



SOPHIA MANGUSSI FRANCHI DUTRA

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À
TOLERÂNCIA A ALTAS TEMPERATURAS
DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES
DE MILHO**

LAVRAS – MG

2014

SOPHIA MANGUSSI FRANCHI DUTRA

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À TOLERÂNCIA A ALTAS
TEMPERATURAS DE GERMINAÇÃO EM SEMENTES DE MILHO**

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

Orientadora

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Dutra, Sophia Mangussi Franchi.

Expressão de genes relacionados à tolerância à altas temperaturas durante a germinação em sementes de milho / Sophia Mangussi Franchi Dutra. – Lavras : UFLA, 2014.

67 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras,
2014.

Orientador: Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Bibliografia.

1. RT-qPCR. 2. Proteômica. 3. Estresse abiótico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.1523

SOPHIA MANGUSSI FRANCHI DUTRA

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À TOLERÂNCIA A ALTAS
TEMPERATURAS DE GERMINAÇÃO EM SEMENTES DE MILHO**

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

APROVADA em 31 de julho de 2014.

Dr. João Almir Oliveira

(UFLA)

Pesquisadora Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa

(EMBRAPA)

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

Orientadora

LAVRAS - MG

2014

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que eu chegasse até aqui. Por estar em todos os momentos comigo e nunca me abandonar.

Às famílias Mangussi e Franchi Dutra pelo apoio e atenção.

Aos meus pais, minha gratidão e amor eterno, pela confiança e dedicação.

A minha orientadora, Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, por toda atenção, dedicação, ensinamento e competência.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura, em especial ao Setor de Sementes, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro, respectivamente.

Aos membros do comitê de orientação, Prof. Renato Mendes Guimarães, Pesquisador Adriano Delly Veiga, Prof. Renzo Garcia Von Pinho e Profa. Heloisa Oliveira dos Santos, pela disposição sempre que precisei.

Aos professores do setor de Sementes, Prof. Renato Mendes Guimarães, Profa. Maria Laene Moreira de Carvalho e Prof. João Almir Oliveira, exemplos de ética e dedicação e por contribuírem sempre com meu aprendizado.

Aos membros da banca examinadora, Prof. João Almir Oliveira e a Pesquisadora Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa, pelas valiosas contribuições.

Aos estagiários, bolsistas de iniciação científica e BIC-junior's, por todo auxílio e dedicação na condução dos experimentos.

Em especial à aluna Aline Caroline Lima.

Aos funcionários do Laboratório de Sementes, Elenir, Elza, Viviane, Cláudio e Antonio pelo auxílio na execução dos experimentos e disponibilidade.

Aos amigos do setor de Sementes e demais colegas da pós-graduação pelo companheirismo durante esses anos em Lavras, em especial às amigas Izabel Costa Neta e Tatiana Fantazzini, que sempre estiveram ao meu lado tanto no que se refere à execução do trabalho, quanto na vida pessoal.

Aos amigos de todas as horas: Tati, Natássia, Bel, Vivi, Samira, Ste, Cris, Rebeca, Elise, Tatão, Lívia e Rayana pela paciência, amizade, carinho, companheirismo em todos os momentos e por tornarem meus dias mais alegres e ternos.

Aos membros do NESem, pela amizade e contribuição profissional.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para que essa fase da minha vida fosse tão abençoada e especial, **MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

Em regiões quentes é importante a utilização de cultivares que sejam tolerantes a altas temperaturas, principalmente nas fases de germinação e emergência de plântulas. Assim, a identificação de genes relacionados à tolerância ao calor é fundamental para o desenvolvimento de sementes de alta qualidade tolerantes a essa condição de estresse. Objetivou-se com a pesquisa avaliar linhagens de milho e a expressão de genes envolvidos à tolerância a altas temperaturas durante a germinação por meio de testes fisiológicos, além de análises proteômica e transcriptômica. Foram utilizadas sementes de seis linhagens de milho com diferentes níveis de tolerância a altas temperaturas, sendo três classificadas como tolerantes e três apresentando baixa tolerância a altas temperaturas de germinação. Na análise proteômica foi avaliada a expressão das proteínas resistentes ao calor, e das enzimas catalase, esterase, superóxido dismutase e α -amilase. Foi estudada a expressão dos genes AOX1, AOX2, ZmAN-13, ZmDBP2, *late embryogenesis abundant protein* e *late embryogenesis abundant protein* D-34. Pode-se concluir que as linhagens 54 e 91 são mais tolerantes à condição de altas temperaturas; ocorre maior expressão da enzima α -amilase em sementes de milho submetidas à deterioração controlada, para as linhagens 30 e 91; com a deterioração controlada a maior expressão dos genes não se relaciona de maneira positiva com os materiais tolerantes; ocorre associação da menor expressão dos genes envolvidos nos sistemas de proteínas resistentes ao calor com a linhagem 44, sendo esta mais suscetível às altas temperaturas e que ocorre maior expressão dos genes *Lea* D34, ZmAN13 e AOX 1 na linhagem 64, quando as sementes foram submetidas à deterioração controlada.

Palavras-chave: RT-qPCR. Proteômica. Estresse abiótico.

ABSTRACT

In hot regions it is important to use cultivars that are tolerant to high temperatures, especially in the stages of germination and seedling emergence. Thus, the genes identification related to heat tolerance is fundamental to the development of high quality seeds tolerant to this stress condition. The objective of the research was to evaluate maize lineages and the genes expression involved to tolerance to high temperatures during germination by physiological tests, as well as proteomics and transcriptomics analysis. Seeds of six maize lineages with different levels of tolerance to high temperatures were used, three being classified as tolerant and three had low tolerance to high temperatures for germination. In proteomic analysis evaluated the expression of resistant-protein to heat, and of the enzymes catalase, esterase, superoxide dismutase and α -amylase. The genes expression AOX1, AOX2, ZmAN-13, ZmDBP2, *late embryogenesis abundant protein* and *late embryogenesis abundant protein D-34* was studied. It can be concluded that lineages 54 and 91 are more tolerant to high temperature condition; occurs increased enzyme expression α -amylase in corn seeds subjected to controlled damage to the lineages 30 and 91; with controlled deterioration the highest expression of genes does not correlate positively with the tolerant materials; association of lower expression of genes involved in heat-resistant protein systems with lineage 44, this being more susceptible to high temperatures and occurs increased gene expression Lea D34, ZmAN13 and AOX 1 in lineage 64, when the seeds were subjected to controlled deterioration.

Keywords: RT-qPCR. Proteomics. Abiotic stress.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	A importância da cultura do milho	12
2.2	Aspectos fisiológicos relacionados à tolerância ao calor	13
2.3	Expressão Gênica	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Local	24
3.2	Seleção de linhagens quanto à tolerância a altas temperaturas durante a germinação	24
3.3	Multiplicação das sementes de seis linhagens contrastantes em relação à tolerância a altas temperaturas de germinação	24
3.4	Avaliação da qualidade física e fisiológica das sementes de milho ..	25
3.4.1	Avaliação da qualidade fisiológica das sementes de milho em relação a diferentes temperaturas durante a germinação	25
3.4.1.1	Teor de água	25
3.4.1.2	Teste de germinação em diferentes temperaturas	26
3.4.1.3	Índice de velocidade de germinação	26
3.4.2	Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho submetidas ao teste de deterioração controlada	27
3.4.2.1	Deterioração Controlada	27
3.4.2.2	Comprimento e matéria seca da parte aérea e sistema radicular ..	28
3.5	Análise proteômica por meio da técnica de eletroforese	28
3.5.1	Proteínas resistentes ao calor	29
3.5.2	Enzima alfa amilase	29
3.5.3	Enzimas catalase, esterase e superóxido dismutase	30

3.6	Análise de transcritos de genes relacionados à tolerância ao calor por meio da técnica de qRT-PCR.....	30
3.6.1	Extração e Purificação do RNA.....	31
3.6.2	Transcrição reversa para síntese do cDNA.....	31
3.6.3	Desenho dos <i>primers</i>.....	32
3.7	Análise estatística.....	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1	Análise fisiológica de sementes de milho em diferentes temperaturas de germinação.....	35
4.2	Análise fisiológica de sementes de milho submetidas ao teste de deterioração controlada.....	40
4.3	Análise proteômica.....	46
4.4	Análise transcriptômica.....	54
4.5	Considerações gerais.....	61
5	CONCLUSÕES.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63
	ANEXOS.....	70

1 INTRODUÇÃO

O milho é um dos cereais mais cultivados no mundo e no Brasil, ocupa a segunda posição em área plantada, sendo esta de 15,41 milhões de hectares (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2013). Essa cultura pode ser utilizada de diversas formas, que vão desde o consumo *in natura* até a indústria de alta tecnologia.

Devido à importância econômica dessa cultura é crescente a demanda por sementes de milho com alta qualidade, e com características genéticas que confirmam adaptação às diversas condições climáticas durante o seu ciclo.

Uma das fases críticas para o estabelecimento da cultura de milho é a germinação de sementes, sendo que altas temperaturas durante a germinação podem afetar de maneira negativa o desenvolvimento das plântulas. Nessas condições tem sido observada menor expressão de enzimas relacionadas à germinação, danos às membranas celulares, menor eficiência do uso de carboidratos armazenados. Assim, em regiões quentes, é necessária a utilização de cultivares que sejam tolerantes às altas temperaturas, principalmente nas fases de germinação e emergência de plântulas.

A identificação dos genes relacionados à tolerância ao calor é fundamental para a seleção de cultivares que apresentam sementes tolerantes a essa condição de estresse nas fases iniciais de desenvolvimento da planta.

Em respostas das plantas a estresses causados pelas diferenças de temperatura durante a germinação ocorre a expressão de genes associados a esta característica, as quais podem ser utilizadas em programas de melhoramento. Tais eventos vêm sendo relacionados a alguns genes a exemplo daqueles que controlam a expressão de proteínas resistentes ao calor, pertencente à família LEA, bem como aos genes pertencentes à família AOX, ZnF-AN1 e DREBs.

A determinação qualitativa e quantitativa dos níveis de transcritos de células vegetais permite que genes, diferencialmente expressos possam ser identificados, e conseqüentemente, sua função metabólica possa ser investigada (KUHN, 2001). Nesse contexto a técnica de PCR Quantitativo em Tempo Real tem sido utilizada para a análise da expressão gênica em plantas, facilitando o entendimento de genes associados à qualidade fisiológica de sementes (FERREIRA et al., 2010).

Diante disso, objetivou-se nesta pesquisa avaliar linhagens de milho e a expressão de genes envolvidos à tolerância a altas temperaturas durante a germinação por meio de testes fisiológicos, além de análises proteômica e transcriptômica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A importância da cultura do milho

O milho é o cereal de maior volume de produção no mundo, com aproximadamente 960 milhões de toneladas, sendo que o Brasil é o terceiro maior produtor e o segundo maior exportador mundial.

O cultivo do milho ocorre em regiões com ampla diversidade climática. No Brasil o milho é cultivado principalmente nas regiões Sul e Centro-Oeste cuja amplitude térmica anual é relativamente alta. No estado do Paraná, a amplitude térmica anual varia entre 12°C e 13°C. Já no estado do Mato Grosso a variação é entre 24°C e 26°C ao ano.

Na região Centro-Sul brasileira tem sido observada a expansão da área cultivada com milho safrinha, cuja semeadura ocorre, extemporaneamente, de janeiro a abril, quase sempre depois da soja precoce. Esse sistema de plantio, feito fora da época normal e em condições climáticas desfavoráveis, se tornou componente fundamental das cadeias produtivas que têm na produção e no consumo do milho um item importante. Nas regiões aptas a esse cultivo, o planejamento da safrinha de milho deve ser iniciado já no planejamento da cultura anterior, de modo a propiciar a semeadura na época de maior probabilidade de sucesso, considerando as necessidades hídricas e térmicas das plantas. A escolha correta das cultivares a serem utilizadas, principalmente considerando ciclo e adaptação a esse período de cultivo, é também fundamental para garantir o sucesso do empreendimento.

Um dos entraves para o desenvolvimento da cultura do milho safrinha é a semeadura sob altas temperaturas, o que exige a seleção de genótipos que apresentam sementes com tolerância a altas temperaturas durante o processo de germinação. Parece existir importante diversidade entre genótipos de milho para

esta característica. Uma etapa importante nos programas de melhoramento é a seleção de linhagens que tolerem altas temperaturas durante a germinação para o desenvolvimento de híbridos promissores no mercado.

Sabe-se que programas de melhoramento genético são essenciais para a produção de sementes de alta qualidade, garantindo o aumento da produtividade da cultura do milho. Tem sido observado também que as empresas produtoras de sementes investem, cada vez mais, em programas de controle de qualidade interno, visando garantir a comercialização de sementes com alta qualidade.

Existem poucos estudos relacionados aos genes que estão associados à tolerância a altas temperaturas, sendo importante a identificação de genótipos relacionados à tolerância a altas temperaturas na fase de germinação de sementes por meio de tecnologias disponíveis, a exemplo, testes fisiológicos, análises transcriptômicas e proteômicas.

