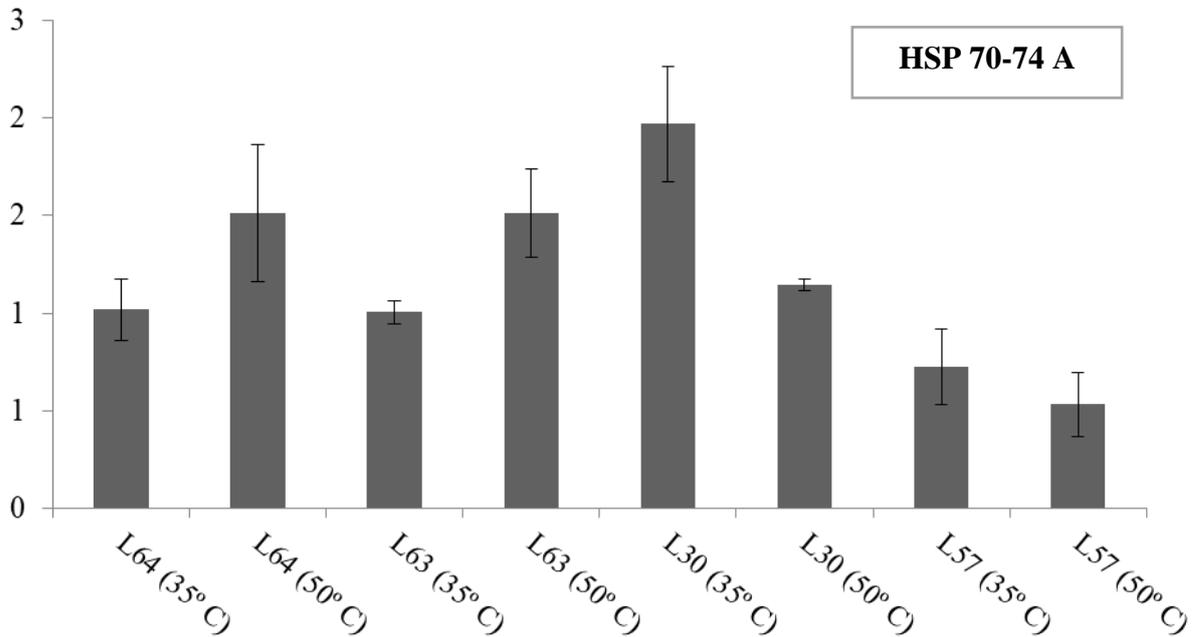


Fonte: Do autor (2018).

Para o gene 70-74 A, quando as sementes foram secadas a 50° C, houve aumento dos valores de expressão nos materiais classificados como tolerantes (64 e 63), comparados

àqueles observados em sementes secadas a 35° C, sendo este valor significativo para a linhagem 63. Por outro lado, para as linhagens não tolerantes à alta temperatura de secagem (no caso, 30 e 57), houve redução desta expressão, sendo tal valor significativo para a linhagem 30. Assim, infere-se que a expressão deste gene está diretamente ligada à aquisição de termotolerância em sementes de milho (FREY et al., 2015).

Figura 3 - Expressão do gene HSP 70-74 A em sementes de linhagens de milho secadas a 35°C e a 50°C. UFLA, Lavras, 2018.



Fonte: Do autor (2018).

Ressalta-se, aqui, a tese de que o aumento ou diminuição na expressão de um gene, em relação a outro que também contribua para aquela característica, não significa, necessariamente, que aquele gene seja menos ou mais importante para a característica estudada do que o outro. Afinal, estes genes podem desempenhar funções distintas dentro de uma cascata de eventos de resposta ao estresse.

Diante do que foi estudado e avaliado neste trabalho e, principalmente, levando-se em consideração que tal característica abordada, tolerância a altas temperaturas de secagem, é poligênica, faz-se necessária a avaliação da expressão de um número maior de genes.

5 CONCLUSÕES

Houve maior expressão dos genes HSP 26 e HSP 70-74 B em sementes das linhagens de milho após secagem a 50°C, independente do grau de tolerância à alta temperatura de secagem.

Houve maior expressão do gene HSP 70-74 A, quando as sementes foram secadas à 50°C, nas linhagens tolerantes (64 3 63) à altas temperatura imposta.

Houve menor expressão do gene HSP 70-74 A, quando as sementes foram secadas à 50°C, para as linhagens não tolerantes (30 e 57).