2.2 Aspectos fisiológicos relacionados à tolerância ao calor

O estresse causado por temperaturas altas geralmente ocorre durante um período de tempo suficiente para provocar danos irreversíveis no crescimento e desenvolvimento da planta. A extensão em que isso ocorre em zonas climáticas específicas depende da probabilidade e período de temperaturas elevadas que ocorrem durante o dia e/ou noite. A tolerância ao calor é geralmente definida como a capacidade da planta para crescer e produzir sob altas temperaturas (PEET; WILLITS, 1998).

Em climas tropicais, as altas temperaturas e o excesso de radiação solar são muitas vezes os fatores mais limitantes que afetam o crescimento da planta e produção de sementes. Altas temperaturas podem causar consideráveis danos pré e pós-colheita (GUILIONI; WERY; TARDIEU, 1997; ISMAIL; HALL, 1999; VOLLENWEIDER; GUNTARDT-GOERG, 2005). Da mesma forma, nas

regiões temperadas, o estresse ao calor tem sido relatado como uma das mais importantes causas de redução da produção de matéria seca e de rendimento em muitas colheitas, incluindo o milho (GIAVENO; FERRERO, 2003).

A desuniformidade da emergência de plântulas de milho é uma das principais limitações da cultura em regiões tropicais, sendo responsável pelas altas temperaturas do solo, frequentemente, encontradas no início do período de crescimento (BALLAUX, 1975; BUCKLE; GRANT, 1974). A temperatura é considerada um dos fatores mais importantes na germinação de sementes (NERSON, 2007). Esse fator pode causar mudanças na percentagem, velocidade e uniformidade da germinação (MARCOS FILHO, 2005).

A temperatura apresenta grande influência sobre a velocidade, porcentagem de germinação e emergência, afetando as reações bioquímicas que determinam o processo germinativo. Em cada tipo de sementes de espécie e/ou cultivar existe uma faixa de temperatura, na qual ocorrem germinação e emergência ideal. Isso, se o suprimento de umidade for adequado e outros estresses forem mínimos. Na maioria das espécies a temperatura ótima de germinação, na qual a maior germinabilidade é alcançada em menor tempo, encontra-se entre 15 e 30°C; a máxima varia entre 35 e 40°C, podendo a mínima chegar ao ponto de congelamento (MAYER; POLJAKOFF-MAYBER, 1989). Acima da temperatura máxima as sementes geralmente morrem em poucos dias e abaixo da temperatura mínima, as sementes não germinam em período razoável de tempo. A temperatura ótima recomendada no teste de germinação de sementes de milho é 25°C (BRASIL, 2009).

O processo de germinação pode ser conceituado de diferentes maneiras. Sob aspecto fisiológico ele se encerra com a protrusão da raiz primária, enquanto, sob o ponto de vista tecnológico, a germinação inclui o desenvolvimento da estrutura embrionária e a formação de uma plântula em que sejam evidentes as suas partes constituintes (MARCOS FILHO, 2005).

O processo, do ponto de vista fisiológico pode ser dividido em três fases: embebição, alongamento celular e divisão celular. Havendo condições favoráveis, o processo de embebição, para a maioria das sementes, ocorre segundo um padrão trifásico. Na primeira fase, a absorção de água pelas sementes é rápida devido à diferença de potencial matricial encontrada nos tecidos da semente. Nessa fase as sementes mortas também absorvem água. Há também nessa fase a retomada do crescimento do embrião, em consequência do início da germinação de reservas. Na segunda fase, há indicações de que esteja ocorrendo um transporte ativo de substâncias desdobradas na fase anterior, do tecido de reserva para o tecido meristemático. Nesta fase, os potenciais hídricos do substrato e das sementes são semelhantes, fazendo com que a absorção de água seja quase nula. Nesse momento, o teor de água das sementes endospermáticas chega a valores entre 25% e 30% e para as cotiledonares entre 35% a 40%. No final da segunda fase há o acréscimo repentino do teor de água das sementes. A última fase é caracterizada pela germinação visível e pelo início do crescimento do eixo embrionário. Porém, para chegar à protrusão radicular, mudanças no nível bioquímico acontecem, ou seja, as substâncias desdobradas na fase I e transportadas na fase II são reorganizadas em substâncias mais complexas que formam o citoplasma, o protoplasma e as paredes celulares (BEWLEY; BLACK, 1994).

Na fase de germinação das sementes de milho, os carboidratos armazenados no endosperma constituem a principal fonte de energia para o processo germinativo e crescimento inicial das plântulas (BRUCKERIDGE et al., 2004). Quando essas plântulas são submetidas às altas temperaturas, a eficiência do uso dos carboidratos armazenados é função da tolerância ao calor de cada genótipo, eficiência traduzida pelo menor consumo de carboidratos no processo respiratório, proporcionando maior acúmulo de massa seca na plântula (BLUM; SINMENA, 1994).

Em trabalho realizado por Alka e Khanna-Chopra (1995), a resposta de cultivares de trigo às altas temperaturas foi analisada em relação à atividade da amilase e taxa de respiração das sementes na fase de germinação. Esses autores relatam que o crescimento inicial das plântulas é dependente da atividade da α -amilase que degrada o amido em maltose e glicose, e afirmam que esses açúcares servem como substratos para respiração, que fornece energia para o rápido crescimento do eixo embrionário, sendo que a síntese e secreção de α -amilase são influenciadas pela temperatura. Nesse contexto existem evidências de que a tolerância ao calor da planta adulta esteja associada à tolerância no estágio de plântula (BLUM; SINMENA, 1994).

Cargnin et al. (2006) trabalharam com sementes de oito genitores e oito populações segregantes (geração F3) de trigo e concluíram que a alta temperatura na fase de germinação ocasiona redução da massa seca de plântula e da eficiência de uso do endosperma. Observaram ainda, que há tolerância ao estresse de calor entre as populações e entre os genitores na fase de germinação.

Em sementes de milho, o embrião é o local de maior sensibilidade às altas temperaturas. Esse estresse é responsável pela baixa taxa de síntese de proteínas em embriões. Existem algumas possíveis razões para essa baixa taxa de síntese de proteínas, como: a menor taxa de síntese de RNA; maior taxa rotativa de RNA; inibição do processamento de moléculas de RNA ou da sua liberação a partir do núcleo; deficiência de algumas enzimas e outros fatores envolvidos na síntese de polipeptídeos e/ou ainda instabilidade de algumas dessas enzimas ao calor (RILEY, 1981).

Altas temperaturas podem alterar ainda a composição e a função da bicamada lipídica, o que causa um aumento na fluidez da membrana, podendo levar a desintegração dessa bicamada (ALLAKHVERDIEV et al., 2008).

A alteração no funcionamento das membranas, por altas temperaturas, compromete as rotas metabólicas das plantas, com relação à respiração e à

fotossíntese. Na fotossíntese resultam alterações nas propriedades físico-químicas dos tilacoides, além de induzir um aumento na fluidez da matriz lipídica (RAISON; ROBERTS; BERRY, 1982), fazendo com que a membrana celular se desestruture e reduza sua atividade.

Também compromete o transporte de elétrons para a cadeia transportadora na respiração, gerando um desequilíbrio iônico. Esse desequilíbrio resulta em radicais livres e conseqüentemente produção de espécies reativas de oxigênio (EROS).

Em condições de altas temperaturas, a produção de EROS é alta, gerando danos ao DNA, proteínas e lipídios (MILLER; SHULAEV; MITTLER, 2008). Diante disso, como defesa, as mitocôndrias das plantas têm um sistema pró-ativo de dissipação de energia que diminui, significativamente, a taxa de produção de EROS mitocondrial pela cadeia transportadora de elétrons, a partir da manutenção de um baixo nível de redução de ubiquinona (KEUNEN et al., 2013), nesse sistema atua a oxidase alternativa (AOX).

A alta expressão de AOX na planta de milho ocorre em condições de deficiência respiratória ou despolarização da membrana, sendo respostas das plantas aos estresses causados por temperatura (KARPOVA et al., 2002).

Segundo Allakhverdiev et al. (2008), a tolerância ao calor nas células vegetais pode ser proporcionada pelos seguintes fatores: aumento na expressão das proteínas de tolerância ao calor, aumento na atividade antioxidante, aumento na insaturação da membrana lipídica, expressão e tradução de genes relacionados à tolerância e estabilidade térmica de proteínas.

Imediatamente após a exposição às altas temperaturas ocorrem alterações em nível molecular, com a alteração da expressão de genes e do acúmulo de transcritos, o que leva à síntese de proteínas relacionadas ao estresse, como estratégia de tolerância (IBA, 2002). As proteínas *heat shock* (HSPs) estão envolvidas na transdução de sinal durante o estresse ao calor

(SCHÖFFL; PRANDL; REINDL, 1999). Existe grande variação da expressão dessas proteínas dentro e entre espécies, o que pode ser explorado nos programas de melhoramento genético. Algumas tentativas de desenvolver genótipos tolerantes ao calor por meio de protocolos convencionais de melhoramento de plantas têm sido bem sucedidas (CAMEJO et al., 2005; EHLERS; HALL, 1998).

Na obtenção da tolerância a altas temperaturas existem vários mecanismos envolvidos, tendo destaque a indução de proteínas resistentes ao calor. As altas temperaturas induzem o acúmulo de proteínas LEA “*embryogenesis accumulated*”. Os mRNA dessas proteínas aparecem em tecidos embrionários declinando progressivamente após a embebição da semente (BAKER; STEELE; DURE, 1988; GALAU; JAKOBSEN; HUGHES, 1991).

Proteínas do tipo LEA são ricas em glicina e outros aminoácidos hidrofílicos e apresentam poucos resíduos hidrofóbicos, sendo extraídas em condições de alta temperatura. Essas proteínas resistentes ao calor têm sido associadas à tolerância a altas temperaturas (BLACKMAN et al., 1991; KIGEL; GALILI, 1995).

As proteínas resistentes ao calor foram descobertas há quatro décadas e têm sido consistentemente associadas com a tolerância à dessecação devido ao seu perfil de expressão e sua hidrofiliidade (CUMING, 1999). Essas proteínas além de hidrofílicas são abundantes, extraídas em condições de altas temperaturas, e são armazenadas nos últimos estádios de desenvolvimento das sementes.

Tem sido relatada importante diversidade de características estruturais e bioquímicas para as proteínas resistentes ao calor. Segundo Boucher et al. (2010) uma característica importante da sobrevivência no estado seco é a capacidade de proteger as membranas em fase de transição, impedindo a perda

de integridade. Esse papel tem sido atribuído às deidrinhas, proteínas *heat shocks* e proteínas LEA.

Essas proteínas são capazes de proteger estruturas celulares ou amenizar o efeito do estresse causado pela dessecação. As proteínas LEA possuem motivos repetidos que podem ser classificados em vários grupos, de acordo com as características de sua estrutura primária e desempenham um papel importante na tolerância à dessecação, sendo que a sua expressão geralmente coincide com a tolerância à dessecação (MACHEREL et al., 2007).

Um dos mecanismos mais estudados na adaptação dos organismos à condição de estresse é a indução de proteínas resistentes ao calor, *heat shock proteins* (HSP), o qual inclui várias famílias de proteínas conservadas. Segundo Vertucci e Farrant (1995), a função das HSP tem sido relacionada à preservação e o reparo das estruturas macromoleculares durante a desidratação ou reidratação, respectivamente. Embora todos os organismos sintetizem HSP em resposta ao calor, o balanço de proteínas sintetizadas e a relativa importância das famílias individuais de HSP na tolerância ao estresse variam enormemente entre organismos (QUEITSCH et al., 2000).

Conforme Manfre et al. (2009), a redução da expressão de LEAs, proteínas quando da embebição de sementes, pode ser uma evidência de que algumas dessas proteínas tenham duplo papel durante o ciclo da vida vegetal, funcionando como uma proteína de armazenamento durante a germinação e como uma proteína de proteção à dessecação durante o desenvolvimento da semente.

A enzima α -amilase, ao promover a hidrólise do amido, disponibiliza os carboidratos necessários ao desenvolvimento do embrião, possibilitando assim o processo germinativo (FRANCO et al., 2002). No entanto, Oliveira et al. (2013) ressaltam que além dos genes das amilases, vários outros genes podem estar

envolvidos no controle do caráter: qualidade fisiológica de sementes, como exemplo, os genes relacionados diretamente com a respiração.

Durante a germinação das sementes, as reservas insolúveis de alto peso molecular são degradadas e convertidas em formas solúveis, que são rapidamente transportadas aos tecidos em crescimento e utilizadas em reações de síntese ou de produção de energia. As modificações metabólicas que ocorrem nesses estágios são resultados da atividade de várias enzimas de hidrólise e transferência (BEWLEY; BLACK, 1985). São vários os fatores que influenciam na síntese e atividade de α -amilase durante a germinação das sementes e grande número de estudos de caracterização e expressão de α -amilase têm sido conduzidos em cevada, trigo e arroz (FINCHER, 1989). No milho, no entanto, existem poucos trabalhos sobre os processos de transcrição, tradução e ativação dessa enzima durante a germinação sob altas temperaturas.