REFERÊNCIAS

- ABREU, V. M. et al. Heat-resistant protein expression during germination of maize seeds under water stress. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, 2016.
- AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; GROVER, A. Plant Hsp100 proteins: Structure, function and regulation. **Plant Science**, v. 163, n. 3, p. 397–405, 2002.
- ALEXANDROV, N. N. et al. Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing. **Plant Molecular Biology**, v. 69, n. 1–2, p. 179–194, 2009.
- AMARA, I. et al. Insights into maize LEA proteins: From proteomics to functional approaches. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 2, p. 312–329, 2012.
- ANDRADE, T. et al. Physiological quality and gene expression related to heat-resistant proteins at different stages of development of maize seeds. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 3630–3642, 2013.
- ASHRAF, M. Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 1, p. 169–183, 2010.
- BATTAGLIA, M. et al. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. **Plant Physiology**, v. 148, n. 1, p. 6–24, 2008.
- BENEŠOVÁ, M. et al. The physiology and proteomics of drought tolerance in maize: early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration? **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38017, jan. 2012.
- BERJAK, P. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. **Seed Science Research**, v. 16, n. 1, p. 1–15, 2006.
- BIES-ETHÈVE, N. et al. Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 67, n. 1–2, p. 107–124, 2008.
- BOROVSKII, G. B. et al. Accumulation of dehydrin-like-proteins in the mitochondria of cold-treated plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 156, n. 5–6, p. 797–800, 2000.
- BOROVSKII, G. B. et al. Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. **BMC Plant Biology**, v. 2, 2002.
- BRAY, E. A. Molecular and physiological responses to water-deficit stress. In: **Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops**. [s.l.: s.n.]. p. 121–140.
- BRINI, F. et al. Functional characterization of DHN-5, a dehydrin showing a differential phosphorylation pattern in two Tunisian durum wheat (*Triticum durum* Desf.) varieties with marked differences in salt and drought tolerance. **Plant Science**, v. 172, n. 1, p. 20–28, jan. 2007.

CAMPBELL, S. A.; CLOSE, T. J. Dehydrins: Genes, proteins, and associations with phenotypic traits. **New Phytologist**, v. 137, n. 1, p. 61–74, 1997.

CAO, Z. et al. Constitutive expression of ZmsHSP in Arabidopsis enhances their cytokinin sensitivity. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 2, p. 1089–1097, 2010.

CHEN, J. et al. Role of phosphatidic acid in high temperature tolerance in maize. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p. 2506–2515, 2010.

CHEN, X. et al. Expression and interaction of small heat shock proteins (sHsps) in rice in response to heat stress. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 4, p. 818–828, 2014.

CROWE, J. H.; CARPENTER, J. F.; CROWE, L. M. **The role of vitrification in anhydrobiosis** *Annual Review of Physiology*, 1998. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0031953362&partnerID=40&md5=57f09111b0cc2f9737506bb9fead311a>

DANYLUK, J. et al. Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. **Plant Cell**, v. 10, n. 4, p. 623–638, 1998.

DINLER, B. S.; DEMIR, E.; KOMPE, Y. O. Regulation of auxin, abscisic acid and salicylic acid levels by ascorbate application under heat stress in sensitive and tolerant maize leaves. **Acta Biologica Hungarica**, v. 65, n. 4, p. 469–480, 2014.

DUTRA, S. M. F. **Expressão de genes relacionados à tolerância a altas temperaturas**. 2014.

FREIDIN, S. et al. **Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing**. p. 179–194, 2009.

FREY, F. P. et al. Genome-wide expression profiling and phenotypic evaluation of European maize inbreds at seedling stage in response to heat stress. **BMC genomics**, v. 16, p. 123, 2015.

GU, L. et al. Functional analysis of the 5' regulatory region of the maize GALACTINOL SYNTHASE2 gene. **Plant Science**, v. 213, p. 38–45, 2013.

GU, L. et al. ZmGOLS2, a target of transcription factor ZmDREB2A, offers similar protection against abiotic stress as ZmDREB2A. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 1–2, p. 157–170, 2016.

GUO, M. et al. The plant heat stress transcription factors (HSFS): Structure, regulation, and function in response to abiotic stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. FEB2016, 2016.