A utilização de técnicas de identificação de RNA mensageiro (mRNA) durante o processo de germinação pode definir a cinética de produção de α -amilase, bem como a influência de fatores abióticos, como a alta temperatura na atividade dessa enzima e, conseqüentemente, na germinação das sementes.

2.3 Expressão Gênica

A expressão gênica pode ser estudada devido aos avanços na área da biotecnologia. O estudo desses genes só é possível em nível proteico ou de transcritos das células.

A maximização da sensibilidade dos métodos de quantificação tem levado ao desenvolvimento de técnicas cada vez mais complexas, entre elas a PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR), que já é usada há bastante tempo na área médica, e há algum tempo vem sendo utilizada como ferramenta nos

estudos de expressão gênica e quantificação de sequências específicas em plantas (GACHON et al., 2004).

A RT qPCR difere do PCR clássico pela mensuração do produto da PCR, amplificado em cada ciclo da reação da PCR. Comparado as outras técnicas de avaliação existentes, esta permite uma detecção de um dado ácido nucleico alvo de maneira rápida, específica e muito sensível (GACHON et al., 2004).

A quantificação é a característica mais importante da RT qPCR. Comparada ao PCR clássico, uma das principais vantagens da RT qPCR é a rapidez em fornecer dados confiáveis.

Na ciência básica, a qPCR tem sido amplamente empregada na quantificação de transcritos específicos (RT-q PCR), na análise de famílias multigênicas. A técnica da PCR em tempo real pode ser utilizada em estudos de expressão gênica de proteínas resistentes ao calor em milho as quais estão relacionadas à tolerância ao calor durante a germinação.

Assim, através da técnica da PCR em tempo real, é possível a identificação de genes que possam estar envolvidos no mecanismo para a obtenção de tolerância a altas temperaturas.

Segundo Zhao (2004), dois genes da família GOLS no milho, foram detectados durante o desenvolvimento ou germinação de sementes sob estresse. A expressão desses genes está sob controle temporal: durante o desenvolvimento da semente o gene ZmGOLS3 é predominantemente transcrito, e as sementes embebidas expressam ZmGOLS2 principalmente quando estão sob estresse por desidratação.

Em estudos com sementes de linhagem de milho foi possível detectar uma curta transcrição do gene ZmGOLS3 podendo desempenhar algum papel na tolerância ao calor. Os resultados de ensaios de proteção de ribonuclease (RPA) mostraram que o ZmGOLS3 expresso durante o desenvolvimento da semente é

rapidamente degradado na embebição. Após o estresse de desidratação, as sementes de milho embebidas acumulam transcrição de ZmGOLS2 (ZHAO; MEELEY; DOWNIE, 2003).

Xuan (2011), descreveu a caracterização funcional do gene ZmAN13, membro da família ZnF-AN1 no milho, que mostra a expressão induzida por um ou vários estresses abióticos. A expressão de ZmAN13 foi mais elevada nas folhas do que em outros órgãos, e é induzida pelo frio e por tratamento de ABA e também sob estresse à seca. Já a superexpressão de ZmAN13 em *Arabidopsis* apresenta tolerância conferida ao frio, mas causou em linhagens transgênicas uma maior sensibilidade à seca.

Genes adicionais de ZnF-AN1 foram identificados a partir de *Populus trichocarpa*, *Zea mays*, e *Chlamydomonas reinhardtii*. A maioria desses genes está envolvida em respostas a estresses abióticos (JIN, 2007).

Proteínas de elemento de ligação que respondem à desidratação (DREBs) desempenham funções reguladoras vitais em resposta ao estresse abiótico em plantas. A transcrição do gene ZmDBP2 foi altamente induzida pela seca e moderadamente induzida por sal e ácido abscísico exógeno. A superexpressão de ZmDBP2 melhora a tolerância ao estresse hídrico em plantas transgênicas de *Arabidopsis*. O ZmDBP2 pode ser um novo membro da família DREB envolvido na ativação de genes em resposta a estresses ambientais (WANG; YANG; WANG, 2011).

A AR2/ERF é uma grande família de fatores de transcrição na planta, que codifica os reguladores da transcrição com uma variedade de funções envolvidas nos processos de desenvolvimento e fisiológicos. A análise bioinformática sugere que as proteínas AP2/ERF do milho podem, potencialmente, participar em uma variedade de respostas ao estresse, conferindo-lhes a capacidade para regular um grande número de programas de transcrição (ZHUO; TANG; WU, 2012).

Com isso a caracterização de genes que se expressam durante o processo de germinação sob altas temperaturas é importante para a seleção de cultivares de milho em programas de melhoramento, para atender à expansão da cultura em regiões cujas temperaturas durante a fase de germinação são críticas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

A pesquisa foi conduzida na área experimental e no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

3.2 Seleção de linhagens quanto à tolerância a altas temperaturas durante a germinação

As sementes de seis linhagens de milho (30, 44, 54, 63, 64 e 91) foram submetidas aos testes de envelhecimento acelerado e deterioração controlada para a seleção de linhagens discrepantes em relação à tolerância ao calor. As linhagens utilizadas são provenientes dos programas de melhoramento de milho da empresa Geneseds Recursos Genéticos Ltda. Essas linhagens têm sido utilizadas em outras pesquisas demonstrando potencial para estudos de expressão gênica em condições desfavoráveis de cultivo.

Após a seleção de linhagens de milho com diferentes níveis de tolerância a altas temperaturas, as sementes das linhagens foram multiplicadas.

3.3 Multiplicação das sementes de seis linhagens contrastantes em relação à tolerância a altas temperaturas de germinação

Foram multiplicadas sementes das linhagens de milho (30, 44, 54, 63, 64, 91). Foram instaladas 8 linhas de 10 metros com o espaçamento entre linhas de 0,8 m e 5 plantas por metro. O solo foi preparado convencionalmente e as correções de acidez realizadas de acordo com a análise química do mesmo. A

adubação de cobertura e os demais tratos culturais foram realizados de acordo com os recomendados 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.

Durante o desenvolvimento das sementes foi feito o acompanhamento da solidificação do endosperma por meio da linha de leite, sendo que a colheita foi realizada em espigas no estágio de desenvolvimento ML5 (100% do endosperma duro).

Após a colheita, as espigas foram despalhadas manualmente e secadas com auxílio de secador regulado a 30 °C. A secagem foi realizada até as sementes atingirem 13% de teor de água. Em seguida, as espigas foram debulhadas manualmente.

Para as análises fisiológicas e moleculares realizadas nesta pesquisa, as sementes foram classificadas em peneiras, com crivo redondo n° 19/64'' e n° 20/64''.

3.4 Avaliação da qualidade física e fisiológica das sementes de milho

3.4.1 Avaliação da qualidade fisiológica das sementes de milho em relação a diferentes temperaturas durante a germinação

A avaliação fisiológica das sementes de linhagens de milho foi feita pelos seguintes testes:

3.4.1.1 Teor de água

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

3.4.1.2 Teste de germinação em diferentes temperaturas

A germinação das sementes das seis linhagens foi realizada em cinco temperaturas (25°C, 30°C, 35°C, 40°C e 45°C), sendo que para cada temperatura o teste foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes. A semeadura foi realizada entre papel umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. Os rolos foram acondicionados em sacos plásticos e mantidos em câmara tipo B.O.D. regulada nas temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C, 40°C e 45°C (+ou – 1 °C). As avaliações das plântulas normais foram realizadas aos 4, 7 e 14 após a instalação dos testes. Adotou-se como padrão de plântulas normais, aquelas que apresentavam pelo menos 0,5 cm de raiz primária. Os resultados foram expressos em porcentagem média.

3.4.1.3 Índice de velocidade de germinação

Juntamente com o teste de germinação foi realizado o teste de velocidade de germinação, por meio de avaliações diárias e no mesmo horário, computando-se o número de sementes com protrusões radiculares até 14 dias após a semeadura. Os dados foram submetidos à fórmula de Maguire (1962). Adotou-se como padrão para considerar plântulas normais, aquelas que apresentavam pelo menos 0,5cm de raiz primária.

3.4.2 Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho submetidas ao teste de deterioração controlada

Após a avaliação do teste de germinação em diferentes temperaturas, foi verificado que a temperatura de 35°C, na primeira contagem de germinação, permitiu diferenciar as seis linhagens entre si quanto à tolerância à alta temperatura. A partir desses resultados utilizou-se a temperatura de 35°C para os demais testes e análises.

3.4.2.1 Deterioração Controlada

Elevou-se o teor de água das sementes para 25%. Para ser atingido o teor de água previamente estabelecido adicionou às sementes a quantidade de água calculada pela fórmula:

$$W2 = 100 - A / 100 - B \times W1 \quad (1)$$

onde: A - teor de água inicial das sementes (base no peso úmido); B – teor de água requerido; W1 – peso inicial das sementes (g); W2 – peso final das sementes (g); W2 – W1 – água a ser adicionada (WANG; HAMPTON, 1991 citado por HAMPTON; JOHNSTONE; EUA-UMPO, 1992). Em seguida, as sementes acondicionadas em embalagens de alumínio, as quais foram seladas a quente e mantidas por 24 horas a 10 °C, para uniformização do teor de água das sementes. As sementes foram envelhecidas a 42 °C, por 48 horas, em câmara de germinação (BOD-Marconi).

Após esse período as sementes foram mantidas em repouso em temperatura ambiente até atingirem um teor de água próximo a 13% para posteriormente serem submetidas ao teste de germinação a 35°C. As avaliações

das plântulas normais foram realizadas aos 4 e 7 dias após a instalação do teste. Adotou-se como padrão de plântulas normais, aquelas que apresentavam pelo menos 0,5 cm de raiz primária para as avaliações realizadas aos 4 e 7 dias após a instalação do teste.

Além do teste de germinação, as sementes que foram submetidas ao teste de deterioração controlada foram avaliadas quanto ao comprimento e matéria seca da parte aérea e do sistema radicular.

3.4.2.2 Comprimento e matéria seca da parte aérea e sistema radicular

Foram utilizadas sementes submetidas e não submetidas à deterioração controlada. Nesse teste foi utilizada a temperatura de 35 °C por permitir diferenciar as linhagens entre si. O teste foi conduzido com quatro repetições de 15 sementes, e a semeadura foi realizada entre papel umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. Os rolos foram acondicionados em sacos plásticos e mantidos em câmara tipo B.O.D. regulada na temperatura de 35 °C (+ou - 1 °C) por 7 dias. As avaliações do comprimento de parte aérea e o sistema radicular foram realizados em uma única avaliação no sétimo dia, após a semeadura. A massa de matéria seca da parte aérea, assim como do sistema radicular foram determinadas separadamente. Os tecidos foram separados das sementes e acondicionados em sacos de papel e submetidos à estufa regulada a 60 °C até a estabilização do peso. Após esse período o material foi pesado em balança de precisão utilizando-se três casas decimais.

3.5 Análise proteômica por meio da técnica de eletroforese

Para a análise proteômica foram utilizadas sementes submetidas e não submetidas à deterioração controlada.

3.5.1 Proteínas resistentes ao calor

Para a análise eletroforética de proteínas resistentes ao calor utilizou-se embriões de sementes. Esses foram moídos por um minuto e quinze segundos em mortar sobre gelo, em seguida, em microtubos com capacidade de 1500 μ L foi acrescentada solução tampão (50mM tris-HCL-7,5; 500mM NaCL; 5mM MgCl₂; 1mM PMSF) na proporção de 1:10 (peso do material: volume tampão de extração). Os homogeneizados foram centrifugados a 14000 rpm por 30 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante incubado em banho-maria a 85 °C por 15 minutos e novamente centrifugado. O sobrenadante foi vertido em microtubos e o *pellet* descartado. Antes da aplicação no gel os tubos de amostras contendo 70 μ L de extrato + 40 μ L de solução tampão da amostra foram colocados em banho-maria com água em ebulição por 5 minutos (BLACKMAN et al., 1991). Foram aplicados 50 μ L do extrato com proteínas + tampão da amostra por canaleta, em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi realizada a 150 v por 8 horas e os géis corados em Coomassie Blue a 0,05%, durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10% (ALFENAS, 2006).

3.5.2 Enzima alfa amilase

Para a extração da enzima α -amilase, as sementes submetidas e não submetidas à deterioração controlada foram colocadas para germinar em rolo de papel por um período de 72 horas à temperatura de 25 °C. Decorrido esse período, os eixos embrionários e escutelos de 11 sementes foram descartados e

os endospermas restantes foram triturados a frio, em moinho refrigerado, na presença de nitrogênio líquido. Para a extração, 100mg do pó do endosperma foram ressuspensos em 300 µl do tampão de extração (Tris-HCl 0,2M, pH 8,0 + 0,4% PVP). Em seguida foi feita aplicação de 40 µl do extrato proteico em cada canaleta, nos géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador – contendo amido solúvel 1%) e 4,5% (gel concentrador). A revelação foi feita de acordo Alfenas (2006).

3.5.3 Enzimas catalase, esterase e superóxido dismutase

Para a análise eletroforética das enzimas catalase, esterase e superóxido dismutase, foram utilizadas sementes inteiras submetidas e não submetidas à deterioração controlada. As sementes foram trituradas na presença de PVP e nitrogênio líquido em moinho refrigerado.