GUO, X. et al. Pyrophosphate-dependent fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase induction and attenuation of Hsp gene expression during endosperm modification in Quality Protein Maize. **Plant Physiology**, v. 158, n. 2, p. 917–929, 2012.

GUPTA, M. L.; GEORGE, D. L.; PARWATA, I. G. M. A. Effect of harvest time and drying

on supersweet sweet corn seed quality. **Seed Science and Technology**, v. 33, n. 1, p. 167–176, 2005.

HALPERIN, S. J.; KOSTER, K. L. Sugar effects on membrane damage during desiccation of pea embryo protoplasts. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 10, p. 2303–2311, 2006.

HAND, S. C. et al. **LEA proteins during water stress: Not just for plants anymore** **Annual Review of Physiology**, 2011. Disponível em:
<<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-79951782916&partnerID=40&md5=7e17a31786932c8410cf776f6cb09a38>>

HARRIGAN, G. G. et al. The forage and grain of MON 87460, a drought-tolerant corn hybrid, are compositionally equivalent to that of conventional corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 20, p. 9754–9763, 2009.

HU, X. et al. Heat shock protein 70 regulates the abscisic acid-induced antioxidant response of maize to combined drought and heat stress. **Plant Growth Regulation**, v. 60, n. 3, p. 225–235, 2010.

HU, X. et al. Protein sHSP26 improves chloroplast performance under heat stress by interacting with specific chloroplast proteins in maize (*Zea mays*). **Journal of Proteomics**, v. 115, p. 81–92, 2015a.

HU, X.-W. et al. Genome-wide analysis of the BSKs gene family in maize (*Zea mays*). **Zhiwu Shengli Xuebao/Plant Physiology Journal**, v. 51, n. 4, p. 528–536, 2015b.

HUANG, H.; MØLLER, I. M.; SONG, S.-Q. Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 4, p. 1247–1262, 2012.

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**, v. 68, p. 61–70, 2013.

HUANG, Z.; BANTON, M. C.; TUNNACLIFFE, A. Modeling anhydrobiosis: Activation of the mitogen-activated protein kinase ERK by dehydration in both human cells and nematodes. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 313 A, n. 10, p. 660–670, 2010.

HUNDERTMARK, M.; HINCHA, D. K. LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Genomics**, v. 9, 2008.

IRAR, S. et al. Towards the identification of late-embryogenic-abundant phosphoproteome in *Arabidopsis* by 2-DE and MS. **Proteomics**, v. 6 Suppl 1, 2006.

IZLI, N.; ISIK, E. Determination of economic cost, vigour and rate of germination in batch drying of maize seeds. **International Agrophysics**, v. 24, n. 1, p. 93–96, 2010.

JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, A. S. et al. Functional and structural analysis of maize Hsp101 IRES. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.

JOSÉ, S. C. B. R. et al. **GENETIC CONTROL OF CORN SEEDS TOLERANCE TO HIGH**. p. 414–428, 2004.

KLEIN, R. D. et al. Chaperone function of two small heat shock proteins from maize. **Plant Science**, v. 221–222, p. 48–58, 2014.

KOAG, M.-C. et al. The K-segment of maize DHN1 mediates binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes. **Plant Physiology**, v. 150, n. 3, p. 1503–1514, 2009.

KOLLIPARA, K. P. et al. **Expression Profiling of Reciprocal Maize Hybrids Divergent for Cold Germination and Desiccation Tolerance**. v. 129, p. 974–992, 2002.

LANGRIDGE, P.; PALTRIDGE, N.; FINCHER, G. Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 4, n. 4, p. 343–354, 2006.

LARKINDALE, J.; VIERLING, E. **Core Genome Responses Involved in Acclimation to**. v. 146, p. 748–761, 2008.

LÁZARO-MIXTECO, P. E. et al. The absence of heat shock protein HSP101 affects the proteome of mature and germinating maize embryos. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 6, p. 3246–3258, 2012.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, v. 3, n. 4, p. 231–246, 1993.

LI, H.-C. et al. Cloning, localization and expression analysis of zmhsf-like gene in zea mays. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, n. 6, p. 1230–1238, 2014a.

LI, H.-C. et al. Expression of maize heat shock transcription factor gene ZmHsf06 enhances the thermotolerance and drought-stress tolerance of transgenic Arabidopsis. **Functional Plant Biology**, v. 42, n. 11, p. 1080–1091, 2015.

LI, P.-S. et al. Genome-wide analysis of the Hsf family in soybean and functional identification of GmHsf-34 involvement in drought and heat stresses. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, 2014b.

LI, Q.; LIU, B. Genetic regulation of maize flower development and sex determination. **Planta**, n. 61, 2017.

LI, Y.-F. et al. Transcriptome analysis of heat stress response in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). **BMC Plant Biology**, v. 13, n. 1, 2013.

LIN, Y.-X. et al. Genome-wide identification, classification and analysis of heat shock transcription factor family in maize. **BMC Genomics**, v. 12, 20. **BMC Genomics**, v. 12, 2011.

LIU, M. Y. et al. Spermidine enhances waterlogging tolerance via regulation of antioxidant

defence, heat shock protein expression and plasma membrane H⁺-ATPase activity in *Zea mays*. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 200, n. 3, p. 199–211, 2014.

LIU, T. et al. Identification of proteins regulated by ABA in response to combined drought and heat stress in maize roots. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 2, p. 501–513, 2013a.

LIU, Y. et al. ZmLEA3, a multifunctional group 3 LEA protein from maize (*Zea mays* L.), is involved in biotic and abiotic stresses. **Plant and Cell Physiology**, v. 54, n. 6, p. 944–959, 2013b.

LÓPEZ-FRÍAS, G. et al. Role of HSP101 in the stimulation of nodal root development from the coleoptilar node by light and temperature in maize (*Zea mays* L.) seedlings. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 13, p. 4661–4673, 2011.

MISHRA, R. C. et al. Characterization of 5'UTR of rice ClpB-C/Hsp100 gene: evidence of its involvement in post-transcriptional regulation. **Cell Stress and Chaperones**, v. 21, n. 2, p. 271–283, 2016.

MISHRA, R. C.; GROVER, A. ClpB/Hsp100 proteins and heat stress tolerance in plants. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 862–874, 2016.

MORROW, G.; HEIKKILA, J. J.; TANGUAY, R. M. Differences in the chaperone-like activities of the four main small heat shock proteins of *Drosophila melanogaster*. **Cell Stress and Chaperones**, v. 11, n. 1, p. 51–60, 2006.

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**, v. 43, n. 8, p. 861–870, 2016.

NOVER, L. et al. Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: How many heat stress transcription factors do we need? **Cell Stress and Chaperones**, v. 6, n. 3, p. 177–189, 2001.

OLIVEIRA, E. et al. LC-MS/MS identification of *Arabidopsis thaliana* heat-stable seed proteins: Enriching for LEA-type proteins by acid treatment. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, n. 11, p. 1485–1495, 2007.

RIERA, M. et al. Protein kinase CK2 modulates developmental functions of the abscisic acid responsive protein Rab17 from maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 26, p. 9879–9884, 2004.

RISTIC, Z. et al. A maize mutant with decreased capacity to accumulate chloroplast protein synthesis elongation factor (EF-Tu) displays reduced tolerance to heat stress. **Plant Science**, v. 167, n. 6, p. 1367–1374, 2004.

RISTIC, Z. et al. Chloroplast protein synthesis elongation factor, EF-Tu, reduces thermal aggregation of rubisco activase. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 12, p. 1564–1571, 2007.

RORAT, T. Plant dehydrins - Tissue location, structure and function. **Cellular and**

Molecular Biology Letters, v. 11, n. 4, p. 536–556, 2006.

SALEKDEH, G. H.; KOMATSU, S. Crop proteomics: Aim at sustainable agriculture of tomorrow. **Proteomics**, v. 7, n. 16, p. 2976–2996, 2007.

SALGADO, K. C. et al. Mapping of quantitative trait locus associated with maize tolerance to high seed drying temperature. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 7, n. 4, p. 1319–1326, 2008.

SCHARF, K.-D. et al. The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1819, n. 2, p. 104–119, 2012.

SEKI, M. et al. Transcriptome analysis of plant drought and salt stress response. In: **Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops**. [s.l.: s.n.]. p. 261–283.

SETIAWAN, S. et al. Effects of Drying Conditions of Corn Kernels and Storage at an Elevated Humidity on Starch Structures and Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 23, p. 12260–12267, 2010.