Para a extração das enzimas foi utilizado o tampão Tris HCL 0,2M pH 8,0 + (0,1% de mercaptoetanol), na proporção de 250µL por 100mg de sementes. O material foi homogeneizado em vortex e mantido *overnight*, em geladeira, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos, a 4 °C.

A corrida eletroforética foi realizada em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). Foram aplicados 60 µL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética foi efetuada a 120 V por 5 horas.

Terminada a corrida os géis foram revelados conforme Alfenas (2006).

3.6 Análise de transcritos de genes relacionados à tolerância ao calor por meio da técnica de qRT-PCR

A análise de transcritos de genes relacionados à tolerância ao calor por meio da técnica de qRT-PCR foi dividida em quatro etapas: extração e purificação do RNA, transcrição reversa para síntese do cDNA, PCR em tempo real, e análise dos resultados.

Para a extração do RNA foram utilizadas sementes das seis linhagens (30, 44, 54, 63, 64 e 91) submetidas e não submetidas à deterioração controlada.

3.6.1 Extração e Purificação do RNA

Para a extração do RNA as sementes de milho foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e com a adição do reagente *Pure Link RNA Plant*[®] (*Invitrogen*), seguindo as especificações do manual do fabricante.

A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1% e visualizada após a coloração com brometo de etídio. A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro, utilizando-se comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

Após as extrações dos ácidos nucleicos as amostras foram tratadas com DNAs e para evitar qualquer contaminação com DNA. Para isso foi utilizado o DNAs e DNA *Free* (*Applied Biosystems*) e protocolo realizado conforme recomendações do fabricante. Para comprovar a eficiência da descontaminação foi feita uma reação de PCR convencional com todas as amostras, comprovando a não amplificação do DNA. Nessa reação como controle positivo foi utilizada uma amostra de DNA de sementes de milho e os *primers* dos controles endógenos Ubiquitina e Desidrogenase Alcoólica (*ADH*). As amplificações foram avaliadas em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

3.6.2 Transcrição reversa para síntese do cDNA

Após o processo de extração e purificação de RNA foi realizada a síntese de cDNA. Para isso foi utilizado *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription cDNA®* da *Applied Biosystems*, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

3.6.3 Desenho dos primers

Para a análise da expressão gênica pela técnica de qRT-PCR, os genes foram selecionados com base na revisão de literatura devido à importância nos estudos de tolerância das plantas às altas temperaturas. Os primers utilizados foram desenhados com o auxílio do *software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems)* após a busca das sequências dos genes no *site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>*, (Tabela 1). Como controles endógenos foram utilizados os genes da Ubiquitina e ADH.

Tabela 1 Sequências dos Primers utilizados na análise de qRT-PCR

Gene*	Identificação	Sequência 5'-----3'
<i>Zm-ANI3</i>	Função reguladora em resposta ao estresse abiótico	F AGCTGTTGCCCAAGTCGAGTT R GCTGGGTCCGGCAACAT
<i>AOX-1</i>	Rota alternativa da respiração / antioxidante	F GCGAGGAGCAAACAGCAAA R GGCCACTAGTGCGGTCAACT
<i>AOX-2</i>	Rota alternativa da respiração / antioxidante	F CCAAGACGCTGATGGATAAGG R AGCCATACCGCCTCTGGAA
<i>Zm DBP2</i>	Proteínas de elemento de ligação que respondem a desidratação	F CAATACCAGCGCACACCAGAT R TCGTTATAAAAGGCTCGAGTGCTT
<i>LEAP (D-34)</i>	Proteínas resistentes ao calor	F CCGGCTCCACGCAGAAC R TATAGGCGTAGCCCTGCATGA
<i>LEAP</i>	Proteínas resistentes ao calor	F TGCAGCTCCTAGTGCTTGTAC R TGGAAGAGGACCTGGGATTG
UBI	Controle endógeno	F AAGGCCAAGATCCAGGACAA R TTGCTTTCCAGCGAAGATGA
<i>ADH-DA</i>	Controle endógeno	F AGGACGCTGAGTTAAGACC

*LEAP (D-34): *Late embryogenesis abundant protein D-34*; LEAP: *Late embryogenesis abundant protein*; UBI: Ubiquitina; ADH-DA ADH-Desidrogenase Alcoólica; F: sequência do primer *foward*, R: sequência do primer *reverse*.

Para a análise da expressão gênica quantitativa por qRT-PCR foi utilizado o equipamento *ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems)*, e o sistema de detecção *SYBR Green* e o *cDNA* obtido a partir de RNA extraído das sementes. As condições térmicas da reação foram de 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, e finalizando com 15 segundos a 95 °C. Os dados foram coletados e armazenados no programa *7500 Software (Versão 2.0.1)*. Para cada reação foi utilizado 1,0 µL de *cDNA* diluído 1:5, 0,2 µL de cada *primer* e 5,0 µL de *Master Mix SYBR green UDG com ROX (Invitrogen)* para um volume final 10,0 µL/amostra. Os controles negativos e as curvas de *melting* foram incluídos em todas as análises.

Foram utilizadas duas repetições biológicas em três replicatas técnicas, para cada gene em estudo, sendo os resultados normalizados usando o Ciclo *Threshold (CT)*, obtidos pela expressão dos genes de referência Ubiquitina 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*). Foi utilizado o método do CT comparativo. Para isso, previamente, foi realizado um experimento de validação para comprovar que as eficiências de amplificação dos genes-alvo e de referências são similares e bem próximas de 100% (TYAGI; BRATU; KRAMER, 1998). As curvas padrões para os genes em estudo foram geradas a partir das seguintes diluições: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 e 1:3125. Esse procedimento também permitiu a definição da melhor diluição de *cDNA* utilizada em cada reação, a qual foi de 1:5.

As amostras de menor expressão, para cada gene, foram utilizadas como amostras calibradoras e o método utilizado para medir a expressão relativa foi o Método da Curva Padrão Relativa que descrito no manual do aparelho (*Applied Biosystems*). Para a quantificação da expressão gênica pela técnica de *PCR* em tempo real, os valores obtidos correspondentes aos níveis de mRNA's das amostras foram comparados relativamente aos valores dos níveis de mRNA's de controle. Após a obtenção dos dados brutos, esses foram analisados por meio do programa *7500 Software SDS* (Versão 2.0.1). Para calcular o nível de expressão dos genes de interesse foram considerados: Ct (aumento exponencial do produto de PCR) do gene-alvo e controle endógeno, $\Delta Ct = Ct \text{ (amostra)} - Ct \text{ (controle endógeno)}$ e o $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (amostra)} - \Delta Ct \text{ (calibrador)}$. Em seguida o nível de expressão foi calculado pela fórmula: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para plotagem dos gráficos utilizou-se o programa *SigmaPlot*.

3.7 Análise estatística

Para a análise dos resultados dos testes utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica foi realizada em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 6x5, sendo seis genótipos e cinco temperaturas, com quatro repetições; e 6x2, sendo seis genótipos e duas condições, sementes submetidas ou não à deterioração controlada. Os dados foram previamente submetidos aos testes de normalidade dos resíduos e homocedasticidade das variâncias, sendo submetidos à análise de variância e às médias comparadas entre si pelo Scott & Knott, a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas no programa estatístico SISVAR[®] (FERREIRA, 2000).

A análise dos dados do teste de PCR em tempo real foi realizada por meio do programa *7500 Software SDS* (Versão 2.0.1) (APPLIED BIOSYSTEMS).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de água médio das sementes foi de 12% com variação máxima de 1%.

4.1 Análise fisiológica de sementes de milho em diferentes temperaturas de germinação

Segundo o resumo da análise de variância dos resultados (Tabela 1A) do teste de germinação houve interação significativa entre as linhagens e as diferentes temperaturas em todas as épocas de avaliação do teste.

Com relação aos dados de germinação em diferentes temperaturas (Tabela 2) referente à primeira leitura de germinação no 4º dia após a instalação dos testes, a 25°C maiores valores de germinação e vigor foram observados para as linhagens 30 e 91, enquanto que menor valor de germinação foi observado em sementes da linhagem 44. A 30°C não houve diferença significativa entre as seis linhagens avaliadas. Já a 35°C menores valores de germinação foram observados em sementes da linhagem 44, seguida das linhagens 63 e 64. Maior valor de germinação foi observado em sementes da linhagem 91, sendo seguido da linhagem 54.

Tabela 2 Porcentagem de germinação de seis linhagens de milho submetidas a diferentes temperaturas de germinação aos 4 dias após a instalação do teste

Linhagens	Temperatura – 4 dias				
	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C
30	97 Aa	99 Aa	76 Cb	0 Ac	0 Ac
44	83 Db	99 Aa	64 Ec	0 Ad	0 Ad
54	88 Cb	100 Aa	82 Bc	0 Ad	0 Ad
63	90 Cb	97 Aa	70 Dc	0 Ad	0 Ad
64	93 Bb	97 Aa	68 Dc	0 Ad	0 Ad
91	98 Aa	100 Aa	99 Aa	0 Ab	0 Ab

Resultados seguidos pela mesma letra minúscula na linha e letra maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

Nas temperaturas de 40°C e 45°C, durante o processo de germinação, não houve a germinação das sementes das seis linhagens.

De uma maneira geral os maiores valores de germinação foram observados à temperatura de 30°C. Essa temperatura é a recomendada para a realização do teste de germinação de sementes de milho, uma vez que a essa temperatura espera-se a maior expressão de enzimas que favorecem a germinação de sementes, a exemplo da alfa-amilase. No entanto, em condições de campo, em algumas regiões de cultivo dessa cultura, a temperatura do solo, durante o processo de germinação pode exceder a 30°C, comprometendo o estabelecimento de plantas no campo.

Em relação ao comportamento das sementes das linhagens em diferentes temperaturas de germinação, as sementes da linhagem 30 apresentaram maiores valores de germinação quando submetidas às temperaturas de 25°C e 30°C, seguida da temperatura de 35°C. Já as sementes das linhagens 44, 54, 63 e 64, apresentaram maiores valores de germinação a 30°C, seguida de 25°C. A 35°C, as sementes dessas linhagens apresentaram valores intermediários. A linhagem 91 destacou-se por apresentar maior valor de germinação numa maior faixa de

temperatura, a 25°C, 30°C e 35°C. Foi verificado que a 40°C e 45°C as sementes das seis linhagens não germinaram.

O sucesso da produção dependerá, entre outros aspectos, do estabelecimento de plântulas no campo, fator esse diretamente relacionado com a germinação e vigor de sementes. O alto vigor das sementes é uma condição necessária para tolerar estresses ambientais como condições de altas temperaturas.

A temperatura é considerada o fator de maior influência sobre a velocidade e porcentagem de germinação de sementes e emergência de plântulas. Para cada espécie existe uma faixa de temperatura, na qual ocorrem os maiores valores de germinação e emergência, se o suprimento de umidade for adequado e outros fatores adversos forem mínimos (DELOUCHE, 2004).

Pereira, Nascimento e Vieira (2007), trabalhando com sementes de cenoura sob condições de altas temperaturas, observaram que houve um decréscimo na germinação à medida que a temperatura foi aumentada, sendo que a 36°C apenas 27% das sementes germinaram. Em condições de alta temperatura (35°C) a germinação foi bastante reduzida para a maioria das cultivares trabalhadas.

Com relação aos resultados de germinação nas temperaturas de 25°C, 30°C e 35°C (Tabela 3) referente à avaliação no 7º dia após a instalação do teste, não houve diferença significativa entre as linhagens avaliadas e nem entre as diferentes temperaturas. A 40°C menor valor de germinação foi observado em sementes da linhagem 44. As demais linhagens não diferiram entre si. Já a 45°C não houve germinação das sementes das linhagens avaliadas.

Tabela 3 Porcentagem de germinação de sementes de seis linhagens de milho submetidas a diferentes temperaturas de germinação aos 7 dias após a instalação do teste

Linhagens	Temperatura – 7 dias				
	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C
30	99 Aa	99 Aa	99 Aa	90 Ab	0 Ac
44	100 Aa	100 Aa	100 Aa	81 Bb	0 Ac
54	100 Aa	100 Aa	99 Aa	94 Ab	0 Ac
63	99 Aa	98 Aa	98 Aa	92 Ab	0 Ac
64	99 Aa	98 Aa	98 Aa	92 Ab	0 Ac
91	100 Aa	100 Aa	100 Aa	96 Aa	0 Ab

Resultados seguidos pela mesma letra minúscula na linha e letra maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

Verificando o comportamento das sementes das linhagens em relação às diferentes temperaturas de germinação, as sementes das linhagens 30, 44, 54, 63 e 64, apresentaram maiores valores de germinação quando submetidas às temperaturas de 25°C, 30°C e 35°C, seguida da temperatura de 40°C. Já a linhagem 91 apresentou maiores valores de germinação a 25°C, 30°C, 35°C e 40°C. Foi verificado que a 45°C as sementes das seis linhagens não germinaram.