SHIH, M. -D.; HOEKSTRA, F. A.; HSING, Y.-I. C. **Chapter 4 Late Embryogenesis Abundant Proteins** **Advances in Botanical Research**, 2008. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-57149119064&partnerID=40&md5=fe630149ff39098e346350a0f19cb404>>

SILVA NETA, I. C. **Expressão de genes relacionados à tolerância à baixa temperatura de germinação em sementes de milho**. 2014.

SONG, J. et al. Cloning and expression analysis of the Hsp70 gene ZmERD2 in zea mays. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 30, n. 2, p. 219–226, 2016.

SONG, L.; JIANG, Y.; ZHAO, H. **Acquired thermotolerance in plants**. 2012.

SUN, L. et al. ZmHSP16.9, a cytosolic class I small heat shock protein in maize (*Zea mays*), confers heat tolerance in transgenic tobacco. **Plant Cell Reports**, v. 31, n. 8, p. 1473–1484, 2012.

SUN, L.-X. et al. The effects of grain texture and phenotypic traits on the thin-layer drying rate in maize (*Zea mays* L.) inbred lines. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 2, p. 317–325, 2016.

TAYLOR, N. L. et al. Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 3, p. 367–378, 2009.

TOSONI, K. et al. The p23 co-chaperone protein is a novel substrate of CK2 in *Arabidopsis*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 356, n. 1–2, p. 245–254, 2011.

TUNNACLIFFE, A.; WISE, M. J. The continuing conundrum of the LEA proteins.

Naturwissenschaften, v. 94, n. 10, p. 791–812, 2007.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: A review. **Amino Acids**, v. 35, n. 4, p. 753–759, 2008.

WANG, C. et al. Purification, characterization and safety assessment of the introduced cold shock protein B in DroughtGard™ maize. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 71, n. 2, p. 164–173, 2015.

WANG, D. et al. Effects of CO₂ on the tolerance of photosynthesis to heat stress can be affected by photosynthetic pathway and nitrogen. **American Journal of Botany**, v. 101, n. 1, p. 34–44, 2014a.

WANG, D.; FAN, J.; HECKATHORN, S. A. Acclimation of photosynthetic tolerance to acute heat stress at elevated CO₂ and N. **Plant Science**, v. 226, p. 162–171, 2014.

WANG, P. et al. Epigenetic changes are associated with programmed cell death induced by heat stress in seedling leaves of zea mays. **Plant and Cell Physiology**, v. 56, n. 5, p. 965–976, 2014b.

WANG, W.-Q. et al. Proteomic comparison between maturation drying and prematurely imposed drying of zea mays seeds reveals a potential role of maturation drying in preparing proteins for seed germination, seedling vigor, and pathogen resistance. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 2, p. 606–626, 2014c.

WATERS, E. R. The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 2, p. 391–403, 2013.

WECKWERTH, P.; EHLERT, B.; ROMEIS, T. ZmCPK1, a calcium-independent kinase member of the Zea maysCDPK gene family, functions as a negative regulator in cold stress signalling. **Plant, Cell and Environment**, v. 38, n. 3, p. 544–558, 2015.

WU, X. et al. Proteomic analysis reveals differential accumulation of small heat shock proteins and late embryogenesis abundant proteins between ABA-deficient mutant vp5 seeds and wild-type Vp5 seeds in maize. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. JAN, p. 1–18, 2015.

XING, X. et al. Overexpression of a maize dehydrin gene, ZmDHN2b, in tobacco enhances tolerance to low temperature. **Plant Growth Regulation**, v. 65, n. 1, p. 109–118, 18 mar. 2011.

XU, Z.-S. et al. Heat shock protein 90 in plants: Molecular mechanisms and roles in stress responses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 15706–15723, 2012.

YANG, Z. et al. Adaptive evolution and divergent expression of heat stress transcription factors in grasses. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, n. 1, 2014.

ZHANG, Y.; ZHOU, X. Quality evaluation and parameter selection of maize by hot-air and vacuum drying. **Nongye Gongcheng Xuebao/Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering**, v. 26, n. 3, p. 346–352, 2010.

ZHAO, L. et al. Stress response and tolerance of *Zea mays* to CeO₂ nanoparticles: Cross talk among H₂O₂, heat shock protein, and lipid peroxidation. **ACS Nano**, v. 6, n. 11, p. 9615–9622, 2012.

ZHAO, Y. A. N. G. et al. Identification and characterization of the RCI2 gene family in maize (*Zea mays*). **Journal of Genetics**, v. 93, n. 3, p. 655–666, 2014.