Para a obtenção de melhor estande no campo, principalmente em condições adversas de altas temperaturas, a seleção e o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes são recomendados.

A habilidade de uma semente germinar sob amplo limite de condições é definida como a manifestação do seu vigor, dependendo, entre outros fatores, das condições ambientais encontradas no local onde foi semeada (SIMONI et al., 2011). Ressalta-se ainda, que o vigor de sementes também seja influenciado pelo genótipo.

Silva Neta (2014), a partir da avaliação fisiológica classificou sementes de seis linhagens de milho em relação à tolerância à baixa temperatura de germinação. As linhagens 44, 54 e 57 foram mais suscetíveis, enquanto que as

linhagens 63, 64 e 91 foram mais tolerantes às baixas temperaturas de germinação.

De acordo com os resultados observados no 14º dia após a semeadura não houve diferença estatística entre os valores de germinação das sementes das linhagens germinadas a 25°C, 30°C, 35°C e 45°C (Tabela 4). Já a 40°C, menores valores de germinação foram observados para as sementes das linhagens 30, 44, 63 e 64. Nesta temperatura a linhagem 91 destacou-se por apresentar o maior valor de germinação. Ressalta-se ainda que na temperatura de 45°C, de modo geral, não houve germinação das sementes.

Tabela 4 Porcentagem de germinação de sementes de seis linhagens de milho submetidas a diferentes temperaturas de germinação aos 14 dias após a instalação do teste

Linhagens	Temperatura – 14 dias				
	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	45°C
30	99 Aa	99 Aa	99 Aa	94 Cb	0 Ac
44	100 Aa	100 Aa	100 Aa	93 Cb	0 Ac
54	100 Aa	100 Aa	99 Aa	97 Bb	0 Ac
63	99 Aa	98 Aa	98 Aa	95 Cb	1 Ac
64	99 Aa	98 Aa	98 Aa	93 Cb	1 Ac
91	100 Aa	100 Aa	100 Aa	99 Aa	0 Ab

Resultados seguidos pela mesma letra minúscula na linha e letra maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

Em relação ao comportamento das sementes das linhagens sob diferentes temperaturas de germinação, as sementes das linhagens 30, 44, 54, 63 e 64 apresentaram maiores valores de germinação quando submetidas às temperaturas de 25°C, 30°C e 35°C, seguida da temperatura de 40°C. Já a linhagem 91 apresentou maiores valores de germinação a 25°C, 30°C, 35°C e 40°C. Foi verificado que a 45°C as sementes das seis linhagens não germinaram.

Em sementes de milho, o embrião é o local de maior sensibilidade às altas temperaturas. Este estresse é responsável pela baixa taxa de síntese de proteínas em embriões. Existem algumas possíveis razões para essa baixa taxa de síntese de proteínas como: a menor taxa de síntese de RNA; maior taxa rotativa de RNA; inibição do processamento de moléculas de RNA ou da sua liberação a partir do núcleo; deficiência de algumas enzimas e outros fatores envolvidos na síntese de polipeptídeos e/ou ainda instabilidade de algumas dessas enzimas ao calor (RILEY, 1981).

Altas temperaturas podem alterar ainda a composição e a função da bicamada lipídica, o que causa um aumento na fluidez da membrana, podendo levar a desintegração dessa bicamada (ALLAKHVERDIEV et al., 2008). Observa-se ainda, que as altas temperaturas podem desencadear a desnaturação de enzimas, podendo ter redução na expressão dessas enzimas nessas condições.

4.2 Análise fisiológica de sementes de milho submetidas ao teste de deterioração controlada

O resumo da análise de variância dos dados de germinação de sementes das linhagens submetidas ou não à deterioração controlada está representado na tabela 2A. Houve interação significativa entre as linhagens e as condições, sementes submetidas ou não à deterioração controlada.

No quarto dia de avaliação menores valores de germinação foram observados em sementes submetidas à deterioração. Nessa condição maiores valores de germinação foram verificados em sementes das linhagens 44 e 63, seguido da linhagem 91 e menores valores observados em sementes da linhagem 64, seguidos dos observados nas linhagens 30 e 54 (Tabela 5).

Já nas sementes não submetidas ao envelhecimento, menor valor de germinação foi observado em sementes da linhagem 44, sendo que para as

demais linhagens não foi observada diferença significativa entre os resultados (Tabela 5).

Tabela 5 Porcentagem de germinação de sementes de seis linhagens de milho submetidas (SDC) e não submetidas (NSDC) ao teste de deterioração controlada, aos 4 dias após a instalação do teste

Linhagens	Temperatura 35°C - 4 dias	
	NSDC	SDC
30	98 Aa	29 Db
44	64 Ba	52 Ab
54	100 Aa	36 Cb
63	99 Aa	54 Ab
64	96 Aa	15 Eb
91	99 Aa	48 Bb

Resultados seguidos pela mesma letra minúscula na linha e letra maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

No 7º dia de avaliação em sementes não submetidas à deterioração controlada não houve diferença significativa entre os valores de germinação de sementes das linhagens avaliadas. Em sementes submetidas à deterioração controlada menores valores de germinação foram observados nas linhagens 63 e 64 e maiores na linhagem 91 (Tabela 6).

Tabela 6 Porcentagem de germinação de sementes de seis linhagens de milho submetidas (SDC) e não submetidas (NSDC) ao teste de deterioração controlada, aos 7 dias após a instalação do teste

Linhagens	Temperatura 35°C - 7 dias	
	NSDC	SDC
30	99 Aa	83 Bb
44	100 Aa	86 Bb
54	99 Aa	83 Bb
63	98 Aa	72 Cb
64	98 Aa	23 Db
91	100 Aa	95 Aa

Resultados seguidos pela mesma letra minúscula na linha e letra maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

Em relação aos resultados de matéria seca e comprimento de parte aérea e sistema radicular (Tabela 3A), houve interação significativa entre as linhagens e as condições, sementes submetidas ou não submetidas à deterioração controlada.

Com relação à matéria seca da parte aérea maiores valores foram observados em plântulas de sementes não submetidas à deterioração. Nessa condição, maior valor de matéria seca de parte aérea foi verificado em plântulas de sementes da linhagem 91, seguido da linhagem 54 e menores valores observados em sementes das linhagens 30, 44, 63 e 64. Já nas sementes submetidas à deterioração, maiores valores de matéria seca foram verificados em plântulas de sementes das linhagens 44 e 91 e menores valores nas demais que não diferenciaram entre si (Tabela 7).

Tabela 7 Matéria seca de parte aérea (MSPA) de plântulas de seis linhagens de milho provenientes de sementes submetidas (SDC) e não submetidas (NSDC) ao teste de deterioração controlada

Linhagens	MSPA	
	NSDC	SDC
30	0,89 Ca	0,04 Bb
44	1,07 Ca	0,29 Ab
54	1,76 Ba	0,08 Bb
63	1,22 Ca	0,04 Bb
64	1,11 Ca	0,01 Bb
91	2,67 Aa	0,36 Ab

Resultados seguidos pela mesma letra minúscula na linha e letra maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

Em relação à matéria seca do sistema radicular (Tabela 8), para as sementes não submetidas à deterioração controlada, maior valor foi observado para a linhagem 91 e menores valores foram observados para as plântulas das

linhagens 30, 44, 54 e 64. Para sementes submetidas à deterioração controlada, maiores valores de matéria seca foram verificados nas plântulas das linhagens 44, 54 e 91, as demais linhagens não diferiram entre si.

Tabela 8 Matéria seca do sistema radicular (MSSR) de plântulas de seis linhagens de milho provenientes de sementes submetidas (SDC) e não submetidas (NSDC) ao teste de deterioração controlada

Linhagens	MSSR	
	NSDC	SDC
30	0,23 Ca	0,06 Bb
44	0,29 Ca	0,39 Aa
54	0,38 Ca	0,26 Aa
63	0,68 Ba	0,14 Bb
64	0,26 Ca	0,01 Bb
91	0,97 Aa	0,34 Ab

Resultados seguidos pela mesma letra minúscula na linha e letra maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

Em relação ao comprimento de parte aérea (Tabela 9), resultados superiores foram verificados para a linhagem 91, tanto em plântulas de sementes submetidas quanto em plântulas de sementes não submetidas à deterioração controlada. Para a linhagem 44 foi observado valor intermediário quando foram utilizadas sementes não submetidas à deterioração controlada. Já para as sementes submetidas à deterioração foi observado menor valor de comprimento de parte aérea em plântulas da linhagem 64.

Tabela 9 Comprimento da parte aérea (CPA) de plântulas de seis linhagens de milho provenientes de sementes submetidas (SDC) e não submetidas (NSDC) ao teste de deterioração controlada

Linhagens	CPA	
	NSDC	SDC
30	10,41 Ca	1,30 Cb
44	17,08 Ba	4,12 Bb
54	11,55 Ca	3,10 Bb
63	12,53 Ca	0,78 Cb
64	13,48 Ca	0,14 Db
91	20,59 Aa	7,25 Ab

Resultados seguidos pela mesma letra minúscula na linha e letra maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

Em sementes não submetidas à deterioração controlada foi observado maior valor de comprimento do sistema radicular nas plântulas da linhagem 91 e menor valor nas plântulas da linhagem 44 (tabela 10). Já nas sementes submetidas à deterioração controlada foi observado maior valor de comprimento do sistema radicular nas plântulas da linhagem 44, seguido das linhagens 54 e 91.

Tabela 10 Comprimento do sistema radicular (CSR) de plântulas de seis linhagens de milho provenientes de sementes submetidas (SDC) e não submetidas (NSDC) ao teste de deterioração controlada

Linhagens	CSR	
	NSDC	SDC
30	7,50 Ba	0,83 Cb
44	5,30 Ca	4,50 Aa
54	8,94 Ba	1,50 Bb
63	8,55 Ba	0,61 Cb
64	9,35 Ba	0,45 Cb
91	20,59 Aa	1,89 Bb

Resultados seguidos pela mesma letra minúscula na linha e letra maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

Foram observados menores valores de comprimento de parte aérea e do sistema radicular quando foram utilizadas sementes submetidas à deterioração controlada.

Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991) verificaram que o envelhecimento acelerado em sementes de milho leva a perda de integridade das membranas. Os radicais livres, os quais são produzidos como resultado da peroxidação de lipídeos no envelhecimento reagem com os lipídeos das membranas celulares, destruindo a estrutura dessas e também as reservas das sementes, resultando na redução da qualidade das sementes.

Neste trabalho ficou caracterizado o efeito da temperatura no desenvolvimento das plântulas. Assim, a avaliação do desenvolvimento da plântula é importante, pois é uma característica que pode auxiliar na seleção de materiais em programas de melhoramento. Importante ressaltar os resultados observados em sementes submetidas à deterioração controlada ou não em relação aos genótipos avaliados.

Para a maioria dos parâmetros avaliados foram observados os maiores valores de germinação e vigor em sementes e plântulas da linhagem 91. No entanto, em alguns genótipos, a exemplo das linhagens 44 e 64, houve comportamento diferenciado, em relação aos parâmetros avaliados, principalmente quando as sementes foram submetidas à deterioração controlada. Maiores valores de germinação aos 4 dias (Tabela 5), de matéria seca da parte aérea (Tabela 7), de matéria seca do sistema radicular (Tabela 8), comprimento do sistema radicular (Tabela 10) foram observados em sementes e plântulas da linhagem 44, quando as sementes foram submetidas à deterioração controlada. Já para as sementes e plântulas da linhagem 64, menores valores de germinação aos 4 dias (Tabela 5), aos 7 dias (Tabela 6), de matéria seca de parte aérea (Tabela 7), de matéria seca do sistema radicular (Tabela 8), comprimento de

parte aérea (Tabela 9) e comprimento do sistema radicular (Tabela 10) foram observados quando as sementes foram deterioradas.

Ao comparar os resultados observados para esses mesmos parâmetros da linhagem 44, em sementes não submetidas à deterioração controlada, verifica-se menor tolerância a condições impostas. Já ao comparar os resultados de germinação observados em sementes não submetidas à deterioração controlada da linhagem 64, verifica-se maior tolerância. A partir desses resultados infere-se que as condições de estresse nas quais as sementes são expostas podem induzir a expressão de genes que não são expressos sob condições mais favoráveis para a germinação e crescimento de plântulas, em relação à linhagem 44. Os resultados em referência foram obtidos a partir de sementes submetidas à deterioração controlada e à subsequente germinação a 35°C. No entanto, quando as sementes da linhagem 44 foram submetidas à germinação a 40°C, menores valores de germinação aos 7 dias (Tabela 3), 14 dias (Tabela 4) foram observados para esta linhagem. Nesta mesma linhagem, em sementes não submetidas à deterioração controlada e germinadas a 35°C, menor tolerância a estas condições foi observada para a linhagem 44, principalmente quando comparada aos resultados observados para a linhagem 91, tabelas 5, 7, 8, 9 e 10.

Para os estudos de tolerância ao calor é importante a associação dos resultados fisiológicos com os observados a partir de análises de transcritos e de proteínas associados a essa característica.

4.3 Análise proteômica

Nas figuras 1, 2, 3 e 4, encontram-se os zimogramas referentes à expressão das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), esterase (EST) e α -amilase (α -A), em sementes das seis linhagens avaliadas submetidas ou não ao teste de deterioração controlada.

Houve aumento da expressão da SOD em sementes de todas as linhagens avaliadas, submetidas à deterioração controlada (Figura 1). A maior expressão pode ser observada pela intensidade de banda de menor peso molecular ou maior mobilidade indicada pelo número 1. Em sementes das linhagens 30 e 44 houve maior expressão dessa enzima em sementes submetidas à deterioração controlada, a qual pode ser observada pela maior intensidade das bandas como 1 e 2.

A enzima superóxido dismutase (SOD) é considerada como a primeira no processo de defesa antioxidante e atua anulando a ação dos superóxidos, catalisando sua conversão a peróxido de hidrogênio.

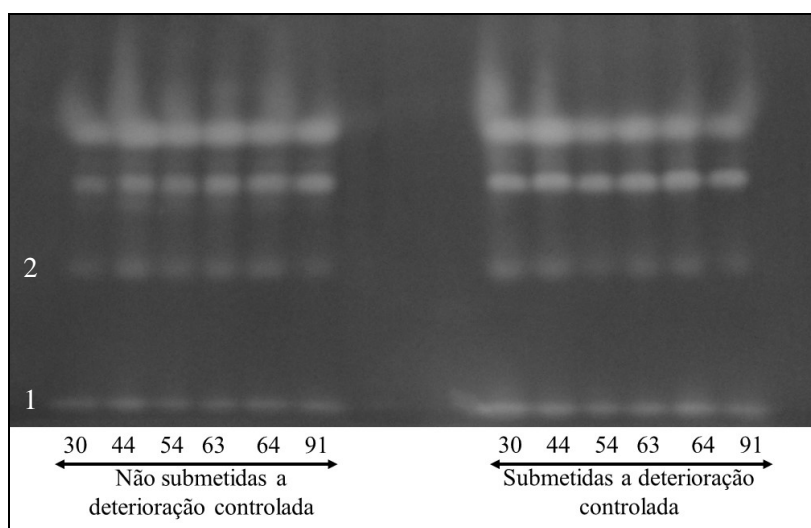


Figura 1 Atividade da enzima SOD em sementes de diferentes linhagens de milho submetidas ou não à deterioração controlada

Em outros estudos também tem sido observada a maior expressão dessa enzima, quando as sementes são submetidas a condições de estresse. Silva Neta (2014), estudando a tolerância à baixa temperatura durante a germinação de

sementes em seis linhagens de milho, verificou que para a linhagem 63, tolerante às baixas temperaturas, houve mudança na expressão da SOD em sementes embebidas por 24h a 25 °C e na maioria das linhagens a expressão da SOD foi maior em sementes embebidas por 48h a 25 °C.

Abreu et al. (2014), estudando tolerância à seca em sementes de cinco linhagens de milho observaram alta atividade da enzima SOD no potencial hídrico controle (0MPa). À medida que foi reduzindo esse potencial hídrico, uma redução na intensidade das bandas foi observado para as linhagens 63, 54 e 64, o que não ocorreu nas linhagens 91 e 44. Maior vigor das sementes das linhagens 91 e 44 foi observado sob condições de restrição hídrica. Nessas sementes ocorreu maior expressão de enzimas do sistema antioxidante. Em plantas sob estresse hídrico observou-se um aumento na atividade dessa enzima relacionada ao aumento na tolerância à seca (ZHU, 2002).

Houve variação da expressão da enzima catalase em sementes das linhagens quando as mesmas foram submetidas à deterioração controlada. Houve aumento da expressão desta em sementes das linhagens 30, 44 e 91 e redução em sementes das linhagens 54 e 63. As variações da expressão podem ser observadas pela intensidade e expansão das bandas no zimograma. Em sementes das linhagens 30 e 44 o aumento da expressão pode ser explicado em função da maior expressão da enzima SOD, nas mesmas condições de tratamento (Figura 2).

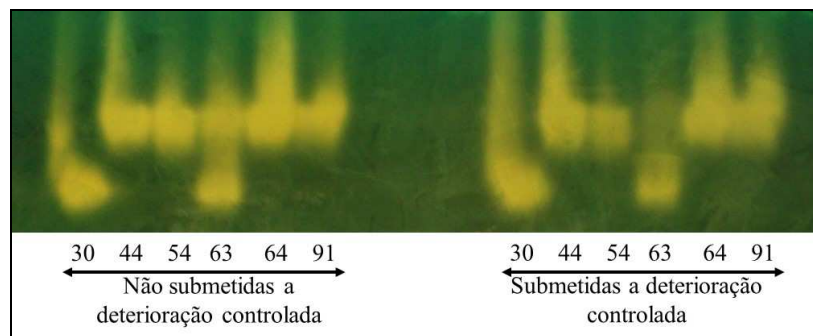


Figura 2 Atividade da enzima CAT em sementes de diferentes linhagens de milho submetidas ou não à deterioração controlada

Após a expressão da SOD ocorre a formação de peróxido de hidrogênio, e uma segunda enzima, a CAT se expressa para atuar na proteção das sementes, uma vez que transforma o peróxido em oxigênio e água (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2004).

A catalase é uma enzima antioxidante que catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em água, protegendo as células da oxidação causada por radicais livres. Sendo assim, a redução na atividade dessa enzima, poderá resultar na diminuição da prevenção de danos oxidativos.

Na figura 3 encontra-se o zimograma da enzima esterase observado em sementes das linhagens de milho estudadas, submetidas ou não à deterioração controlada. Pelo zimograma infere-se a expressão em dois locos. Houve variação da expressão nos dois locos em sementes submetidas ou não à deterioração controlada. Em relação ao primeiro loco houve aumento da expressão em sementes das linhagens 30, 44, 54, 64 e 91 submetidas à deterioração controlada. Já no segundo loco, em sementes submetidas à deterioração houve menor expressão da enzima esterase. Observa-se que nas sementes deterioradas não foram observadas algumas isoformas presentes em sementes não deterioradas.

Com exceção da linhagem 54, nas sementes das demais linhagens a menor expressão da enzima no segundo loco é visível.

A esterase é uma enzima degradativa que está envolvida em reações de hidrólise de ésteres e está diretamente ligada ao metabolismo dos lipídios, como os fosfolipídios de membrana. Sendo a peroxidação de lipídeos um evento associado a danos de membrana das sementes (BASAVARAJAPPA; SHETTY; PRAKASH, 1991), alterações nos padrões dessa enzima podem estar associadas à ocorrência de eventos deteriorativos, e da qualidade fisiológica de sementes. Assim, a expressão da enzima não parece estar mais associada à deterioração de sementes e redução da qualidade fisiológica.

Em sementes não submetidas à deterioração controlada, considerando ambos os locos, maior expressão da enzima esterase foi observada em sementes da linhagem 64 e menor nas da linhagem 91.

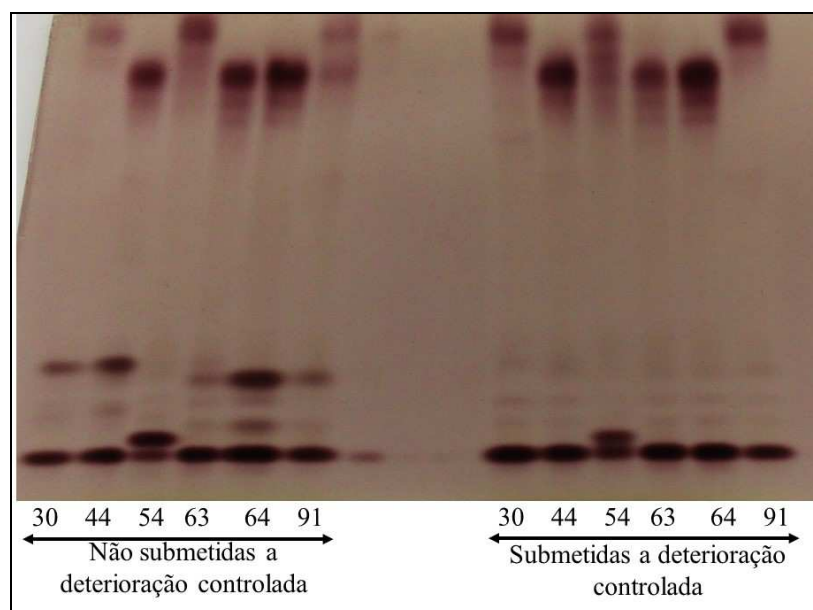


Figura 3 Atividade da enzima EST em sementes de diferentes linhagens de milho submetidas ou não à deterioração controlada

A EST atua em ésteres de membrana, e a menor expressão dessa enzima em sementes da linhagem 91 não submetidas à deterioração controlada pode estar associada à alta qualidade fisiológica das sementes, quando submetidas à condição de estresse.

Padilha et al. (2001) avaliaram a expressão da enzima EST em sementes de milho híbrido submetidas ao teste de deterioração controlada por diferentes tempos de embebição e teor de água das sementes. Verificaram alterações nos padrões dessa enzima com o desaparecimento de isoformas.

Quanto à expressão da enzima α -amilase em sementes das linhagens avaliadas observa-se variações nos padrões em sementes deterioradas para alguns genótipos (Figura 4). Houve redução da expressão em sementes deterioradas das linhagens 63 e 64 e aumento da expressão dessa em sementes da linhagem 91, quando comparada com a observada em sementes não deterioradas. Em sementes deterioradas da linhagem 91 observa-se duas isoformas adicionais (a e b) com menores pesos moleculares. Embora tenha ocorrido a expressão dessas isoformas, menor expressão da enzima α -amilase em sementes deterioradas ocorreu em sementes da linhagem 91 e maior expressão em sementes da linhagem 30.

Segundo Franco et al. (2002), a enzima α -amilase ao promover a hidrólise do amido disponibiliza os carboidratos necessários ao desenvolvimento do embrião, possibilitando assim o processo germinativo da semente de milho. Porém, Oliveira et al. (2013) ressaltam que além dos genes das amilases, vários outros genes podem estar envolvidos no controle do caráter: qualidade fisiológica de sementes, como exemplo, os genes relacionados diretamente com a respiração. Nesta pesquisa também não foi observada relação entre a expressão da α -amilase e a qualidade fisiológica das sementes das linhagens de milho avaliadas.

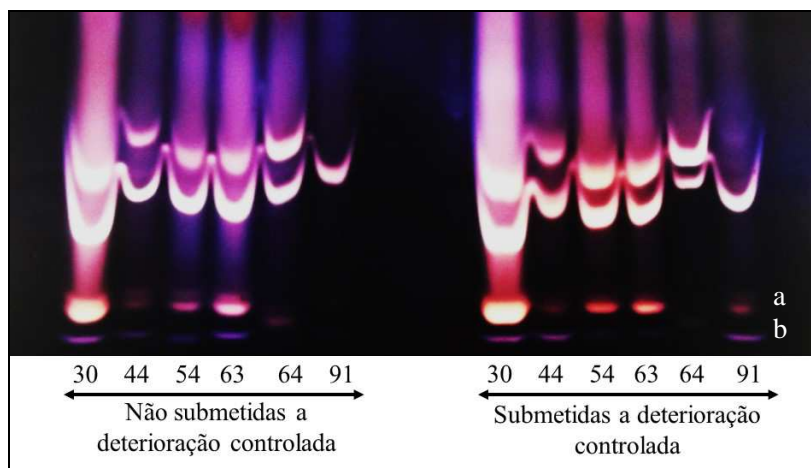


Figura 4 Atividade da enzima α -A em sementes de diferentes linhagens de milho submetidas ou não à deterioração controlada

Na Figura 5 está representado o zimograma da expressão de proteínas resistentes ao calor.

Em geral, menor expressão de proteínas resistentes ao calor foi observada em sementes de linhagens submetidas à deterioração controlada.

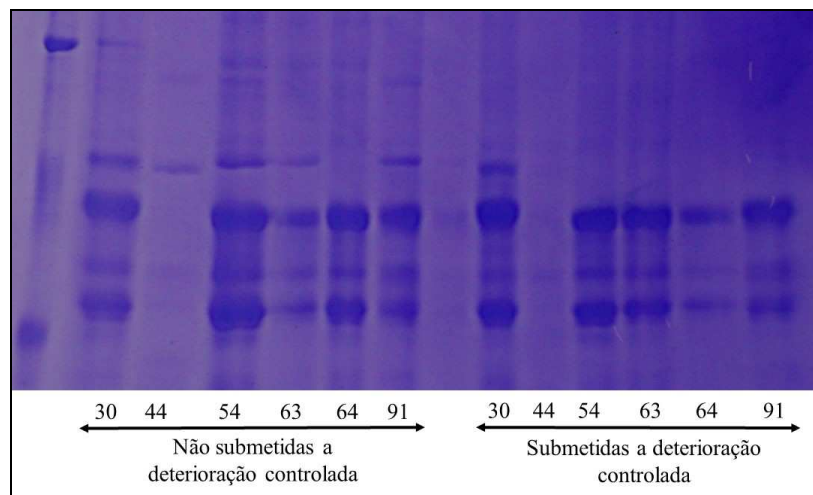


Figura 5 Atividade da proteína resistente ao calor em sementes de diferentes linhagens de milho submetidas ou não à deterioração controlada.

Independentemente das sementes serem submetidas ou não à deterioração controlada, nas sementes da linhagem 44 foi observada menor expressão de proteínas resistentes ao calor. Nessas sementes não deterioradas foram observados os menores valores de germinação e vigor. Em sementes não deterioradas maior expressão dessas proteínas foi observada em sementes das linhagens 30 e 54.

Andrade et al. (2013), trabalhando com diferentes linhagens de sementes de milho, verificaram que a expressão de proteínas resistentes ao calor, detectada por meio da técnica de eletroforese inicia-se em estádios de desenvolvimento iniciais (LL 3) em linhagens tolerantes às altas temperaturas de secagem, quando comparadas a linhagens não tolerantes às altas temperaturas de secagem.

4.4 Análise transcriptômica

A análise da expressão de transcritos foi realizada em sementes das seis linhagens submetidas e não submetidas à deterioração controlada.

No gráfico 1 está representada a expressão relativa do gene *late embryogenesis abundant protein D-34* (Lea D-34). Pode-se observar que a expressão desse gene foi maior em sementes submetidas à deterioração controlada, sendo os maiores valores de expressão em sementes das linhagens 64, 63 e 30 com maior expressão em sementes da linhagem 64. Observa-se aumento significativo da expressão do gene nas sementes submetidas à deterioração controlada em sementes de todas as linhagens avaliadas. Tanto em sementes não deterioradas quanto nas deterioradas a menor expressão do gene Lea D34 foi observada em sementes da linhagem 44, classificada como de baixa tolerância à temperatura de 40°C durante o processo de germinação.

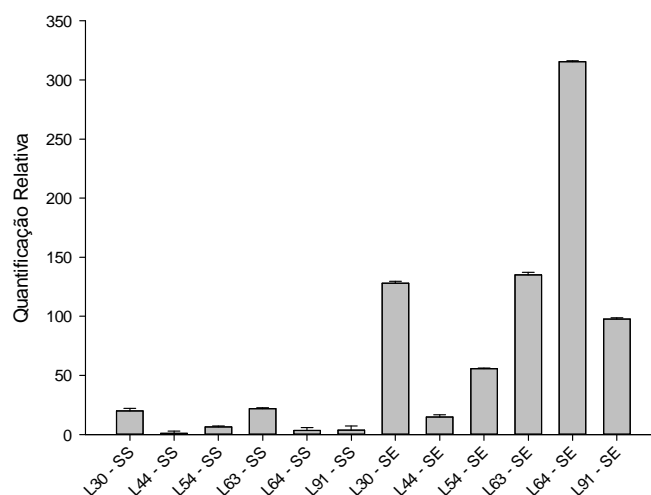


Gráfico 1 Expressão do gene LEA D-34 em relação às sementes das seis linhagens submetidas (SE) e não submetidas (SS) à deterioração controlada

Nos resultados da expressão gênica de proteínas resistentes ao calor, avaliada pela técnica de eletroforese, foi observada maior expressão em sementes não submetidas à deterioração controlada. No entanto, ressalta-se que pela técnica de qRT-PCR foram avaliados e quantificados apenas dois genes e que pelas técnicas de eletroforese e espectrofotometria analisa-se a expressão de mais genes que codificam para proteínas resistentes ao calor.

No gráfico 2 está representada a expressão relativa do gene *late embryogenesis abundant protein* (LEA). Observou-se a maior expressão do gene nas sementes submetidas à deterioração controlada com exceção da observada em sementes da linhagem 44. Nessas sementes a expressão do gene LEA foi baixa independentemente das sementes terem sido ou não submetidas à deterioração controlada. Esse mesmo comportamento foi observado para o gene *Lea D34* (Gráfico 1). Tanto nas sementes não submetidas quanto nas sementes submetidas à deterioração, observou-se maior expressão do gene na linhagem 63.

Os maiores aumentos nos valores de expressão do gene LEA em sementes deterioradas, comparados aos observados em sementes não deterioradas foram observados em sementes das linhagens 63 e 64 respectivamente.

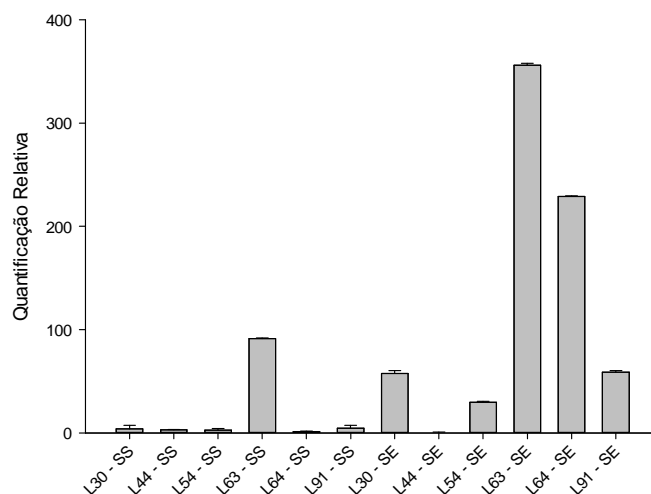


Gráfico 2 Expressão do gene LEA em relação às sementes das seis linhagens submetidas (SE) e não submetidas (SS) à deterioração controlada

No gráfico 3 está representada a expressão relativa do gene ZmAN-13. Em sementes não submetidas à deterioração controlada observou-se maior expressão desse gene nas sementes da linhagem 64, seguido da linhagem 91. Em sementes submetidas à deterioração a maior expressão foi observada também em sementes da linhagem 64, seguido das linhagens 63 e 91. No entanto, deve ser ressaltado que o maior aumento da expressão desse gene quando as sementes foram deterioradas ocorreu para a linhagem 63. Já em sementes da linhagem 91 a expressão foi reduzida em sementes envelhecidas. Essas mudanças de expressão não foram significativas em sementes das linhagens 44 e 54.

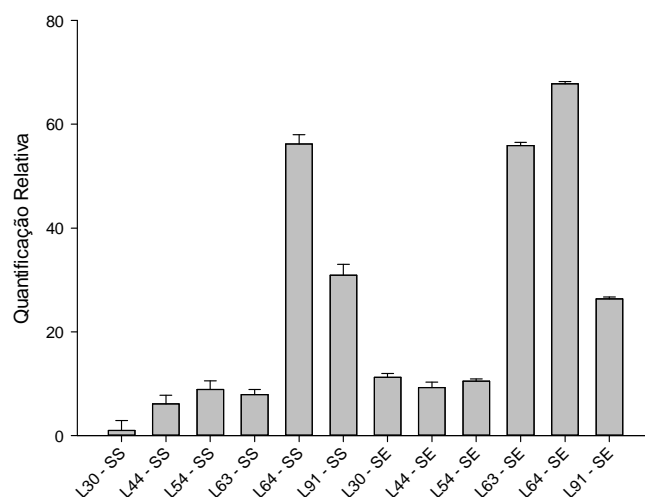


Gráfico 3 Expressão do gene ZmAN13 em relação às sementes das seis linhagens submetidas (SE) e não submetidas (SS) à deterioração controlada

O gene Zm-AN13 pertence à família ZnF-AN1. De acordo com Jin et al. (2007) e Xuan (2011), os genes dessa família presentes no genoma do milho mostraram expressão para um ou múltiplos estresses abióticos, como o estresse causado por temperatura.

No gráfico 4 está representada a expressão relativa do gene ZmDBP2. Houve variação da expressão do gene em função da linhagem e da condição de deterioração. Nas sementes não submetidas à deterioração controlada observou-se uma maior expressão desse gene na linhagem 91. No entanto, quando essas sementes foram envelhecidas houve redução significativa da expressão do gene. Essa redução também foi observada em sementes das linhagens 30 e 54.

Já nas sementes deterioradas ocorreu uma maior expressão na linhagem 44, seguido das linhagens 63 e 91, sendo que o maior aumento da expressão do gene em sementes deterioradas ocorreu em sementes da linhagem 44.

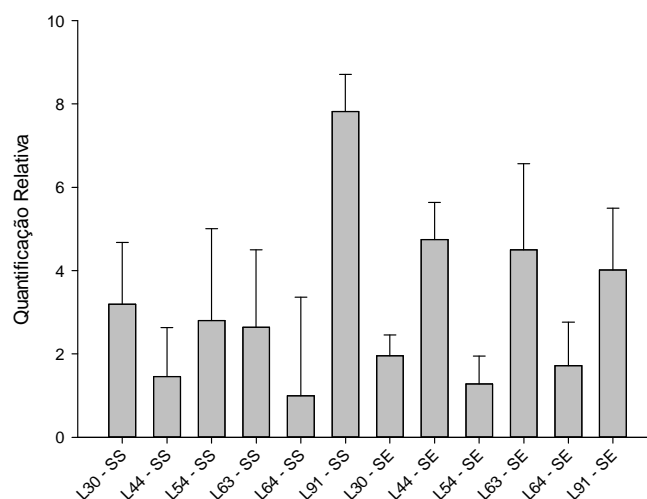


Gráfico 4 Expressão do gene ZmDBP2 em relação às sementes das seis linhagens submetidas (SE) e não submetidas (SS) à deterioração controlada

A transcrição do gene ZmDBP2 é ativada pela tolerância térmica de alta temperatura e pelo estresse salino. A superexpressão de ZmDBP2 conferiu tolerância térmica às altas temperaturas em plantas transgênicas de *Arabidopsis* (WANG; YANG; WANG, 2011). Segundo este mesmo autor, proteínas de elemento de ligação que respondem à desidratação (DREBs) desempenham funções reguladoras vitais em resposta ao estresse abiótico em plantas. A transcrição do gene ZmDBP2 é altamente induzida por altas temperaturas e/ou pela seca e moderadamente induzida por sal e ácido abscísico exógeno (WANG; YANG; WANG, 2011).

No gráfico 5 está representada a expressão relativa do gene oxidase alternativa 1 (AOX1).

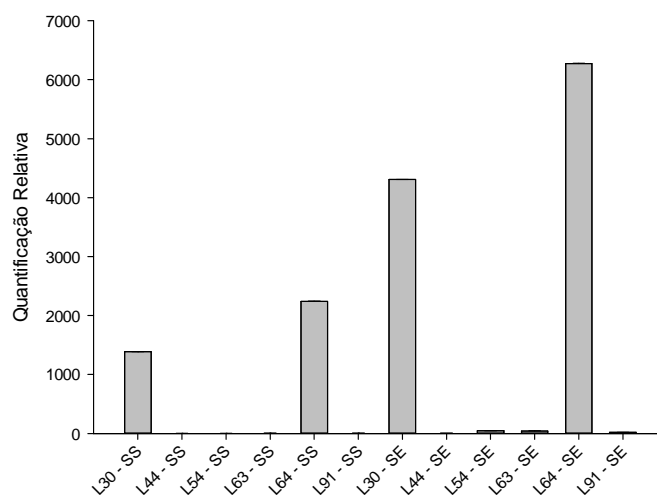


Gráfico 5 Expressão do gene AOX-1 em relação às sementes das seis linhagens submetidas (SE) e não submetidas (SS) à deterioração controlada

Pode-se observar que esse gene foi expresso em sementes submetidas ou não à deterioração controlada das linhagens 30 e 64, com maior expressão em sementes da linhagem 64. Para essa mesma linhagem, em relação aos dados fisiológicos, quando as sementes foram submetidas à deterioração controlada, observou-se menores valores de germinação. Assim, infere-se que a tolerância a altas temperaturas está inerente ao genótipo.

A AOX tem sido sugerida como importante marcador funcional para a seleção de plantas resistentes aos estresses abióticos. Isso se deve ao fato de que, quando as plantas são submetidas a condições abióticas adversas um gene específico da oxidase alternativa é altamente induzido.

Condições que causam estresse oxidativo, como os estresses abióticos, induzem a atividade da oxidase alternativa (AOX), sugerindo que essa enzima pode funcionar como um mecanismo para diminuir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), produzidas como resultado da atividade respiratória diminuída ou restrita (MOORE et al., 2002).

No gráfico 6 está representada a expressão relativa do gene oxidase alternativa 2 (AOX2).

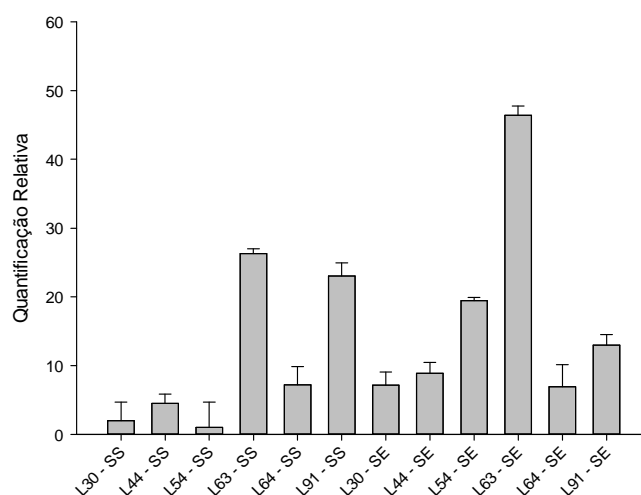


Gráfico 6 Expressão do gene AOX-2 em relação às sementes das seis linhagens submetidas (SE) e não submetidas (SS) à deterioração controlada

Em sementes deterioradas houve aumento da expressão deste gene em sementes das linhagens 30, 44, 54 e 63 e redução da expressão em sementes da linhagem 91.

A maior expressão do gene foi observada na linhagem 63, tanto de sementes não submetidas quanto em sementes deterioradas. Também nessas

sementes houve o maior aumento da expressão em sementes deterioradas seguido do aumento da expressão em sementes deterioradas da linhagem 54.

A confiabilidade dos resultados se deve a utilização de um gene endógeno, o qual apresenta o mesmo nível de expressão, independentemente do tratamento a que a amostra foi submetida, neste trabalho os genes endógenos utilizados foram Ubiquitina e ADH.

4.5 Considerações gerais

As alterações observadas nas análises fisiológicas de transcriptômica e proteômica, quando as sementes das seis linhagens de milho foram submetidas à alta temperatura de germinação e à condição de deterioração controlada, reforçam a complexidade da característica de tolerância ao calor.

A partir dos resultados desta pesquisa infere-se que as condições de estresse nas quais as sementes são expostas podem induzir a expressão de genes que não são expressos em condições favoráveis para a germinação e desenvolvimento de plântulas.

Diante disso existe a necessidade de prosseguir com os estudos, no sentido de elucidar mecanismos que auxiliem em programas de melhoramento para produção de genótipos tolerantes às altas temperaturas durante a germinação de sementes e emergência de plântulas, como o estudo do controle genético dos genes trabalhados nesta pesquisa.

A expressão de genes que torna possível a separação de linhagens com alta e baixa tolerância a altas temperaturas de germinação, como os genes estudados neste trabalho, pode auxiliar na obtenção de linhagens de milho tolerantes ao calor, a exemplo dos genes relacionados às proteínas tolerantes ao calor.

5 CONCLUSÕES

As linhagens 54 e 91 são mais tolerantes à condição de altas temperaturas.

Ocorre maior expressão da enzima α -amilase em sementes de milho submetidas à deterioração controlada para as linhagens 30 e 91.

Com a deterioração controlada a maior expressão dos genes não se relaciona de maneira positiva com os materiais tolerantes.

Ocorre associação da menor expressão dos genes envolvidos nos sistemas de proteínas resistentes ao calor com a linhagem 44, sendo essa mais suscetível a altas temperaturas.

Ocorre maior expressão dos genes Lea D34, ZmAN13 e AOX 1 na linhagem 64, quando as sementes foram submetidas à deterioração controlada.

REFERÊNCIAS

- ABREU, V. A. et al. Physiological performance and expression of isozymes in maize seeds subjected to water stress. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, p. 40, 2014.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa, MG: UFV, 2006. 574 p.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 627 p.
- ALKA, S.; KHANNA-CHOPRA, R. Influence of temperature on germination and seedling growth and its relationship with amylase activity and respiration in wheat varieties differing in temperature tolerance. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 33, p. 775-779, 1995.
- ALLAKHVERDIEV, S. I. et al. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 98, p. 541-550, 2008.
- 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**, Ribeirão Preto, v. 12, p. 3630-3642, 2013.
- BAKER, J.; STEELE, C.; DURE, L. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 11, p. 277-291, 1988.
- BALLAUX, J. C. Temperature and seedling emergence. In: **PHYSIOLOGY PROGRAM FORMULATION WORKSHOP**, 1., 1975, Ibadã. **Proceedings...** Ibadã: International Institute of Tropical Agriculture, 1975. p. 91- 94.
- BASAVARAJAPPA, B. S.; SHETTY, H. S.; PRAKASH, H. S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated aging of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 19, n. 2, p. 279-286, 1991.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. New York: Plenum, 1985. 367 p.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. 2.ed. New York: Plenum, 1994. 445p.

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

BLUM, A.; SINMENA, B. Wheat seed endosperm utilization under heat stress and its relation to thermotolerance in the autotrophic plant. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 37, n. 3, p. 185-191, 1994.

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

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

BRUCKERIDGE, M. S. et al. Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Ed.). **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artimed, 2004. p.163-185.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry e molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2005. 1367 p.

BUCKLE, J. A.; GRANT, P. M. Effects of soil temperature on plumule growth and seedling emergence of maize (*Zea mays* L.). **Rhodesian Journal of Agricultural Research**, Salisbury, v. 12, p. 149–161, 1974.

CAMEJO, D. et al. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 162, p. 281–289, 2005.

CARGNIN, A. et al. Tolerância ao estresse de calor em genótipos de trigo na fase de germinação de trigo na fase de germinação. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 2, p. 245-251, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Grãos**: safra 2012/2013. Sexto levantamento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_03_07_10_39_19_levantamento_safras_graos_6.pdf>. Acesso em: 22 jan. 2014.

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

DELOUCHE, J. C. O problema nem sempre é a qualidade das sementes. **Seed News**, Pelotas, v. 8, p. 42, 2004.

EHLERS, J. D.; HALL, A. E. Heat tolerance of contrasting cowpea lines in short and long days. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 55, p. 11–21, 1998.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows® versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programas e Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

FERREIRA, E. N. et al. Evaluation of quantitative RT-PCR using nonamplified and amplified RNA. **Diagnostic Molecular Pathology**, New York, v. 19, n. 1, p. 45-53, Mar. 2010.

FINCHER, G. B. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, n. 1, p. 305-346, 1989.

FRANCO, O. L. et al. Plant -amylase inhibitors and their interaction with insect a-amylases. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 269, p. 397-412, 2002.

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

GALAU, G. A.; JAKOBSEN, K. S.; HUGHES, D. W. The controls of late dicot embryogenesis and early germination. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 81, p. 280-288, 1991.

GIAVENO, C.; FERRERO, J. Introduction of tropical maize genotypes to increase silage production in the central area of Santa Fe, Argentina. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 3, p. 89–94, 2003.

GUILIONI, L.; WERY, J.; TARDIEU, F. Heat stress-induced abortion of buds and flowers in pea: is sensitivity linked to organ age or to relations between reproductive organs? **Annals of Botany**, London, v. 80, p. 159–168, 1997.

HAMPTON, J. G.; JOHNSTONE, K. A.; EUA-UMPON, V. Ageing vigour tests for mungbean and reach beand seed lots. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 20, n. 3, p. 643-653, 1992.

IBA, K. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 53, p. 225–245, 2002.

ISMAIL, A. M.; HALL, A. E. Reproductive-stage heat tolerance, leaf membrane thermostability and plant morphology in cowpea. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 1762–1768, 1999.

JIN, Y. et al. Phylogenetic and expression analysis of ZnF-AN1 genes in plants. **Genomics**, San Diego, v. 90, p. 265–275, 2007.

KARPOVA, O. V. et al. Differential expression of Alternative Oxidase Genes in maize mitochondrial mutants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 3271–3284, Dec. 2002.

KEUNEN, E. et al. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 36, p. 1242–1255, 2013.

KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: M. Dekker, 1995. 853 p.

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

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

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MANFRE, A. J. et al. Seed dehydration and the establishment of desiccation tolerance during seed maturation is altered in the arabidopsis thaliana mutant atem6-1. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 50, n. 2, p. 243-253, Feb. 2009.

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

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. 4th ed. Oxford: Pergamon , 1989. 270 p.

MILLER, G.; SHULAEV, V.; MITTLER, R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 133, p. 481–489, 2008.

MOORE, A. L. et al. Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 11, p. 478-481, Nov. 2002.

NERSON, H. Seed production and germinability of cucurbit crops. **Seed Science Biotechnology**, Takamatsu, v. 1, p. 1-10, 2007.

OLIVEIRA, G. E. et al. Physiological quality and amylase enzyme expression in maize seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, p. 40-48, 2013.

PADILHA, L. et al. Relação entre o teste de deterioração controlada e o desempenho de sementes de milho em diferentes condições de estresse. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 198-204, 2001.

PEET, M. M.; WILLITS, D. H. The effect of night temperature on greenhouse grown tomato yields in warm climate. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 92, p. 191–202, 1998.

PEREIRA, R. S.; NASCIMENTO, W. M.; VIEIRA, J. V. Germinação e vigor de sementes de cenoura sob condições de altas temperaturas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 215-219, 2007.

QUEITSCH, C. et al. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 479-492, 2000.

RAISON, J. K.; ROBERTS, J. K. M.; BERRY, J. A. Correlations between thermal stability of chloroplast (thylakoid) membranes and the composition and fluidity of their polar lipids upon acclimation of the higher plant *Nerium oleander*, to growth temperature. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 688, p. 218-228, 1982.

RILEY, G. J. P. Effects of high temperature on the germination of maize (*Zea mays* L.). **Planta**, Berlin, v. 151, p. 68-74, 1981.

SCHÖFFL, F.; PRANDL, R.; REINDL, A. Molecular responses to heat stress. In: SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (Ed.). **Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants**. Austin: R. G. Landes Company, 1999. p. 81–98.

SILVA NETA, I. C. **Expressão de genes relacionados à tolerância à baixa temperatura de germinação em sementes de milho.** 2014. 61 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

SIMONI, F. et al. Sementes de *Sorghum bicolor* L. – Gramineae, submetidas ao estresse hídrico simulado com PEG (6000). **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, Campina grande, v. 11, p. 188-192, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

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

VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination.** New York: M. Dekker, 1995. p. 237-271.

VOLLENWEIDER, P.; GUNTARDT-GOERG, M. S. Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage. **Environmental Pollution**, Philadelphia, 137, 455–465, 2005.

WANG, C. T.; YANG, Q. Q.; WANG, C. T. Isolation and functional characterization of ZmDBP2 encoding a dehydration-responsive element-binding protein in *Zea mays*. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 29, p. 60-68, 2011.

WANG, Y. R.; HAMPTON, J. G.; HILL, M. J. Red clover vigour testing - Effect of three test variables. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 22, n. 1, p. 99-105, 1991.

XUAN, N. et al. A putative maize zinc-finger protein gene, ZmAN13, participates in abiotic stress response. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 107, p. 101–112, 2011.

ZHAO, T. Y. et al. Expression of the maize GALACTINOL SYNTHASE gene family: (I) Expression of two different genes during seed development and germination. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 121, p. 634–646, 2004.

ZHAO, T. Y.; MEELEY, R. B.; DOWNIE, B. Aberrant processing of a Maize GALACTINOL SYNTHASE transcript is caused by heat stress. **Plant Science**, Oxford, v. 165, p. 245-256, 2003.

ZHOU, M. L.; TANG, Y. X.; WU, Y. M. Genome: wide analysis of AP2/ERF transcription factor family in Zea Mays. **Current Bioinformatics**, Roma, v. 7, p. 324-332, 2012.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 247-273, 2002.

ANEXOS

Tabela 1A Resumo da análise de variância dos dados obtidos para porcentagem de germinação de seis linhagens de milho submetidas a cinco diferentes temperaturas de germinação

Fatores ¹	GL	QM		
		4° dia	7° dia	14° dia
Lin.	5	280,63*	19,20*	5,65*
Temp.	4	64095,28*	45650,72*	46256,28*
Lin.*temp.	20	165,28*	24,66*	5,20*
Erro	90	3,17	9,73	2,43
CV (%)		3,15	4,01	1,98
Média		56,57*	77,82*	78,72*

¹Temp.: Temperatura; Lin.: Linhagem; Temp.*Lin.: Temperatura*Linhagem; CV: coeficiente de variação; Média: Média Geral.*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 2A Resumo da análise de variância dos dados obtidos para porcentagem de germinação de sementes de seis linhagens submetidas ou não à deterioração controlada

Fatores ¹	GL	QM	
		4° dia	7° dia
Lin.	5	558,52*	1350,44*
Cond.	1	34243,52*	7777,52*
Lin.*Cond.	5	1150,32*	1302,37*
Erro	36	5,11	24,23
CV (%)		3,44	5,69
Média		65,85*	86,44*

¹Cond.: Condição; Lin.: Linhagem; Lin*Cond.: Linhagem*Condição; CV: coeficiente de variação; Média: Média Geral.*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 3 A Resumo da análise de variância dos dados obtidos para matéria seca de sementes de seis linhagens submetidas ou não à deterioração controlada

Fatores ¹	GL	QM			
		MSPA	MSSR	CPA	CSR
Lin.	5	0,17*	0,08*	2,61*	1,35*
Cond.	1	4,06*	0,24*	54,68*	38,40*
Lin.*Cond.	5	0,07*	0,04*	0,50*	1,78*
Erro	36	0,01	0,00	0,05	0,05
CV (%)		9,5	6,87	7,99	10,21
Média		1,09*	0,90*	2,74*	2,27*

¹Cond.: Condição; Lin.: Linhagem; Lin*Cond.: Linhagem*Condição; CV: coeficiente de variação; Média: Média Geral.*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.